

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, QUÍMICA E CONSERVAÇÃO  
*IN VITRO* DE *Pfaffia glomerata* (SPRENGEL) PEDERSEN**

**ROSA DE BELEM DAS NEVES ALVES**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências  
Agronômicas da Unesp - Campus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Doutor em Agronomia (Horticultura)

BOTUCATU - SP  
Junho - 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, QUÍMICA E CONSERVAÇÃO  
*IN VITRO* DE *Pfaffia glomerata* (SPRENGEL) PEDERSEN**

**ROSA DE BELEM DAS NEVES ALVES**

**Orientadora: Profa Dra. Ana Maria Soares Pereira**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências  
Agronômicas da Unesp - Campus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Doutor em Agronomia (Horticultura)

BOTUCATU – SP  
Junho – 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

A474c      Alves, Rosa de Belem das Neves, 1958-  
            Caracterização morfológica, química e conservação *in vitro* de *Pfaffia glomerata*(Sprengel)Pedersen / Rosa de Belem das Neves Alves. - Botucatu : [s.n.], 2008.  
            xv, 112 f. : il. color., gráfs., tabs.

            Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2008  
            Orientador: Ana Maria Soares Pereira  
            Inclui bibliografia

1. Ginseng. 2. Germoplasma vegetal. 3. Amarantacea. 4. Ecdisona. 5. Plantas medicinais. I. Pereira, Ana Maria Soares. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU  
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, QUÍMICA E CONSERVAÇÃO  
IN VITRO DE *Pfaffia glomerata* (SPRENGEL) PEDERSEN"

ALUNO: ROSA DE BELEM DAS NEVES ALVES

ORIENTADOR: PROFª. DRª. ANA MARIA SOARES PEREIRA

Aprovado pela Comissão Examinadora

  
PROFª DRª ANA MARIA SOARES PEREIRA

  
PROFª DRª GIUSEPPINA PACÉ PEREIRA LIMA

  
DRª MÁRCIA ORTIZ MAYO MARQUES

  
PROF. DR. ROBERTO FONTES VIEIRA

  
PROFª DRª SUZELEI DE CASTRO FRANÇA

Data da Realização: 24 de junho de 2008.

***Dedico***

*Aos meus pais Raimunda e Rosendo,  
pelo exemplo de coragem e dignidade  
e, sobretudo, pelo apoio e amor  
incondicional.*

***In memoriam***

*À profa. Dra. Linda Styer Caldas,  
minha primeira orientadora, pela  
pessoa especial e amiga,  
profissional exemplar, a mais  
profunda admiração.*

## AGRADECIMENTOS

À Professora Ana Maria Soares Pereira, agradeço pela orientação e exemplo de sabedoria de vida, a amizade, os conhecimentos transmitidos, a confiança e o incentivo, fundamentais para a realização deste trabalho. Sou grata pela forma como respeitou e compreendeu o meu modo de trabalhar e ao mesmo tempo soube participar e compartilhar de todas as etapas.

Ao Dr. José Manoel Cabral de Souza Dias, em nome da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, meu reconhecimento pela oportunidade para a minha qualificação profissional, pela bolsa de estudos e por todas as condições oferecidas para a concretização desta pesquisa.

Aos professores Romy Goto e Antônio Ismael Cardoso, em nome dos docentes do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Horticultura da Faculdade de Ciências Agrárias/Unesp-Botucatu, SP, expresso a mais sincera gratidão pelos ensinamentos compartilhados e a ajuda recebida os quais contribuíram de forma relevante para o meu aperfeiçoamento profissional.

A Professora Suzelei de Castro França, coordenadora do Departamento de Biotecnologia Vegetal da Unaerp, SP, agradeço como gentilmente disponibilizou os laboratórios, salas e demais dependências para a execução das análises experimentais. Sou grata ainda a todos os professores e funcionários do Departamento pelo apoio constante.

A Sra. Carmen Sílvia em nome de todos os queridos amigos da Casa Espírita Terra de Ismael, Jurucê, SP, agradeço a generosidade em conceder a área para o ensaio de campo, por colocarem à disposição as instalações necessárias para o processamento pós-colheita, os funcionários de campo que auxiliaram no plantio e na colheita. Obrigada pelo

carinho e cuidados, assim como, nossas conversas tão essenciais para o meu fortalecimento espiritual e o meu caminhar.

Aos professores Giuseppina Pace Pereira Lima, Marcia Ortiz Mayo Marques, Roberto Fontes Vieira e Suzelei de Castro França, meu reconhecimento pelas críticas construtivas e sugestões que certamente enriqueceram e contribuíram para a melhoria deste trabalho.

Ao professor e amigo Lin Chau Ming, pelo exemplo de profissional e que de forma simples, mas exemplar me fez lembrar que a pesquisa pode ser realizada de modo sustentável ao meio-ambiente e à sociedade; e ainda, aos queridos professores Giuseppina Lima e Luis Vítor Sacramento, a alegria contagiante de vocês aliada à competência profissional faz toda a diferença.

Ao Roberto Fontes Vieira pelo incentivo desde quando este trabalho era apenas uma idéia, pelo companheirismo e confiança, pelo carinho demonstrado nas palavras de estímulo, pelas sugestões e críticas sempre tão sensatas e oportunas, pela paciência ao ouvir as minhas intermináveis inquietações e pela grandeza da amizade que é dádiva na minha vida.

Aos amigos e colegas da Embrapa, Abadia Solino, Aldicir Scariot, Antonieta Salomão, Bruno Walter, Célia Cordeiro, Dijalma Barbosa, Ivo Roberto, José Francisco Valls, Luciano Bianchetti, Luciano Nass, Luciene Cardoso, Lucimar Padilha, Magaly Wetzel, Marília Burle, Sandra Zarur, Taciana Cavalcanti e Terezinha Dias agradeço pelo encorajamento e pelas contribuições indispensáveis.

Aos queridos Denise Návia, Clayton Debiasi, Lylian Diniz e Edieidia Pina pessoas tão especiais com as quais construí uma amizade imperecível, agradeço o apoio constante, os momentos alegres e importantes compartilhados.

As amigas Chrystiane Fráguas, Karina Almeida, Ana Maria, agradeço a vivência de um cotidiano harmonioso, agradável e tranquilo em Botucatu.

Aos amigos de turma Cristiane Guerreiro, Chrystian Yezid, Elisângela Camili, Gláucia Soró, Isabel Ramdonwski, Juliana Faria, Lenita Haber, Maira Vasconcelos, Maria Aparecida Veira, Milena Pilla, Raquel Mattana e Santino Seabra, por nossos encontros alegres, nossas horas de descontração, nosso aprendizado dentro e fora das salas de aula e laboratórios.

Aos amigos conquistados em Ribeirão Preto, Ana Valéria de Souza, Ligia Moraes, Patrícia Roberto, Paulo Vinícius, Simone Torres, Thácia Dal Picolo, e Valéria Conde pelo carinho e o amparo em todos os momentos compartilhados os quais contribuíram de forma imprescindível para o meu crescimento profissional e pessoal.

A Any Linares, meu reconhecimento pela amizade desde os tempos de Itumbiara, GO, pela força nas horas não tão fáceis e pela ajuda em todos os aspectos. Sou grata ainda à sua família, Edmilson, Ila e Ian, pelo acolhimento em Ribeirão Preto, vocês sempre foram a certeza de um porto seguro e de momentos inesquecíveis.

Ao professor Paulo Sérgio Pereira, agradeço a amizade e por disponibilizar o laboratório de Química de Produtos Naturais, Unaerp, SP, para a análise química, assim como a ajuda indispensável da técnica de laboratório Sarazete Pereira.

À professora Bianca Waléria Bertoni, agradeço por sua amizade, pelos conhecimentos transmitidos no laboratório de Biologia Molecular, Unaerp, SP, pela ajuda nas análises de caracterização genética, na análise de componentes principais e principalmente, pela paciência e boa vontade perante minhas dúvidas.

E ainda, à Carla, Helenice, Rose, Edenilza, Paulinho e Patrícia pela amizade, pelo convívio agradável e por nossos inesquecíveis cafés da manhã aos sábados.

Aos meus irmãos, irmãs, cunhados, cunhadas, sobrinhos, obrigada pelo afeto tão fundamental para minha felicidade.

À Fapesp agradeço pelo suporte financeiro para a concretização desta pesquisa.

“Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

Charles Chaplin

*“Mas se Deus é as flores e as árvores e os montes e sol e o luar, então acredito nele, ....Mas se Deus é as árvores e as flores e os montes e o luar e o sol, para que lhe chamo eu Deus? Chamo-lhe flores e árvores e montes e sol e luar; porque, se ele se fez para eu o ver, sol e luar e flores e árvores e montes, se ele me aparece como sendo árvores e montes e luar e sol e flores, é que ele quer que eu o conheça como árvores e montes e flores e luar e sol.”*

De *O guardador de rebanhos*  
Fernando Pessoa

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
1 RESUMO.....	1
2 SUMMARY.....	3
3 INTRODUÇÃO.....	5
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
4.1 Conservação de recursos genéticos.....	8
4.1.1 Conservação de germoplasma <i>in vitro</i> .....	10
4.2 Recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas.....	12
4.3 Caracterização de germoplasma.....	16
4.3.1 Caracterização química.....	18
4.3.1.1 Fitoecdisteróides.....	20
4.4 <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen.....	23
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
5.1 Coleção de germoplasma.....	32
5.2 Coleta de germoplasma.....	33
5.3 Cultivo <i>in vitro</i> .....	35
5.3.1 Assepsia dos explantes.....	35
5.4 Caracterização morfológica.....	39
5.4.1 Material vegetal.....	39
5.4.2 Cultivo das populações de <i>Pfaffia glomerata</i> .....	39
5.4.3 Área experimental.....	40
5.4.4 Instalação do experimento no campo.....	43
5.4.5 Caracterização dos acessos.....	46
5.4.5.1 Caracteres fenotípicos das variáveis quantitativas.....	46
5.4.5.2 Caracteres fenotípicos das variáveis qualitativas.....	47
5.4.6 Colheita e processamento das amostras pós-colheita.....	48

5.4.7 Determinação do teor de $\beta$ -ecdisona.....	49
5.5 Estabelecimento do banco de germoplasma <i>in vitro</i> .....	51
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
6.1 Coleta de germoplasma.....	54
6.2 Caracterização morfológica.....	57
6.2.1 Caracteres fenotípicos das variáveis quantitativas.....	57
6.2.1.1 Altura da planta (AP).....	57
6.2.1.2 Diâmetro do caule (DC).....	60
6.2.1.3 Comprimento entre o quarto e o quinto entrenó (CE).....	61
6.2.1.4 Número de caules (NC).....	62
6.2.1.5 Diâmetro da raiz principal (DRP).....	65
6.2.1.6 Matéria fresca da parte aérea e da raiz (MFPA e MFR).....	67
6.2.1.7 Matéria seca da parte aérea (MSPA).....	69
6.2.1.8 Matéria seca da raiz (MSR).....	70
6.2.1.9 $\beta$ -ecdisona (E).....	72
6.2.1.10 Ocorrência de nematóides (NEM).....	77
6.2.1.11 Índice de colheita (IC).....	81
6.2.2 Produtividade.....	82
6.2.3 Análise de componentes principais.....	83
6.2.4 Variabilidade intrapopulacional.....	85
6.2.5 Caracteres fenotípicos das variáveis qualitativas.....	85
6.3 Ocorrência de insetos.....	89
6.4 Estabelecimento do banco de germoplasma <i>in vitro</i> .....	91
6.5 Considerações finais.....	95
7. CONCLUSÕES.....	97
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
APÊNDICE 1.....	111
APÊNDICE 2.....	112

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Página</b>
Tabela 1 - Espécies medicinais, forma de conservação e número de acessos conservados no banco de germoplasma <i>in vitro</i> da Unaerp. Ribeirão Preto, SP, 2007.....	12
Tabela 2 - Tratamentos utilizados para descontaminação de explantes de <i>Pfaffia glomerata</i> . Ribeirão Preto, SP, 2005.....	36
Tabela 3 - Tratamentos com antibiótico cefotaxima sódica 0,2% em tempos (h) diferentes para avaliar a descontaminação bacteriana em explantes de <i>Pfaffia glomerata</i> . Ribeirão Preto, SP, 2005.....	36
Tabela 4 - Testes com o antibiótico cefotaxima em diferentes concentrações (%) para controle bacteriano em explantes de <i>Pfaffia glomerata</i> . Ribeirão Preto, SP, 2005.....	37
Tabela 5 - Testes com os antibióticos gentamicina e cefotaxima para controle bacteriano em explantes de <i>Pfaffia glomerata</i> . Ribeirão Preto, SP, 2005.....	37
Tabela 6 - Avaliação dos antibióticos cefotaxima e gentamicina 0,1% por 48 horas no controle bacteriano em explantes de <i>Pfaffia glomerata</i> . Ribeirão Preto, SP, 2005.....	37
Tabela 7 - Avaliação dos antibióticos cefotaxima e gentamicina 0,1% por 36 horas no controle bacteriano em explantes de <i>Pfaffia glomerata</i> . Ribeirão Preto, SP, 2005.....	38
Tabela 8 - Avaliação do antibiótico cefotaxima em diferentes concentrações (%) por 48 horas no controle bacteriano em explantes de <i>Pfaffia glomerata</i> . Ribeirão Preto, SP, 2005..	38

Tabela 9 -	Número da população, localização, número do coletor e posição geográfica das oito populações de <i>Pfaffia glomerata</i> avaliadas no experimento de campo. Ribeirão Preto, SP, 2005.....	39
Tabela 10 -	Análise de macronutrientes e micronutrientes do solo na área experimental localizada no distrito de Jurucê, município de Jardinópolis, SP, 2005.....	41
Tabela 11 -	Resultado da análise granulométrica do solo da área experimental no distrito de Jurucê, Jardinópolis, SP, 2005.....	41
Tabela 12 -	Identificação das populações e dos indivíduos de <i>Pfaffia glomerata</i> , número de coleta e local de origem das oito populações avaliadas no experimento de campo. Ribeirão Preto, SP, 2005.....	44
Tabela 13 -	Tratamentos para definição do meio de cultura no estabelecimento do banco de germoplasma <i>in vitro</i> de <i>Pfaffia glomerata</i> . Ribeirão Preto, SP, 2006.....	51
Tabela 14 -	Correlações simples entre as variáveis quantitativas calculadas pelo coeficiente de Pearson, em 80 indivíduos de <i>Pfaffia glomerata</i> . Ribeirão Preto, SP, 2007.....	58
Tabela 15 -	Tipo de caule (%) em oito populações (P1 a P8) de <i>Pfaffia glomerata</i> avaliadas em condições de campo. Ribeirão Preto, SP, 2005.....	64
Tabela 16 -	Teor de $\beta$ -ecdisona (%) em indivíduos de <i>Pfaffia glomerata</i> não infectados e em indivíduos infectados por nematóide de galhas. Ribeirão Preto, SP, 2007.....	79
Tabela 17 -	Peso da matéria seca das raízes (g) em indivíduos de <i>Pfaffia glomerata</i> não infectados e em indivíduos infectados por nematóides de galhas. Ribeirão Preto, SP, 2007.....	81
Tabela 18 -	Variância acumulada (%) e autovetores para o primeiro (CP1) e segundo (CP2) componente principal para um descritor químico e dez descritores morfológicos de acessos de <i>Pfaffia glomerata</i> . Ribeirão Preto, SP, 2008.....	84
Tabela 19 -	Plântulas vivas (%), explantes com brotação (%), altura da plântula (cm), número de brotos por explante, número de segmentos por haste em seis tratamentos para definição do meio de cultura no estabelecimento do banco de germoplasma <i>in vitro</i> de <i>Pfaffia glomerata</i> . Ribeirão Preto, SP, 2007.....	91

Tabela 20 - Médias de descritores morfológicos avaliados em oito populações de <i>Pfaffia glomerata</i> . Ribeirão Preto, SP, 2007.....	96
Tabela 21 - Quadrados médios dos parâmetros AP (altura da planta), DC (diâmetro do caule), CE (comprimento do entrenó), NC (número de caules) e IC (índice de colheita) de plantas de <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen de oito populações diferentes. Ribeirão Preto, SP, 2006.....	111
Tabela 22 - Tabela 22 - Quadrados médios dos parâmetros DRP (diâmetro da raiz principal), MFPA (matéria fresca da parte aérea), MFR (matéria fresca da raiz), MSPA (matéria seca da parte aérea) e MSR (matéria seca da raiz) de plantas de <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen de oito populações diferentes. Ribeirão Preto, SP, 2006.....	111
Tabela 23 - Quadrados médios dos parâmetros explantes com brotações (EB), altura da plântula (AP), número de brotos por explante (NBE), número de segmentos nodais por explante (NSNE) de plântulas de <i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen cultivadas em meio MS em seis tratamentos para estabelecimento de banco de germoplasma <i>in vitro</i> . Ribeirão Preto, SP, 2006.....	111
Tabela 24 - Identificação dos indivíduos e das populações de <i>Pfaffia glomerata</i> introduzidas no Banco de germoplasma <i>in vitro</i> da Universidade de Ribeirão Preto, Unaerp, 2007.....	112

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
Figura 1 - Estrutura química da 20-hidroxiecdisona (20E) (Fonte: SciFinder Scholar CAS 5289-74-7). Ribeirão Preto, 2008.....	22
Figura 2 - Precipitação diária (mm) registrada na região de Ribeirão Preto, SP, 2005 e 2006 (Fonte: Instituto Agronômico de Campinas - IAC).....	42
Figura 3 - Temperaturas (°C) mensais mínimas, médias e máximas registradas na região de Ribeirão Preto, SP, 2005 e 2006. (Fonte: Instituto Agronômico de Campinas - IAC).....	42
Figura 4 – Curva padrão de $\beta$ -ecdisona. Ribeirão Preto, SP, 2007.....	50
Figura 5 - Preparo da área de plantio e experimento de <i>Pfaffia glomerata</i> no campo em Jurucê, SP, 2005.....	52
Figura 6 - Micropropagação de <i>Pfaffia glomerata</i> e mudas para plantio no campo. Ribeirão Preto, SP, 2005.....	52
Figura 7 - Planta inteira de <i>Pfaffia glomerata</i> . Ribeirão Preto, SP, 2008. ....	53
Figura 8 - Diferentes formas de raízes de <i>Pfaffia glomerata</i> . Ribeirão Preto, SP, 2006.....	53
Figura 9 - Pontos de coleta de germoplasma de <i>Pfaffia glomerata</i> em populações naturais nos estados de Mato Grosso do Sul, Paraná e São Paulo.....	56
Figura 10 - Altura das plantas (m) de oito populações de <i>Pfaffia glomerata</i> (P1 a P8) cultivadas em condições de campo. Ribeirão Preto, SP, 2006.....	58

Figura 11 -	Diâmetro do caule (cm) de indivíduos de oito populações de <i>Pfaffia glomerata</i> (P1 a P8) cultivadas em condições de campo. Ribeirão Preto, SP, 2006.....	60
Figura 12 -	Comprimento entre o quarto e quinto entrenó (cm) das plantas de oito populações de <i>Pfaffia glomerata</i> cultivadas em condições de campo. Ribeirão Preto, SP, 2006.....	61
Figura 13 -	Número de caules de plantas de oito populações de <i>Pfaffia glomerata</i> (P1 a P8) avaliadas em condições de campo. Ribeirão Preto, SP, 2006.....	63
Figura 14 -	Porcentagem geral do tipo de caule das plantas de oito populações (P1 a P8) de <i>Pfaffia glomerata</i> avaliadas em condições de campo. Ribeirão Preto, SP, 2006.....	63
Figura 15 -	Diâmetro da raiz principal (cm) de plantas de oito populações de <i>Pfaffia glomerata</i> (P1 a P8) avaliadas em condições de campo. Ribeirão Preto, SP, 2006..	65
Figura 16 -	Matéria fresca da parte aérea (g) das plantas de oito populações de <i>Pfaffia glomerata</i> (P1-P8) avaliadas em condições de campo. Ribeirão Preto, SP, 2006.....	68
Figura 17 -	Matéria fresca da raiz (g) de plantas de oito populações de <i>Pfaffia glomerata</i> (P1 a P8) avaliadas em condições de campo. Ribeirão Preto, SP, 2007.....	69
Figura 18 -	Matéria seca da parte aérea (g) de plantas de oito populações, de <i>Pfaffia glomerata</i> (P1 a P8), avaliadas em condições de campo. Ribeirão Preto, SP, 2007.	70
Figura 19 -	Matéria seca da raiz (g) de plantas de oito populações de <i>Pfaffia glomerata</i> (P1 a P8) avaliadas em condições de campo. Ribeirão Preto, SP, 2006.....	71
Figura 20 -	Teor de $\beta$ -ecdisona (%) em plantas de oito populações de <i>Pfaffia glomerata</i> (P1 a P8) avaliadas em condições de campo. Ribeirão Preto, SP, 2007.....	73
Figura 21 -	Teor de $\beta$ -ecdisona (%) nos indivíduos da população P8 de <i>Pfaffia glomerata</i> avaliados em condições de campo. Ribeirão Preto, SP, 2007.....	76
Figura 22 -	Porcentagem total de indivíduos de <i>Pfaffia glomerata</i> com presença ou ausência de nematóides de galhas nas raízes, avaliadas em condições de campo. Ribeirão Preto, SP, 2006.....	77
Figura 23 -	Porcentagem de indivíduos de <i>Pfaffia glomerata</i> não infectados por nematóides de galhas em cada população avaliada em campo. Ribeirão Preto, SP, 2006.....	78

Figura 24 - Índice de colheita de cada população de <i>Pfaffia glomerata</i> avaliada em condições de campo, Ribeirão Preto, SP, 2006.....	81
Figura 25 - Análise de componentes principais (ACP) de oito populações de <i>Pfaffia glomerata</i> com base em onze descritores. Ribeirão Preto, SP, 2008.....	85
Figura 26 - Cor das raízes de cada população de <i>Pfaffia glomerata</i> (P1 a P8) avaliadas em condições de campo. Ribeirão Preto, SP, 2006.....	86
Figura 27- Porcentagem do formato do limbo (a) e formato predominante (b) em cada população de <i>Pfaffia glomerata</i> , (P1 a P8) cultivadas nas condições de Ribeirão Preto, SP, 2006.....	87
Figura 28 - Forma do ápice e da base do limbo foliar de plantas de <i>Pfaffia glomerata</i> , cultivadas nas condições de Ribeirão Preto, SP, 2006.....	87
Figura 29 - Porcentagem de plantas quanto à pilosidade (a) e distribuição da pilosidade em plantas cada população (b) de <i>Pfaffia glomerata</i> , (P1 a P8) cultivadas nas condições de Ribeirão Preto, SP, 2006.....	88
Figura 30 - Porcentagem da cor do caule nas plantas (a) e cor predominante em cada população (b) de <i>Pfaffia glomerata</i> cultivada nas condições de Ribeirão Preto, SP, 2006.....	89
Figura 31 - Porcentagem da cor do pecíolo e mesofilo e cor predominante em cada população de <i>Pfaffia glomerata</i> cultivada nas condições de Ribeirão Preto, SP, 2006.....	89
Figura 32 - Hemíptera visitando inflorescência de <i>Pfaffia glomerata</i> . Ribeirão Preto, SP, 2008.....	90
Figura 33 - Plântulas de <i>Pfaffia glomerata</i> submetidas a seis tratamentos para definição do meio de cultura no estabelecimento de banco de germoplasma <i>in vitro</i> , após seis meses de cultivo, Ribeirão Preto, SP, 2006.....	94

## 1 RESUMO

O presente estudo teve como objetivos coletar germoplasma de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, caracterizar genótipos provenientes de oito populações naturais, utilizando descritores morfológicos e um marcador químico e estabelecer um banco de germoplasma *in vitro*. Foram realizadas duas expedições de coleta, a primeira, à região localizada às margens do rio Santo Inácio e rio Tamanduá, Itatinga, SP e a segunda, ao Pantanal Sul Mato-grossense às margens do rio Paraguai, Corumbá, e às margens do rio Miranda, MS. Foram coletados 218 indivíduos em oito populações naturais que ainda não haviam sido amostradas e incorporação desses materiais ao banco de germoplasma *in vitro* da Unaerp, Ribeirão Preto, SP. Para a caracterização morfológica e química foi conduzido um experimento de campo com oito populações, em delineamento com blocos casualizados. As características avaliadas foram: altura da planta, comprimento do entrenó, diâmetro do caule, número de caules, tipo de caule, comprimento da raiz principal, número de raízes secundárias, diâmetro da raiz principal, matéria fresca e seca do caule, matéria fresca e seca das raízes, índice de colheita, a produtividade, cor caule, cor do pecíolo, pilosidade, cor da raiz, formato do limbo foliar, forma do ápice e da base do limbo foliar, relação comprimento/largura do limbo foliar, ocorrência de nematóides formadores de galhas e o teor de  $\beta$ -ecdisona. Foi registrada também a presença de insetos nas inflorescências. Os resultados foram submetidos à análise de variância, ao teste de separação de médias de Scott Knott a 5% de probabilidade. Visando definir o meio de cultura ideal para o estabelecimento do banco de germoplasma *in vitro* para a espécie foram avaliados seis tratamentos: 1) MS + 2% de sacarose + 4% de sorbitol; 2) MS/2 + 2% de sacarose + 4% de sorbitol; 3) MS + 2% de sacarose + 4% de

sorbitol + 2 mg.L<sup>-1</sup> de pantotenato de cálcio; 4) MS/2 + 2% de sacarose + 4% de sorbitol + 2 mg.L<sup>-1</sup> de pantotenato de cálcio; 5) MS + 2% de sacarose + 3% de manitol + 2 mg.L<sup>-1</sup> de pantotenato de cálcio; 6) MS/2 + 2% de sacarose + 3% de manitol + 2 mg.L<sup>-1</sup> de pantotenato de cálcio. Houve diferenças entre as populações avaliadas, principalmente, quanto à produção de matéria seca das raízes, altura da planta, número de caules, diâmetro da raiz principal, matéria seca da parte aérea e teor de β-ecdisona. Os descritores matéria fresca da parte aérea e matéria fresca da raiz foram as que mais contribuíram para a variabilidade observada. O meio de cultivo do tratamento dois foi o que proporcionou menor crescimento das plantas e ao mesmo tempo maior sobrevivência, desta forma, mostrou-se o mais adequado ao estabelecimento de um banco de germoplasma *in vitro* para a *P. glomerata*.

MORPHOLOGICAL AND CHEMICAL CHARACTERIZATION OF *Pfaffia glomerata* (SPRENGEL) PEDERSEN AND *IN VITRO* CONSERVATION.

Botucatu, 2008. 112p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: ROSA DE BELEM DAS NEVES ALVES

Adviser: ANA MARIA SOARES PEREIRA

## 2 SUMMARY

The aim in the present study was to collect germplasm of *Pfaffia glomerata*(Spreng.) Pedresen, characterize genotypes from eight natural populations utilizing morphological descriptors and a chemical marker and to establish a germplasm bank. The collecting expeditions were first to the region of the Santo Inacio and Tamandua riverbanks, Itatinga, SP and secondly to the Pantanal Sul region of the State of Mato Grosso, at the Paraguai and Miranda riverbanks. Two hundred and eighteen individuals were collected from eight natural populations not previously sampled and incorporated to the *in vitro* germplasm bank of the University of Ribeirao Preto (Unaerp), Ribeirao Preto Sao Paulo. For the morphological and chemical characterization the field experiment was conducted with eight populations and delineated in randomized blocks. The characteristics evaluated were: plant height, inter-nodule length, stem diameter, number of stems, type of stem, main root length, number of secondary roots, diameter of the main root, fresh and dry stem matter, fresh and dry root matter, stem color, petiole color, hairiness, root color, shape of the foliar limbus, shape of the apical part and base of the foliar limbus, length/width ratio of the foliar limbus, occurrence of gall forming nematodes, level of  $\beta$ -ecdysone and harvest index. Productivity and insect presence in the inflorescences was also verified. The results were submitted to analysis of variance and to the Scott Knott test of mean separations, with 5% probability. To define the best culture medium for the establishment of an *in vitro* germplasm bank six treatments were evaluated: 1) MS + 2% sacarose + 4% sorbitol; 2) MS/2 + 2% sacarose + 4% sorbitol; 3) MS + 2% sacarose + 4% sorbitol + 2mg.L<sup>-1</sup> calcium pantothenate; 4) MS/2 + 2% sacarose + 4% sorbitol + 2mg.L<sup>-1</sup> calcium pantothenate; 5) MS + 2% sacarose + 3% manitol + 2mg.L<sup>-1</sup> calcium pantothenate; 6) MS/2 + 2% de sacarose + 3% manitol + 2mg.L<sup>-1</sup> calcium

pantothenate. There were differences between the populations evaluated mainly in the production of root dry matter, plant height, number of stems, diameter of the main root, aerial part dry matter and level of  $\beta$ -ecdysone. The culture medium in treatment two showed the smallest plant growth but the higher survival and was chosen as the more adequate for the establishment of an *in vitro* germplasm bank of *P. glomerata*.

### 3 INTRODUÇÃO

As inúmeras espécies vegetais endêmicas dos biomas tropicais e subtropicais contêm genes adaptados a diversos ambientes, genes de interesse para a agricultura, para a indústria de fitoterápicos e importantes para o melhoramento dos produtos já existentes e para a síntese de novas moléculas, podendo gerar benefícios incalculáveis (MAZZA e BAGGIO, 2002). No Brasil os biomas contemplam uma alta diversidade biológica, incluindo centenas de espécies úteis ou potencialmente úteis, representando um estoque genético rico e variado, que vem contribuindo para o avanço da agricultura, da indústria e da produção de fármacos.

Por outro lado, o crescimento demográfico, a fragmentação dos ecossistemas, a construção de hidrelétricas e estradas, as queimadas e a introdução de espécies exóticas estão entre as causas da perda da biodiversidade. Para se contrapor a essa realidade, o estabelecimento de estratégias de conservação da diversidade biológica é uma das ações que possibilita a sustentabilidade dos biomas brasileiros para atender às demandas das próximas gerações.

A biodiversidade possui como um dos seus mais importantes componentes os recursos genéticos os quais encerram a variabilidade genética de espécies de plantas, animais e microrganismos, de interesse socioeconômico atual ou potencial para utilização em programas de melhoramento genético, na biotecnologia, na farmacologia e em outras áreas afins (NASS, 2001).

O princípio da conservação dos recursos genéticos é a manutenção da sua viabilidade e integridade. Fundamentalmente, existem duas estratégias complementares de

conservação de recursos genéticos: a *in situ* e a *ex situ*. A conservação *in situ* é realizada dentro do ecossistema, permitindo a dinâmica evolutiva. Por outro lado, a conservação *ex situ* é conduzida fora do ambiente original, podendo ser realizada a médio ou longo prazo. A regeneração regular e cuidadosa dos genótipos pode fazer da conservação *ex situ* uma forma segura de conservar genes das grandes culturas por décadas (HOYT, 1992).

Os programas de conservação *ex situ* de recursos genéticos têm priorizado o estabelecimento de bancos de germoplasma, como estratégia para conservar espécies cultivadas e nativas. Desde o estabelecimento dos primeiros bancos de germoplasma a ênfase foi para a coleta e conservação de espécies utilizadas tradicionalmente na agricultura. Com a crescente perda de recursos genéticos e a degradação dos ecossistemas naturais em todo o mundo, ampliou-se a atuação das coletas de germoplasma passando a incluir recursos genéticos de espécies silvestres, de importância potencial, particularmente, das plantas medicinais (WALTER, et al., 2005).

A conservação *ex situ* do germoplasma por meio de bancos e coleções *in vitro* é especialmente recomendada para espécies com sementes recalcitrantes e as de propagação vegetativa. Também é adequada para aquelas que apesar de produzirem sementes ortodoxas, são propagadas tradicionalmente por via vegetativa, possibilitando a manutenção de características desejáveis, mas passíveis de desaparecer com a segregação na propagação via semente, como no caso da mandioca (*Manihot esculenta*), batata (*Solanum tuberosum*) e batata-doce (*Ipomea batatas*) (VALOIS et al., 2001).

A falta ou insuficiência de informação sobre os acessos mantidos em bancos ou coleções de germoplasma é apontada por vários especialistas como uma das causas do pouco uso destes materiais. Os bancos e coleções que conseguem manter seus genótipos caracterizados e avaliados despertam maior interesse entre os pesquisadores que estudam o recurso genético vegetal conservado. No caso das espécies com propriedades medicinais, a avaliação dos metabólitos secundários, se faz indispensável para o amplo conhecimento da diversidade não apenas genética, mas química.

As substâncias bioativas ou metabólitos secundários são caracterizados por diversidade estrutural, mas com distribuição restrita a certos *taxa*. Esses compostos têm função de polinizadores ou defesa contra predadores e patógenos, e constituem-se em peças fundamentais no processo adaptativo e co-evolutivo dos vegetais (HARBORNE, 1997; TAIZ e ZEIGER, 2004).

O estudo da diversidade química pode contribuir para um melhor entendimento sobre a variabilidade populacional e sazonal de metabólitos secundários em vegetais com propriedades terapêuticas e para a prospecção de substâncias biologicamente ativas.

Dentre as plantas medicinais nativas com potencial para pesquisas encontra-se *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). Conhecida também como “ginseng” brasileiro, a espécie vem sendo submetida a extrativismo intenso devido ao uso medicinal de suas raízes. A exploração predatória pode contribuir para a erosão genética comprometendo estudos básicos ainda não realizados tais como biologia floral, sistema reprodutivo e dinâmica de populações.

Magalhães (2000) enfatizou a necessidade urgente de pesquisas que contribuam para o maior conhecimento da *P. glomerata* visando fornecer subsídios à conservação e ao manejo sustentável da espécie. Além disso, o autor considerou os estudos em agrotecnologia fundamentais para estabelecer o seu cultivo. A produção em escala pode ser uma alternativa da atividade agrícola, essencial para o fornecimento de matéria-prima de qualidade.

O Projeto de Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Biológica Brasileira (Probio) financiou, em 2004, um levantamento realizado por equipes de pesquisadores nas cinco regiões do País. Foram selecionadas 775 espécies nativas denominadas de “Plantas do Futuro”, 99 possuem potencial medicinal, dentre elas encontra-se a *Pfaffia glomerata*. Acredita-se que a continuidade de estudos poderá revelar novas funções para a espécie, criar oportunidades para os agricultores, gerar benefícios e desenvolvimento às regiões produtoras, desde que, a sua exploração seja norteadas por técnicas de cultivo ambientalmente corretas e manejo sustentável.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 Conservação de recursos genéticos

Um dos primeiros estudos sobre diversidade genética em plantas cultivadas foi realizado nas décadas de 1910 a 1930 sob a liderança do cientista russo Nicolai I. Vavilov que junto com seus colaboradores identificou os centros de diversificação de um grande número de plantas cultivadas (FREIRE et al., 1999). A partir de 1920 começaram a surgir as estações regionais de introdução de plantas, os laboratórios oficiais, os centros de pesquisa com coleções internacionais e expedições de coleta formais, evidenciando a necessidade de preservar os recursos genéticos vegetais (FRANKEL e HAWKES, 1975).

Na década de 1950 os recursos genéticos passaram a ser cada vez mais valorizados, fato que se deve em parte ao avanço da genética. Na década de 1960, houve uma preocupação da comunidade científica com as perdas de material genético, principalmente, aqueles relacionados às plantas cultivadas. Em 1972, a Conferência do Homem e Meio Ambiente, realizada em Estocolmo concluiu que medidas efetivas deveriam ser tomadas para evitar a perda contínua de genes. A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) estimulou, naquela década, o estabelecimento de uma rede mundial de Centros de Conservação de Recursos Genéticos localizados nas regiões de maior variabilidade genética e, em 1974, o *Consultative Group on International Agricultural Research*/Grupo Consultivo de Pesquisa Agropecuária Internacional (CGIAR) fundou o *International Plant Genetic Resources Institute*/Instituto Internacional de Recursos Genéticos Vegetais (IPGRI) atualmente *Bioversity International* (COSTA, 1996).

Seguindo a tendência mundial, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) criou em 1974 o Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen). Dessa forma, são mantidos vários bancos de germoplasma *in situ* e *ex situ*, além da conservação a longo prazo em câmaras a  $-20^{\circ}\text{C}$  que constitui a Coleção de Base (Colbase). A conservação *ex situ* de recursos genéticos encontra nos bancos e coleções de germoplasma as estruturas físicas onde são armazenadas as amostras de material vivo, representativas de um indivíduo, ou de vários indivíduos, na forma de sementes, plantas ou partes da planta, tecidos ou células, para a manutenção da variabilidade genética visando a sua utilização (IBPGR, 1991).

A coleta de germoplasma representa uma ação essencial nas estratégias de conservação de recursos genéticos e, em sentido amplo, para conservar parte da biodiversidade. Desde o estabelecimento dos primeiros bancos de germoplasma a ênfase foi para a coleta e conservação de espécies utilizadas tradicionalmente na agricultura. Com a crescente perda de recursos genéticos e a degradação dos ecossistemas naturais em todo o mundo, ampliou-se a atuação das coletas passando a incluir recursos genéticos de espécies silvestres, de importância potencial (WALTER et al., 2005).

Valois et al. (2001) consideram, basicamente, a existência de três formas de conservação *ex situ*, que dependem das características reprodutivas do germoplasma:

- a) Conservação de sementes, indicada para preservar espécies que produzem sementes ortodoxas e são propagadas sexualmente;
- b) Conservação no campo, para espécies produtoras de sementes recalcitrantes ou intermediárias, de propagação vegetativa, espécies perenes, além daquelas que produzem quantidades reduzidas de sementes como as forrageiras;
- c) Conservação *in vitro* e criopreservação, para plantas de propagação vegetativa e/ou que produzem sementes recalcitrantes ou intermediárias.

A conservação *ex situ* possui algumas vantagens como: a manutenção do material em espaço reduzido facilitando o cuidado; reúne muitos acessos num só local otimizando a caracterização e avaliação nas coleções de campo, e mantém o material livre de patógenos no caso das coleções *in vitro*. No entanto, dependendo da forma de conservação, existem algumas desvantagens como a interrupção da evolução quando são usadas técnicas que reduzem as atividades vitais do germoplasma por longos períodos; o risco de instabilidade

genética nas coleções de sementes ortodoxas e *in vitro*; a deriva genética que significa a perda aleatória de genes devido à amostragem ou à multiplicação de amostras muito pequenas e a pressão de seleção, geralmente, quando o material é multiplicado em áreas com condições edafoclimáticas distintas de seu local de coleta (VALOIS et al., 2001).

#### 4.1.1 Conservação de germoplasma *in vitro*

Nos últimos anos, as técnicas de cultura *in vitro* para conservação em médio prazo em banco de germoplasma foram amplamente desenvolvidas e aplicadas em mais de mil espécies, muitas das quais são de regiões tropicais (LATA, 1991). Para as espécies ameaçadas de extinção e cuja conservação por sementes não é possível, este é um método considerado altamente promissor (HOYT, 1992). Entretanto, o custo da técnica ainda representa uma limitação para a ampliação de seu uso.

Segundo Villalobos e Engelman (1995), desde 1960, houve um crescimento significativo do número de coleções *in vitro* para preservação de plantas e subsequente melhoramento genético. De acordo com a FAO no ano de 1994 haviam milhares de acessos conservados *in vitro*, sendo 50% do total armazenado em países industrializados, 38% em países em desenvolvimento e 12% nos grupos independentes (ANAON, 1994).

Coleções e bancos *in vitro*, em geral, são conservados sob condições especiais protegidos de eventuais perdas, garantindo a sua utilização a curto, médio e longo prazo. Acessos introduzidos nesses bancos têm sido coletados nos centros de origem das culturas ou nas regiões onde se desenvolvem raças locais (TOWILL, 2000). O recente desenvolvimento das técnicas de transformação de plantas possibilita a manipulação genética dos materiais conservados *in vitro* na forma de tecidos ou células isoladas permitindo, também, a geração de variabilidade.

A utilização da cultura de tecidos, órgãos e células para conservar germoplasma é de interesse e constitui-se numa ferramenta auxiliar na conservação de recursos genéticos vegetais (WITHERS e WILLIAMS, 1998). É importante ressaltar que uma estratégia conveniente para a preservação do germoplasma é aquela que combina os vários métodos existentes de forma a se complementarem.

Os acessos que são conservados *in vitro* são submetidos a condições que diminuam o metabolismo e a redução do crescimento da planta, sem afetar a sua viabilidade e possibilitando o máximo de intervalo entre os subcultivos. Esta diminuição na atividade metabólica pode ocorrer pela limitação na intensidade de luz ou temperatura, acréscimo de retardadores de crescimento ao meio de cultura ou restringindo-se a concentração dos componentes salinos e orgânicos do meio (VILLALOBOS e ENGELMAN, 1995; WITHERS e WILLIAMS, 1998).

O manitol e o sorbitol são açúcares alcoólicos utilizados para alterar as condições osmóticas, proteger as membranas celulares das baixas temperaturas e redução de hiperhidricidade evitando a vitrificação (ENGELMANN, 1991; KADOTA, 2001). Segmentos de tecidos de cana-de-açúcar cultivados *in vitro* sobreviveram melhor em baixas temperaturas em meios de cultura contendo sorbitol e dextrose, quando comparados com os propágulos que continham apenas sacarose (LEMOS et al., 2002).

Plantas mantidas em banco de germoplasma *in vitro* têm baixa taxa de divisão celular, o que tende a diminuir a frequência de mutações que podem ocorrer durante a duplicação do DNA na fase mitótica (HENSHAW, 1982). Mesmo assim, pesquisas são necessárias e têm sido realizadas no sentido de ampliar o conhecimento sobre o efeito do armazenamento no genoma das plantas conservadas *in vitro* (WALLNER et al., 1996).

No Brasil uma das iniciativas pioneiras no que se refere à conservação de recursos genéticos de plantas medicinais em cultura de tecidos foi a criação, em 1987, do banco de germoplasma *in vitro* de plantas medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (Unaerp). O banco foi instalado com auxílio financeiro advindo da Central de Medicamentos (CEME) - Ministério da Saúde, com objetivo de reunir o maior número possível de acessos de *Maytenus aquifolium* e *M. ilicifolia* para disponibilizá-los à indústria de fitoterápicos. Em 2000, com a aprovação de vários projetos financiados pelo CNPq e Fapesp foram introduzidas dezenas de acessos de espécies medicinais do Cerrado e da Mata Atlântica na forma de plântulas e células (Tabela 1). Posteriormente, em janeiro de 2001 o banco foi ampliado mais uma vez, a partir de um projeto temático dentro do Programa Biota-Fapesp, cuja finalidade foi a introdução *in vitro* de espécies medicinais da família Bignoniaceae com atividade antitumoral.

**Tabela 1.** Espécies medicinais, forma de conservação e número de acessos conservados no banco de germoplasma *in vitro* da Unaerp, Ribeirão Preto, SP, 2007.

Espécie	Forma de conservação <i>in vitro</i>	Número de acessos
<i>Anemopaegma arvense</i>	Plântula	88
<i>Bauhinia forficata</i>	Célula	5
<i>Dimorphandra mollis</i>	Célula	3
<i>Dipteryx alata</i>	Célula	4
<i>Jacaranda decurrens</i>	Plântula	50
<i>Lychnophora ericoides</i>	Plântula	10
<i>Mandevilla velutina</i>	Plântula	9
<i>Maytenus ilicifolia</i>	Plântula/célula	30
<i>Photomorphe umbellata</i>	Célula	3
<i>Physalis angulata</i>	Plântula e célula	4
<i>Pilocarpus jaborandi</i>	Plântula	33
<i>Psychotria ipecacuanha</i>	Plântula/célula	60
<i>Sapindus saponaria</i>	Célula	5
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	Plântula	10
<i>Zeyheria montana</i>	Plântula	256

#### 4.2 Recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas

O Brasil possui uma diversidade de etnias, com forte influência em nosso hábito alimentar e cultural, particularmente no que diz respeito ao uso de plantas medicinais e aromáticas. A colonização trouxe ao País a influência do uso de espécies utilizadas pelos europeus com propriedade medicinal similar, por exemplo, vários *taxa* da flora nativa são denominados popularmente como arnica, em referência a *Arnica montana*, espécie típica da região mediterrânea. Contudo, foi com a vinda dos africanos que uma série de vegetais foram introduzidos e incorporados ao uso popular, como é o caso do manjeriço (*Ocimum* spp) (VIEIRA, 2002).

Outras espécies acabaram aclimatando-se muito bem em algumas regiões brasileiras, constituindo-se em plantas denominadas de ruderais, muito utilizadas por

diversas populações, rurais ou urbanas, como o melão-de-são-caetano (*Momordica charantia*), tanchagem (*Plantago major*), fedegoso (*Senna occidentalis*), quebra-pedra (*Phyllanthus* spp), mastruz (*Chenopodium ambrosioides*), dente-de-leão (*Taraxacum officinale*), entre outras.

Com exceção das ruderais, as demais plantas exóticas são cultivadas, em maior ou menor escala, dependendo do grau de utilização e/ou comercialização. Diferentemente, são poucas as espécies nativas cultivadas, sendo predominantemente obtidas por extrativismo. Em relação ao aspecto comercial, alguns *taxa* possuem um grande mercado interno e externo, como é o caso do guaraná (*Paulinia cupana*), já outros vegetais possuem uma forte demanda regional, como por exemplo, o juazeiro (*Ziziphus joazeiro*). Por outro lado, algumas espécies nativas possuem uso localizado, geralmente, com importância sócio-cultural, e normalmente são obtidas nas próprias comunidades tradicionais (SCHEFFER et al., 1999).

Segundo Vieira (2002), a riqueza cultural traduzida na forma de múltiplas influências no uso de plantas medicinais e aromáticas, faz do Brasil um país peculiar quanto ao emprego da fitoterapia. Porém, este grande potencial de recursos genéticos vegetais encontra-se ameaçado pela destruição acelerada da vegetação natural, por meio da expansão agropecuária, de queimadas, da exploração madeireira, da construção de estradas e hidrelétricas, além do extrativismo predatório. Este cenário torna-se preocupante na medida em que os recursos genéticos vegetais ainda não identificados, mas, com provável valor tanto para a medicina tradicional quanto para a indústria, são passíveis de extinção.

De acordo com Vieira e Alves (2003) os principais desafios relacionados à conservação de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas nativas são:

a) O escasso conhecimento científico básico sobre as espécies, principalmente nas áreas de taxonomia, genética, fisiologia de sementes, biologia reprodutiva, dinâmica de populações e bioquímica de metabólitos secundários. Além disso, a pesquisa básica para a produção de matéria-prima ainda é incipiente;

b) O acelerado processo de erosão genética, devido ao avanço da fronteira agrícola, da construção de rodovias e hidrelétricas, da exploração madeireira e do extrativismo predatório;

c) O rápido processo de desestruturação e aculturação das comunidades tradicionais, com perda do valioso conhecimento associado aos recursos genéticos autóctones;

d) Poucas espécies da flora nativa de importância medicinal possuem estudos farmacológicos e químicos, o que dificulta a definição de espécies prioritárias para conservação;

e) Quantidade insuficiente de bancos de germoplasma de plantas medicinais e aromáticas, predominando a existência de coleções, com grande número de espécies e pequena variabilidade intra-específica;

f) Outro desafio que se impõe é a elaboração de um programa nacional para conservação de recursos genéticos de espécies medicinais e aromáticas com a colaboração e participação de várias instituições brasileiras de pesquisa.

Para minimizar o extrativismo desordenado da maioria das espécies medicinais e aromáticas nativas é imprescindível a pesquisa sobre o manejo sustentável e o cultivo em escala, além disso, favorece a produção de matéria-prima de qualidade. No entanto, nos poucos bancos de germoplasma a variabilidade genética conservada ainda é insuficiente para a seleção de materiais promissores destinados à produção agrícola e aos estudos sobre domesticação e melhoramento (VIEIRA, 2002).

Skorupa e Vieira (2006) identificaram três grupos de plantas medicinais e aromáticas para o desenvolvimento dos trabalhos envolvendo a conservação *ex situ*: Grupo I. Espécies utilizadas na medicina tradicional, sem comprovação científica sobre suas propriedades terapêuticas, eficácia e/ou toxicidade; Grupo II. Espécies com propriedades terapêuticas comprovadas, substâncias ativas conhecidas ou não, mas em uso como fitoterápicos e Grupo III. Espécies contendo constituintes químicos em uso pela indústria farmacêutica e na área médica.

O estabelecimento de níveis de prioridade possibilita obter informações sobre espécies ou grupos de espécies vulneráveis e que necessitam de ações imediatas de preservação. Proporciona também maior articulação entre as várias áreas do conhecimento e dos grupos de pesquisa, identificando eventuais lacunas que devam ser supridas. Assim, Skorupa e Vieira (2006) definem as espécies dos grupos II e III como prioritárias em trabalhos de coleta e de conservação de germoplasma. Os *taxa* presentes nesses grupos têm seus materiais botânicos (folhas, raízes, casca, etc.) amplamente utilizados de forma direta ou indireta na produção de medicamentos ou no comércio informal de plantas medicinais, sendo obtidos principalmente por extrativismo.

O grupo I apresenta grande potencial sendo tratado genericamente de um grupo de espécies “potencialmente medicinais”. *Taxa* desse grupo podem migrar, a qualquer momento, para os grupos de maior prioridade na conservação *ex situ*, dependendo do grau de conhecimento alcançado, do potencial demonstrado e, finalmente, das evidências de pressão de exploração e da redução de sua variabilidade genética na natureza (SKORUPA e VIEIRA, 2006).

A seleção de plantas medicinais para a conservação está diretamente relacionada às informações geradas por outras áreas de conhecimento como a taxonomia, a biogeografia, a etnobotânica, ou a química e a farmacognosia de produtos naturais. A integração dessas informações é fundamental na definição sobre as espécies ou grupos de espécies a serem priorizados em trabalhos de coleta e conservação de germoplasma *ex situ* e/ou *in situ* em longo prazo (PEREIRA et al., 2007).

Os critérios para seleção de espécies prioritárias para a conservação estão intimamente relacionados. Desta forma, espécies com maior grau de conhecimento científico e comprovação das suas propriedades terapêuticas, na maioria das vezes são as mais comercializadas, gerando crescente demanda. Além disso, é importante considerar a parte usada da planta (raiz, caule, folha, frutos), a frequência com que a espécie ocorre na natureza, endemismo e o tamanho das populações.

As plantas medicinais e aromáticas prioritárias para a conservação e manejo sustentável podem ser agrupadas ainda, de acordo com sua distribuição geográfica em grandes biomas. A primeira reunião técnica sobre estratégias para conservação de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas (VIEIRA et al., 2002), identificou algumas espécies prioritárias tais como o pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), a arnica-do-cerrado (*Lychnophora ericoides* Mart.), a espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.), a aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All) e o “ginseng” brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] para inclusão em linhas de pesquisa, preferencialmente de caráter trans e multidisciplinar, viabilizando o fortalecimento entre as instituições envolvidas.

Scheffer et al. (1999) descreveram pontos importantes em relação aos desafios da conservação de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas:

- 1) O conhecimento das características morfológicas e químicas é importante para o entendimento de adaptações ocorridas pela pressão ambiental e das modificações nas estruturas produtoras dos princípios ativos;

2) A garantia da conservação dos acessos coletados de forma adequada, mantendo-se as informações sobre o local de origem. Avaliação das coleções de plantas regionais, inicialmente nos locais de ocorrência natural da espécie, estimulando o trabalho integrado de grupos de pesquisa.

3) O manejo sustentável e o desenvolvimento de tecnologia de cultivo são as ações mais urgentes para a conservação dos recursos genéticos das espécies ameaçadas. Os *taxa* selecionados para estudos e com etapas implantadas necessitam de um planejamento da pesquisa em conservação e cultivo, de forma a se obter resultados concretos.

Skorupa e Viera (2006) ressaltam que “o avanço das técnicas de isolamento e identificação de compostos químicos de origem vegetal, bem como do emprego de novos procedimentos para testar diversas atividades biológicas de forma simultânea e mais rápida, serão, sem dúvida, os grandes responsáveis pelo aumento da geração de conhecimento e de demandas específicas para a conservação de germoplasma *ex situ*. Ao lado disso, o emprego crescente de processos biotecnológicos na produção de fármacos traz uma nova dimensão para o valor das coleções de germoplasma, onde o foco de interesse se reduz à própria célula ou a segmentos específicos de DNA”.

### **4.3 Caracterização de germoplasma**

Querol (1993) definiu a caracterização como uma atividade de coleta de dados, sobretudo qualitativos, para descrever e diferenciar, acessos da mesma espécie. Nesse sentido, o autor considerou também, que os principais dados são as características: da planta (altura, forma, hábito de crescimento e ramificações); da folha (forma, largura, comprimento, cor, tipo de borda e nervuras); da flor (forma, cor e tipo de cálice); do fruto (forma, cor, volume e número de sementes por fruto); da semente (tamanho, forma e cor); e das partes subterrâneas (tamanho, forma e cor).

A caracterização de populações a níveis genéticos ou fenotípicos é importante para conhecer a variabilidade e estrutura genética existente no germoplasma disponível, e também identificar aqueles caracteres que sejam ligados à produtividade. Ainda, fornecer informações utilizando descritores a fim de individualizar fenotipicamente cada acesso, bem como permitir eficiência no manejo de bancos de germoplasma (SILVA, 1999).

Valls (2007) acrescenta que uma vantagem adicional da caracterização e avaliação é a identificação de acessos duplicados, o que traz como consequência imediata à racionalização dos trabalhos relativos às coleções, evitando a duplicação de atividades, economia de tempo e de recursos financeiros.

No processo de caracterização e avaliação de qualquer acesso, considera-se a existência de cinco etapas subseqüentes e correlatas: a) a correta identificação botânica; b) a elaboração de cadastro de acessos disponíveis por espécie; c) a caracterização; d) a avaliação preliminar; e) avaliação complementar ou aprofundada (agronômica ou não). Essas etapas contribuem sobremaneira para um melhor conhecimento dos acessos, sendo possível a detecção de eventuais duplicações indesejáveis nas coleções. Diferentes níveis de caracterização são possíveis, entre eles: morfológica, bioquímica e molecular (VALLS, 1988, 2007).

A atividade de caracterização permite a identificação de caracteres botânicos de alta herdabilidade, facilmente visíveis ou mensuráveis e que se expressam consistentemente em todos os ambientes (BURTON e DAVIES, 1984 *apud* VALLS, 2007). Assim entendida, a caracterização se fixa basicamente em aspectos morfológicos e fenológicos, observados de forma sistemática nos acessos, através do confronto com listas de características descritivas ou descritores (VALLS, 2007).

O descritor pode ser definido como um atributo ou característica inerente observada em acessos de um banco de germoplasma, possibilitando a diferenciação entre genótipos de uma mesma cultura (HOWES, 1981). Nas listas de descritores diferentes categorias reconhecidas como válidas para aquele descritor (ex. cor do caule: 1. verde, 2. arroxeadado) são previstos para cada um, com base na experiência prévia dos pesquisadores com a cultura. Em poucas, as categorias são vinculadas aos alelos que as determinam, mostrando, então, sua condição de marcadores genéticos morfológicos (IBPGR, 1982 *apud* VALLS, 2007).

A falta ou insuficiência de informação adequada sobre a variabilidade disponível é uma das principais causas do uso limitado de acessos mantidos em bancos de germoplasma (SLOTEN, 1987). A intensificação da caracterização e da avaliação do amplo germoplasma hoje reunido é apontada como maneira de superar essa situação, configurando-se entre as prioridades na estratégia de abordagem e manejo de recursos genéticos no Brasil. Os bancos e coleções de germoplasma que conseguem manter seus acessos caracterizados e

avaliados são mais procurados por melhoristas, biotecnólogos e outros pesquisadores interessados em explorar o recurso genético vegetal (VALLS, 1988).

#### 4.3.1 Caracterização química

Os vegetais produzem uma grande variedade de compostos químicos, denominados de metabólitos secundários, que têm função, principalmente, de defesa contra predadores e patógenos. Existem três principais grupos de metabólitos secundários, de acordo com sua biossíntese: os terpenos, os compostos fenólicos e os compostos contendo nitrogênio (TAIZ e ZEIGER, 2004).

O estudo do metabolismo secundário possui diversas aplicações práticas, pois muitas destas substâncias são fisiologicamente ativas contra herbívoros ou patógenos. Vários terpenos são de importância para a agricultura por apresentarem ação inseticida como os piretróides, os limonóides e a azadiractina que é uma substância presente no nim indiano (*Azadirachta indica*). Dentre os alcalóides também estão incluídos metabólitos de importância agrônômica, como a cafeína (*Coffea arabica*), a nicotina (*Nicotiniana tabacum*) e a teobromina (*Theobroma cacao*) e de importância medicinal como a pilocarpina (*Pilocarpus* spp).

Os metabólitos secundários são compostos caracterizados por enorme diversidade estrutural, mas com distribuição restrita a certos *taxa*. Tal diversidade química torna essas substâncias peças fundamentais no processo adaptativo e co-evolutivo dos vegetais, pois, o perfil fitoquímico de uma espécie e, inclusive, de indivíduos, pode ser influenciada pelo ambiente a ele associado (HARBORNE, 1997). O conhecimento da diversidade química pode contribuir para o estudo da variabilidade populacional e sazonal de metabólitos secundários e para a prospecção de substâncias bioativas.

Apesar do efeito ambiental sobre a produção de metabólitos secundários, o controle de sua biossíntese é realizado por genes que codificam enzimas específicas, responsáveis pela formação destes compostos e regulação das vias biossintéticas. Assim, o controle do metabolismo secundário depende da capacidade genética da planta em responder a estímulos internos ou externos e da existência desses estímulos no momento apropriado (VIEIRA, 2000).

Estudos com populações silvestres de plantas aromáticas e medicinais, relacionando composição química com a área de ocorrência desses vegetais, têm demonstrado que existe uma variação genética entre indivíduos de diferentes populações (SKOULA et al., 2000). Portanto, uma espécie encontrada em uma região não necessariamente produzirá os mesmos compostos que outra distante desta, ou talvez produza, porém em quantidades diferentes (VIEIRA, 2000).

Populações quimicamente distintas, dentro de uma mesma espécie, com ênfase nos metabólitos secundários majoritários foram definidas como raças químicas ou quimiotipos (HAY e SVOBODA, 1993). O termo quimiotipo deve ser aplicado somente nas plantas em que não se possa verificar distinção morfológica entre as populações analisadas. Se houver tais diferenças serão consideradas variedades botânicas e não quimiotipos (MARTINS, 1998).

Segundo Vieira (2002) a existência e reconhecimento de quimiotipos são fundamentais, também, quando se pensa na coleta de espécies nativas para estudos agrônômicos em que se tenta avaliar e melhorar a capacidade destas de produzirem determinado constituinte químico. Considerando este aspecto, é fundamental que a conservação dos recursos genéticos de plantas nativas, tenha como base uma coleta de germoplasma que amostre os diferentes quimiotipos existentes, permitindo ao usuário deste material genético acesso a uma variabilidade maior.

Segundo Figueira (2000) o estudo da produção agrícola de espécies medicinais e aromáticas, deve primeiramente considerar a base genética em interação com o ambiente, a qual resulta no metabolismo do composto de interesse, assim como o grau de herdabilidade dos fatores genéticos que determinam a composição química.

Os esforços destinados ao conhecimento de metabólitos secundários e sua distribuição nas plantas precisam ser ampliados, de modo a minimizar as lacunas existentes entre estes dados e os morfológicos, por exemplo. Tal esforço pode levar a um maior entendimento da evolução desses metabólitos e também aumentar o número e a diversidade de caracteres a serem utilizados em estudos filogenéticos (SANTOS, 2000).

Os marcadores químicos podem ser utilizados na separação de acessos porém, com limitado sucesso, uma vez que esses constituintes são afetados por fatores bióticos, como herbivoria e doenças, e por fatores abióticos, como luz, temperatura e estágio de desenvolvimento. Sem dúvida, o uso de marcadores moleculares permitiu melhor

discriminação, uma vez que não são influenciados pela idade da planta ou pelo meio ambiente (VIEIRA et al., 2001; VIEIRA e AGOSTINI-COSTA, 2007).

A caracterização química pode ser considerada como uma estratégia para o uso e a conservação de recursos genéticos vegetais de importância medicinal. Assim, esse tipo de caracterização é um recurso importante para estabelecer e intensificar o uso de bancos de germoplasma de plantas medicinais.

#### 4.3.1.1 Fitoecdisteróides

Terpenos ou terpenóides constituem o maior grupo de metabólitos secundários e derivam-se da união de unidades pentacarbonadas que apresentam um esqueleto ramificado de isopentano. Os elementos estruturais básicos dos terpenos são algumas vezes chamados de unidades isoprênicas, pois os terpenos, quando submetidos a altas temperaturas, podem se decompor em isoprenos. Assim, todos os terpenos são, ocasionalmente, referidos como isoprenóides (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Os terpenos são classificados pelo número das unidades pentacarbonadas. Os monoterpenos possuem 10 carbonos em duas unidades  $C_5$  (ex.: mentol, linalol); os terpenos com três unidades  $C_5$  são os sesquiterpenos (ex.: ácido abscísico), já os diterpenos apresentam quatro unidades  $C_5$  (ex.: ácido giberélico). Os maiores terpenos incluem triterpenos com 30 carbonos (ex.: sitosterol), tetraterpenos com 40 carbonos (ex.: carotenóides) e politerpenóides com  $[C_5]_n$  carbonos, onde  $n > 8$  (ex.: borracha) (VIEIRA e AGOSTINI-COSTA, 2007; TAIZ e ZEIGER, 2004).

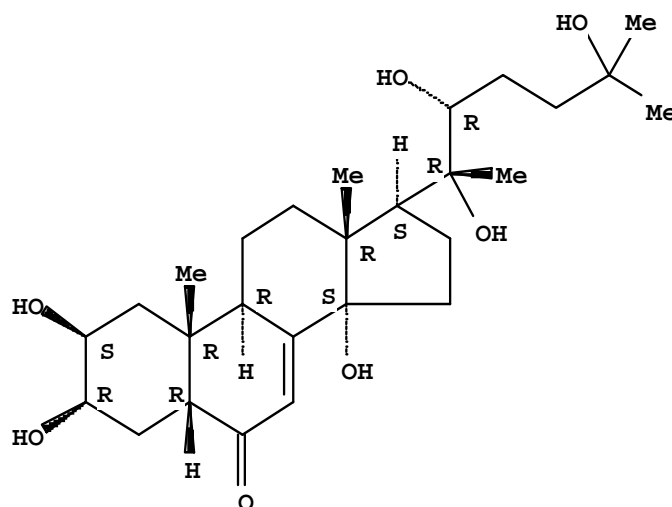
Os terpenos são biossintetizados a partir de duas vias metabólicas. Na primeira rota, a do ácido mevalônico, é formado o isopentenil difosfato (IPP), a unidade ativa básica na formação dos terpenos. Os monoterpenos são formados a partir do geranyl difosfato (GPP), molécula de 10 carbonos. O GPP ao se ligar à molécula a uma molécula de IPP, forma um composto de 15 carbonos, o farnesil difosfato (FPP), precursor da maioria dos sesquiterpenos. A adição de mais uma molécula de IPP produz o geranylgeranyl difosfato (GGPP), precursor dos diterpenos. Finalmente, FPP e GGPP podem dimerizar para formar triterpenos ( $C_{30}$ ), esteróides ( $C_{27}$ ) e tetraterpenos ( $C_{40}$ ), respectivamente (TAIZ e ZEIGER, 2004).

Atualmente, considera-se que o IPP também possa ser formado a partir de outra via metabólica, a do metileritritol fosfato (MEP) (TAIZ e ZAIGER, 2004), que ocorre nos cloroplastos e outros plastídeos (LICHTENTHALER et al., 1997; LICHTENTHALER, 1999; McCASKILL e CROTEAU, 1999; ROHMER, 2003).

A reação que une duas unidades de farnesil difosfato (FPP) é catalisada pela esqualeno sintase (EC 2.5.1.21), formando o esqualeno, o precursor da maioria dos esteróides. O esqualeno é então seletivamente epoxidado para formar 2,3-oxidoesqualeno, o qual sofre ciclização. Esta seqüência é catalisada por pelo menos duas enzimas: esqualeno epoxidase (EC 1.14.99.7) e a cicloartenol sintase (EC 5.4.99.8) as quais catalisam reações em que ocorre rearranjo do epoxiesqualeno para formar o precursor dos ecdisteróides, o cicloartenol (LEE et al., 2004; MANN, 1994).

Os ecdisteróides são hormônios esteroidais responsáveis pela ecdise e estão envolvidos nos processos de metamorfose e de reprodução nos artrópodes. Espécies vegetais também sintetizam ecdisteróides (fitoecdisteróides) e estudos apontam para a função de proteção contra insetos fitófagos e nematóides do solo (MELÉ et al., 1992; SLÁMA et al., 1993; SORIANO et al., 2004). A 20-hidroxiecdisona (20E) (Figura 1) foi identificada a partir de artrópodes e atualmente é considerado o principal ecdisteróide biologicamente ativo em vários invertebrados (DINAN, 2001).

A síntese de fitoecdisteróides em células vegetais *in vitro* foi registrada pela primeira vez em *Achyranthes* sp. (HIKINO et al., 1971) e desde então a cultura de tecidos tem contribuído com os estudos visando o entendimento da rota metabólica desses compostos. Diferentemente dos insetos, as plantas são capazes de produzir fitoecdisteróides a partir do ácido mevalônico. Contribuição importante também para a compreensão da via de biossíntese dessas substâncias foi conduzida por Reixach et al. (1996) que utilizaram *Polypodium vulgare* cultivada *in vitro* e demonstraram que o mevalonato e o colesterol marcados radioativamente, foram incorporados em todos os fitoecdisteróides identificados.



**Figura 1.** Estrutura química da 20-hidroxicdisona (20E) (Fonte: SciFinder Scholar – CAS 5289-74-7). Ribeirão Preto, SP, 2008.

Grebenok et al. (1994) trabalhando com *Spinacea oleracea* (espinafre) demonstraram que os ecdisteróides polifosforilados e os conjugados estão envolvidos na regulação da biossíntese. Em um outro estudo com a mesma espécie foi demonstrado que a hidroxilação da ecdisona no carbono 20 para formar a 20E é catalisada pela enzima ecdisona-20-monoxigenase (EC. 1.14.99.22) em uma reação dependente do citocromo P450 que ocorre predominantemente na fração microsomal (GREBENOK et al., 1996).

Dinan (2001) considera necessária mais ênfase na elucidação da rota biossintética dos fitoecdisteróides diante do potencial desses compostos. A modificação nos seus perfis e nos níveis encontrados nos vegetais por engenharia genética é possível e está relacionada ao conhecimento das vias metabólicas e da sua regulação.

Em certos vegetais já foi observado que a síntese de fitoecdisteróides é aumentada em resposta ao ataque por insetos, danos mecânicos, herbivoria e também pela presença do jasmonato (DINAN, 2001). Para Harborne (1998) é relevante o estudo sobre a ocorrência de ecdisteróides em animais e em plantas para o entendimento evolutivo desses seres e de sua capacidade adaptativa. A atividade biológica dessas substâncias e sua função ecológica na interação química entre vegetais e insetos evidenciam a sua importância (VANEK et al., 1990).

Os nematóides também pertencem ao clado Ecdysozoa, portanto, é provável que possuam regulação hormonal semelhante à dos insetos para a ecdise (AGUINALDO et al., 1997 *apud* SORIANO et al., 2004). Estudos comprovaram que os ecdisteróides possuem atividade biológica em nematóides (NELSON e RIDDLE, 1984), assim, os fitoecdisteróides desempenham um importante papel de defesa também contra os nematóides (SORIANO et al., 2004).

Soriano et al. (2004) inocularam três espécies de nematóides em *Spinacea oleracea* e verificaram que *Pratylenchus neglectus*, *Heterodera schachtii* e *Meloidogyne javanica* induziram a biossíntese de 20-hidroxiecdisona (20E). Foram verificados vários efeitos do fitoecdisteróide sobre os parasitas: ecdise anormal, a imobilidade, a redução quanto a invasão, a diminuição do desenvolvimento e a morte dos nematóides expostos diretamente à 20E. Além disso, foi constatada a capacidade de síntese *de novo* de 20E nas plantas não inoculadas, mas expostas à aplicação de metil jasmonato (MJ). O ecdisteróide 20E foi o principal composto induzido por metil jasmonato que afetou os nematóides avaliados. Os autores consideraram que o conhecimento dos níveis de fitoecdisteróides em plantas economicamente importantes pode ser útil no controle de populações de nematóides.

Nas últimas três décadas foi descrita a estrutura de mais de 200 tipos de fitoecdisteróides em centenas de espécies vegetais. A possibilidade do uso desses compostos no controle de pragas agrícolas, na biologia de insetos transmissores de doenças e em estudos farmacológicos tem atraído a atenção de vários pesquisadores. Ainda não está claro o papel biológico da extensiva variedade dessas substâncias, mas, numerosos análogos estruturais fornecem um excelente recurso para as investigações sobre a atividade fisiológica e bioquímica. A continuidade das pesquisas sobre a distribuição desses metabólitos nos vegetais pode contribuir com uma possível implicação quimiotaxonomica e ecológica (DINAN, 2001).

#### **4.4 *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen**

A família Amaranthaceae é formada atualmente por 170 gêneros com cerca de 2000 espécies, ocorrendo nos trópicos, subtropicais e regiões temperadas da América e da África. No Brasil ocorrem vinte gêneros e aproximadamente 100 espécies da família (SOUZA e LORENZI, 2005). Alguns exemplos importantes de Amaranthaceae são: *Celosia*,

*Amaranthus*, *Gomphrena*, *Pfaffia*, *Iresine*, *Alternanthera* e *Chamissoa* (BARROSO et al., 1978).

O gênero *Pfaffia* foi determinado por Martius em 1826, sendo o nome em honra ao cientista alemão Cristian Heinrich Pfaff (SMITH e DOWNS, 1972). O gênero possui padrão de distribuição geográfica do tipo Amplo Interamericano, isto é, somente no continente americano, a maioria no Brasil (SIQUEIRA, 1994). Em *Pfaffia* as espécies estão distribuídas em três seções: *Pfaffia*, *Serturnera* e *Hebanthe*, e são consideradas de importância alimentar e medicinal, especialmente aquelas denominadas como “ginseng” brasileiro, entre as quais estão *P. glomerata*, *P. gnaphalioides* (L. f.) Mart., *P. iresinoides* (Kunth) Spreng., *P. paniculata* (Mart.) O. Kuntze [(*Hebanthe paniculata* (Mart.))] e *P. tuberosa* (Spreng.) Hicken.

*Pfaffia glomerata* ocorre em vários estados do Brasil e países limítrofes da região Sul. É comum encontrá-la na beira de rios e nas orlas das matas de galerias, onde podem receber bastante luz, pois é uma espécie hidrófita e heliófita (SMITH e DOWNS, 1972). A planta é típica também de campos de inundação de rios e é freqüente no cerrado e matas do estado de Mato Grosso do Sul (POTT e POTT, 1994). A distribuição geográfica de *P. glomerata* é ampla, ocupando condições climáticas e edáficas diferentes, resultando em populações com variabilidade genética (MAGALHÃES, 2000).

A principal área de ocorrência de *P. glomerata* localiza-se às margens do rio Paraná, na divisa entre os estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul e Paraná. O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) classifica a formação vegetacional dessa região como Floresta Estacional Semidecidual (IBGE, 1992). A região possui clima do tipo “Tropical subquente úmido” com um a dois meses secos por ano, tipo Cwa conforme a classificação de Köppen de 1948 (NIMER, 1977). O regime de precipitação pluviométrica caracteriza-se por totais anuais entre 1.200 a 1.500 mm, a média de umidade relativa do ar é de 75%. A espécie desenvolve-se melhor em uma temperatura média anual em torno de 22°C, com média das máximas de 32°C e média das mínimas de 16,0°C; abaixo desta temperatura, a planta paralisa seu desenvolvimento (CORRÊA JÚNIOR, 2004).

*Pfaffia glomerata* é uma espécie perene, de porte herbáceo a arbustivo, conhecida também pelos nomes populares de “ginseng” do pantanal, corango, corrente, sempre-viva, acônito, batata-do-mato, caxixe, para-tudo, raiz-da-vida, raiz-sagrada e raiz-da-longevidade.

A espécie apresenta entre suas principais características botânicas: raízes de consistência tuberosa, ocorrendo uma parte de origem caulinar, onde podem ser encontradas gemas endógenas e exógenas, com capacidade de propagação (VASCONCELOS, 1986); o caule é ereto ou um pouco escandente, roliço, estriado, muitas vezes oco na parte superior, com nós engrossados e entrenós com até 23 cm de comprimento. As ramificações são predominantes dicotômicas, glabras ou pubescentes, principalmente os ramos jovens e nós. As folhas possuem pecíolos com até dois centímetros de comprimento, lâmina com forma e tamanho variando de linear-oblongas até largo-ovaladas, com 1-14 cm de comprimento e 0,3 cm a 4,5 cm de largura, sendo as superiores sempre menores. As inflorescências são capitulares, paleáceas, branco-amareladas; pedúnculos com 3 cm a 20 cm de comprimento, pubescentes, simples, di ou tricotômicos; cimosas, com capítulos menores que 8 mm de diâmetro, globosos, passando a espiciformes com a queda das flores inferiores; raque lanosa. As flores são todas hermafroditas. Fruto tipo utrículo; as sementes lenticulares apresentam formato cordiforme, coloração verde-clara quando imaturas e marrom-acastanhadas quando maduras, medindo um mm de diâmetro (VASCONCELOS, 1982). Na semente, com cerca de 1,5 mm de comprimento, o embrião é envolvido por endosperma farináceo e abundante (VASCONCELOS, 1986).

As raízes de espécies do gênero *Pfaffia* são usadas na medicina popular brasileira, especialmente como tônico, afrodisíaco e no controle do diabetes. Ainda, com base em dados etnobotânicos, as raízes e folhas da planta têm sido utilizadas ancestralmente como estimulantes gerais, tranqüilizantes, anti-reumáticas, antidiarréicas, antiinflamatórias, antidiabéticas, febrífugas, cicatrizantes internas e externas, anti-hemorroidicas, melhoria da visão e da memória e para o tratamento de distúrbios gástricos, artrite, artrose, anemia, astenia e dores (SILVA JÚNIOR e OSAIDA, 2005). O uso dessas espécies despertou o interesse no Japão e na Europa, que vêm importando quantidades cada vez maiores. Estima-se que, nos últimos anos o consumo aumentou 15% a 17% ao ano (CORRÊA JÚNIOR et al., 2002).

Shiobara et al. (1993) analisando a composição química das raízes de *P. glomerata* detectaram a presença de substâncias com atividade adaptógena (característica farmacológica de promover aumento da resistência), como ácido glomérico (triterpenóide), ácido pfamérico (nortriterpenóide), ecdisterona, rubrosterona, ácido oleanólico e  $\beta$ -glicopiranosil oleanolato. Nishimoto et al. (1986) encontraram ecdisterona nas raízes de *P. iresinoides* Spreng. substância existente em outras espécies do gênero e que são empregadas

usualmente no processamento de fitoterápicos. O fitoecdisteróide 20-hidroxiecdisona (20E) também é citado como ecdisterona e  $\beta$ -ecdisona, sendo este o mais utilizado na literatura quando em referência à *Pfaffia glomerata*.

A raiz de *P. glomerata* tem componentes que atuam na regeneração das células, na purificação do sangue, na inibição do crescimento de células cancerígenas, na regularização das funções hormonais e sexuais e como bioenergético (NISHIMOTO *et al.*, 1986; NISHIMOTO *et al.*, 1987; SHIOBARA *et al.*, 1993).

Investigações recentes sobre os aspectos da morfogênese e da calogênese de *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* e a avaliação da produção de  $\beta$ -ecdisona em plantas micropropagadas, clones e calos *in vitro*, revelaram a necessidade de se ampliar as pesquisas químicas, biológicas e farmacológicas. Verificou-se que as técnicas de cultivo *in vitro* adotadas possibilitaram a produção de  $\beta$ -ecdisona a partir de calos e/ou órgãos cultivados *in vitro* fornecendo subsídios para estudos biossintéticos de vários metabólitos de importância econômica e farmacológica encontrados nessas espécies (FLORES, 2006).

Em um dos estudos farmacológicos conduzidos com *P. glomerata*, Marques (1998) avaliou o efeito adaptogênico da espécie. O liofilizado e o extrato seco padronizado das raízes apresentaram baixa toxicidade em roedores e humanos, promoveu benefício na aprendizagem e na memória de ratos idosos tratados cronicamente. Os produtos também melhoraram o desempenho de voluntários idosos normais em testes psicométricos, particularmente, nos aspectos cognitivos, na atenção, na memória de curto prazo e na memória declarativa. Causaram algum prejuízo na praxia e na orientação geral desses voluntários testados em bicicleta ergométrica.

As raízes de várias espécies de *Pfaffia* são comercializadas como “ginseng brasileiro” o que pode levar a adulterações. Estudos têm sido realizados visando à definição e validação de métodos de controle de qualidade, como por exemplo, a quantificação das saponinas de *Pfaffia glomerata* por espectrofotometria (VIGO *et al.*, 2003). Em outro trabalho Vigo *et al.* (2004) caracterizaram comparativamente *P. glomerata* e *Hebanthe paniculata* sob o aspecto da farmacognosia e os resultados obtidos permitiram diferenciar as duas espécies com base nos dados botânicos, físico-químicos, qualitativos e quantitativos.

Espécies do gênero *Pfaffia* também são utilizadas em substituição ao “ginseng” coreano (*Panax spp*, Araliaceae). Considerando a deficiência de critérios de qualidade para estas matérias-primas vegetais, foi estabelecido método químico por

Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para a diferenciação entre as espécies mencionadas (ZIMMER et al., 2005). A mesma autora também validou, uma metodologia simples e rápida para quantificação de ecdisterona em extratos de *P. glomerata*, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (ZIMMER et al., 2006).

A partir dos vários estudos sobre as atividades farmacológicas dos compostos presentes nas raízes de *P. glomerata* e de outras espécies do gênero houve um grande interesse comercial. Assim, intensificou-se a exploração predatória das populações naturais da espécie, justificando as pesquisas para viabilizar planos de manejo sustentável nas áreas de ocorrência, projetos visando a produção comercial e o estabelecimento de bancos e coleções de germoplasma, fundamentais para amenizar a pressão ecológica sobre a espécie (MONTANARI JUNIOR et al., 1999).

Desta forma, vários trabalhos foram realizados sobre a propagação vegetativa por estaquia em *P. glomerata* (Lazzarini et al., 2001; Ming et al., 2002; Montanari Junior et al., 2002; Nicoloso et al., 2001a). Também foi desenvolvido um protocolo eficiente, reproduzível e rápido de micropropagação do “ginseng” brasileiro permitindo a obtenção de aproximadamente 15.000 plantas a partir de um único explante, num período de seis meses. Após dois meses de aclimação das mudas foi obtido 95% de sucesso no transplante a campo (Nicoloso et al., 2001b).

Adicionalmente às investigações sobre a propagação vegetativa foram realizados ensaios de campo referentes a espaçamento, a época de plantio e de colheita, secagem e rendimento, os quais são indispensáveis para que a implantação do sistema de produção agrícola possa ser efetivada. (CORRÊA JÚNIOR et al., 2002; MAGALHÃES, 2000; MONTANARI JUNIOR et al., 1999).

Para ampliar a viabilidade da produção comercial, experimentos sobre a germinação das sementes de *P. glomerata* foram conduzidos por vários autores. Assim, a literatura mostra índices de germinação variando de 50% a 95% (MAGALHÃES et al., 1994; MATTOS e SALIS, 2004; MENDES et al., 2004; RIBEIRO e PEREIRA, 1994; SILVA JÚNIOR e OSAIDA, 2005). A variação nos resultados pode ser devida aos diferentes tipos de substratos utilizados em cada pesquisa.

Sementes de *P. glomerata* foram submetidas a tratamentos com baixa temperatura associados a diferentes concentrações de GA<sub>3</sub>, com ou sem a presença de luz. Não foram obtidas diferenças significativas entre a germinação de sementes de *P. glomerata* na luz

ou no escuro, indicando ser esta uma espécie fotoblástica neutra, característica da maioria das plantas cultivadas. As sementes não apresentaram dormência e nem necessitaram de GA<sub>3</sub> para germinar. O pré-resfriamento com ou sem adição de GA<sub>3</sub> reduziu a porcentagem de germinação (RENNER et al., 2007). Visando a conservação de sementes, estudos ainda são necessários para definir se a espécie é ortodoxa, intermediária ou recalcitrante.

Outra contribuição importante na área de produção agrícola foi o estudo pioneiro de Guerreiro (2006) sobre adubação orgânica em *P. glomerata*. Foi avaliado o desenvolvimento, a absorção de N, P e K e a produção de β-ecdisona em plantas cultivadas em função de diferentes doses de adubação orgânica com esterco de galinha (15, 30, 45 e 60 t/ha) e seis épocas de colheita: 60, 120, 180, 240, 300 e 360 dias após a emergência. O estudo concluiu que as plantas responderam a adubação até o limite de 30 a 45 t/ha de esterco de galinha curtido. A absorção dos macronutrientes pelas plantas de *P. glomerata* seguiu a seguinte ordem: K>N>P. O teor de β-ecdisona não sofreu influência das doses de esterco de galinha curtido nem das épocas de colheita, indicando ser uma variável não influenciada por estes fatores.

Um dos aspectos que pode dificultar o cultivo de *P. glomerata* é a ocorrência de doenças. Mattos (1993) relata que a espécie é suscetível ao fungo *Uromyces platensis*, principalmente em ambientes com temperatura em torno de 25°C combinadas com fotoperíodo de 12 horas. Mota et al. (2004) identificaram nas folhas de *P. glomerata* uma espécie de potyvirus denominado mosaico da *Pfaffia* (*PfMV*), os ensaios demonstraram que esse vírus reduziu significativamente o crescimento da planta.

A busca de genótipos de *Pfaffia glomerata* resistentes a doenças é imprescindível para viabilizar o cultivo em escala comercial. Nesse sentido, Araújo et al. (1994) avaliaram acessos de dezenove procedências de *P. glomerata* quanto à resistência ao nematóide das galhas *Meloidogyne javanica*. Os resultados evidenciaram um acesso suscetível, três acessos altamente suscetíveis e dois resistentes. Em outro estudo, Carneiro et al. (2007) identificaram os nematóides *Meloidogyne javanica*, *M. incognita* e *Meloidogyne* sp., causando sérios danos ao sistema radicular de *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia paniculata*, no Distrito Federal. Essas espécies de *Meloidogyne* ocorreram em populações mistas, em condições de campo, com a predominância de *M. javanica*. Foi verificada ainda alta suscetibilidade das duas espécies de *Pfaffia* à *M. javanica*. Os autores relataram também que o sistema radicular de *P. glomerata* apresentou grande número de galhas e produziu menos massa das raízes do que a

testemunha. Por outro lado, em *P. paniculata* as raízes mostraram-se engrossadas e necrosadas, com produção maior de massa quando comparada com a planta sadia.

Gomes (2006) selecionou acessos de *P. glomerata* quanto à resistência ao nematóide *Meloidogyne incognita* raça 1, encontrando materiais altamente resistentes, resistentes, suscetíveis e altamente suscetíveis. Foram comparadas também as respostas histológicas quanto à infestação por *M. incognita* de um acesso resistente e de um acesso suscetível. A resistência esteve associada a um fator não identificado que limitou a entrada do nematóide e a uma resposta bioquímica que se manifestou após a infecção.

Estudos sobre a diversidade e distância genética podem auxiliar na coleta e na ampliação da variabilidade dos genótipos de um banco de germoplasma, além disso, são extremamente úteis na avaliação de duplicações, gerando economia de tempo e recursos. As investigações sobre a diversidade genética também fornecem informações importantes sobre a estrutura de populações naturais. Esses dados são úteis para detectar se a espécie já está prejudicada pelo seu pequeno tamanho ou se existem algumas subpopulações com maior variabilidade que outras.

Análises sobre a diversidade genética de quatro populações naturais de *P. glomerata* da região de Ilha Grande, PR, por meio de caracterização fenotípica e do marcador molecular RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* – Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) indicaram menores níveis de dissimilaridade entre os indivíduos e maiores entre as populações, sugerindo que novas coletas de germoplasma seriam relevantes para o incremento da diversidade genética em coleções e bancos de germoplasma da espécie (KAMADA, 2006).

Uma coleção de *Pfaffia glomerata* com 23 acessos oriundos das várias regiões do Brasil foi avaliada em Campos de Goytacazes, RJ. Todos os parâmetros usados para comparação tais como: peso da matéria fresca da parte aérea e raiz, o número de folhas, o peso da matéria seca da parte aérea e raiz, o índice de colheita e o teor de  $\beta$ -ecdisona, apresentaram diferenças significativas entre os acessos, indicando variabilidade genética (FIGUEIREDO et al., 2004).

Corrêa Junior (2004) também observou diferenças nas características morfológicas entre e dentro de populações de *Pfaffia* coletadas no local de ocorrência natural, no estado do Paraná. Em área experimental constatou-se uma grande variação entre os acessos em

relação a formação das mudas, produção de biomassa e conteúdo de  $\beta$ -ecdisona, bem como na resposta à alteração das condições ambientais.

A caracterização citogenética vegetal tem sido utilizada, entre outros, para estabelecer relações genômicas nas pesquisas biossistemáticas e como contribuição aos programas de melhoramento das culturas. O primeiro estudo citogenético realizado com *P. glomerata* avaliou dez populações naturais e cultivadas do sul do Brasil e norte da Argentina. Nove populações apresentaram  $2n=34$  e uma  $2n=32, 33$ . Apesar dos cromossomos serem pequenos, um par de cromossomos satélite foi registrado no cariótipo de todas as populações. Os cromossomos foram predominantemente do tipo metacêntrico e submetacêntrico. Na interfase a estrutura da cromatina apresentou-se do tipo areticulado nas populações analisadas. A presença de grande quantidade de cromatina condensada durante a prófase foi considerada uma característica importante na evolução do gênero (TASCETTO e PAGLIARINI, 2003).

Uma das características de *Pfaffia glomerata* é produzir uma grande quantidade de inflorescências em praticamente todos os meses do ano, esta particularidade pode conferir uma função ecológica para a espécie. Neste sentido, Leite et al. (2005) avaliaram os artrópodes (espécies e densidades) associados às flores de três acessos de *Pfaffia glomerata*: NAT, de Natividade, RJ, ROST, de Rio das Ostras, RJ e GSD1, de Campinas, SP, visando a possibilidade de seu uso como atrativo de fitófagos ou de inimigos naturais. O estudo permitiu recomendar o acesso NAT como bordadura em culturas que são atacadas por *Aphis gossypii* (Glover) (Homoptera: Aphididae) por servir de planta-isca bem como manter parasitóides e predadores que controlam as populações do pulgão. Já os acessos ROST e GSD1 foram considerados fonte alternativa de néctar e pólen para atrair os inimigos naturais de outras culturas.

A exploração das populações naturais de *Pfaffia glomerata* é realizada principalmente por trabalhadores volantes e pequenos agricultores. Esse tipo de atividade constitui-se numa complementação da renda familiar e é a única fonte de recursos que estes trabalhadores obtêm fora de suas propriedades. Os agricultores colhem, anualmente, 16.440 kg de raízes ao longo de oito meses de trabalho. Com isso, a renda média por família obtida com a coleta da *P. glomerata* é de US\$ 2.220,00 ao ano (CORRÊA JUNIOR, 2003).

A queimada é o recurso mais empregado pelos extratores para facilitar a localização das plantas de *P. glomerata*, pois são as primeiras a emergir após a queima. Promotorias de meio ambiente vêm exercendo trabalhos no sentido de proibir a extração de

*Pfaffia glomerata* na região de ocorrência natural no Paraná. Em diferentes locais no oeste deste estado alguns produtores têm cultivado e expandido o cultivo da espécie para a comercialização interna e exportação para os países asiáticos (TASCETTO e PAGLIARINI, 2003).

A coleta de germoplasma de *P. glomerata* em populações naturais, ainda não amostradas, é uma ação importante visando capturar maior variabilidade genética e contribuir para a conservação da espécie. Por outro lado, é extremamente relevante para a segurança e manutenção dos acessos coletados, que sejam conservados também *in vitro*, visto que, já existem vários estudos de otimização dos protocolos de micropropagação para a espécie (NICOLOSO et al., 2001). A avaliação deste germoplasma mantido em bancos e coleções é uma estratégia fundamental para a sua utilização.

Dentro deste contexto o presente trabalho teve como objetivos coletar germoplasma de *Pfaffia glomerata*, avaliar características morfológicas e determinar o teor do princípio ativo nos acessos de uma coleção. Ainda, verificar a presença de nematóide de galhas nas raízes e a ocorrência de insetos nas plantas em experimento de campo. Além disto, o estudo visou estabelecer um banco de germoplasma *in vitro* para a espécie.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Coleção de germoplasma

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- (Unesp/Botucatu), SP, o Instituto Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural (Emater-PR) e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa, DF) num esforço conjunto para conservar a variabilidade genética de *Pfaffia glomerata* realizaram uma coleta de germoplasma em populações naturais na principal região de ocorrência da espécie, localizada na divisa entre os estados de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul, em 2001. O local também é a área de maior exploração extrativista predatória de *P. glomerata*. O material coletado compõe uma coleção de germoplasma conservada na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. “Voucher” encontra-se depositado no herbário CEN da Embrapa, DF, sob o número de tombo 62.024. No presente estudo foram avaliadas oito populações em experimento de campo, cinco acessos foram obtidos da coleção da Embrapa. A seguir a descrição dos locais de coleta:

1) Local da coleta: ambiente cultivado em área de posto, na beira do rio Ivaí, Querência do Norte, PR, a 233m de altitude, latitude de 23°13'09.2”S e longitude de 53°34'07.6”O. Foram coletados 23 indivíduos, coletor e número de coleta: Roberto Fontes Vieira (RFVieira-2202);

2) Local da coleta: ambiente de capinzal na Ilha do Mineiro, a 5km de porto Natal, Querência do Norte, PR, a 239m de altitude, latitude de 23°07'27”S e longitude de 53°38'49.9”O. Foram coletados 24 indivíduos, coletor e número de coleta: RFVieira-2205;

3) Local da coleta: beira de estrada entre os municípios de Porto Primavera e Porto S. José, Bataiporã, MS, a 239m de altitude, latitude de 22°33'24.1"S e longitude de 53°06'13.9"O. Foram coletados 27 indivíduos, coletor e número de coleta: RFVieira-2209;

4) Local da coleta: sub-bosque com vegetação perturbada, área sobre bosque com Embaúba, na Ilha do Marçal, Prainha, Vila Alta, PR, a 232m de altitude, latitude de 23°23'09.7"S e longitude de 53°50'02.1"O. Foram coletados 25 indivíduos, coletor e número de coleta: RFVieira-2216;

5) Local da coleta: beira barranco com mata de Embaúba na extremidade norte da Ilha Grande, PR, a 233m de altitude, latitude de 23°23'45.1"S e longitude de 53°49'21.5"O. Foram coletados 20 indivíduos, coletor e número de coleta: RFVieira-2211.

## 5.2 Coleta de germoplasma

Foram realizadas duas coletas de *Pfaffia glomerata* em locais que ainda não haviam sido amostrados visando ampliar a variabilidade genética da coleção de germoplasma da Embrapa. A primeira expedição foi realizada em março de 2004, ao município de Itatinga, SP, onde os acessos foram coletados em ilhas, às margens do rio Santo Inácio e em barrancos do rio Tamanduá. A segunda viagem de coleta, em setembro de 2006, amostrou populações de *P. glomerata* localizadas às margens do rio Paraguai, em Corumbá e Ladário, MS e às margens do rio Miranda, no Pantanal sul mato-grossense.

Os roteiros das viagens foram estabelecidos com base em dados da literatura especializada, em herbários e a partir de informações obtidas de pesquisadores e extensionistas. Para os acessos coletados no Pantanal sul mato-grossense contou-se com informações valiosas do Dr. Arnildo Pott, Embrapa Gado de Corte.

As expedições tiveram a participação dos seguintes professores e pesquisadores: Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira (Universidade de Ribeirão Preto, Unaerp, SP), Prof. Dr. Lin Chau Ming (Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita, Unesp-Botucatu, SP), Engenheira Agrônoma, Mestre, Cristiane Porto Viegas Guerreiro.

Os dados botânicos das plantas, as informações sobre a vegetação local, sobre o solo, a localização geográfica (latitude, longitude e altitude) obtida pelo Sistema de Posicionamento Global (GPS), entre outros, foram devidamente anotados em caderneta de coleta.

O tamanho da amostra foi definido em função do número de indivíduos presentes em cada população, em média 35 indivíduos coletados ao acaso. A unidade de coleta consistiu da planta individual da qual foram recolhidos ramos, para a obtenção de estacas com pelo menos dois nós. Essas foram envolvidas em papel-toalha umedecido, colocadas em sacos plásticos numericamente identificados e acondicionadas em caixas de isopor até o plantio.

Material botânico fértil foi coletado para confecção de “voucher” e encaminhado para identificação taxonômica ao especialista da família Amaranthaceae, Prof. Dr. Josafá Carlos de Siqueira do Herbário Friburgense (FCAB), RJ. As exsicatas foram depositadas nos seguintes herbários brasileiros: Herbário de Plantas Medicinais da Unaerp (HPMU), números de registro HPMU 1298 a HPMU 1304 e Herbário Friburgense (FCAB), RJ, números de registro FCAB 6092; FCAB 6095 e FCAB 6098.

As estacas coletadas foram plantadas em sacos de polietileno preto (10x22cm) com solo e colocadas em telado para o crescimento das plantas matrizes, no departamento de Biotecnologia da Unaerp, Ribeirão Preto, SP.

Descrição dos locais da coleta de germoplasma ao município de Itatinga, SP, e da coleta no Pantanal sul mato-grossense:

1) Local da coleta: ambiente de vegetação nativa perturbada, à margem do rio Santo Inácio, em Itatinga, SP, a 570 m de altitude, latitude 23°28'76"S, longitude 48°56'34"O; foram coletados 37 indivíduos; coletores LRC (iniciais dos primeiros nomes de Lin Ming, Rosa Alves e Cristiane Guerreiro), número de coleta 1 (primeiro ponto de coleta);

2) Local da coleta: ambiente de vegetação secundária, em barranco do rio Tamanduá, em Itatinga, SP, a 570 m de altitude, latitude 23°27'95"S, longitude 48°55'59"O; foram coletados 23 indivíduos; coletores LRC 2;

3) Local da coleta: ambiente de vegetação nativa perturbada, em ilha do rio Santo Inácio, em Itatinga, SP, a 570 m de altitude, latitude 23°27'97"S, longitude 48°54'80"O; foram coletados 28 indivíduos; coletores LRC 3;

Descrição dos locais da coleta de germoplasma no Pantanal sul mato-grossense:

1) Local da coleta: margem de um braço do rio Miranda, no km 658 da BR 262, MS, a 98m de altitude, latitude de 19°43'01,6"S e longitude de 56°59'17,2"O. Foram coletados 20 indivíduos, coletor: Ana Maria Soares Pereira (A.M.S.Pereira) et al., número de coleta: MIR 1(primeiro ponto de coleta em Miranda);

2) Local da coleta: margem do rio Paraguai, oposta à Corumbá, entrada do "bracinho", MS, a 96m de altitude, latitude de 19°00'21,9"S e longitude de 57°32'07"O. Foram coletados 26 indivíduos, coletor: A.M.S.Pereira et al., número de coleta PAR 1 (primeiro ponto de coleta no rio Paraguai);

3) Local da coleta: margem do rio Paraguai, mesma margem de Corumbá, MS, a 88m de altitude, latitude de 19°01'17,2"S e longitude de 57°29'13,3"O. Foram coletados 33 indivíduos, coletor: A.M.S.Pereira et al., número de coleta PAR 2;

4) Local da coleta: BR 262 Km 576, ponte do rio Salobra, Miranda, MS, a 90m de altitude, latitude de 20°11'20,3"S e longitude de 56°30'15,8"O. Foram coletados 27 indivíduos, coletor: A.M.S.Pereira et al., número de coleta MIR 2;

h) Local da coleta: BR 262 Km 576, margem do rio Miranda, Miranda, MS, a 99m de altitude, latitude de 20°11'56,2"S e longitude de 56°30'05,7"O. Foram coletados 25 indivíduos, coletor: A.M.S.Pereira et al., número de coleta MIR 3.

### **5.3 Cultivo *in vitro***

#### **5.3.1 Assepsia dos explantes**

As plantas matrizes obtidas a partir das estacas coletadas em Itatinga, SP e no Pantanal, MS, foram colocadas em telado no departamento de Biotecnologia da Unaerp, para fornecimento de explantes visando o cultivo *in vitro*. Inicialmente, procedeu-se a assepsia dessas plantas. Os materiais foram borrifados com Cercobin® 700 a 1% (P/V) por uma semana. Ramos de 20 a 30 cm e com cerca de cinco nós foram lavados com detergente Tween 20 removido com água corrente. Os explantes consistiram de segmentos nodais com cerca de 1,0 cm de comprimento com duas gemas e sem folhas.

Os propágulos foram imersos em solução contendo os fungicidas: a) Cercobin® 700 PM a 1%, b) Captan a 1% e c) Captan 1% + Cercobin 1% para descontaminação (Tabela 2). Amostras contaminadas por bactéria foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia da Unaerp para identificação da espécie. A partir dos resultados obtidos no antibiograma foram realizados testes utilizando-se o antibiótico cefotaxima sódica (Tabela 3).

**Tabela 2.** Tratamentos utilizados para descontaminação de explantes de *Pfaffia glomerata*, Ribeirão Preto, SP, 2005.

Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3
Cercobin 1% 2 h, sob agitação.	Captan 1% por 2h, sob agitação	Cercobin 1% por 1 h, sob agitação.
Lavagem em álcool 70% 30 s	Lavagem em álcool 70% 30 s	Captan 1% por 1h
Hipoclorito de cálcio 0,5%, 15min.	Hipoclorito de cálcio 0,5%, 15 min.	Lavagem em álcool 70% 30 s
		Hipoclorito de cálcio 0,5%, 15 min.

**Tabela 3.** Tratamentos com antibiótico cefotaxima sódica 0,2% em tempos diferentes (h) para avaliar a descontaminação bacteriana em explantes de *Pfaffia glomerata*. Ribeirão Preto, SP, 2005.

Tratamento 1	Tratamento 2
Cercobin 1% por 2 h sob agitação.	Cercobin 1% por 2 h sob agitação.
Álcool 70% por 30 s.	Álcool 70% por 30 s
Hipoclorito de cálcio 0,5% por 15 min.	Hipoclorito de cálcio 0,5% por 15 min.
Cefotaxima sódica 0,2% por 3h.	Cefotaxima sódica 0,2% por 24h.

Foi realizado teste com a cefotaxima sódica nas concentrações de 0,2% a 1% por 24h (Tabela 4). O antibiótico sulfato de gentamicina 1% isoladamente e combinado com cefotaxima sódica 1% também foi utilizado para o controle bacteriano (Tabela 5).

**Tabela 4.** Testes com o antibiótico cefotaxima em diferentes concentrações (%) para controle bacteriano em explantes de *Pfaffia glomerata*. Ribeirão Preto, SP, 2005

Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4	Teste 5
Cercobin 1% por 2h, sob agitação.	Cercobin 1% por 2h, sob agitação.	Cercobin 1% por 2h, sob agitação.	Cercobin 1% por 2h, sob agitação.	Cercobin 1% por 2h, sob agitação.
Lavagem em álcool 70% por 30 s	Lavagem em álcool 70% 30s	Lavagem em álcool 70% 30s	Lavagem em álcool 70% 30s	Lavagem em álcool 70% 30s
Hipoclorito de cálcio 0,5% 15min	Hipoclorito de cálcio 0,5% 15min	Hipoclorito de cálcio 0,5% 15min	Hipoclorito de cálcio 0,5% 15min	Hipoclorito de cálcio 0,5% 15min
Cefotaxima 0,2% 24h	Cefotaxima 0,4% 24h	Cefotaxima 0,6% 24h	Cefotaxima 0,8%, 24h	Cefotaxima 1%, 24h

**Tabela 5.** Testes com os antibióticos gentamicina e cefotaxima para controle bacteriano em explantes de *Pfaffia glomerata*. Ribeirão Preto, SP, 2005

Teste 1	Teste 2	Teste 3
Cercobin 1%, 2 h, sob agitação.	Cercobin 1%, 2 h, sob agitação.	Cercobin 1%, 2 h, sob agitação.
Lavagem em álcool 70%, 30 s	Lavagem em álcool 70%, 30 s	Lavagem em álcool 70%, 30 s
Hipoclorito de cálcio 0,5%, 15min	Hipoclorito de cálcio 0,5%, 15min	Hipoclorito de cálcio 0,5%, 15min
Gentamicina 1%, 48 h	Cefotaxima 1%, 48 h	Cefotaxima 1% + Gentamicina 1%, 48 h

Após avaliação dos resultados foram realizados outros testes utilizando os antibióticos gentamicina e cefotaxima em diferentes concentrações e tempo de exposição (Tabelas 6, 7 e 8).

**Tabela 6.** Avaliação dos antibióticos cefotaxima e gentamicina 0,1% por 48 horas no controle bacteriano em explantes de *Pfaffia glomerata*. Ribeirão Preto, SP, 2005.

Teste 1	Teste 2	Teste 3
Cercobin 1%, 2 h, sob agitação.	Cercobin 1%, 2 h, sob agitação.	Cercobin 1%, 2 h, sob agitação.
Lavagem em álcool 70%, 30 s	Lavagem em álcool 70%, 30 s	Lavagem em álcool 70%, 30 s
Hipoclorito de cálcio 0,5% 15min	Hipoclorito de cálcio 0,5% 15min	Hipoclorito de cálcio 0,5%, 15min
Gentamicina 0,1%, 48h	Cefotaxima 0,1%, 48h	Gentamicina 0,1% + Cefotaxima 0,1%, 48h

**Tabela 7.** Avaliação dos antibióticos cefotaxima e gentamicina 0,1% por 36 horas no controle bacteriano em explantes de *Pfaffia glomerata*. Ribeirão Preto, SP, 2005.

Teste 1	Teste 1	Teste 1
Cercobin 1%, 2 h, sob agitação.	Cercobin 1%, 2 h, sob agitação.	Cercobin 1%,2 h, sob agitação.
Lavagem em álcool 70%, 30 s	Lavagem em álcool 70%, 30 s	Lavagem em álcool 70%, 30 s
Hipoclorito de cálcio 0,5%, 15min	Hipoclorito de cálcio 0,5%, 15min	Hipoclorito de cálcio 0,5%, 15min
Gentamicina 0,1%, 36h	Cefotaxima 0,1%, 36h	Gentamicina 0,1% + Cefotaxima 0,1%, 36h

**Tabela 8.** Avaliação do antibiótico cefotaxima em diferentes concentrações (%) por 48 horas no controle bacteriano em explantes de *Pfaffia glomerata*. Ribeirão Preto, SP, 2005.

Teste 1	Teste 1	Teste 1
Cercobin 1%, 2 h, sob agitação.	Cercobin 1%, 2 h, sob agitação.	Cercobin 1%,2 h, sob agitação.
Lavagem em álcool 70%, 30 s	Lavagem em álcool 70%, 30 s	Lavagem em álcool 70%, 30 s
Hipoclorito de cálcio 0,5%, 15min	Hipoclorito de cálcio 0,5%, 15min	Hipoclorito de cálcio 0,5%, 15min
Cefotaxima 0,1%, 36h	Cefotaxima 0,5%, 36h	Cefotaxima 1%, 36h

O delineamento experimental para todas as avaliações foi o inteiramente casualizado com cinco repetições, sendo que cada repetição era composta por quatro parcelas experimentais. Foram utilizados frascos de vidro de 8 cm de altura x 5,5cm de diâmetro (cubeta) com tampa de plástico. Em cada frasco foi adicionado cerca de 7mL de meio de cultivo MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e um segmento nodal. O meio de cultura MS basal foi acrescido de 3% de sacarose e solidificado com Phytigel®, o pH foi ajustado para 5.8. Procedeu-se autoclavagem a 1 atmosfera de pressão (atm), a 120°C, por 15 minutos Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2$  °C, umidade relativa de  $60 \pm 5$  %, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de  $40 \mu\text{moles.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpada fluorescente branca, e avaliados após 10 dias da inoculação quanto ao índice de contaminação.

## 5.4 Caracterização morfológica

### 5.4.1 Material vegetal

As características morfológicas e o teor do princípio ativo foram avaliados em oito populações de *P. glomerata*, em experimento de campo. Cinco populações foram obtidas da coleção de germoplasma da Embrapa e três originaram-se da coleta ao município de Itatinga, SP. As populações foram numeradas de 1 a 8 (P1 a P8), a seguir são descritas as oito populações de *P. glomerata*:

**Tabela 9.** Número da população, localização, número do coletor e posição geográfica das oito populações de *Pfaffia glomerata* avaliadas no experimento de campo, Ribeirão Preto, SP, 2005.

População	Local, município, UF	Número do coletor	Latitude	Longitude
P1	Beira do rio Ivaí, Querência do Norte, PR	RFVieira-2202	23°13'09.2" S	53°34'07.6" O
P2	Ilha do Mineiro, Querência do Norte, PR	RFVieira-2205	23°07'27" S	53°38'49.9" O
P3	Entre Porto Primavera e Porto S. José, Bataiporã, MS	RFVieira-2209	22°33'24.1" S	53°06'13.9" O
P4	Ilha do Marçal, Vila Alta, PR	RFVieira-2216	23°23'09.7" S	53°50'02.1" O
P5	Extremidade Norte da Ilha Grande, PR	RFVieira-2211	23°23'45.1" S	53°49'21.5" O
P6	Margem do rio Santo Inácio, Itatinga, SP	LRC-1	23°28'76" S	48°56'34" O
P7	Barranco do rio Tamanduá, Itatinga, SP	LRC-1	23°27'95" S	48°55'59" O
P8	Ilha à margem do rio Santo Inácio, Itatinga, SP	LRC-1	23°27'97" S	48°54'80" O

### 5.4.2 Cultivo das populações de *Pfaffia glomerata*

As mudas de *P. glomerata* para plantio no ensaio de campo e avaliação morfológica e do princípio ativo foram obtidas por micropropagação, no laboratório de cultura de tecidos do departamento de biotecnologia de plantas medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (Unaerp), SP.

De cada população foram avaliados dez indivíduos. Cerca de 30 segmentos nodais de cada indivíduo, após desinfestação, foram inoculados em meio de cultura MS acrescido de 3% de sacarose, pH 5,8. Os propágulos foram mantidos nesse meio por 40 dias, em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $60 \pm 5\%$ , fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de  $40 \mu\text{moles.m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpada fluorescente branca.

Após 40 dias as plântulas foram transferidas para sala com temperatura ambiente ( $32^\circ\text{C}$ ) por dez dias e após esse período foram retiradas dos frascos, as raízes lavadas com água corrente para retirada dos resíduos de meio de cultura e em seguida foram plantadas em bandejas de poliestireno com 72 células, contendo vermiculita e Plantmax® (2:1) como substrato. O plantio era realizado após as 16h para evitar transpiração excessiva. Cada célula era coberta com frascos de vidro e sobre as bandejas foram colocadas mini estufas de plástico, este procedimento possibilitou a formação de um micro clima favorável ao estabelecimento das plântulas.

As bandejas foram então levadas para casa de vegetação com temperatura média de  $29^\circ\text{C}$  e irrigação diária, por 30 dias. Em seguida, as plantas foram transferidas para sacos de polietileno preto (12 x 22 x 0,5cm) com solo e esterco de gado (3:1) como substrato, permanecendo 15 dias em ambiente protegido até o plantio na área experimental localizada no distrito de Jurucê, SP.

### **5.4.3 Área experimental**

O experimento de campo foi realizado no sítio “Casa Espírita Terra de Ismael”, distrito de Jurucê, município de Jardinópolis, SP, distante cerca de 25 km de Ribeirão Preto, localização geográfica  $21^\circ04'18,8''$  Sul,  $47^\circ44'08,8''$  Oeste, a 566 m de altitude. O solo da região é do tipo Latossolo vermelho amarelo. Segundo a classificação de Köppen o clima é o subtropical Cwa, já na distribuição climática de “Thorntwaite” o tipo climático é o Mesotérmico úmido (FERREIRA, 2007).

Amostras de solo de três locais da área foram coletadas e reunidas numa amostra composta para a análise química e física e avaliação da disponibilidade dos

nutrientes, realizada no Laboratório de Química Agrícola da Unaerp, Ribeirão Preto, SP (Tabela 10 e 11).

**Tabela 10.** Análise de macronutrientes e micronutrientes do solo na área experimental localizada no distrito de Jurucê, município de Jardinópolis, SP, 2005 e 2006.

M.O.	pH	P	K	Ca	Mg	Al	S-SO <sub>4</sub>	SB	H+Al	CTC	V	B	Cu	Fe	Mn	Zn
g/dm <sup>3</sup>	CaCl <sup>2</sup>	resina mg/dm <sup>3</sup>	mmol/dm <sup>3</sup>				mg/dm <sup>3</sup>	mmol/dm <sup>3</sup>			%	mg/dm <sup>3</sup>				
45	5,7	26	1,9	91	14	-	6	106,9	31	140,9	76	0,16	0,4	14	7,9	1,3

M.O. - matéria orgânica; SB - soma de bases; H+Al - acidez potencial; CTC - capacidade de troca catiônica; V - saturação de bases

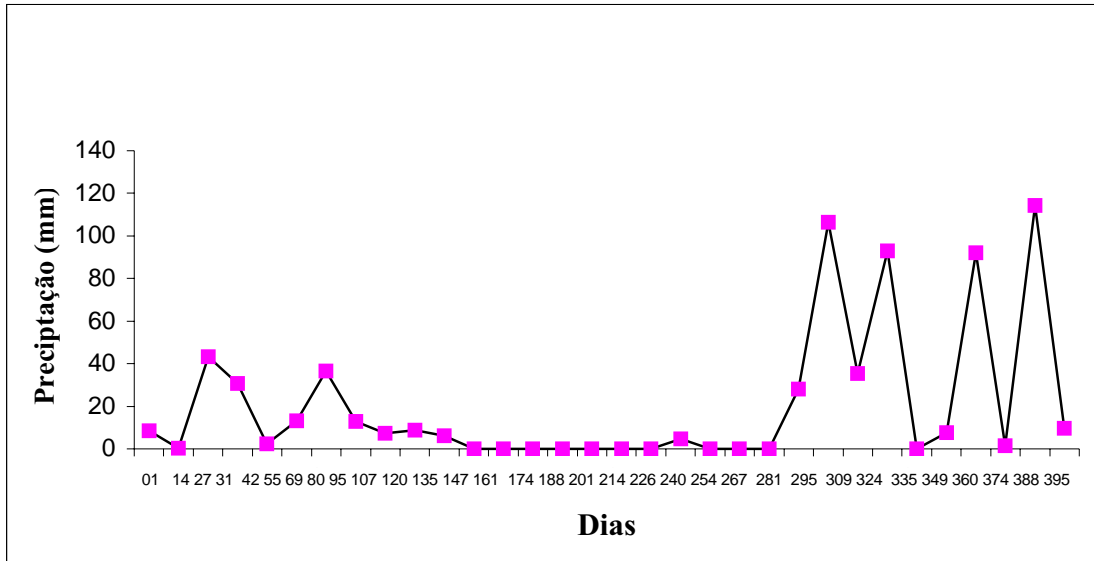
**Tabela 11.** Resultado da análise granulométrica do solo da área experimental no distrito de Jurucê, Jardinópolis, SP. 2005-2006.

Argila < 0,002mm	Silte 0,053-0,002	Areia total	Areia grossa	Areia fina
g/kg				
457	327	216	101	115

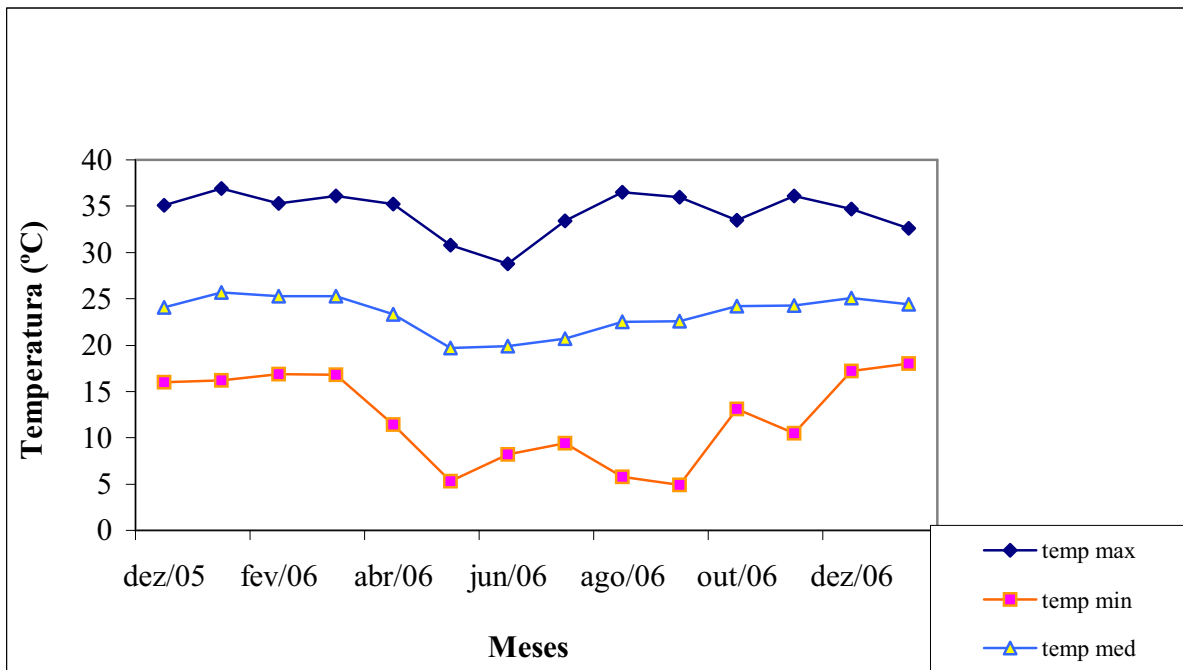
A área foi gradeada e arada dois meses antes do plantio, e ao solo foi incorporado 30 t/ha de esterco de gado curtido. De acordo com a análise do solo não houve necessidade de efetuar calagem devido à porcentagem apresentada pela saturação de bases.

Foi realizada análise nematológica em amostras do solo e de raízes das plantas de mandioca, botão azul, timbete, capim-pé-de-galinha, caruru, mamona, perpétua-do-mato, picão e losna, que estavam na área antes da implantação do experimento. Os materiais foram avaliados pelo Laboratório de Nematologia do Departamento de Produção Vegetal, FCA, Unesp, Botucatu.

A precipitação pluvial durante o período em que o experimento esteve no campo foi de 1.289,8 mm (Figura 2), com temperatura média de 23,36°C (Figura 3).



**Figura 2.** Precipitação diária (mm) registrada na região de Ribeirão Preto, SP, 2005 e 2006. (Fonte: Instituto Agrônomo de Campinas-IAC).



**Figura 3.** Temperaturas (°C) mensais mínimas, médias e máximas registradas na região de Ribeirão Preto, SP, 2005 e 2006. (Fonte: Instituto Agrônomo de Campinas-IAC).

#### 5.4.4 Instalação do experimento no campo

O plantio das mudas foi realizado na primeira semana de dezembro de 2005, em covas de 30cmx10cm. Foram selecionadas as plantas mais uniformes e sadias de cada indivíduo. Na Tabela 12 encontra-se a relação dos dez indivíduos de cada uma das oito populações de *Pfaffia glomerata*.

Na segunda quinzena de dezembro ocorreu o início de um ataque de formigas que foi controlado com iscas de Macex®, formicida utilizado na agricultura orgânica. Foram realizadas quatro capinas durante o tempo de permanência das plantas no campo. Foi executada uma poda aos 225 dias após o plantio devido ao adensamento, a quebra dos galhos durante as capinas e em razão de dificuldades para se tomar as medidas das plantas. Foi iniciada irrigação aos 270 dias até os 295 dias após o plantio quando as chuvas tornaram-se regulares. Não foi verificado sintoma de ataques por insetos e nem de doenças durante o experimento.

Nos períodos de floração foram coletados insetos que visitaram as inflorescências utilizando-se rede entomológica. Os insetos foram armazenados em solução de álcool 70%, e enviados ao entomologista prof. Dr. Eraldo Medeiros Costa Neto, da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), BA.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com quatro blocos. Os tratamentos consistiram das oito populações com dez indivíduos em cada uma, portanto, o bloco continha 80 parcelas. Foram utilizadas três plantas úteis por parcela, resultando em 240 plantas por bloco e totalizando 960 plantas na área útil do experimento. O espaçamento utilizado foi de 0,5m entre plantas e 1,0m entre linhas. Foram plantadas duas linhas de bordadura entre os blocos assim como em volta dos mesmos. A área total do experimento foi de 816 m<sup>2</sup> incluindo todas as bordaduras.

As parcelas foram numeradas de 1 a 80 e a cada uma foi atribuída a sua denominação, isto é, o número da população e do indivíduo. Realizou-se sorteio para distribuição das parcelas nos blocos e a seguir desenhou-se um croqui de cada bloco. A disposição dos blocos foi em “L” para manter as condições ambientais mais homogêneas dentro de cada bloco.

Os dados obtidos neste experimento foram submetidos à análise de variância e ao teste de separação de médias de Scott Knott a 5% de probabilidade. O software utilizado foi o Sisvar (Sistema de Análises Estatísticas) na versão 4.6 da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Descritores morfológicos que diferenciaram significativamente os acessos foram selecionados para a análise das componentes principais (ACP) de acordo com Cruz (2006), utilizando o software Genes.

**Tabela 12.** Identificação das populações e dos indivíduos de *Pfaffia glomerata* avaliados no experimento de campo, número de coleta e local de origem das oito populações. Ribeirão Preto, SP, 2005.

População	Nº de campo	Nº de coleta	Local de origem, UF
1	1	RFVieira 2202-1	Querência do Norte, PR
1	2	RFVieira 2202-2	Querência do Norte, PR
1	3	RFVieira 2202-4	Querência do Norte, PR
1	4	RFVieira 2202-5	Querência do Norte, PR
1	5	RFVieira 2202-7	Querência do Norte, PR
1	6	RFVieira 2202-8	Querência do Norte, PR
1	7	RFVieira 2202-11	Querência do Norte, PR
1	8	RFVieira 2202-16	Querência do Norte, PR
1	9	RFVieira 2202-18	Querência do Norte, PR
1	10	RFVieira 2202-22	Querência do Norte, PR
2	11	RFVieira 2205-6	Ilha do Mineiro, PR
2	12	RFVieira 2205-7	Ilha do Mineiro, PR
2	13	RFVieira 2205-8	Ilha do Mineiro, PR
2	14	RFVieira 2205-10	Ilha do Mineiro, PR
2	15	RFVieira 2205-12	Ilha do Mineiro, PR
2	16	RFVieira 2205-18	Ilha do Mineiro, PR
2	17	RFVieira 2205-20	Ilha do Mineiro, PR
2	18	RFVieira 2205-23	Ilha do Mineiro, PR
2	19	RFVieira 2205-24	Ilha do Mineiro, PR
2	20	RFVieira 2205-25	Ilha do Mineiro, PR
3	21	RFVieira 2209-2	Bataiporã, MS
3	22	RFVieira 2209-8	Bataiporã, MS
3	23	RFVieira 2209-9	Bataiporã, MS
3	24	RFVieira 2209-10	Bataiporã, MS
3	25	RFVieira 2209-11	Bataiporã, MS
3	26	RFVieira 2209-12	Bataiporã, MS
3	27	RFVieira 2209-13	Bataiporã, MS
3	28	RFVieira 2209-15	Bataiporã, MS
3	29	RFVieira 2209-16	Bataiporã, MS
3	30	RFVieira 2209-20	Bataiporã, MS
4	31	RFVieira 2216-6	Ilha do Marçal, PR
4	32	RFVieira 2216-7	Ilha do Marçal, PR
4	33	RFVieira 2216-10	Ilha do Marçal, PR
4	34	RFVieira 2216-13	Ilha do Marçal, PR

---

4	35	RFVieira 2216-14	Ilha do Marçal, PR
4	36	RFVieira 2216-15	Ilha do Marçal, PR
4	37	RFVieira 2216-16	Ilha do Marçal, PR
4	38	RFVieira 2216-17	Ilha do Marçal, PR
4	39	RFVieira 2216-18	Ilha do Marçal, PR
4	40	RFVieira 2216-20	Ilha do Marçal, PR
5	41	RFVieira 2211-10	Ilha Grande, PR
5	42	RFVieira 2211-14	Ilha Grande, PR
5	43	RFVieira 2211-15	Ilha Grande, PR
5	44	RFVieira 2211-18	Ilha Grande, PR
5	45	RFVieira 2211-20	Ilha Grande, PR
5	46	RFVieira 2211-17	Ilha Grande, PR
5	47	RFVieira 2211-24	Ilha Grande, PR
5	48	RFVieira 2211-3	Ilha Grande, PR
5	49	RFVieira 2211-19	Ilha Grande, PR
5	50	RFVieira 2211-9	Ilha Grande, PR
6	51	LRC-3	Rio Santo Inácio, Itatinga, SP
6	52	LRC-4	Rio Santo Inácio, Itatinga, SP
6	53	LRC-7	Rio Santo Inácio, Itatinga, SP
6	54	LRC-17	Rio Santo Inácio, Itatinga, SP
6	55	LRC-18	Rio Santo Inácio, Itatinga, SP
6	56	LRC-21	Rio Santo Inácio, Itatinga, SP
6	57	LRC-26	Rio Santo Inácio, Itatinga, SP
6	58	LRC-29	Rio Santo Inácio, Itatinga, SP
6	59	LRC-33	Rio Santo Inácio, Itatinga, SP
6	60	LRC-35	Rio Santo Inácio, Itatinga, SP
7	61	LRC-43	Rio Tamanduá, Itatinga, SP
7	62	LRC-46	Rio Tamanduá, Itatinga, SP
7	63	LRC-48	Rio Tamanduá, Itatinga, SP
7	64	LRC-56	Rio Tamanduá, Itatinga, SP
7	65	LRC-50	Rio Tamanduá, Itatinga, SP
7	66	LRC-52	Rio Tamanduá, Itatinga, SP
7	67	LRC-53	Rio Tamanduá, Itatinga, SP
7	68	LRC-60	Rio Tamanduá, Itatinga, SP
7	69	LRC-61	Rio Tamanduá, Itatinga, SP
7	70	LRC-63	Rio Tamanduá, Itatinga, SP
8	71	LRC-70	Ilha no Rio Santo Inácio, Itatinga, SP
8	72	LRC-73	Ilha Rio Sto Inácio, Itatinga, SP
8	73	LRC-74	Ilha no Rio Santo Inácio, Itatinga, SP
8	74	LRC-76	Ilha no Rio Santo Inácio, Itatinga, SP
8	75	LRC-77	Ilha no Rio Santo Inácio, Itatinga, SP
8	76	LRC-79	Ilha no Rio Santo Inácio, Itatinga, SP
8	77	LRC-80	Ilha no Rio Santo Inácio, Itatinga, SP
8	78	LRC-90	Ilha no Rio Santo Inácio, Itatinga, SP
8	79	LRC-95	Ilha Rio Sto Inácio, Itatinga, SP
8	80	LRC-98	Ilha Rio Sto Inácio, Itatinga, SP

---

RFVieira – coletor das populações 1 a 5; LRC – iniciais do primeiro nome dos coletores das populações 6 a 8.

### 5.4.5 Caracterização dos acessos

Foram avaliados 20 descritores morfológicos de *P. glomerata* dos utilizados para a espécie por Kamada (2006) que apresentaram descrição e quantificação favorável em todos os indivíduos. Os caracteres fenotípicos foram divididos em dois grupos, conforme a descrição e quantificação de seus fenótipos.

#### 5.4.5.1 Caracteres fenotípicos das variáveis quantitativas:

1. Matéria fresca da parte aérea (MFPA): peso de massa fresca do caule, ramos, folhas e inflorescências, em grama, obtida no momento da colheita.
2. Matéria seca da parte aérea (MSPA): peso da massa seca do caule, ramos, folhas e inflorescências, em grama, determinado após a secagem em estufa de ventilação forçada a 42°C até peso constante.
3. Matéria fresca da raiz (MFR): peso da massa fresca da raiz, em grama, no momento da colheita.
4. Matéria seca da raiz (MSR): peso da massa seca da raiz, em grama, determinado após a secagem em estufa de ventilação forçada a 42°C até peso constante.
5. Altura da planta (AP): medida em centímetro desde o início do caule até a última inflorescência, obtida no momento da colheita.
6. Diâmetro do caule (DC): medida em centímetro obtida do diâmetro do caule, tomada a 10 cm acima da região do colo, no momento da colheita.
7. Número de caules (NC): contagem de caules lançados na região basal da planta até altura de 10 cm acima do coleto.
8. Comprimento de entrenós (CE): medida avaliada na região mediana da planta entre o quarto e o quinto entrenó, valores anotados em centímetro.
9. Comprimento da raiz principal (CRP): medida em centímetro estabelecida a partir da base do coleto até a extremidade da raiz principal, no momento da colheita.
10. Diâmetro da raiz principal (DRP): medida em centímetro obtida na região mediana da raiz de maior comprimento, no momento da colheita.

11. Número de raízes secundárias (NRS): número de raízes excluindo-se a principal, contagem realizada no momento da colheita.
12. Índice de colheita (IC): valor obtido entre a relação da produção de raízes secas e o peso seco da parte aérea, determinado pela seguinte expressão:

$$IC = MSR/(MSR + MSC),$$

MSR: matéria seca da raiz e

MSC: matéria seca da parte aérea.

Foi calculada também a produtividade utilizando o valor obtido da produção total de matéria seca das raízes (kg) na área útil do experimento (ha).

#### **5.4.5.2 Caracteres fenotípicos das variáveis qualitativas:**

1. Cor do pecíolo (CP): foram atribuídos valores ao padrão da coloração na região do pecíolo, de acordo com a deposição de pigmento vermelhos nas suas faces abaxial e adaxial e no mesófilo margeante, nas folhas basais do terceiro e quarto nós: 1 = deposição de pigmento em qualquer face do pecíolo e no mesófilo; 2 = deposição apenas no mesófilo; e 3 = nenhuma deposição na região do pecíolo.
2. Pilosidade do caule (PIL): os valores foram atribuídos conforme a frequência, persistência e local de ocorrência dos pelos: 1 = abundante em locais próximos ao ápice e ao longo do caule, pêlos persistentes; 2 = pouco freqüente, presença de pêlos em regiões jovens e pouca freqüência de pêlos persistentes ao longo do caule; e 3 = rara freqüência, baixa quantidade próxima ao ápice e ausência de pêlos persistentes ao longo do caule.
3. Cor do caule (CC): padrão de coloração avaliada desde a base até a região próxima ao ápice: 1 = distribuição abundante de pigmento vermelho, a qual atinge acima de 75% da altura do caule; 2 = distribuição freqüente de pigmento vermelho, entre 25 e 75% da altura do caule; e 3 = predomínio da cor verde e pouca quantidade de pigmento vermelho atingindo no máximo 25% da altura do caule.
4. Tipo de caule (TC): descrição predominante da disposição do caule. Foram atribuídos os seguintes valores: 1 = caules eretos, próximos entre si, sem ramificação e pequena área de projeção lateral da copa; 2 = caules semiprostrados, eretos, mas com ramificações e 3 = prostrado, caules com predomínio de crescimento paralelo à superfície horizontal.

5. Cor da raiz (CR): coloração atribuída à raiz seca, moída e peneirada em 40 mesh, baseada na carta de Munsell® para cores de tecidos vegetais.
6. Descrição do ápice e base do limbo foliar (ABL): atribuíram-se valores conforme o tipo de combinação entre a forma do ápice e da base do limbo foliar.

Valor	Forma do Ápice	Forma da Base
1	Agudo a acuminado	Oblíqua a acunheada
2	Agudo a acuminado	Truncada a reniforme
3	Mucronado	Oblíqua a acunheada
4	Mucronado	Truncada a reniforme

7. Formato do limbo (FL): descrição do formato predominante do limbo das folhas localizadas entre 1/3 e 2/3 da altura da planta. Foram atribuídos os seguintes valores:  
1 = elíptico; 2 = lanceolado; e 3 = oval.
8. Presença ou ausência de nematóides (N): atribuiu-se valor = 1 para raízes com os sintomas característicos de infecção por nematóides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp) e, valor = 2 para raízes sem sintomas de infecção por nematóides de galhas.

#### 5.4.6 Colheita e processamento das amostras pós-colheita

A colheita foi realizada em dezembro de 2006, dos 350 aos 372 dias após o plantio no campo. As plantas inteiras foram colhidas pela manhã com auxílio de enxadas e enxada, colocadas em sacos de ráfia e transportadas até o galpão de secagem do sítio “Terra de Ismael”. A parte aérea fresca foi separada das raízes, pesada e acondicionada em sacos de papel para secagem. As raízes lavadas foram submetidas às seguintes medições: comprimento e diâmetro da raiz principal, número de raízes secundárias, avaliação da presença de galhas resultante da infecção por nematóides. Após duas horas de pré-secagem à sombra as raízes foram pesadas, em seguida foram fatiadas e colocadas em sacos de papel permanecendo em estufa de ventilação forçada a 42°C até peso constante para obtenção da matéria seca e para a análise do teor de  $\beta$ -ecdisona.

#### 5.4.7 Determinação do teor de $\beta$ -ecdisona

As análises foram conduzidas no laboratório de Química de Produtos Naturais da Unidade de Biotecnologia de Plantas Mediciniais/Unaerp. O protocolo para determinação do teor de  $\beta$ -ecdisona seguiu o descrito por Carneiro et al. (2007).

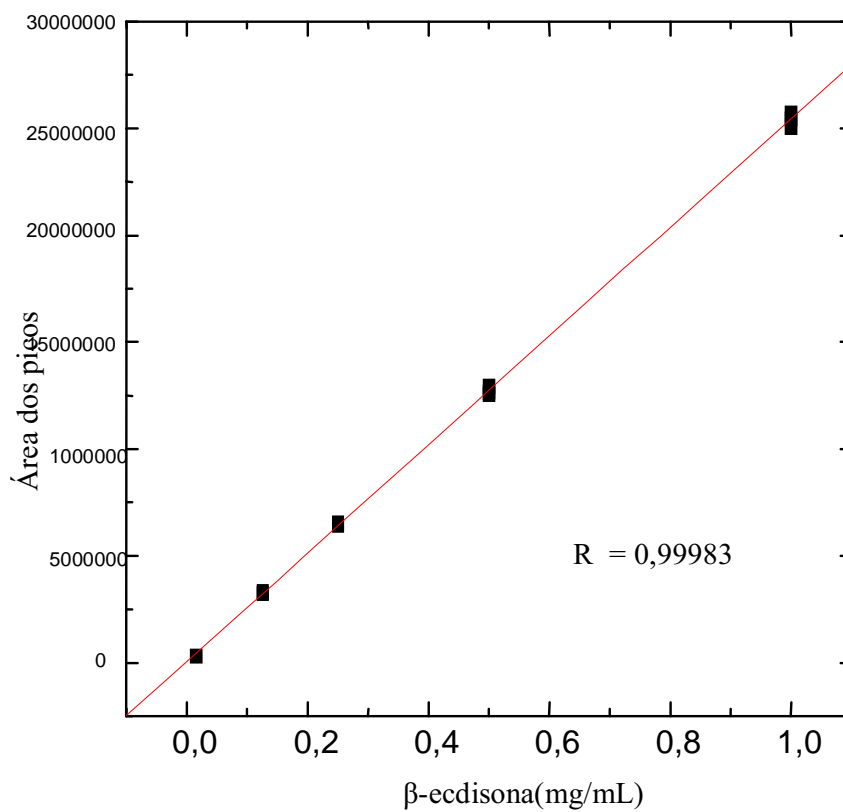
As raízes frescas de *P. glomerata* colhidas no experimento de campo foram secas em estufa a 42°C até peso constante. Em seguida, foram pesadas, moídas em moinho de faca e peneiradas (40 mesh). Amostras de 200mg de raízes de cada indivíduo, em triplicata, foram pesadas em balança semi-analítica e submetidas à extração com 5 mL de metanol (PA Synth) em ultra-som por 30 minutos. Os extratos foram colocados em capela com ventilação a temperatura ambiente para evaporação do solvente. Utilizou-se 1 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) para ressuspensão dos extratos e em seguida as amostras foram submetidas à partição com 1mL de hexano (P.A. Synth). Utilizou-se filtro de nylon (0,45  $\mu$ m Alltech) para retirada de impurezas na fase hidroalcolica.

As amostras foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em cromatógrafo líquido Shimadzu acoplado com detector de arranjo de diiodo (modelo SPD-M10A *vp*) e injetor automático (modelo SIL-10AD *vp*). A coluna utilizada foi Supelcosil<sup>TM</sup> LC18 (4,6mm x 250mm, partículas de 5 $\mu$ m, Supelco). A fase móvel empregada consistiu de MeOH:H<sub>2</sub>O (Ácido Acético, 0,1%), 10:90 à 30:70 gradiente linear por 15 min; 30:70 eluição conduzida de forma isocrática por 10 min; 30:70 à 100:0 gradiente linear por 25 min e 100:0 à 10:90 gradiente linear por 5 min, sendo o tempo total de análise de 40 min. O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL/min. e a detecção a 240nm. O volume de injeção das amostras foi de 20  $\mu$ L. O metanol grau CLAE (J. T. Baker) foi filtrado antes de ser utilizado no sistema cromatográfico e a água destilada e deionizada para a CLAE foi purificada pelo sistema Millipore Milli-Q.

O método utilizado para a análise foi à padronização externa, selecionando-se sete pontos para curva. Soluções do padrão de  $\beta$ -ecdisona (Fluka®), com mais de 99% de pureza, foram preparadas a partir da diluição da amostra original (1 mg) em 1 mL de metanol, grau HPLC, obtendo-se uma solução estoque com concentração inicial de 1000  $\mu$ g/mL. A partir desta solução foram realizadas diluições sucessivas para a obtenção de soluções de trabalho, em triplicata, contendo 15,63; 31,25; 62,5; 125; 250, 500 e 1000  $\mu$ g/mL de  $\beta$ -ecdisona.

A curva de calibração foi construída por meio de um gráfico de regressão linear, relacionando a área dos picos com as concentrações do padrão. A linearidade do método foi verificada através do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) da curva obtida na análise de regressão. A identificação de  $\beta$ -ecdisona nas amostras foi baseada no tempo de retenção.

A concentração de  $\beta$ -ecdisona ( $\mu\text{g/mL}$ ) foi estimada por meio da equação da reta da curva padrão:  $Y = 49976,528 + 253831,469X$ , onde  $Y$  = concentração e  $X$  = área, ( $r^2=0,9997$ ).



**Figura 4.** Curva padrão de  $\beta$ -ecdisona. Ribeirão Preto, SP, 2007

### 5.5 Estabelecimento do banco de germoplasma *in vitro*

O experimento visando às condições ideais para o estabelecimento do banco de germoplasma *in vitro* de *Pfaffia glomerata* utilizou como planta matriz doadora dos explantes o indivíduo de número 2205-8, coletor RFVieira, originário de Querência do Norte, PR, obtido da coleção da Embrapa. Plântulas micropropagadas tiveram seus segmentos nodais inoculados em meio de cultura contendo agentes de estresse osmótico, os tratamentos utilizados encontram-se descritos na Tabela 13.

A parcela experimental consistiu de frascos de vidro de 8 cm x 5,5 cm com tampa de plástico (cubeta) contendo em torno de 7 mL do meio de cultura e um segmento nodal de aproximadamente 1,0cm com um nó e sem folhas. O meio foi solidificado com Phytigel® antes da autoclavagem (1atm, 120°C, 15 min.), ajustado para pH 5,8. Os explantes foram mantidos no banco de germoplasma *in vitro* da Unaerp, com temperatura de  $16 \pm 2$  °C, umidade relativa de  $60 \pm 5$  %, 16h de fotoperíodo e intensidade luminosa de  $40 \mu\text{moles.m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpada fluorescente branca. Após seis meses de permanência no banco, foi avaliado o índice de sobrevivência, o número de explantes com brotações, a altura das plântulas, o número de brotos por explante, o número de gemas por haste e a presença de raiz.

As plântulas sobreviventes foram transplantadas para sacos plásticos com solo permanecendo em casa de vegetação por dois meses para avaliar a adaptação ao ambiente *ex vitro*. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 30 repetições por tratamento. Os dados obtidos neste experimento foram submetidos à análise de variância e ao teste de separação de médias de Scott Knott a 5% de probabilidade.

**Tabela 13.** Tratamentos para definição do meio de cultura no estabelecimento do banco de germoplasma *in vitro* de *Pfaffia glomerata*, Ribeirão Preto, SP, 2006.

Tratamentos	Meio de cultura
1	MS + 2% sacarose + 4 % de sorbitol
2	MS/2 + 2% sacarose + 4 % de sorbitol
3	MS + 2% sacarose + 4 % de sorbitol + 2mg/L pantotenato de cálcio
4	MS/2 + 2% sacarose + 4 % de sorbitol + 2mg/L pantotenato de cálcio
5	MS + 2% sacarose + 3 % de manitol + 2mg/L pantotenato de cálcio
6	MS/2 + 2% sacarose + 3 % de manitol + 2mg/L pantotenato de cálcio



**Figura 5.** Preparo da área de plantio e experimento de *Pfaffia glomerata* no campo em Jurucê, SP, 2005. (Fotos: Ana Maria Soares Pereira)



**Figura 6.** Micropropagação de *Pfaffia glomerata* e mudas para plantio no campo, Ribeirão Preto, SP, 2005. (Fotos: Edieidia Souza Pina e Ana Maria Soares Pereira)



**Figura 7.** Planta inteira de *Pfaffia glomerata*. Ribeirão Preto, SP, 2008. (Foto: Ana Maria Soares Pereira)



**Figura 8.** Diferentes formas de raízes de *Pfaffia glomerata*, Ribeirão Preto, SP, 2006. (Foto: Ana Maria Soares Pereira)

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Coleta de germoplasma

A introdução de acessos originários do Pantanal sul mato-grossense e de Itatinga, SP, constituiu ação relevante no sentido de ampliar a variabilidade genética da coleção de *Pfaffia glomerata*. Por outro lado, a inserção desses acessos possibilita a exploração e seleção de materiais adaptados às condições ecológicas específicas e úteis para atender as diversas necessidades dos agricultores.

As populações naturais de *Pfaffia glomerata* coletadas no Pantanal foram localizadas principalmente, em barrancos e margens dos rios Paraguai e Miranda, desenvolvendo-se em solos úmidos e nas orlas das matas. A cobertura vegetal às margens do Rio Paraguai, em Ladário, MS, encontrava-se relativamente preservada. A coleta realizada em setembro no início do período de seca permitiu observar que as populações amostradas encontram-se adaptadas aos regimes de cheia apresentando crescimento do caule em largura, espessura e muitas vezes prostrados, quase horizontais ao solo. Os ambientes variaram de áreas cultivadas com pastagem a sub-bosque com vegetação perturbada e beira de mata ciliar. No geral, predominaram ambientes de intensa ação antrópica.

A paisagem às margens do rio Miranda apresentou-se bastante alterada, indicando que a vegetação nativa é retirada periodicamente. Foi observado que o porte das plantas foi menor do que o verificado na região do rio Paraguai, provavelmente devido à intensa pressão antrópica. A área é totalmente inundada na época da cheia do rio. Nos locais

visitados foi observado a presença das plantas companheiras, *Copernicia alba* (Carandá) e *Lippia alba*, ocorrendo sempre de forma associada à fáfia.

As populações de *P. glomerata* da região de Itatinga foram localizadas às margens dos rios ou nas ilhas ao longo desses, em locais aonde a vegetação natural foi totalmente substituída. Verificou-se intensa ação antrópica, principalmente devido ao avanço de investimentos imobiliários. Os indivíduos de fáfia apresentaram-se com porte mais ereto e com crescimento menor em diâmetro quando comparados com aqueles da região do Pantanal. A espécie caracterizou-se por apresentar adaptabilidade a diversas variações ambientais.

A seguir são descritas as informações sobre as populações coletadas nas expedições à Itatinga, SP e ao Pantanal sul mato-grossense, MS:

a) Local da coleta: margem do rio Santo Inácio, Itatinga, SP, a 570m de altitude, latitude de 23°28'76"S e longitude de 48°56'34"O. Foram coletados 37 indivíduos, coletor: L.C.Ming et al. 1;

b) Local da coleta: barranco do rio Tamanduá, Itatinga, SP, a 570m de altitude, latitude de 23°27'95"S e longitude de 48°55'59"O. Foram coletados 23 indivíduos, coletor: L.C.Ming et al. 2;

c) Local da coleta: ilha à margem do rio Santo Inácio, Itatinga, SP, a 570m de altitude, latitude de 23°27'97"S e longitude de 48°54'80"O. Foram coletados 27 indivíduos, coletor: L.C.Ming et al. 3;

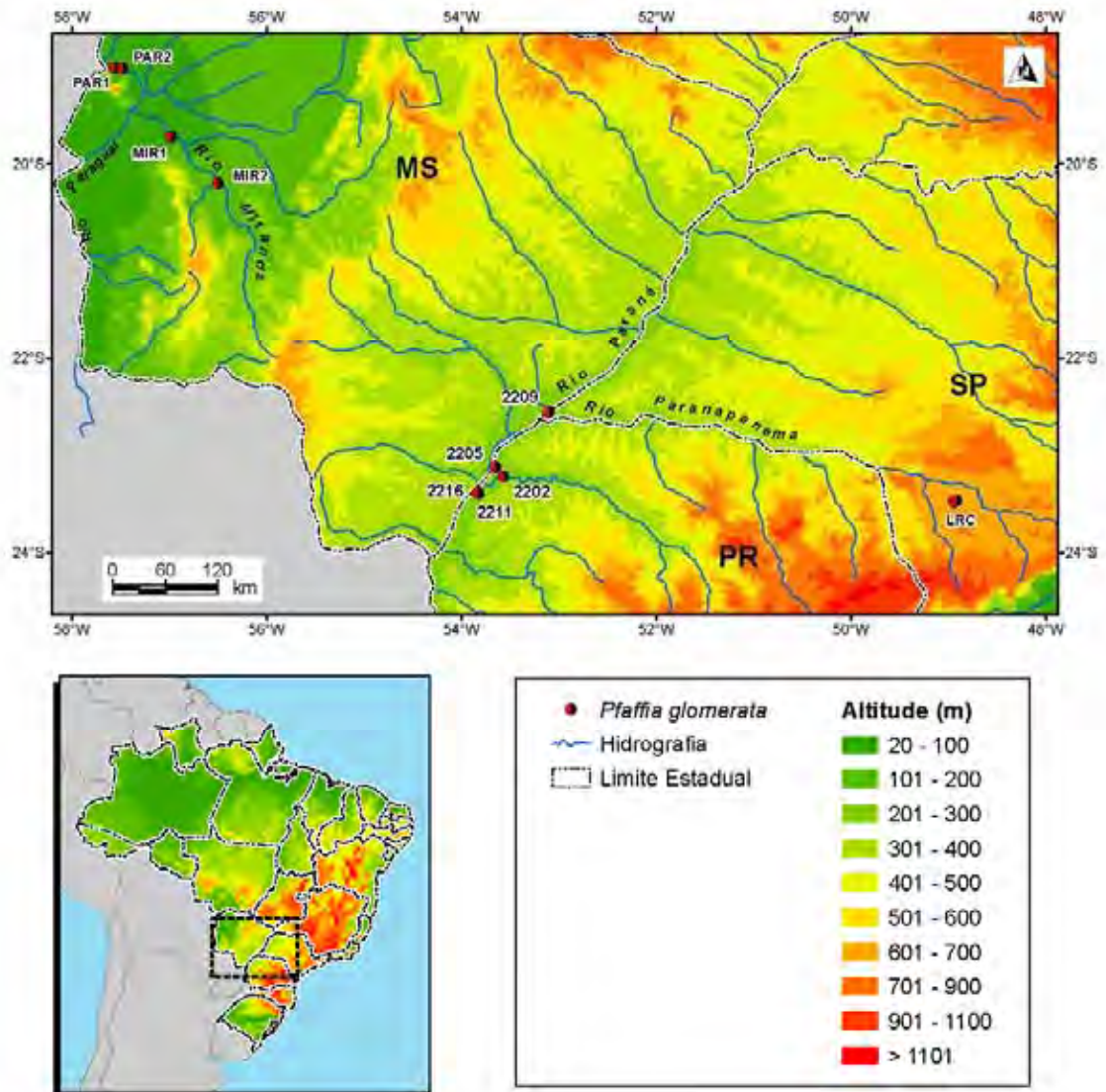
d) Local da coleta: margem de um braço do rio Miranda, no km 658 da BR 262, MS, a 98m de altitude, latitude de 19°43'01,6"S e longitude de 56°59'17,2"O. Foram coletados 20 indivíduos, coletor: A.M.S.Pereira et al. MIR 1;

e) Local da coleta: margem do rio Paraguai, oposta a Corumbá, entrada do "bracinho", MS, a 96m de altitude, latitude de 19°00'21,9"S e longitude de 57°32'07"O. Foram coletados 26 indivíduos, coletor: A.M.S.Pereira et al. PAR 1;

f) Local da coleta: margem do rio Paraguai, mesma margem de Corumbá, MS, a 88m de altitude, latitude de 19°01'17,2"S e longitude de 57°29'13,3"O. Foram coletados 33 indivíduos, coletor: A.M.S.Pereira et al. PAR 2;

g) Local da coleta: BR 262 Km 576, ponte do rio Salobra, Miranda, MS, a 90m de altitude, latitude de 20°11'20,3"S e longitude de 56°30'15,8"O. Foram coletados 27 indivíduos, coletor: A.M.S.Pereira et al. MIR 2;

h) Local da coleta: BR 262 Km 576, margem do rio Miranda, Miranda, MS, a 99m de altitude, latitude de 20°11'56,2''S e longitude de 56°30'05,7''O. Foram coletados 25 indivíduos, coletor: A.M.S.Pereira et al. MIR 3;



**Figura 9.** Pontos de coleta de germoplasma de *Pfaffia glomerata* em populações naturais nos estados de Mato Grosso do Sul, Paraná e São Paulo (Autor: Sérgio Noronha, Embrapa).

## 6.2 Caracterização morfológica

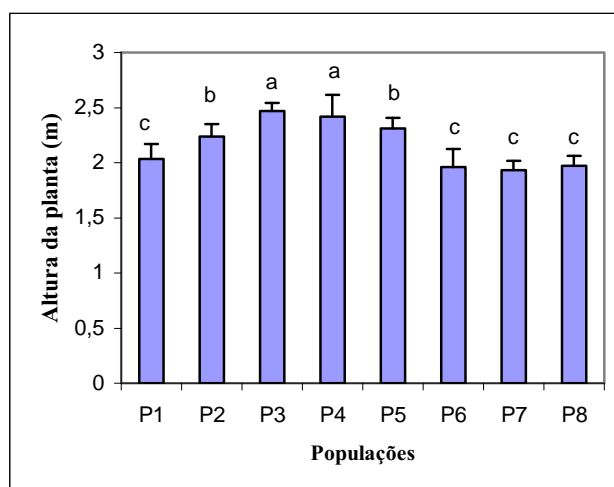
### 6.2.1 Caracteres fenotípicos das variáveis quantitativas

#### 6.2.1.1 Altura da planta (AP)

Os acessos de *Pfaffia glomerata* avaliados nas condições de campo mostraram diferenças entre as populações quanto às seguintes características: altura da planta, diâmetro do caule, comprimento entre o quarto e quinto entrenó, número de caules, relação largura comprimento do limbo foliar, diâmetro da raiz, matéria fresca da parte aérea, matéria seca da parte aérea, matéria fresca da raiz, matéria seca da raiz, teor de  $\beta$ -ecdisona, cor da raiz, resistência/suscetibilidade a nematóides de galhas e índice de colheita.

Os indivíduos das populações três e quatro (P3 e P4) apresentaram significativamente as maiores alturas ( $2,46\text{m} \pm 0,07\text{m}$  e  $2,42\text{m} \pm 0,19\text{m}$ , respectivamente) seguidos de P2 e P5 (Figura 10). A população 3 é proveniente de Bataiporã, MS, região da divisa entre os estados de Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná, a população 4 é de Vila Alta, PR, ambas da região pertencente ao Parque Nacional de Ilha Grande, PR. As populações originárias da região de Itatinga, SP, (P6, P7 e P8) apresentaram menor crescimento quando comparadas com aquelas provenientes do Parque Nacional (PN) de Ilha Grande, PR. A população P7 foi a que apresentou indivíduos com menor altura  $1,93\text{m} \pm 0,08\text{m}$ , mas não diferiu significativamente dos indivíduos das populações P1, P6 e P8. A média geral para a altura das plantas foi de  $2,16\text{m} (\pm 0,23\text{m})$ . A população 1 é procedente de Querência do Norte, PR, área do PN de Ilha Grande.

Houve correlação significativa e positiva (0,9715) entre a altura das plantas e a produção de matéria seca da parte aérea (Tabela 14). Este resultado mostra que apesar da poda e do período de seca, as plantas mostraram uma rápida recuperação do crescimento, provavelmente devido ao restabelecimento do regime de chuvas associada à elevação da temperatura. A presença das reservas acumuladas nas raízes, a adubação com esterco de gado curtido, a disponibilidade de nutrientes do solo, a boa drenagem e a aeração também podem ter contribuído para essa recuperação.



**Figura 10.** Altura das plantas (m) de oito populações de *Pfaffia glomerata* (P1 a P8) cultivadas em condições de campo, Ribeirão Preto, SP, 2006. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, entre si, ao nível de 5% pelo teste de Scott Knott.

**Tabela 14.** Correlações simples entre as variáveis quantitativas calculadas pelo coeficiente de Pearson, em 80 indivíduos de *Pfaffia glomerata*. Ribeirão Preto, SP, 2007.

	AP	CE	DC	DRP	NC	M.F.P.A	M.F.R	M.S.P.A
CE	-0,2948							
DC	0,7530*	0,1646						
DRP.	0,5581	0,2607	0,9544*					
NC	0,6957	-0,0438	0,6951	0,6633*				
M.F.P.A	0,9515*	-0,1195	0,8750*	0,7409*	0,8473*			
M.F.R	0,6374	0,2526	0,9477*	0,9489*	0,7736*	0,8225*		
M.S.P.A	0,9714*	-0,1482	0,8376*	0,6794*	0,8229*	0,9951*	0,7701*	
M.S.R	0,7895*	0,0721*	0,9628*	0,9119*	0,8543*	0,9297*	0,9477*	0,8956*

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Scott Knott

*Pfaffia glomerata* foi descrita como um arbusto que atinge 2,00m de altura em ambientes naturais (VASCONCELOS; 1982 SMITH e DOWNS, 1972). Corrêa Junior (2003) avaliou acessos da espécie em área experimental em Querência do Norte, PR, cujo solo é do tipo Gleissolo melânico Ta distrófico típico. Os acessos coletados em populações ao longo dos rios Paranapanema (Rosana, SP), Paraná (Taquaruçu, MS e Ilha de Santa Terezinha, PR) e Ivaí.(Querência do Norte, PR) atingiram altura máxima de 1,61m oito meses após o plantio. O autor relata que durante o outono a espécie paralisa o seu crescimento ocorrendo quebra das extremidades e queda de folhas.

No trabalho conduzido por Guerreiro (2006) estudou-se o crescimento de *P. glomerata* em função de adubação orgânica com esterco de galinha curtido, em São Manoel, SP, em solo areno argiloso. As plantas formadas de sementes originárias de Querência do Norte, PR atingiram altura de até 1,58 m aos 240 dias. A autora ressalta que houve uma tendência na diminuição do comprimento do caule da terceira para a quarta colheita provavelmente devido à fragilidade dos ramos mais finos da planta, que se quebram facilmente por ação mecânica, de ventos mais fortes ou mesmo durante as atividades de capina. Além desses fatores, a diminuição do comprimento do caule também esteve relacionada com a redução da precipitação.

Em outro estudo com a mesma espécie Montanari Junior e Percin (2006) utilizaram plantas originárias da região de Cáceres, MT e de Mogi das Cruzes, SP. As mudas foram formadas a partir das sementes desses indivíduos e o experimento foi instalado em Paulínia, SP que possui solo argiloso. As plantas colhidas após 14 meses apresentaram altura média de 1,71m.

Kamada (2006) analisou acessos de *P. glomerata* cultivados em vasos com capacidade para 18L, em Viçosa, MG. As plantas foram coletadas em quatro populações nos municípios de Querência do Norte e Vila Alta, PR e Bataiporã, MS. Os acessos foram avaliados após oito meses do transplântio atingindo média geral de 2,70m de altura.

Figueiredo et al. (2004) estudaram 23 acessos de *Pfaffia glomerata* oriundos de várias regiões do Brasil, cultivados em Campos de Goytacazes, RJ. Em relação à altura das plantas verificaram-se valores de 0,62 m para o acesso NdM de São Luís, MA, até a altura de 2,09 m para o acesso Gsd1 de Campinas, SP. A avaliação foi realizada 13 meses após a instalação da cultura no campo.

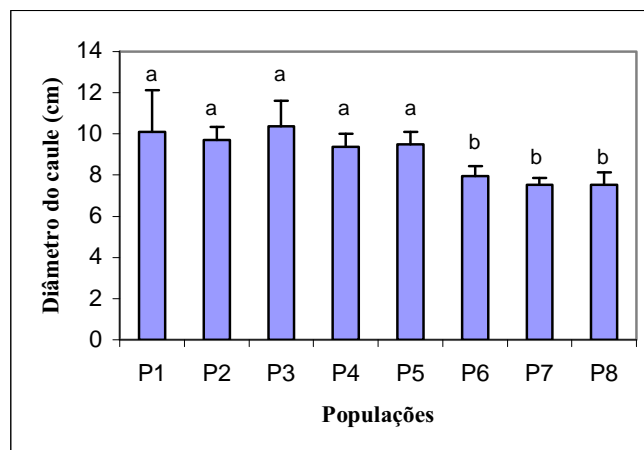
As variações descritas em relação à altura das plantas de *P. glomerata* nos relatos acima citados refletem, inicialmente, as diferentes condições ambientais específicas de cada localidade em que os estudos foram conduzidos, sejam edáficas e/ou climáticas. Além disso, deve-se levar em consideração a procedência dos genótipos avaliados, o espaçamento do plantio, a metodologia para a produção das mudas, quer seja por sementes, por estacas ou por micropropagação, a adubação e a idade da planta no momento da tomada dos dados.

As informações da literatura mostram que a espécie após cerca de um ano de plantio em regiões e condições diferentes, atinge altura média em torno de 1,89 m,

valor próximo ao do que foi verificado para a *P. glomerata* em populações naturais de acordo com Vasconcelos (1982) e Smith e Downs (1972).

### 6.2.1.2 Diâmetro do caule (DC)

Nos indivíduos das populações de *P. glomerata* oriundas de Itatinga, SP o diâmetro do caule foi de 7,54 cm  $\pm$  0,60 cm (P8), 7,54 cm  $\pm$  0,31 cm (P7), 7,94 cm  $\pm$  0,48cm (P6) significativamente menor do que aquele apresentado pelos indivíduos das populações procedentes do P.N. de Ilha Grande, PR (P1, P2, P3, P4 e P5) que variou de 9,37 cm  $\pm$  0,65 cm a 10,38 cm  $\pm$  1,23cm (Figura 11).



**Figura 11.** Diâmetro do caule (cm) de indivíduos de oito populações de *Pfaffia glomerata* (P1 a P8) cultivadas em condições de campo, Ribeirão Preto, SP, 2006. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, entre si, ao nível de 5% pelo teste de Scott Knott.

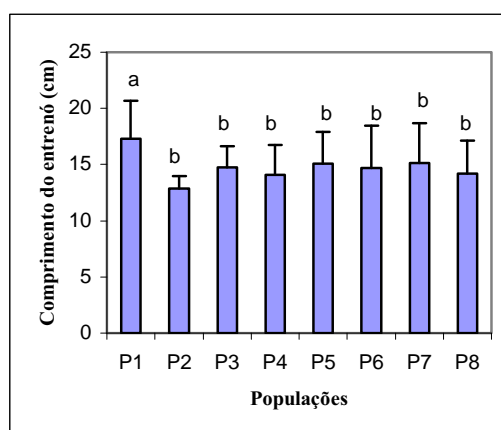
Kamada (2006) encontrou média geral de 13,17 cm para esta característica em *P. glomerata* cultivada em Viçosa, MG; Montanari Junior e Perecin (2006) registraram média geral de 10,01 cm para plantas de fáfia cultivadas em Paulínia, SP, enquanto que no presente estudo a média geral foi de 9,00 cm.

Segundo Benincasa (2003) medidas lineares, como o diâmetro do caule, são úteis na avaliação de experimentos sobre a produção da fitomassa e análise de crescimento de plantas. Em trabalhos sobre a taxa de crescimento de mudas, o vigor também pode ser avaliado por características como o diâmetro do caule, entre outras (BASTOS et al., 2005).

Dessa forma, os programas de melhoramento vegetal de espécies cultivadas, geralmente, selecionam plantas que apresentam maior diâmetro de caule, entre outras características agronômicas desejáveis, com objetivo de se obter fonte de materiais vigorosos (PINTO et al., 2001). Guerreiro (2006) relata que plantas de *P. glomerata* adubadas com 30 t/ha de esterco de galinha curtido produziram maior número de folhas até o florescimento, um alto índice de área foliar e um maior diâmetro do caule.

### 6.2.1.3 Comprimento entre o quarto e quinto entrenó (CE)

Os indivíduos de *P. glomerata* da população um (P1) foram os que alcançaram significativamente os maiores comprimentos de entrenós, 17,27cm ( $\pm 3,40$ cm), por outro lado, na população dois (P2) predominou indivíduos com menor comprimento de entrenó, 12,85cm ( $\pm 1,10$ cm), mas não diferiu estatisticamente dos indivíduos das demais populações, excetuando a número um (Figura 12).



**Figura 12.** Comprimento entre o quarto e quinto entrenó (cm) das plantas de oito populações de *Pfaffia glomerata* (P1 a P8) cultivadas em condições de campo, Ribeirão Preto, SP, 2006. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, entre si, ao nível de 5% pelo teste de Scott Knott.

Mattos e Salis (2004) avaliaram plantas desta espécie procedente de Corumbá, MS (18°14'S e 57°03'W). Sementes de *P. glomerata* coletadas na região do Pantanal foram utilizadas para a produção de plantas que apresentaram o maior comprimento dos entrenós (8,4cm em média) nove meses após o transplântio. As autoras verificaram que o

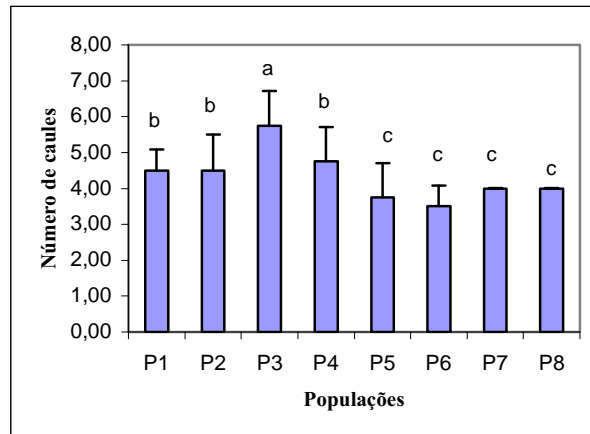
maior crescimento dos entrenós esteve relacionado ao período de maior precipitação e temperaturas mínimas mais elevadas.

Nicoloso et al. (2001) estudaram a influência do comprimento da estaca no enraizamento da *P. glomerata* e concluíram que o tamanho não afetou a percentagem de enraizamento e a produção de massa seca de folhas e raízes. Por outro lado, as mudas obtidas de estacas com 10cm apresentaram maior número e comprimento de brotações, bem como maior quantidade de massa seca de talos e massa seca total e possibilitou a obtenção de mais estacas por ramo.

Assim a partir dos dados obtidos por Nicoloso et al. (2001) concluiu-se que em relação aos acessos avaliados neste experimento a população um (P1) é a menos recomendada para fornecimento de material visando à produção de mudas via estaquia. A seleção de materiais com características desejáveis para a produção agrícola inclui aqueles que possibilitam o fornecimento de estacas viáveis e vigorosas, quando se pretende obter materiais homogêneos. Assim, o comprimento do entre entrenó pode ser um dos indicativos para a escolha de plantas com maior produtividade e que possam ser utilizadas na produção de mudas, fato que contribui sobremaneira para a implantação de cultivos comerciais.

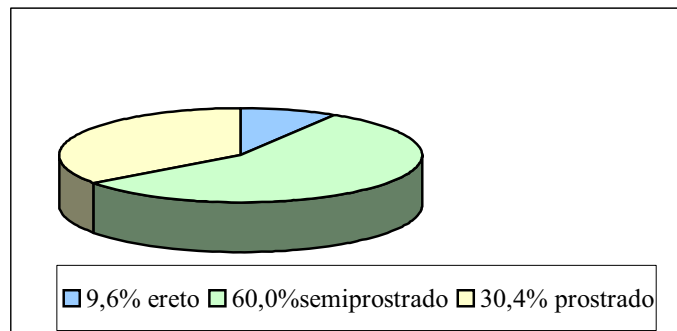
#### **6.2.1.4 Número de caules (NC)**

As plantas da população três (P3) foram as que emitiram significativamente o maior número de caules na região basal ( $5,75 \pm 0,96$ ) (Figura 13). Foi verificado também que 90% dos indivíduos da P3 apresentaram caule semiprostrado (Figura 14) e apenas na P8 predominou o tipo prostrado (Tabela 15). Durante as avaliações do experimento verificou-se que as características maior número de caules e semiprostrado ou prostrado ocorrendo, concomitantemente, mostraram-se prejudiciais ao desenvolvimento das plantas no espaçamento de 0,5m entre plantas e 1,0m entre linhas. Além disso, causou maior quebra de galhos ao se realizar os trabalhos de capina.



**Figura 13.** Número de caules de plantas de oito populações de *Pfaffia glomerata* (P1 a P8) avaliadas em condições de campo, Ribeirão Preto SP, 2006. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, entre si, ao nível de 5% pelo teste de Scott Knott.

O maior número de caules, e preferencialmente de porte ereto, favorece a produção de estacas. Assim, dependendo do objetivo, as plantas que produzem mais caules são aquelas de maior interesse. Correlações significativas e positivas (Tabela 14) foram verificadas entre o número de caules e o peso seco da parte aérea e da raiz, esses dados são um indicativo de que o aumento no número de caules contribuiu para a produção de ramos e folhas, que foram eficientes na produção e translocação de compostos orgânicos para formação do sistema radicular.



**Figura 14.** Porcentagem geral do tipo de caule das plantas de *Pfaffia glomerata* avaliadas em condições de campo, Ribeirão Preto, SP, 2006.

**Tabela 15.** Tipo de caule (%) em oito populações (P1 a P8) de *Pfaffia glomerata* avaliadas em condições de campo, Ribeirão Preto, SP, 2006.

População	Tipo de caule (%)		
	Ereto	Semiprostrado	Prostrado
P1	20a	60d	20c
P2	10b	70c	20c
P3	10b	90a	0e
P4	17a	70c	13d
P5	20a	80b	0e
P6	0c	50e	50b
P7	0c	50e	50b
P8	0c	10f	90a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, entre si, ao nível de 5% pelo teste de Scott Knott.

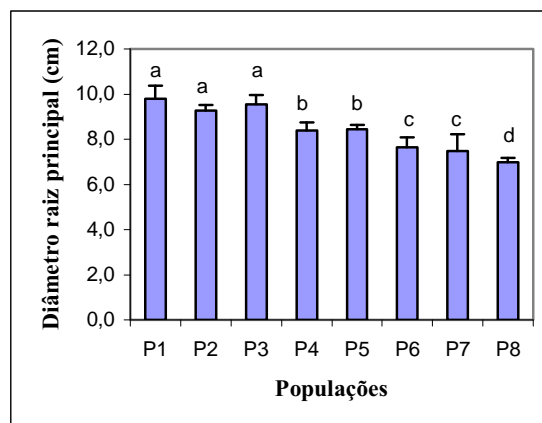
Mattos e Salis (2004) acompanharam mensalmente a fenologia de *P. glomerata* em Corumbá, MS, constatando que o número de ramos foi superior a seis por planta, declinando no final do experimento chegando a 3,3 ramos por planta; Kamada (2006) reportou número médio de 7,82 caules por plantas de fáfia cultivadas em Viçosa, MG. No entanto, Montanari Junior e Perecin (2006) obtiveram média de 13,11 caules para plantas de fáfia crescidas em Paulínia, SP. Essas diferenças provavelmente são devidas à variabilidade genética dos genótipos utilizados, o que dificulta uma comparação, mas, permite conhecer a existência de materiais com características de interesse para a propagação vegetativa por estaquia.

Além disso, o número de caules pode estar relacionado com o grau de dominância apical, visto que, é um dos seus principais determinantes. Os vegetais com forte inibição do crescimento das gemas laterais apresentam um único eixo de crescimento com poucas ramificações laterais. Por outro lado, naqueles que não expressam dominância apical ocorre o crescimento de caules secundários. Embora a dominância apical possa ser determinada inicialmente pela auxina, os estudos de fisiologia indicam que as citocininas desempenham um papel no crescimento inicial das gemas laterais. Além disso, fatores ambientais e genéticos também influenciam no controle que o ápice da parte aérea exerce sobre o crescimento de ramos e gemas laterais (TAIZ e ZEIGER,2004).

### 6.2.1.5 Diâmetro da raiz principal (DRP)

Os genótipos de *Pfaffia glomerata* caracterizados morfológicamente em relação ao diâmetro da raiz principal (Figura 15) ficaram distribuídos em quatro grupos: os maiores diâmetros foram detectados nas plantas de P1, P2 e P3 ( $9,80\text{cm} \pm 0,56\text{cm}$ ,  $9,55\text{cm} \pm 0,4\text{cm}$  e  $9,27\text{cm} \pm 0,25\text{cm}$ , respectivamente). Valores intermediários foram verificados em P4 e P5 ( $8,44 \pm 0,19\text{cm}$  e  $7,64\text{cm} \pm 0,43\text{cm}$ , respectivamente). O grupo composto pelos indivíduos de P6 e P7 produziram raízes principais com diâmetros pequenos ( $7,47\text{ cm} \pm 0,73\text{ cm}$  e  $7,64\text{ cm} \pm 0,43\text{ cm}$ , respectivamente) quando comparados com as populações da região do Paraná. A população oito (P8) apresentou significativamente o menor diâmetro da raiz principal ( $6,98\text{ cm} \pm 0,19\text{ cm}$ ).

Houve correlação positiva significativa (0,9544) entre o diâmetro da raiz principal e o diâmetro do caule (Tabela 15), o que reforça o padrão geral de raízes pivotantes para a espécie. Verificou-se também correlação positiva (0,9119) entre a matéria seca da raiz e o diâmetro da raiz principal o que indica crescimento em diâmetro contribuindo para a produção radicular. Esses dados corroboram com os obtidos por Guerreiro (2006) que ao avaliar plantas de *P. glomerata* cultivadas sob diferentes doses de estercos de galinha curtido, concluiu que o acréscimo em massa está relacionado ao aumento do diâmetro e não ao comprimento da raiz.



**Figura 15.** Diâmetro da raiz principal (cm) de plantas de oito populações de *Pfaffia glomerata* (P1 a P8) avaliadas em condições de campo, Ribeirão Preto, SP, 2006. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, entre si, ao nível de 5% pelo teste de Scott Knott.

Segundo Camargo e Alleoni (1997), a pressão de crescimento das raízes depende da área de contato da raiz e da pressão de turgor das células do meristema radicular em processo de alongamento relacionado à disponibilidade de água. Assim sendo, quanto maior o diâmetro da raiz, maior será a força exercida no processo de alongamento das células do meristema radicular para penetração em determinada camada de solo. É possível que o padrão radicular característico da fáfia possa facilitar o aprofundamento das raízes contribuindo para melhorar a estrutura e o manejo do solo. Segundo Lynch (1995) a arquitetura do sistema radicular apresenta uma configuração espacial com significado funcional, sendo considerada um aspecto fundamental no desenvolvimento da planta, tendo-se em conta a necessidade de se explorar um ambiente heterogêneo e com vários recursos do solo distribuídos desigualmente. O desenvolvimento espacial do sistema radicular é uma medida determinada pela habilidade de uma planta explorar esses recursos (LYNCH, 1995).

O padrão de crescimento do sistema radicular de uma espécie é determinado principalmente por sua característica genética (KUTSCHERA e LICHTENEGGER, 1992 *apud* GROSSO, 2007). Entretanto, também sofre influência da disponibilidade de água, da temperatura, dos nutrientes e das condições químicas e biológicas dos distintos horizontes do solo (FAHN, 1985; SCHUBERT, 1991). O solo na área experimental em Jurucê, SP, apresentou boa capacidade de drenagem e de aeração, e disponibilidade de nutrientes com pH 5,7, fatores que favorecem o desenvolvimento radicular. Além disso, o espaçamento do plantio e o vigor das mudas produzidas por micropropagação contribuíram para o crescimento radicular.

O desenvolvimento do sistema radicular também é fundamental para o estabelecimento da planta e sua permanência na natureza, mesmo sob condições de estresse. Dessa forma, o armazenamento de substâncias de reserva nas raízes é considerado uma estratégia evolutiva eficiente (ESAU, 1985). A presença de carboidratos nas raízes também pode estar relacionada com a tolerância ao frio permitindo a sobrevivência no inverno quando a parte aérea morre e rebrota na primavera (ROSNES et al., 1993). O mesmo pode ocorrer para períodos de seca.

No presente experimento não foi verificado um padrão único em relação à forma da raiz, foram observadas plantas com raízes fusiformes de aspecto humanóide característico e indivíduos com raízes tuberosas fasciculadas em todas as populações estudadas. De acordo com Magalhães (2000) a propagação por sementes em *P. glomerata*

possui a vantagem de promover o desenvolvimento de raízes pivotantes e mais grossas, comparadas com raízes das plantas propagadas por estacas, cujo sistema radicular é predominantemente fasciculado. O valor ou a aceitação comercial é maior para as raízes mais grossas.

Mussury e Moraes-Dallaqua (2004) descreveram a morfologia e a anatomia do sistema subterrâneo de *P. glomerata* o qual é formado por uma raiz principal e raízes laterais tuberosas. A raiz apresentou crescimento secundário resultante da instalação inicial do câmbio vascular e o aumento de diâmetro se fez pela atividade de câmbios acessórios originados a partir do periciclo plurisseriado.

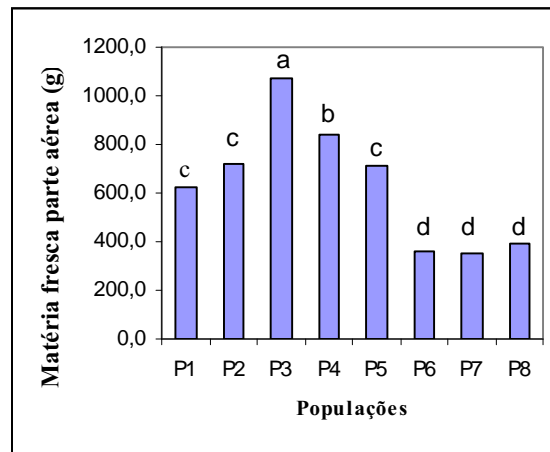
Vigo et al. (2004) realizaram estudos botânicos de amostras de raízes de *P. glomerata* de Porto Rico, PR, e encontraram sistema radicular pivotante composto por uma ou duas raízes principais, ou mais raramente de forma ramificada. As raízes mostraram-se alongadas, de comprimentos variados atingindo até 30 cm ou mais. Quanto à espessura decresceu até a extremidade, os exemplares de raízes adultas variaram de 0,5 a 3,5 cm, sendo que houve raízes secundárias não espessadas. As formas também contrastaram, desde típicas formas humanóides até as simples alongadas únicas; também ocorreram formas encurvadas, torcidas e espiraladas.

#### **6.2.1.6 Matéria fresca da parte aérea e da raiz (MFPA e MFR)**

A população P3 apresentou significativamente, a maior produção de matéria fresca da parte aérea ( $1071,2\text{g} \pm 199,67\text{g}$ ) e de matéria fresca da raiz ( $348,54\text{g} \pm 57,70\text{g}$ ) (Figura 16 e 17). Por outro lado, os indivíduos P6, P7 e P8, das áreas naturais de Itatinga, SP, apresentaram as menores médias de matéria fresca da parte aérea ( $363,8\text{g} \pm 55,2\text{g}$ ,  $354,9\text{g} \pm 42,9\text{g}$  e  $389,9\text{g} \pm 29,1\text{g}$ , respectivamente) e de matéria fresca da raiz, com exceção de P6. O valor médio para a matéria fresca da parte aérea atingiu  $634,42\text{g}$  e para a matéria fresca da raiz foi de  $229,1\text{g}$ .

Houve correlação significativa e positiva (0,8225) entre a matéria fresca da parte aérea e a matéria fresca da raiz indicando partição equilibrada de compostos orgânicos. Além disso, a colheita foi realizada no período de precipitação com disponibilidade de água no solo, o que provavelmente favoreceu a produção de matéria fresca tanto de raízes

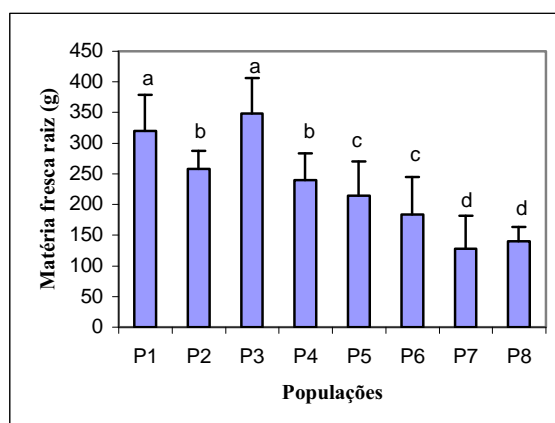
quanto da parte aérea. Até a colheita as plantas não haviam apresentado abscisão foliar. O maior componente do crescimento vegetal é a expansão celular governada pela pressão de turgor, quando as células aumentam várias vezes em volume. Assim, o crescimento pode ser medido, também, em termos de mudança do peso fresco, apesar de que em plantas crescendo em solo ocorre variação do peso em resposta às alterações hídricas, de modo que esse critério não deve ser avaliado isoladamente (TAIZ e ZEIGER, 2004).



**Figura 16.** Matéria fresca da parte aérea (g) das plantas de oito populações de *Pfaffia glomerata* (P1 a P8) avaliadas em condições de campo, Ribeirão Preto, SP, 2006. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, ao nível de 5% pelo teste de Scott Knott.

Montanari Junior (2005) encontrou correlação significativa e positiva entre a altura da planta, o diâmetro do caule, o número de caules e a massa de raízes, para *Pfaffia glomerata* em Paulínia, SP. As correlações mostraram componentes de variância ambiental e genética, mesmo assim o autor considerou as características relevantes para predizer o potencial agrícola dos indivíduos. Plantas cultivadas em Paulínia, SP produziram 866,2 g de matéria fresca de raízes (MONTANARI JUNIOR e PERECIN, 2006).

Corrêa Junior (2003) avaliou a sazonalidade na produção de raízes e conteúdos de  $\beta$ -ecdisona em diferentes acessos da espécie, em Querência do Norte, PR e obteve diferenças significativas entre as épocas de colheita em relação à produção de matéria fresca. A maior produção de raízes/planta (peso médio de 206,88g) foi detectada aos 15 meses, mas não houve diferença significativa com a colheita aos 12 meses, portanto, o autor recomenda que a colheita seja realizada após um ano de transplantio.

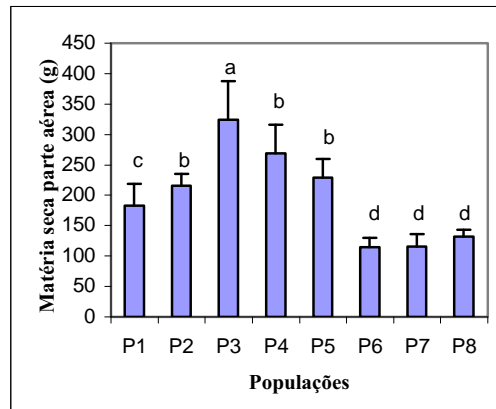


**Figura 17.** Matéria fresca da raiz (g) de plantas de oito populações de *Pfaffia glomerata* (P1 a P8) avaliadas em condições de campo, Ribeirão Preto, SP, 2006. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, entre si, ao nível de 5% pelo teste de Scott Knott.

#### 6.2.1.7 Matéria seca da parte aérea (MSPA)

A maior produção de matéria seca da parte aérea foi encontrada no acesso P3, 324,06 g, ( $\pm 63,21$ g), enquanto que a média geral foi de 197,94 g ( $\pm 78,36$ g) (Figura 18). Todos os acessos originários da região do P.N. Ilha Grande apresentaram maior produção de matéria seca quando comparados com os acessos provenientes de Itatinga, SP. Os dados mostram que houve uma variabilidade de resposta nesse atributo podendo-se distinguir quatro grupos: o acesso P3 com a maior produção, um segundo grupo constituído por P2, P5 e P4 com valores de boa produção de massa seca, o acesso P1 com produção intermediária e P6, P7 e P8 com a menor produção (114,8g,  $\pm 15,23$ g; 115,9g  $\pm 19,65$ g/planta; 132,2 g  $\pm 10,92$ g, respectivamente).

Houve correlação (0,9951) positiva e significativa entre a matéria seca da parte aérea (MSPA) e a matéria fresca da parte aérea. Kamada (2006) também encontrou correlação significativa quanto as duas características e sugere que nas situações em que seja necessário reduzir o número de caracteres para avaliação, é recomendável desconsiderar o descritor matéria fresca do caule. O autor também verificou que a matéria fresca do caule, segundo a metodologia de Singh, apresentou contribuição relativa baixa com valor de 0,1847.



**Figura 18.** Matéria seca da parte aérea (g) de plantas de oito populações de *Pfaffia glomerata* (P1 a P8) avaliadas em condições de campo, Ribeirão Preto, SP, 2006. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, entre si, ao nível de 5% pelo teste de Scott Knott.

Kamada (2006) obteve produção média geral de 380,98g para a matéria seca do caule em genótipos de *P. glomerata* cultivados em vasos no município de Viçosa, MG, após oito meses do plantio. Por outro lado, Guerreiro (2006) observou a produção de fitomassa seca para a parte aérea de 55,28g para a dose de 30t/ha aos 360 dias, nas condições de São Manoel, SP e verificou também que o acréscimo na adubação teve uma relação direta com a produção de fitomassa seca dos caules até o limite de 37,89 t/ha.

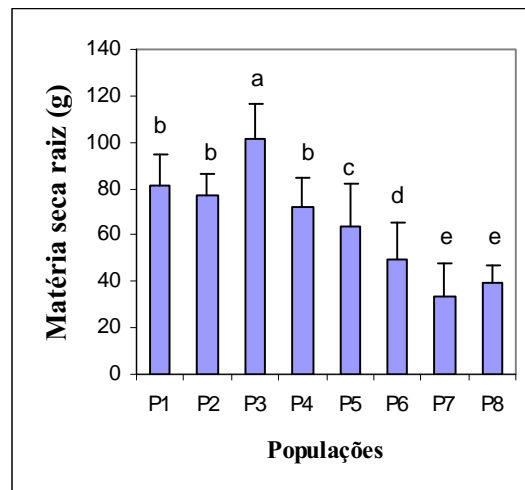
No presente estudo ocorreu um período de cerca de 145 dias ininterruptos sem precipitação (abril a agosto), correspondendo dos cinco até os nove meses do plantio no campo. Considerando-se ainda, o fato das plantas terem sido submetidas a uma poda aos 240 dias (oito meses do plantio), os resultados indicam que ocorreu retomada do crescimento, possivelmente relacionada às boas condições físicas e químicas do solo, pela qualidade das mudas, pelas substâncias de reserva das raízes e pela característica genética dos indivíduos. Assim, levando-se em conta o conjunto de fatores que podem influenciar no crescimento e baseando nas informações descritas na literatura, a espécie revela capacidade de adaptação às diversas paisagens em que se estabeleceram os cultivos acima descritos.

#### 6.2.1.8 Matéria seca da raiz (MSR)

Verificou-se diferença significativa entre os acessos estudados quanto à produção da matéria seca da raiz. As plantas da população P3 produziram 101,47g  $\pm$  15,13g de

matéria seca de raiz, constituindo-se, predominantemente, na maior produção quando comparada estatisticamente com as outras populações avaliadas (Figura 19). Essa população pertence ao grupo de plantas que registrou os maiores valores também para o diâmetro da raiz principal, P1 e P2. Por outro lado, as populações sete e oito foram as que apresentaram os menores pesos de matéria seca da raiz,  $33,3 \text{ g} \pm 14,68 \text{ g}$  e  $39,3 \text{ g} \pm 7,35 \text{ g}$ . A média geral obtida foi de  $64,72 \text{ g} \pm 24,99 \text{ g}$  de matéria seca de raiz/planta.

Verificou-se correlação positiva e significativa (0,8956) entre a matéria seca da parte aérea e a matéria seca da raiz. As populações que apresentaram maior peso de matéria seca da parte aérea (P2, P3 e P4) também acumularam mais matéria seca da raiz, com exceção das populações um e cinco (P1 e P5).



**Figura 19.** Matéria seca da raiz (g) de plantas de oito populações de *Pfaffia glomerata* (P1 a P8) avaliadas em condições de campo, Ribeirão Preto, SP, 2006. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, entre si, ao nível de 5% pelo teste de Scott Knott.

Figueiredo et al. (2004) relatam uma correlação significativa entre a produção de parte aérea e o peso da matéria seca da raiz, em acessos de *P. glomerata* cultivados em Campos de Goytacazes, RJ, local de solo argiloso, após 13 meses do transplântio. Os autores classificaram os acessos em três grupos de acordo com a produtividade: baixa, intermediária e superior. Foi ressaltado que no grupo superior dois materiais são provenientes de regiões próximas ao local do estudo e que provavelmente estariam bem adaptados às condições ambientais de Campos de Goytacazes, RJ.

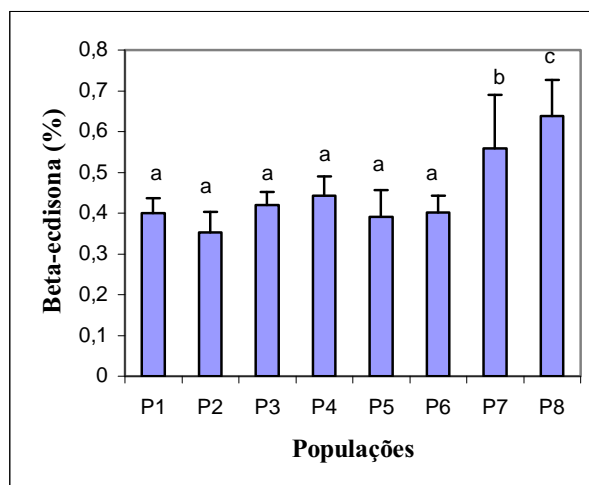
Montanari Junior (2005) obteve valores de 335,3g de matéria seca da raiz em média para plantas de *P. glomerata* colhidas aos 14 meses, em Paulínia, SP. O solo dessa região é do tipo latossolo vermelho, rico em argila (65%), bem estruturado e com boa drenagem. Em outro trabalho com a mesma espécie, Corrêa Junior (2003) registrou valores médios muito próximos ao encontrado no presente experimento, 60,56 g/planta, nos acessos avaliados doze meses após o transplante, em Querência do Norte, PR, cujo solo é do tipo Gleissolo Melânico Ta distrófico hístico. O autor também constatou diferença significativa no peso da matéria seca entre os quatro acessos testados.

Guerreiro (2006) analisou o crescimento de *P. glomerata*, cultivada em solo adubado com esterco de galinha curtido, em São Manoel, SP e registrou média geral de 27,08g aos 360 dias após a emergência. Em outro experimento conduzido em Viçosa, MG, a espécie foi cultivada em vasos plásticos com capacidade para 18 L, contendo mistura de solo e esterco de curral (3:1). A avaliação após 270 dias do plantio mostrou uma produção de matéria seca da raiz entre 58,15g e 326,21 g/planta, sendo a média de 135g (KAMADA, 2006).

A produção de matéria seca de raízes de *P. glomerata* é uma característica fundamental na seleção de indivíduos ou populações de interesse para estudos agrônômicos visando o cultivo comercial e importante para a conservação do germoplasma da espécie em bancos ou coleções *ex situ*. A característica também é essencial para os agricultores que comercializam a fâfia já que as raízes são vendidas à base de seu peso, fresco ou seco.

#### 6.2.1.9 $\beta$ -ecdisona (E)

Os acessos analisados mostraram diferenças significativas em relação ao teor (%) e à quantidade (mg) de  $\beta$ -ecdisona. A população oito (P8) apresentou significativamente o maior teor (0,64%) de  $\beta$ -ecdisona, seguida de P7 que produziu 0,56% (Figura 20). As demais populações produziram significativamente teores menores, sendo que em P2 foi detectado menor valor 0,35%. A média geral ficou em 0,45%. Os valores máximos encontrados nas populações P7 e P8 estão próximos a outros descritos em literatura: 0,67% a 0,71% (MAGALHÃES, 2000) e de 0,69% e 0,70 % (MONTANARI JÚNIOR et al., 1999).



**Figura 20.** Teor (%) de  $\beta$ -ecdisona em plantas de oito populações de *Pfaffia glomerata* (P1 a P8) avaliadas em condições de campo, Ribeirão Preto, SP, 2006. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, entre si, ao nível de 5% pelo teste de Scott Knott.

Não foi observada correlação significativa entre o teor de  $\beta$ -ecdisona e a produção de matéria seca da raiz. As duas populações que produziram os maiores teores de  $\beta$ -ecdisona (P7 e P8) são originárias da região de Itatinga, SP, todavia, são aquelas que produziram menos matéria seca da raiz. No acesso P3 verificou-se a maior produção de matéria seca da raiz, contudo, o teor de  $\beta$ -ecdisona foi de 0,42%. Esse resultado está de acordo com o que foi verificado para a *Pfaffia glomerata* Kamada (2006) e Figueiredo (2004).

No estudo da diversidade genética intra e interpopulacional de *Pfaffia glomerata* coletada na região de ocorrência natural no Paraná e cultivada em Viçosa, MG, o intervalo do teor de 20-hidroxiecdisona (20E) oscilou entre 0,31% e 0,75%, sendo a média estimada em 0,51%. Os indivíduos da população Querência do Norte, local de intenso extrativismo apresentaram os maiores valores do composto, entretanto, apresentaram matéria seca da raiz (MSR) abaixo da média geral (135,1 g/planta). O autor ressalta que a produção total do princípio ativo foi favorecida nos genótipos que apresentaram folhas por um período maior durante o florescimento (KAMADA, 2006).

Figueiredo et al. (2004) compararam 23 acessos de *P. glomerata* nas condições de Campos de Goitacazes, RJ, e encontraram teor de  $\beta$ -ecdisona variando entre 0,15% e 0,47%. O acesso GSd1 (Campinas, SP) foi significativamente superior aos demais em relação ao teor do princípio ativo, apesar da produção intermediária de raízes (151,25g) Por

outro lado, o acesso NdS (Itabaiana, SE) foi um dos que produziram maior peso da matéria seca da raiz, apresentando teor intermediário de  $\beta$ -ecdisona (0,31%).

No presente estudo, as plantas foram colhidas ao final de 12 meses do plantio no campo, época em que provavelmente a  $\beta$ -ecdisona tenha sido redirecionada para outros órgãos que são drenos fortes como as flores e sementes. De acordo com Dinan (2001) as concentrações dos fitoecdisteróides são altas nos tecidos mais importantes para a sobrevivência da planta.

Guerreiro (2006) avaliou *Pfaffia glomerata* cultivada em diferentes níveis de adubação orgânica e verificou a diminuição no teor de  $\beta$ -ecdisona nas raízes, na época em que foi constatada a máxima produção de flores. Em outro estudo, Flores (2006) analisou a produção desse metabólito em plantas de *P. glomerata* e de *P. tuberosa*, após dois anos de plantio no campo, obtendo maior produção na parte aérea quando comparado com o sistema radicular tanto em *P. glomerata* assim como em *P. tuberosa*. Ainda, Corrêa Júnior (2003), avaliando o teor de  $\beta$ -ecdisona em acessos da espécie durante quatro épocas de colheita, obteve maior valor da substância nas plantas colhidas aos 12 meses, e aos 14 meses (última colheita) houve redução no teor da substância. Essa colheita foi realizada na primavera, época em que a planta direciona suas reservas para o desenvolvimento. Desta forma, baseando nos relatos acima descritos, a avaliação do acúmulo da  $\beta$ -ecdisona nas raízes de *P. glomerata* em função dos estádios de desenvolvimento da planta configura-se como investigação importante para ampliar o conhecimento do perfil de distribuição desse fitoecdisteróide.

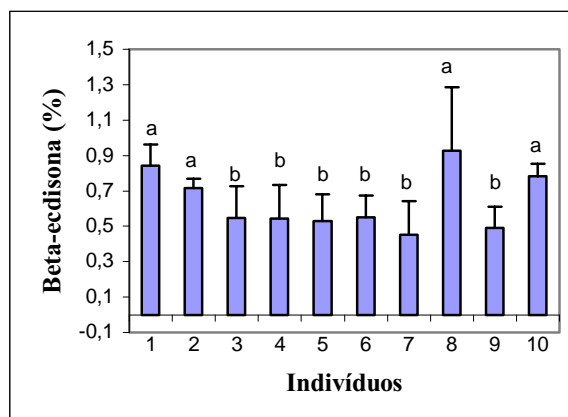
Ao se analisar a quantidade (mg) de  $\beta$ -ecdisona por planta, observou-se que a maior quantidade da substância (388mg) foi encontrada na população três (P3), aquela que também foi a maior produtora de matéria seca da raiz (Figura 19). O acesso P8 que havia apresentado o maior teor (0,64%) do princípio ativo, quando avaliado em relação à quantidade do mesmo produziu 278 mg, este acesso encontra-se no grupo que registrou os menores índices de matéria seca da raiz. Estes resultados estão coerentes com a correlação significativa e positiva (0,7929) que houve entre a matéria seca da raiz e a quantidade de  $\beta$ -ecdisona. Assim, com base nesses dados pode-se inferir que os indivíduos da população P3 também possuem potencial para seleção de materiais visando a produção em escala.

A população P3 foi coletada entre os municípios de Porto Primavera e Porto São José em ambiente de beira de estrada, provavelmente bastante antropizado. Este fato pode ter contribuído para a seleção de indivíduos com maior adaptação a estresse provocado

por fatores abióticos. Entretanto, esta é uma questão complexa e seria necessário realizar um histórico da área para uma análise que leve em consideração a influência que os diversos fatores exercem sobre os indivíduos.

Existe ainda, a possibilidade de que a população P3 possa ter respondido de forma mais eficiente à adubação na produção de matéria seca do que as outras populações. Guerreiro (2006) estudando a influência da adubação orgânica no desenvolvimento de *Pfaffia glomerata*, verificou que nos tratamentos 30 t/ha e 45 t/ha de esterco de galinha curtido as plantas produziram os maiores teores do princípio ativo, 0,513% e 0,55%, respectivamente, aos 120 dias do transplante. Quando se analisou a quantidade de  $\beta$ -ecdisona por planta, foi verificada a influência da adubação e época de colheita, uma vez que a quantidade total do princípio ativo dependeu da fitomassa seca das raízes, a qual respondeu tanto a adubação quanto às épocas de colheita. A adubação interferiu na quantidade total de  $\beta$ -ecdisona/planta não somente pela influência que teve na fitomassa seca das raízes, mas na produção do princípio ativo.

Os indivíduos do acesso P8 apresentaram diferença significativa quanto à produção de peso seco da raiz e teor de  $\beta$ -ecdisona (Figura 21), destacando-se os indivíduos 1 (46,4g de peso seco/planta, 0,84% de  $\beta$ -ecdisona), 2 (61,5 g peso seco/planta e 0,71% de  $\beta$ -ecdisona) e o 10 (46,8 g de peso seco/planta, 0,78% de  $\beta$ -ecdisona). A população P8 é originária de ilha, ambiente com grande disponibilidade de água. É provável que os indivíduos desta população estejam constantemente sujeitos a pressões ambientais de seca e inundação, favorecendo a produção do princípio ativo como uma defesa ao estresse ambiental. Nas populações P7 e P3 não houve diferença significativa entre indivíduos para os teores de  $\beta$ -ecdisona, mas, o peso seco da raiz foi significativamente maior nos indivíduos 5, 7, 8, 9 e 10 de 7 e nos indivíduos 3 (150g peso seco/planta, 8 (145, 9 g de peso seco/planta) e 9 (122,8 g peso seco/planta) pertencentes à P3 do que nos demais. Em P4 não houve diferença significativa entre os indivíduos para o teor de  $\beta$ -ecdisona e nem para peso seco da raiz.



**Figura 21.** Teor de  $\beta$ -ecdisona (%) nos indivíduos da população P8 de *Pfaffia glomerata* avaliados em condições de campo, Ribeirão Preto, SP, 2006. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, entre si, ao nível de 5% pelo teste de Scott Knott.

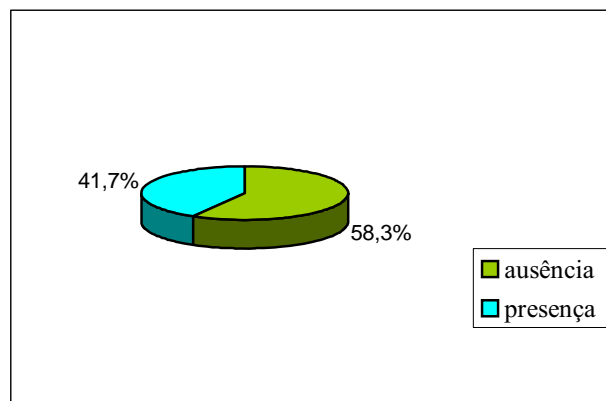
Guerreiro (2006) estudando a influência da adubação orgânica no desenvolvimento de *Pfaffia glomerata*, verificou que nos tratamentos 30 t/ha e 45 t/ha de esterco de galinha curtido as plantas produziram os maiores teores do princípio ativo, 0,513% e 0,55%, respectivamente, aos 120 dias do transplântio. Diferentemente, quando se analisou a quantidade de  $\beta$ -ecdisona por planta, foi verificada a influência da adubação e época de colheita, uma vez que a quantidade total do princípio ativo dependeu da fitomassa seca das raízes, a qual respondeu tanto à adubação quanto ao período em que foram realizadas a colheita.

Flores (2006) avaliou *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* quanto a produção de  $\beta$ -ecdisona (20-hidroxiecdisona) em plantas micropropagadas, em clones e em calos *in vitro*. Foram comparados também quanto ao teor de  $\beta$ -ecdisona dois acessos de *P. glomerata*: BRA (originário de Querência do Norte, PR) e JB-UFSM (Jardim Botânico da UFSM, Santa Maria, RS). Após cultivo no solo, o teor de  $\beta$ -ecdisona encontrado nessas plantas foi similar ao encontrado em plantas nativas. Constatou-se ainda que, em ambas as espécies estudadas, as partes aéreas das plantas acumularam cerca de duas vezes mais teor de  $\beta$ -ecdisona quando comparado ao sistema radicular, levando a autora a sugerir a possibilidade de a parte aérea ser um dos principais locais de biossíntese dos ecdisteróides.

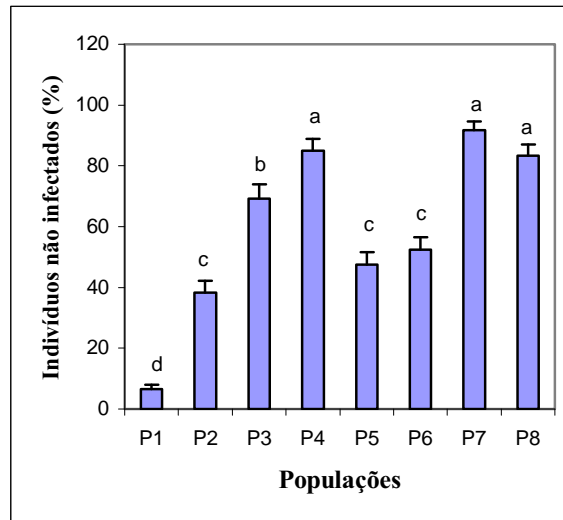
### 6.2.1.10 Ocorrência de nematóides (NEM)

O laudo nematológico apontou a presença de *Meloidogyne* cf. *incognita*, *Pratylenchus zae* e *P. brachyurus*, *Rotylenchulus reniformis* e Criconematidae. Por isso, seis meses antes da instalação do experimento foram plantadas mudas de *Tagetes* sp., espécie utilizada no controle de populações de nematóides em cultivos orgânicos.

Mesmo após esse procedimento foi constatada a presença de nematóide de galhas, *Meloidogyne* sp., em 41,7% dos indivíduos (Figura 22). As populações quatro (P4), sete (P7) e oito (P8) apresentaram genótipos com indicativo de resistência a nematóides de galhas, sendo que na P7 91,7% dos indivíduos não tiveram raízes infectadas por nematóides (Figura 23). Por outro lado, P1, P5, P6 e P2 revelaram uma possível suscetibilidade, na P1 observou-se em 93,3% dos indivíduos galhas características de infecção por *Meloidogyne* sp.



**Figura 22.** Porcentagem total de indivíduos de *Pfaffia glomerata* com presença ou ausência de nematóides de galhas nas raízes, avaliadas em condições de campo, Ribeirão Preto, SP, 2006.



**Figura 23.** Porcentagem de indivíduos de *Pfaffia glomerata* não infectados por nematóides de galhas em cada população (P1 a P8) avaliada em condições de campo, Ribeirão Preto, SP, 2006. Médias seguidas pela mesma letra, entre si, não diferem significativamente, ao nível de 5% pelo teste de Scott Knott.

Corrêa Junior (2003) observou maior incidência de nematóides (*Meloidogyne* sp.) nas raízes de fáfia que crescem em locais de sequeiro. O solo da área experimental em Jurucê, SP, tem boa drenagem, entretanto as análises anteriores ao plantio já indicavam a presença de espécies de nematóides. É possível que o plantio de *Tagetes* sp., espécie não hospedeira, antes da implantação do cultivo de *P. glomerata* tenha minimizado o número de populações de nematóides no solo.

Os acessos P7 e P8 foram os que expressaram os maiores teores de  $\beta$ -ecdisona (0,56% e 0,64%, respectivamente) e as menores porcentagens de raízes com nematóides de galhas, apesar de produzirem menos matéria seca das raízes (33,3 e 39,3g, respectivamente). Por outro lado, em P3 foi verificado o maior valor para matéria seca das raízes (101,5g), valores próximos ao da média geral para o teor do princípio ativo (0,42%) e possível resistência a nematóides de galhas. A população P4 também pertence ao grupo que registrou as menores porcentagens de raízes com *Meloidogyne* sp., produziu teor do metabólito secundário de 0,44% e 63,3g de matéria seca de raízes. Assim, com base nessas informações é possível considerar a existência de genótipos promissores para a produção de matéria seca das raízes, teor de  $\beta$ -ecdisona e com indicativo para resistência a nematóides de galhas nas populações P3, P4, P7 e P8.

Os resultados observados no presente trabalho em relação a presença ou ausência de nematóides formadores de galhas em genótipos de *Pfaffia glomerata* justificam estudos específicos de caracterização nematológica nos acessos da coleção visando à identificação e seleção de materiais resistentes para a inclusão na pesquisa agrônômica.

Dentro deste contexto e levando em consideração todos os caracteres avaliados e a capacidade adaptativa da espécie ao local de cultivo, os acessos P3 e P8 podem ser considerados os mais promissores, portanto, recomendáveis para a seleção de genótipos visando a produção agrícola de *Pfaffia glomerata* na região de Jurucê, SP.

Indivíduos com baixa porcentagem de raízes infectadas por nematóides de galhas apresentaram valores significativamente maiores de  $\beta$ -ecdisona do que aqueles com alta porcentagem de infecção (Tabela 16). A presença de outras espécies de nematóides na área do experimento (*Pratylenchus brachyurus*, *P. zae* e *Rotylenchulus reniformis*), pode ter desencadeado a síntese de  $\beta$ -ecdisona como uma estratégia eficiente de defesa. É possível que as concentrações do metabólito na região da rizosfera tenham inibido a invasão de nematóides de galhas nas raízes de *P. glomerata*, entretanto, essa questão merece investigação mais aprofundada.

**Tabela 16.** Teor de  $\beta$ -ecdisona (%) em indivíduos de *Pfaffia glomerata* não infectados e em indivíduos infectados por nematóides de galhas. Ribeirão Preto, SP, 2007.

Tratamento	Teor de $\beta$ -ecdisona (%)	Desvio padrão
Indivíduos não infectados	0,47a	$\pm 0,17$
Indivíduos infectados	0,40b	$\pm 0,12$

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, entre si, ao nível de 5% pelo teste de Scott Knott

Gomes (2006) caracterizou acessos de *P. glomerata* quanto à resistência ao nematóide *Meloidogyne incognita* raça 1, encontrando materiais altamente resistentes, resistentes, suscetíveis e altamente suscetíveis. A autora descreveu ainda que a resistência de raízes de *P. glomerata* a nematóides esteve associada primeiramente a um mecanismo pré-infectivo, ainda não identificado, o qual limitou a entrada do parasita nas raízes. Um segundo mecanismo, pós-infectivo e de natureza bioquímica, revelou uma resposta de hipersensibilidade relacionada a compostos fenólicos, que aparentemente bloquearam o desenvolvimento dos estádios juvenis (J2-J3-J4) até a fêmea adulta.

Soriano et al. (2004) verificaram que *Pratylenchus neglectus*, *Heterodera schachtii* e *Meloidogyne javanica* inoculados em *Spinacea oleracea* (espinafre) induziram a biossíntese de 20-hidroxiecdisona (20E). *P. neglectus* e *H. schachtii* induziram a síntese de 20E em concentrações equivalentes àquelas quando se aplicou metil jasmonato (MJ). *Meloidogyne javanica* também induziu a produção de 20E mas em concentrações menores do que a aquela induzida por MJ. Além disso, *M. javanica* foi mais sensível à 20E do que *H. schachtii* e *P. neglectus*, pois esses foram afetados somente pós-invasão. A inibição pré-invasiva de *M. javanica* nas raízes por 20E sinalizou que o ecdisteróide pode se difundir para a rizosfera.

Carneiro et al. (2007) identificaram as espécies *Meloidogyne javanica*, *M. incognita* e *Meloidogyne* sp. que ocorrem em *Pfaffia* spp no Distrito Federal e constataram predominância para *M. javanica*. Também foi avaliada a patogenicidade de *M. javanica* sobre *P. glomerata* e *P. paniculata*, após oito meses de inoculação, observando-se alta suscetibilidade, porém, com respostas diferentes. Nas raízes de *P. glomerata* foi verificado um grande número de galhas enquanto que em *P. paniculata* as raízes tornaram-se engrossadas e necrosadas. Em relação à massa fresca das raízes *P. glomerata* infectada produziu menos massa que a testemunha e, em *P. paniculata* foi registrado valor maior que na planta sadia. Em relação à concentração de  $\beta$ -ecdisona houve um aumento significativo nas plantas parasitadas pelo nematóide, principalmente em *P. glomerata*. Observou-se também que não houve influência dos danos causados pelo nematóide na altura das plantas.

As plantas infectadas produziram peso de matéria seca da raiz maior do que as plantas não infectadas (Tabela 17). Abrão e Mazzafera (2001) relatam maior crescimento de raiz em plantas de algodão inoculadas com *Meloidogyne incognita*, provavelmente, devido à emissão de novas raízes secundárias nos pontos de penetração do nematóide. O aumento de massa de raízes infectadas por nematóides tem sido discutido por alguns autores, sugerindo que isso seria a consequência de efeito combinado da emissão de novas raízes secundárias, nos locais de infecção do nematóide (HUTANGURA et al., 1999) e a formação de galhas (CARNEIRO, 2000; CARNEIRO et al., 1999).

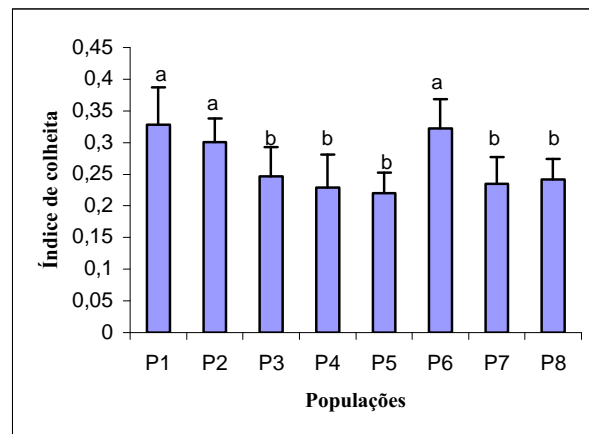
**Tabela 17.** Peso da matéria seca das raízes (g) em indivíduos de *Pfaffia glomerata* não infectados e em indivíduos infectados por nematóides de galhas. Ribeirão Preto, SP, 2007.

Tratamento	MSR (g)	Desvio padrão
Indivíduos não infectados	62,284b	±39,9
Indivíduos infectados	73,331a	±35,8

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, entre si, ao nível de 5% pelo teste de Scott Knott

### 6.2.1.11 Índice de colheita (IC)

O índice de colheita é determinado pela razão entre a produção econômica e a produção biológica da planta. As populações um, dois e seis (P1, P2 e P6) apresentaram os maiores valores para o índice de colheita ( $0,30 \pm 0,05$ ;  $0,31 \pm 0,04$  e  $0,33 \pm 0,03$ , respectivamente) (Figura 24). Os acessos P1 e P2 estão entre os que produziram os maiores valores de matéria seca da raiz. Porém, essas populações não foram as que apresentaram os maiores teores de  $\beta$ -ecdisona, além disso, foram suscetíveis a nematóides de galhas. O IC médio foi de  $0,27 \pm 0,04$  e para P3, P4, P7 e P8 estiveram em  $0,25 \pm 0,05$ ;  $0,23 \pm 0,04$ ;  $0,24 \pm 0,05$  e  $0,24 \pm 0,05$  respectivamente. Foi verificado que P3 e P4 tiveram os maiores crescimentos da parte aérea e provavelmente, devido a este fator o índice de colheita tenha sido inferior ao de outras populações.



**Figura 24.** Índice de colheita de cada população de *Pfaffia glomerata* avaliada em condições de campo, Ribeirão Preto, SP, 2006. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, entre si, ao nível de 5% pelo teste de Scott Knott.

Os índices obtidos são considerados razoáveis e podem apresentar valores superiores se otimizadas as variáveis como homogeneidade dos materiais, espaçamento, profundidade da cova, plantio de acordo com as condições climáticas da região produtora, para que essas plantas possam produzir raízes de forma mais eficiente. Os valores ficaram próximos à média geral de 0,26 para o IC de fáfia cultivada em Viçosa, MG, detectado por Kamada (2006).

Montanari Júnior e Perecin (2006) encontraram correlação significativa e negativa para o índice de colheita e a altura das plantas, número de caules e massa da parte aérea em plantas de *P. glomerata* avaliadas nas condições de Paulínia, SP.

Figueiredo et al. (2004) constataram que os acessos de *P. glomerata* com maior índice de colheita predominaram entre aqueles com o menor peso de matéria seca da raiz, no entanto, os acessos com maior peso de matéria seca da raiz apresentaram índice de colheita intermediário segundo a classificação dos autores (0,30 a 0,34), sendo consideradas plantas relativamente eficientes na conversão de fotoassimilados.

### 6.2.2 Produtividade

A produtividade de raízes secas de *P. glomerata* aos doze meses foi de 1294,38 kg/ha em espaçamento de 1,0m x 0,5m, nesse experimento. Deve-se ressaltar que os materiais eram heterogêneos e que obviamente a produtividade alcançaria índices maiores se fossem usados somente os acessos mais produtivos, mesmo assim os resultados foram promissores comparando-se ao obtido em outros trabalhos com a espécie. A população P3 foi a que apresentou melhor produtividade contribuindo com 253,69 kg/ha.

Em solos com boa fertilidade a produtividade para raízes secas de *P. glomerata* alcançou 1900 kg/ha em Paulínia, SP (MAGALHÃES, 2000), 1200 kg/ha na região de ocorrência natural, no Paraná (CORRÊA JUNIOR et al., 2002) e 670 kg/ha em São Manuel, SP (GUERREIRO, 2006). Corrêa Júnior et al. (2006) ainda constatou produtividade da parte subterrânea moída e seca de 1.620 kg/ha, para lavouras onde as mudas foram produzidas por sementes, e 2.700 kg/ha naquelas formadas por plantas originadas de estaca do colo.

Figueiredo et al. (2004) após avaliarem a produtividade de 23 acessos de *P. glomerata* em Campos de Goitacazes, RJ, observaram a formação de três grupos, o

primeiro, com os menores valores (89 a 455 kg/ha), o segundo, com acessos de produção intermediária (594 a 817 kg/ha) e o terceiro com produtividade superior (1150 a 1322kg/ha).

A capacidade produtiva de *P. glomerata* também foi avaliada em cultivo solteiro e consorciado com *Plantago major* L. (tanchagem), os resultados mostraram que o consórcio com quatro fileiras de tanchagem alternadas com duas fileiras de *P. glomerata*, com espaçamento de 54 cm produziram 2348,8 kg.ha<sup>-1</sup> e foi o recomendável para a produção agrônômica (NASCIMENTO et al., 2007).

Guerreiro (2006) baseado nos dados de produtividade e no custo total para a produção de fáfia estimou que nas condições de São Manuel, SP, com adubação de 30 t/ha de esterco de galinha curtido seria possível um lucro de R\$ 1617,00 por hectare (não incluso o frete do transporte) para um produtor de *Pfaffia glomerata*. Corrêa Júnior e Ming (2004) consideram que de acordo com o custo de produção e os rendimentos por área, o cultivo de fáfia pode constituir-se numa alternativa de renda para os agricultores da região noroeste do Paraná, PR, em especial nas unidades de agricultura familiar por ser uma atividade pouco mecanizada. Além disso, o cultivo de fáfia gera oportunidades de trabalho numa época de menor concentração de demanda (inverno).

Os dados sobre produtividade apresentados em todos os estudos acima mencionados evidenciam que a origem dos materiais, as diferenças nas condições edafo-climáticas e de plantio contribuem para ressaltar as variações nos resultados de cada pesquisa. As informações também apontam à necessidade de se obter materiais selecionados buscando uniformidade e maior produtividade, assim como a otimização das condições de cultivo para cada região, ou ainda, a sistematização do conjunto de conhecimentos gerados em literatura para recomendação a todos os agricultores interessados no plantio de *P. glomerata*.

### **6.2.3 Análise de componentes principais**

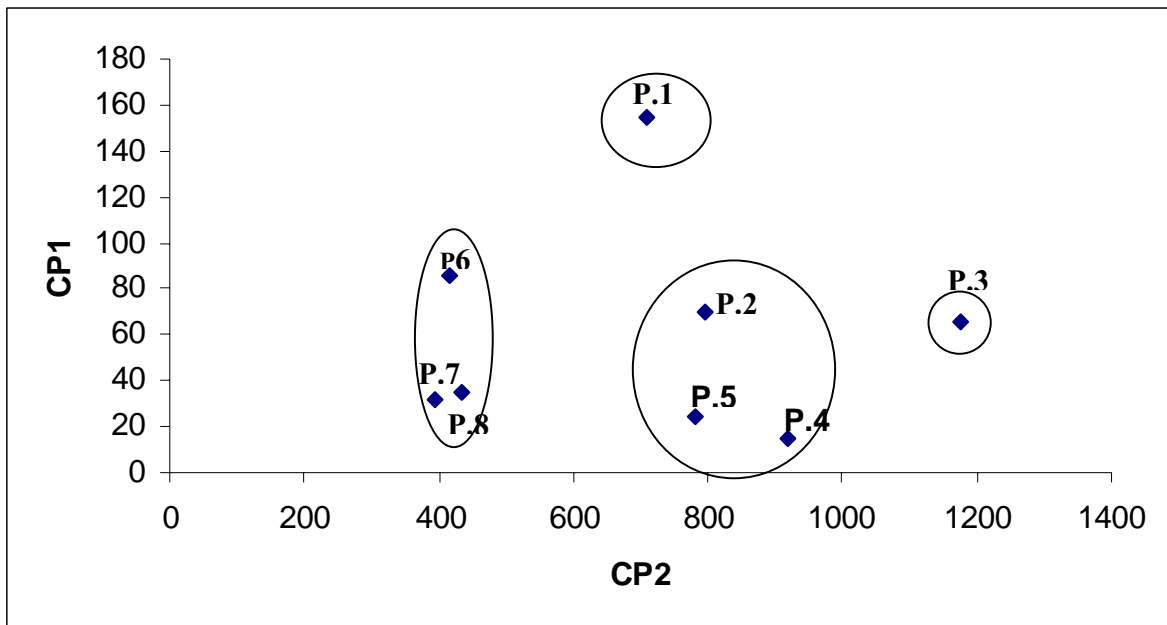
A Tabela 18 contém os autovetores e as porcentagens da variância acumulada para os dois primeiros componentes principais, obtidos para dez descritores morfológicos e um químico. Os dois primeiros componentes encerram 99,58 % da variação total. As maiores cargas foram detectadas para o descritor matéria fresca da parte aérea (mfpa) no primeiro componente e matéria fresca da raiz (mfr), portanto, são os descritores de maior

contribuição para a variabilidade observada. A  $\beta$ -ecdisona não se apresentou como um descritor útil na separação de acessos, mas, é um critério fundamental na seleção de genótipos da espécie.

Na Figura 25 é apresentada a dispersão gráfica das oito populações *Pfaffia glomerata* em relação aos dois primeiros componentes principais. Verifica-se a composição de quatro grupos. As populações de Itatinga, SP (P6, P7 e P8) formaram um agrupamento e três populações de Ilha Grande, PR (P2, P4 e P5) mantiveram um único conjunto. A população P1 é originária de área cultivada e provavelmente esteja sob pressões ambientais mais fortes que as outras, o pode justificar a separação no gráfico. A população P3 é proveniente de Bataiporã, MS, região geograficamente mais afastada das demais da área do PN de Ilha Grande, PR, em localidade sob pressão antrópica.

**Tabela 18.** Variância acumulada (%) e autovetores para o primeiro (CP1) e segundo (CP2) componente principal para um descritor químico e dez descritores morfológicos de acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. Ribeirão Preto, SP, 2008.

Descritores	Componente principal	
	CP1	CP2
Altura da planta	0,0007	-0,0011
Diâmetro do caule	0,0035	0,0046
Diâmetro da raiz principal	0,0030	0,0077
Número de caules	0,0018	0,0022
Comprimento do entrenó	-0,0004	0,0078
Matéria fresca parte aérea	0,9260	-0,2340
Matéria seca parte aérea	0,2733	-0,1242
Matéria fresca raiz	0,2487	0,9360
Matéria seca raiz	0,0771	0,2314
Teor de $\beta$ -ecdisona	-0,0001	-0,0002
Índice de colheita	-0,0001	0,0007
Variância acumulada (%)	93,34	99,58



**Figura 25.** Análise de componentes principais (ACP) de oito populações (P1 a P8) de *Pfaffia glomerata* com base em onze descritores. Ribeirão Preto, SP, 2008.

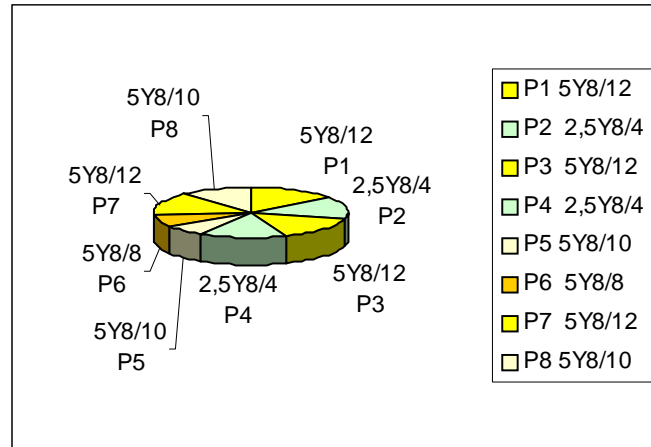
#### 6.2.4 Variabilidade intrapopulacional

A população quatro (P4) foi a que apresentou maior homogeneidade entre os seus indivíduos, somente para a característica comprimento do entrenó houve diferença significativa intrapopulacional. Por outro lado, na população seis (P6) verificou-se diferença significativa entre os indivíduos para as características: altura da planta, diâmetro da raiz principal, número de raízes secundárias, matéria fresca do caule, matéria seca da parte aérea e matéria seca da raiz. O caráter matéria seca da raiz foi o atributo que apresentou diferença significativa entre os indivíduos de todas as populações.

#### 6.2.5 Caracteres fenotípicos das variáveis qualitativas

As populações um, três, cinco, seis, sete e oito (P1, P3, P5, P6, P7 e P8) apresentaram tons de amarelo para a cor da raiz (Figura 26). Apenas os acessos P2 e P4 tiveram raízes de cor creme. No presente estudo não foi verificada coloração branca como foi

descrito para *P. glomerata* por Kamada (2006). Para a *P. iresinoides* Shiobara *et al.* (1992) isolaram das raízes um pigmento amarelo denominado de iresinosídeo. Apesar de não existir um estudo indicando a presença do mesmo composto para a *P. glomerata*, é provável que se trate do mesmo pigmento já que as duas espécies pertencem à mesma seção e são muito próximas.

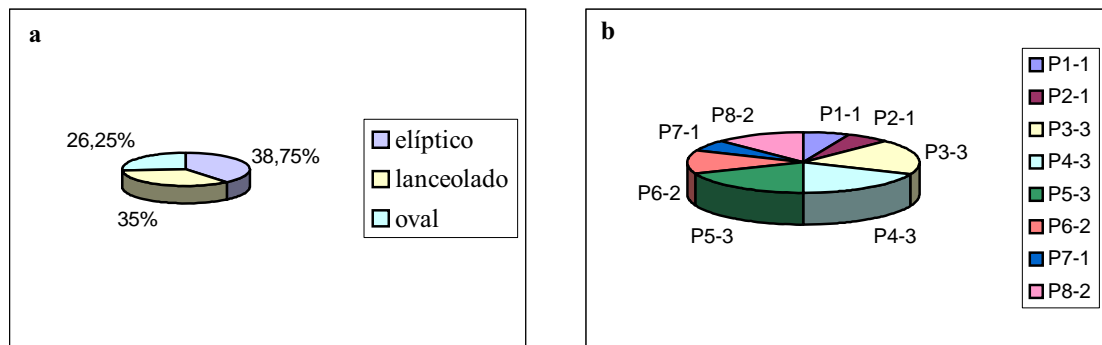


**Figura 26.** Cor das raízes de cada população de *Pfaffia glomerata* (P1 a P8) avaliadas em condições de campo, Ribeirão Preto, SP, 2006. (Fonte dos códigos das cores: Carta de Munsell®)

Segundo Corrêa Junior (2003) a coleta das raízes de fáfia na região noroeste do Paraná concentra-se nos meses de maio e julho (outono-inverno). Os coletores consideram que nessa época as raízes estão “maduras”. Segundo o conceito desses trabalhadores isto significa que a cor da rama e das raízes torna-se mais amarela e com maior peso. Os coletores preferem retirar as plantas nas ilhas do rio, pois observam que as raízes são de melhor “qualidade” e tem maior peso. O autor relacionou o fato à umidade do solo e ao teor de matéria orgânica elevado nesse tipo de solo.

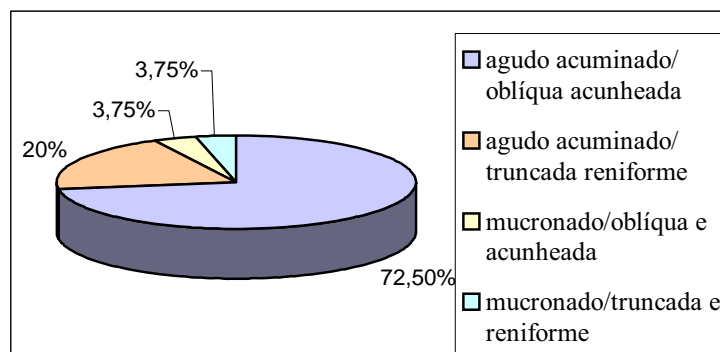
Tomando como ponto de partida os critérios utilizados pelos coletores de fáfia do Paraná, foram analisados os dados obtidos no presente trabalho para verificar uma possível relação entre eles. Verificou-se que a coloração amarela realmente esteve associada a três populações (P3, P7 e P8) com teores expressivos de  $\beta$ -ecdisona, entretanto, apenas a P3, produziu os maiores valores de matéria seca das raízes e de produtividade. Somente a P8 é proveniente de ilha de rio. Uma vantagem adicional dos três acessos foi a resistência a nematóides de galhas.

Analisando-se a distribuição dos três tipos de formato do limbo foliar nas plantas de *P. glomerata* verificou-se que foi praticamente equitativa (Figura 27a). Foi constatado que nas populações do Paraná e Mato Grosso do Sul (P1, P2, P3, P4, P5) não ocorreu o formato do tipo lanceolado, por outro lado, nas populações da região de Itatinga, SP não foi registrado o tipo oval para o limbo foliar (Figura 27b).



**Figura 27a e 27b.** Porcentagem do formato do limbo (a) e formato predominante em cada população (b) de *P. glomerata*, (P1 a P8) cultivadas nas condições de Ribeirão Preto, SP, 2006.

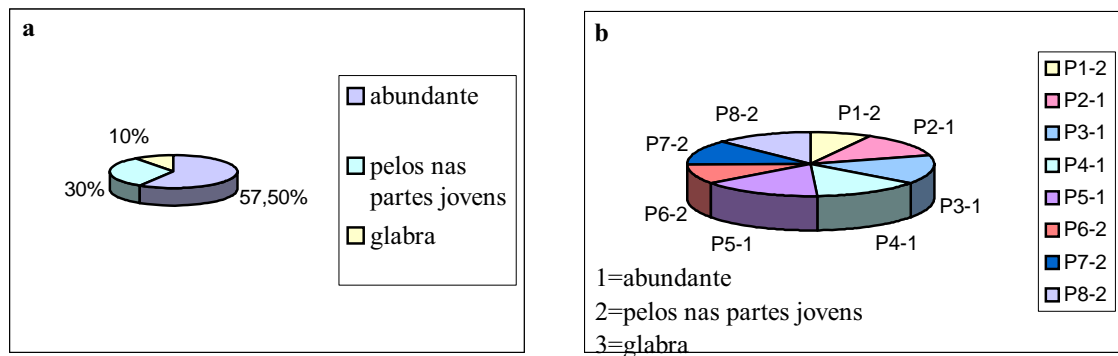
Mussury e Scalon (2004) verificaram metafílos de *P. glomerata* de forma ovada com subtipo lanceolado, de ápice agudo e base obtusa em estudo sobre a morfoanatomia dos tricomas em exemplares coletados em Mato Grosso do Sul. No presente experimento em todas as populações predominou a forma aguda e acuminada para o ápice do limbo foliar e oblíqua e acunhada para a base do limbo, sendo que 72,5% dos indivíduos apresentaram este padrão (Figura 28).



**Figura 28.** Forma do ápice e da base do limbo foliar de plantas de *Pfaffia glomerata* cultivadas nas condições de Ribeirão Preto, SP, 2006.

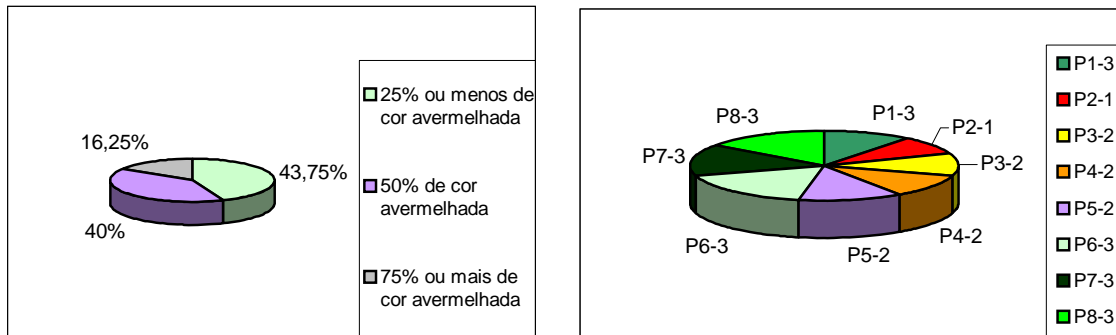
A característica pilosidade esteve presente em 57,5% das plantas e de forma abundante, as plantas glabras expressaram-se em somente 10% dos indivíduos avaliados (Figura. 29a). Em todas as populações da região de Itatinga, SP predominou plantas com pilosidade abundante, isto é, presente nas partes jovens e maduras da planta (Figura 29b). Os metafílos de *Pfaffia glomerata* caracterizados por Mussury e Scalon (2004) indicaram a face ventral dotada de tricomas esparsos e a face dorsal densamente pilosa. Em secção transversal do caule observaram que os tricomas tectores pluricelulares e unisseriados ocorrem em toda a sua circunferência. Nos metafílos em secção transversal mediana, as autoras visualizaram em ambas as epidermes tricomas tectores longos e glandulares, os menos abundantes. Os tricomas tectores longos com célula apical pontiaguda mostraram uma célula basal elevada de conteúdo denso.

Em outro estudo também sobre tricomas em folhas de *Pfaffia glomerata* Vigo et al. (2004) caracterizaram cortes transversais e descreveram dois tipos de tricomas unisseriados, um deles sendo tector composto por quatro a seis células, tendo seu tamanho total muito variável e parede espessada. O outro tipo possuía de cinco a seis células de parede fina, sendo a apical glandular.



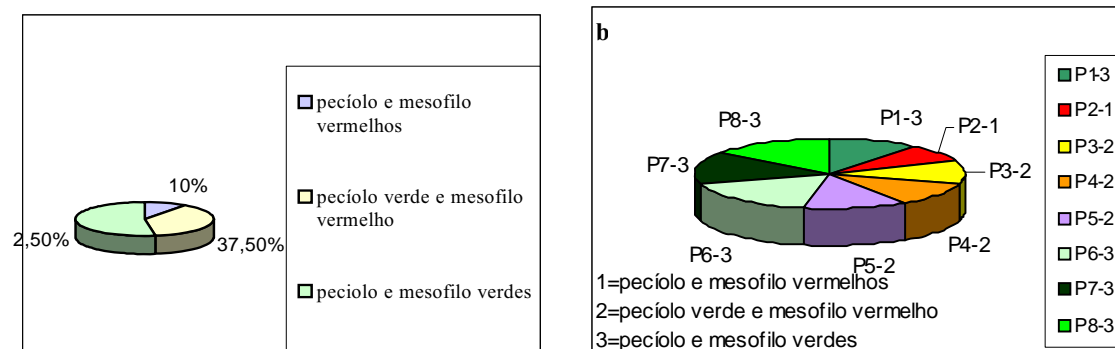
**Figura 29a e 29b.** Porcentagem de plantas quanto à pilosidade (a) e distribuição da pilosidade em cada população (b) de *Pfaffia glomerata*, (P1 a P8) cultivadas nas condições de Ribeirão Preto, SP, 2006.

Para a característica cor do caule foi observado que 43,75% dos genótipos possuíam 25% ou menos do caule com pigmentação avermelhada (Figura 30a). Em todas as populações da região de Itatinga, SP, o caule apresentou 50% de sua extensão com a coloração avermelhada (Figura 30b).



**Figura 30a e 30b.** Porcentagem da cor do caule nas plantas (a) e cor predominante em cada população de *Pfaffia glomerata* (b) cultivada nas condições de Ribeirão Preto, SP, 2006.

Em relação à cor do pecíolo foi detectado que 52,5% dos indivíduos mostraram mesofilo e pecíolo de cor verde (Figura 31a). A característica discriminou a população dois (P2), a única em que ocorreram pecíolos e mesofilos de cor vermelha (Figura 31b).



**Figura 31a e 31b.** Porcentagem da cor do pecíolo e mesofilo (a) e cor predominante em cada população de *Pfaffia glomerata* (b), (P1 a P8) cultivadas nas condições de Ribeirão Preto, SP, 2006.

### 6.3 Ocorrência de insetos

O início da antese aconteceu por volta dos 85 dias do plantio, em março de 2006, e transcorreu até aproximadamente os 240 dias. Após a poda, a antese ocorreu dos 300 dias do plantio até o momento da colheita. No presente estudo foi verificada a presença de cinco ordens de insetos visitando as inflorescências de *P. glomerata*: Lepidóptera; Díptera: família Tabanidae; Hemíptera: família Reduviidae; Coleóptera: famílias

Curculionidae e Chrysomelidae e Hymenoptera: famílias Sphecidae, Vespidae e Apidae (inclusive Euglossini). Essa informação pode ser considerada útil uma vez que existem poucos relatos sobre artrópodes associados às flores de *Pfaffia glomerata* e sua contribuição para o conhecimento da espécie.

*Pfaffia glomerata* possui como uma de suas características florescer em praticamente todos os meses do ano, esta particularidade pode conferir uma nova e importante função ecológica para a espécie, como bordadura de outras plantas para atração de fitófagos ou inimigos naturais. Leite et al. (2005) avaliaram os artrópodes associados às flores de *Pfaffia glomerata* e o estudo possibilitou a indicação da espécie como bordadura em culturas, por servir de planta-isca bem como manter parasitóides e predadores que controlam as populações de pulgão. A espécie também foi considerada adequada para atrair os inimigos naturais que têm uma fonte alternativa de néctar e pólen. Portanto, a propriedade de florescer por quase todo o ano, atraindo insetos polinizadores e os inimigos naturais de pragas, pode imprimir à espécie uma função ambiental ainda incomum, mas, de considerável utilidade para as práticas agrícolas pautadas pelo princípio agroecológico.



**Figura 32.** Hemíptera visitando inflorescência de *Pfaffia glomerata*. Ribeirão Preto, SP, 2008 (Foto: Simone Zampollo Torres).

#### 6.4 Estabelecimento do banco de germoplasma *in vitro*

A Tabela 19 apresenta os resultados de seis tratamentos utilizados para o estabelecimento do banco de germoplasma *in vitro* de *Pfaffia glomerata*. Os explantes submetidos ao tratamento dois (T2) contendo meio MS/2 suplementado com 2% de sacarose + 4% de sorbitol registraram 100% de sobrevivência com a altura média das brotações de 3,1 cm ( $\pm 1,9$ ). Todos os explantes desse tratamento produziram brotações e com o maior índice de brotos ( $1,9 \pm 0,5$ ). Os segmentos nodais do T1 desenvolveram-se significativamente mais quando comparados com os segmentos do T2, provavelmente, pela maior disponibilidade de nutrientes. A única diferença na composição do meio entre os tratamentos T1 e T2 foi em relação à concentração dos mesmos (MS e M/2, respectivamente).

**Tabela 19.** Plântulas vivas (%), explantes com brotação (%), altura da plântula (cm), número de brotos por explante, número de segmentos por haste em seis tratamentos para definição do meio de cultura no estabelecimento do banco de germoplasma de *Pfaffia glomerata*. Ribeirão Preto, SP, 2007.

Tratamentos	Plântulas vivas (%)	Explantes c/ brotação (%)	Altura da plântula (cm)	Nº de brotos por explante.	Nº de segmentos/haste
1	96,6 $\pm$ 1,82) a	96 ( $\pm$ 1,82) a	4,6 ( $\pm$ 2,7) a	1,8 ( $\pm$ 0,7) a	5,4 ( $\pm$ 2,6) a
2	100 ( $\pm$ 0) a	100 ( $\pm$ 0) a	3,1 ( $\pm$ 1,9) b	1,9 ( $\pm$ 0,5) a	4,3 ( $\pm$ 1,6) b
3	100 ( $\pm$ 0) a	100 ( $\pm$ 0) a	4,5 ( $\pm$ 3,1) a	1,7 ( $\pm$ 0,5) a	5,6 ( $\pm$ 2,4) a
4	100 ( $\pm$ 0) a	100 ( $\pm$ 0) a	5,3 ( $\pm$ 2,4) a	1,8 ( $\pm$ 0,7) a	5,9 ( $\pm$ 1,8) a
5	83,3 ( $\pm$ 4,0) b	83,3( $\pm$ 4,0) b	0,2 ( $\pm$ 0,1) c	1,7 ( $\pm$ 0,9) a	1,4 ( $\pm$ 0,9) c
6	56,6 ( $\pm$ 5,0) c	56,6( $\pm$ 5,0) c	0,1 ( $\pm$ 0,1) c	1,2 ( $\pm$ 1) b	0,9 ( $\pm$ 0,8) c
CV (%)	31,2	32,5	60,6	24,3	24,4

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, entre si, ao nível de 1% pelo teste de Scott Knott.

Os tratamentos três (T3) e quatro (T4), com sorbitol 4% suplementado com pantotenato de cálcio, possibilitaram índice de sobrevivência de 100%, altura de brotação maior em relação aos outros tratamentos ( $4,5 \pm 3,1$ cm e  $5,3 \pm 2,4$ cm, respectivamente) e o número de segmentos nodais por haste foi significativamente maior que o tratamento cinco e seis (Figura 33).

Os propágulos dos tratamentos cinco (T5) e seis (T6) mostraram os menores índices de sobrevivência,  $83,3 \pm 4 \%$  e  $56,6 \pm 5 \%$ , respectivamente (Tabela 19). Os explantes do tratamento seis também foram os que produziram os menores números de segmentos nodais por haste e brotações. Os meios de cultura para esses tratamentos continham manitol a 3% acrescido de pantotenato de cálcio 2mg/L. O manitol parece ter exercido um efeito prejudicial à manutenção das plântulas de *P. glomerata*, ou a combinação desse composto com pantotenato de cálcio. Lemos e Baker (1998) relataram efeitos nocivos do manitol em internós de *Annona muricata* cultivados *in vitro*. Bertoni et al. (2007) relataram que o manitol promoveu menor índice de sobrevivência das plântulas de *Zeyheria montana* quando comparado ao meio de cultura contendo sorbitol e que a adição de pantotenato de cálcio teve efeito negativo quando associado com manitol e sorbitol.

Fortes e Pereira (2001) avaliaram o efeito da sacarose e do manitol (87,6 mM), e cinco concentrações de ácido acetilsalicílico (AAS): 0, 30, 60, 90 e 120 mg L<sup>-1</sup> na preservação *in vitro* de batata (*Solanum tuberosum* L.), cultivar Macaca. O uso de manitol causou a formação de um número significativamente inferior de gemas nas brotações de batata, em comparação à sacarose. Os tratamentos com manitol reduziram o crescimento das hastes, entretanto, somente cerca de 37% dos explantes provenientes destes meios sobreviveram no período avaliado. Os autores inferiram que as hastes de batata em presença de manitol sofrem maior estresse fisiológico que as crescidas em meio com sacarose, devido, principalmente, ao estresse osmótico provocado por esse carboidrato, que reduz a absorção de água e nutrientes.

Não foi verificada a produção de calos, e não ocorreu sinal de vitrificação, indicando que as concentrações dos componentes dos meios e do gelificante estão adequadas para a cultura da espécie. Outro fator que pode ter contribuído para a ausência de vitrificação foi a umidade relativa do ar (UR) da sala de crescimento em torno de 60%, alguns trabalhos têm demonstrado que ambientes com elevado índice de umidade favorecem a vitrificação (MORAES et al., 2007). Todos os explantes de *P. glomerata* produziram raízes não tuberizadas.

Foi observado também que cada explante deu origem, em geral, a duas brotações sendo uma bem mais desenvolvida do que a outra. Este padrão de desenvolvimento também foi constatado em trabalhos realizados com segmentos nodais de *Pfaffia tuberosa* (MARTINS e NICOLOSO, 2004) e *Pfaffia glomerata* (NICOLOSO et al., 2001) avaliados em

meio de cultivo MS. Os autores verificaram também que cultivos subseqüentes por mais de dois anos, nas mesmas condições, mantiveram o padrão.

O meio de cultivo mais indicado para os propósitos da conservação *in vitro* é o que proporciona a redução ou paralisação do crescimento das plantas, o que aumenta o intervalo entre os subcultivos e, ao mesmo tempo promover maior sobrevivência, possibilitando a regeneração e multiplicação posterior por via sexual. Desta forma, o tratamento dois foi o que proporcionou redução do crescimento das plantas e ao mesmo tempo maior sobrevivência, mostrando-se o mais adequado ao estabelecimento de um banco de germoplasma *in vitro* para a *P. glomerata*.

Assim, foram introduzidas no Banco de germoplasma *in vitro* oito populações de *P. glomerata* com dez indivíduos (Apêndice 2). Deste modo, espera-se que a variabilidade genética da espécie conservada em banco de germoplasma possa contribuir para os estudos sobre vários aspectos da biossíntese de metabólitos secundários, particularmente, dos fitoecdisteróides.

O Banco de germoplasma uma vez estruturado pode ser o ponto de partida para pesquisas nas áreas de recursos genéticos, farmacologia, biologia reprodutiva e genética de populações, bem como ampliar os estudos sobre o padrão de distribuição geográfico da espécie. Essas pesquisas poderão contribuir para o entendimento sobre a estrutura genética, atividade terapêutica de *P. glomerata* assim como compreender o processo evolutivo da fâfia e seu papel ecológico. Além disso, a avaliação dos genótipos com objetivo de encontrar fontes de resistência às doenças poderá viabilizar o plantio comercial.



**Figura 33.** Plântulas de *Pfaffia glomerata* submetidas a seis tratamentos para definição do meio de cultura no estabelecimento de banco de germoplasma *in vitro*, após seis meses de cultivo, Ribeirão Preto, SP, 2006 (Foto: Paulo Vinícius A de Oliveira).

T1 = MS + 2% sacarose + 4 % de sorbitol; T2 = MS/2 + 2% sacarose + 4 % de sorbitol; T3 = MS + 2% sacarose + 4 % de sorbitol + 2mg/L pantotenato de cálcio; T4 = MS/2 + 2% sacarose + 4 % de sorbitol + 2mg/L pantotenato de cálcio; T5 = MS + 2% sacarose + 3 % de manitol + 2mg/L pantotenato de cálcio; T6 = MS/2 + 2% sacarose + 3 % de manitol + 2mg/L pantotenato de cálcio.

## 6.5 Considerações finais

A Tabela 20 apresenta as médias gerais dos caracteres quantitativos analisados nas oito populações de *Pfaffia glomerata*. Os resultados indicam que houve variabilidade entre as populações justificando a conservação em banco de germoplasma e a sua utilização em futuras pesquisas. A duplicação destes materiais visando a conservação a campo é uma estratégia fundamental para permitir o manejo em condições locais, possibilitando a expressão de novas combinações de alelos em materiais sob pressão de fatores bióticos e abióticos.

Os acessos conservados também poderão ser utilizados para outras caracterizações sejam elas fitoquímicas, fisiológicas e farmacológicas, agregando conhecimento e valorizando o acervo. Além disso, avaliações agronômicas são importantes para a seleção de genótipos promissores na viabilização do cultivo comercial da espécie. É fundamental também para o prosseguimento dos estudos com a *Pfaffia glomerata* a priorização dos temas como biologia reprodutiva e genética de populações.

**Tabela 20.** Médias de descritores morfológicos em oito populações de *Pfaffia glomerata*. Ribeirão Preto, SP, 2007.

População	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	Média
Descritores									
AP(m)	2,03c	2,24b	2,47a	2,42a	2,31b	1,96c	1,93c	1,97c	2,16
DC(cm)	10,11a	9,70a	10,38a	9,37a	9,49a	7,95b	7,54b	7,54b	9,01
CE(cm)	17,27a	12,85b	14,75b	14,06b	15,07b	14,71b	15,11b	14,20b	14,75
NC	4,5b	4,5b	5,8a	4,8b	3,8c	3,5c	4,0c	4,0c	4,3
DRP(cm)	9,80a	9,27a	9,55a	8,39b	8,45b	7,64c	7,48c	6,99d	8,45
MFPA(g)	622,0c	719,3c	1071,2a	842,1b	712,2c	363,8d	354,9d	389,9d	634,4
MFR(g)	320,3a	258,5b	348,5a	239,5b	214,5c	184,1c	127,9d	140,4d	229,2
MSPA(g)	183,5c	215,3b	324,1a	268,5b	229,2b	114,8d	115,9d	132,2d	197,9
MSR(g)	81,2b	77,2b	101,5a	72,3b	63,3c	49,7d	33,3e	39,3e	64,7
E(%)	0,40c	0,35c	0,42c	0,44c	0,39c	0,40c	0,56b	0,64a	0,45
NEM(%)	6,7d	38,3c	69,2b	85,0a	47,5c	52,5c	91,7a	83,3a	59,3
IC	0,33a	0,30a	0,25b	0,23b	0,22b	0,32a	0,24b	0,24b	0,27

\* Médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem significativamente, ao nível de 5% pelo teste de Scott Knott.

Altura da planta (AP), diâmetro do caule (DC), comprimento entre o quarto e o quinto entrenó (CE), número de caules (NC), diâmetro da raiz principal (DRP), matéria fresca da parte aérea (MSPA), matéria fresca da raiz (MFR), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR), teor de  $\beta$ -ecdisona (E), ausência de nematóides (NEM), índice de colheita (IC)

## 7 CONCLUSÕES

A coleta de germoplasma de *Pfaffia glomerata* amostrou variabilidade suficiente para compor um banco de germoplasma *in vitro*;

As populações três e oito foram as mais produtivas em relação à matéria seca de raízes e teor de  $\beta$ -ecdisona, assim, são recomendadas para o sistema de produção agrícola na região de Jurucê, SP;

A partir da caracterização morfológica e da avaliação do teor do princípio ativo pode-se concluir que a *Pfaffia glomerata* apresenta adaptabilidade a diversas condições ambientais, com estabilidade na produção de  $\beta$ -ecdisona, sendo portanto, recomendada para compor programas nacionais de fitoterapia.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRÃO, M. M.; MAZZAFERA, P. Efeitos do nível de inóculo de *Meloidogyne incognita* em algodoeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 60, n.1, p. 19-26, 2001.

AGUINALDO, A. M. A.; TURBEVILLE, J. M.; LINFORD, L. S.; RIVERA, M. C.; GAREY, J. R. RAFF, R. A.; LAKE, J. A.; **Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals**. **Na. Lond**, v. 387, p. 489-493, 1997.

ANAON, R. **Survey of exting data in ex situ**: Collections of plant genetic resources for food and agriculture. Roma: Food and Agriculture Organization, 1994.

ARAÚJO, W. P.; MATTOS, J. K. A.; SOUZA, R. M. Fontes de resistência a *Meloidogyne javanica* entre acessos de *Pfaffia glomerata*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 13, 1994, Fortaleza. **Anais...**Fortaleza: UFC, 1994. p. 270.

BARROSO, G. M. et al. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1978. 255p. 2v.

BASTOS, D. C.; SCARPARE FILHO, J. A.; PIO, R.; LIBARDI, M. N.; ALMEIDA, L. F. Desenvolvimento inicial de mudas enxertadas e de estacas de caramboleira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal: SP, v. 27, n. 2, p. 338-340, 2005.

BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas** (Noções básicas). 2ed Jaboticabal: FUNEP, 2003. 41p.

BERTONI, B. W. et al. *Zeyheria montana* Mart. In: PEREIRA, A. M. S. (Org.) **Recursos genéticos e conservação de plantas medicinais do Cerrado**. Ribeirão Preto: Legis Summa Ltda., 2007. p. 294-326.

BURTON, G. W.; DAVIES, W. E. Handling germplasm of cross-pollinated forage crops. In: HOLDEN, J. H. W.; WILLIAMS, J.T. (Ed.). **Crop genetic resources: conservation and evaluation**. London: G. Allen & Unwin, 1984. p. 180-190.

CAMARGO, O.A.; ALLEONI, L.R.F. **Compactação do solo e o desenvolvimento das plantas**. Piracicaba, 1997. 132p.

CARNEIRO, R. G.; MAZZAFERA, P.; FERRAZ, C. C. B. Carbon partitioning in soybean infected with *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*. **Journal of Nematology**, v. 31, n. 3, p. 348-355, 1999.

CARNEIRO, R.G. **Efeitos de *Meloidogyne incognita* raça 3 e *M. javanica* sobre a absorção e translocação de nitrogênio, fósforo e cálcio e sobre a partição de carbono em cultivares de soja**. 2000. 96p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - ESALQ/Universidade de São Paulo., Piracicaba, 2000.

CARNEIRO, R.M. D. G., MESQUITA, L. F. G.; CIROTTI, P. A S.; PEREIRA, S. I. V.; PEREIRA, P. S.; SILVA, D. B.; VIEIRA, R. F. Detecção de *Meloidogyne* spp em *Pfaffia* spp no Distrito Federal e patogenicidade de *M. javanica* a *Pfaffia glomerata* e *P. paniculata*. **Nematologia Brasileira**, v. 30, n.2, p.159-163, 2007.

CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, L.C.; CORTEZ, D.A G. Aspectos gerais da espécie fáfia (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen) e recomendações técnicas para seu cultivo. JORNADA IBEROAMERICANO DE AGROTECNOLOGIA DE PLANTAS MEDICINAIS, I., 2002, Antigua. **Anais...** Guatemala-Antigua: CYTED/Centro Iberoamericano de Formacion, 2002.

CORRÊA JÚNIOR, C. **Estudo agrônomico de [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]: sazonalidade na produção de raízes e conteúdos de  $\beta$ -ecdisona em diferentes acessos de São Paulo, Paraná e Mato Grosso do Sul**. 2003. 94f. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, L.C. FÁFIA [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]: o ginseng brasileiro. In: ALEXIADES, M.; SHANLEY, P. (Ed.) **Produtos forestales, medios de subsistencia y conservacion – estudios de caso sobre sistemas de manejo de productos forestales no maderables**. Jakarta: CIFOR, 2004, p. 349-364. 3v.

CORRÊA JÚNIOR, C.; CORTEZ, D. A. G.; MING, L. C.; SOARES, W. **Fáfia o ‘ginseng’ brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen]: aspectos agrônômicos e fitoquímicos**. Curitiba: Clichetec, 2006. 22 p.

COSTA, I. R. S. **Coleta de Recursos Genéticos de batata-doce (*Ipomea batatas*) e manejo do material coletado**. Apostila do curso de manutenção, caracterização e avaliação de coleções nacionais de *Ipomea batatas*. Brasília: Embrapa/CIP, 1996.

CRUZ, C. D. **Programa Genes**: versão Windows. Viçosa: UFV, 2001. 648p.

DINAN, L. Phytoecdsteroids: biological aspects. **Phytochemistry**, v.57, p. 325-339, 2001.

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm: review. **Euphytica**, v. 57, p. 227-243, 1991.

ESAU, K. **Anatomía vegetal**. 3ª ed. Omega: Barcelona. 1985.

FAHN, A **Anatomia vegetal**. Madrid: Pirâmide. 1985.

FERREIRA, W.P.M.; **Caracterização climática da área de atuação da Associação Brasileira de Agronegócios de Ribeirão Preto (ABAG-RP)**. Disponível em: <<http://www.abagrp.cnpm.embrapa.br/areas/clima.htm#>>. Acesso em 25 de julho de 2007.

FIGUEIRA, G. M. Avaliação e acompanhamento de metabólitos secundários em cultivo. In: CAVALCANTI, T. B.; WALTER, B. M. T. (Ed.). **Tópicos Atuais em Botânica**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Sociedade Botânica do Brasil, 2000. p. 287-291.

FIGUEIREDO, L. S.; TEIXEIRA, S. L.; FREITAS, S. P.; VIEIRA, I. J. C.; MARTINS, E. R. Comportamento de acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) nas condições de Campos de Goytacazes – RJ. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n.1, p. 67-72, 2004.

FLORES, R. **Cultura de tecidos e produção de  $\beta$ -ecdisona em *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* (Amaranthaceae)**. 2006. 168f. Tese (Doutorado Programa de Pós-Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria Santa Maria, Santa Maria, 2006.

FORTES, G. R. L.; PEREIRA, J. E. S. Preservação *in vitro* da batata com ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n. 10, p. 1261-1264, 2001.

FRANKEL, O H.; HAWKES, J. G. **Crop genetic resources for today and tomorrow**. Cambridge: Cambridge University Press, 1975. 492p.

FREIRE, M. S.; MORALES, E. A V.; BATISTA, M. F. Diversidade Genética. In: VIEIRA, N. R. A.; SANTOS, A B.; SANT'ANA, E. P. (Ed.). **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. p. 559-581.

GOES, M.; MENDES, R. A; Conservação de germoplasma vegetal *in vitro*-criopreservação. In: PUIGNAU, J.P.; CUNHA, R. (Ed.) **Conservación de germoplasma vegetal**. Montevideo: IICA/Procisur, 1996. p. 139-142.

GOMES, A C.M.M. **Resistência e caracterização histológica de acessos de *Pfaffia glomerata* a *Meloidogyne incognita***. 2006. 58f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2006.

GREBENOK, R. J.; VENKATACHARI, S.; ADLER, J.H. Biosynthesis of ecdysone and ecdysone phosphates in spinach. **Phytochemistry**, v. 36, n.6, p. 1399-1408, 1994.

GREBENOK, R. J.; GALBRAITH, D. W.; BENVENISTE, I.; FEYEREISEN, R. Ecdysone 20-monooxygenase, a cytochrome P450 enzyme from spinach, *Spinacia oleracea*. **Phytochemistry**, v. 42, p.927-933, 1996.

GROSSO, M. A. Crescimento secundário inusual em raiz principal de *Pfaffia gnaphalioides* (L. Fil.) Mart. (Amaranthaceae). **Acta Botanica Brasileira**, v.21, n. 1, p. 21-26, 2007.

GUERREIRO, C.P.V. **Análise de crescimento, curva de absorção de macronutrientes (N, P e K) e teor de  $\beta$ -ecdisona em fáfia [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] em função de adubação orgânica.** 2006. 144f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

HARBORNE, J. B. Biochemical plant ecology. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 503-515.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of natural products.** London: Chapman & Hall Ltd, 1998. 288 p.

HAY, R. K. M.; SVOBODA, K. P. Botany. In: HAY, R. K. M.; WATERMAN, P. G. **Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production.** Essex: Longman Group, 1993. p. 73-92.

HENSHAW, G. G. Tissue culture methods and germoplasm storage. In: VILLALOBOS, V. M.; **Proceedings of the 5<sup>th</sup> international congress on plant tissue culture.** Ed. Fujiwara. Tokyo Japan: Abe Photo Printing Co. LTd. 1982. p. 789-792.

HIKINO, H.; JIN, H.; TAKEMOTO, T. Occurrence of insect-moulting substance ecdysterone and inokosterone in callus tissues of *Achyranthes*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 198, p.438-439, 1971.

HOWES, C. Guidelines for developing descriptor list. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v. 45, p. 26-32, 1981.

HOYT, E. **Conservação dos parentes silvestres de plantas cultivadas.** Wilmington: Addison-Wesley Iberoamericana, 1992. 52 p.

HUTANGURA, P.; MATHESIUS, U.; JONES, M.G.K.; ROLFE B.G. Auxin induction is a trigger for root gall formation caused by root-knot nematodes in white clover and is associated with the activation of the flavonoid pathway. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v.26, p.221-231, 1999.

IAC – Instituto Agrônomo de Campinas. Disponível em <<http://ciiagro.sp.gov.br>> acesso em 07.07.2007.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Manual técnico da vegetação brasileira.** Rio de Janeiro: IBGE, 1992. 92p.

IBPGR. **Descriptors for *Phaseolus vulgaris*.** Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1982.

IBPGR. **Report of the third external review of the International Board for Plant Genetics Resources.** Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1991. 85p.

KADOTA, M.; IMIZU, K.; HIRANO, T. Doublé-phase *in vitro* culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. **Scientia Horticulturae**, v. 89, p. 207-215, 2001.

KAMADA, T. **Avaliação da diversidade genética de populações de fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) por RAPD, caracteres morfológicos e teor de  $\beta$ -ecdisona**. 2006. 119f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

KUTSCHERA, L.; LICHTENEGGER, E. *Wurzelatlas mitteleuropaischer Grunlandpflanzen*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. 1992.

LATA, A. H. *In vitro* conservation of tropical plant germoplasm, a review. **Euphytica**, Netherlands Journal of Plant Breeding, Mississippi, v. 57, p. 227 – 243, 1991.

LAZZARINI, G.; LUZ, J. M. Q.; MOTA, J. S.; VASCONCELOS, M. C. Avaliação de tipos de estacas do caule para propagação de fáfia (*Pfaffia glomerata*). **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19, suplemento, 2001. CD-ROM.

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.

LEITE, G. L. D.; PIMENTA, M. ; FERNANDES, P. L. ; MARTINS, E. R.; SILVA, T. G. M. Artrópodes associados às flores de *Pfaffia glomerata* em Montes Claros-MG. **Revista Agropecuária Técnica**, Areia, v. 26, n. 2, p. 178-183, 2005.

LEMOS, E. E. P.; BAKER, D. Shoot regeneration in response to carbon source on internodal explants of *Annona muricata* L. **Plant Growth Regulation**, v. 25, p. 105-112, 1998.

LEMOS, E. E. P.; FERREIRA, M. S.; ALENCAR, L. M. C.; ALBUQUERQUE, M. M.; RAMALHO NETO, C. E. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, 2002.

LICHTENTHALER, H. K.; ROMER, M.; SCHWENDER, J. Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. **Physiologia Plantarum**, v.101, p. 643-652, 1997.

LICHTENTHALER, H. K. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol**, v.50, p. 4755, 1999.

LYNCH, J. Root architecture and plant productivity. **Plant Physiology**, v. 109, p. 7-13, 1995.

MAGALHÃES, P. M. Propagação de algumas espécies do “ginseng” do Brasil. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 13., 1994, Fortaleza. **Anais...Fortaleza: UFC**, 1994. p. 110.

MAGALHÃES, P. M. Agrotecnología para el cultivo de fáfia o “ginseng” brasileiro. In: MARTÍNEZ, J. V. A.; BERNAL, H. Y.; CÁCERES, A. (Org.). **Fundamentos de Agrotecnología de Cultivo de Plantas Medicinales Iberoamericanas**. 1/1 ed. Santafé de Bogotá: Andrés Bello/CYTED, 2000. p. 323-332.

MANN, J. **Chemical aspects of biosynthesis**. Oxford: Oxford Science Publications, 1994. 93p.

MARQUES, L. C. **Avaliação adaptógena das raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, Amaranthaceae**. 1998. 145f. Tese (Doutorado em Psicobiologia) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1998.

MARTINS, E. R. Estudos em *Ocimum selloi* Benth.: isozimas, morfologia e óleo essencial. In: MING, L. C. SCHEFFER, M. C.; CORRÊA JR., C.; BARROS, I. B. I.; MATTOS, J. K. A. **Plantas medicinais, aromáticas e condimentares: avanços na pesquisa agrônômica**. Botucatu: Unesp, 1998. p. 97-126. 2v.

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.

MATTOS, J.K.A. **Biologia da ferrugem (*Uromyces platensis* SPEG.) da *Pfaffia glomerata***. 1993. 54f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília, 1993.

MATTOS, P. P.; SALIS, S. M. Características de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen cultivada no Pantanal, sub-região do Paraguai, Corumbá, Mato Grosso do Sul In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SOCIO-AMBIENTAIS DO PANTANAL, 4., 2004, Corumbá. **Resumos do IV Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-ambientais do Pantanal**. Corumbá: Simpapan, 2004. p.1-7.

MAZZA, M. C. M.; BAGGIO, A. J. Pesquisas na área de conservação e manejo de plantas medicinais desenvolvidas na Embrapa Florestas. In: VIEIRA, R. F. et al. (Ed.) **Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas: resultados da primeira reunião técnica**. Brasília: Embrapa/Ibama/CNPq, 2002. p. 142-145.

McCASKILL, D.; CROTEAU, R. Isopentenyl diphosphate is the terminal product of the Deoxyxylulose-5-phosphate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **Tetrahedron Letters**, v. 40, p. 653-656, 1999.

MÉLE, E. et al. *In vitro* bioassay for the effect of *Ajuga reptans* phytoecdysteroids on *Trialeuroides vaporariorum* larval development. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 62, p.163-168, 1992.

MENDES, J.; LOPES, J. C.; RENNER, G. D. R. Análise comparativa dos meios MS e de Dyer na germinação de *Pfaffia glomerata* e *Lippia alba*. **Caderno de Iniciação à Pesquisa da Univille**, Joinville, v.6, p.153-156, 2004.

MING, L. C.; CORRÊA JR. C.; CHAVES, F. C. M. Influência do diâmetro e posição no ramo no pegamento de estacas caulinares de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17., 2002, Cuiabá. **Resumos...**Cuiabá: UFMT, 2002.

MONTANARI JUNIOR, I.; MAGALHÃES, P.M.; QUEIROGA, C.L. Influence of plantation density and cultivation cycle on root productivity and tenors of  $\beta$ -ecdysone in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Acta Horticulturae**, v.3, n. 502, p.125-128, 1999.

MONTANARI JUNIOR, I.; MAGALHÃES, P. M.; QUEIROGA, C. L. PEREIRA, B. O ciclo de cultivo e sua influência na produção de raízes e teores de  $\beta$ -ecdisona em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17., 2002, Cuiabá. **Resumos...**Cuiabá: UFMT, 2002.

MONTANARI JUNIOR, I. **Avaliação de genótipos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen visando o seu cultivo comercial.** 2005. 75f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Vegetal) - Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2005.

MONTANARI JUNIOR, I.; PERECIN, M. B. Evaluation of morphological and agricultural characteristics and their phenotypic correlations in genotypes of a *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen population. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. esp., p. 46-48, 2006.

MORAES, R. M. et al. Micropropagação e banco de germoplasma *in vitro* para produção e conservação de plantas nativas do Cerrado. In: PEREIRA, A M. S. **Recursos genéticos e conservação de plantas medicinais do Cerrado.** Ribeirão Preto: Legis Summa Ltda, 2007. p. 185-211.

MOTA, L. D.; et al. *Pfaffia* mosaic virus: a novel potyvirus found infecting *Pfaffia glomerata* in Brazil. **Plant Pathology**, v. 53, p. 368-373, 2004.

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

MUSSURY, R. M.; MORAES-DALLAQUA, M. Morfo-anatomia do sistema subterrâneo de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen – Amaranthaceae. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 55., 2004, Viçosa. **Resumos...** Viçosa: UFV, 2004.

MUSSURY, R. M.; SCALON, S. P. Q. Caracterização dos tricomas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen “ginseng brasileiro”- Amaranthaceae. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 2, 2004. Suplemento CD-ROM.

NASCIMENTO, E. X.; MOTA, J. H.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A. H. Produção de biomassa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Plantago major* L. em cultivo solteiro e consorciado. **Ciência Agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 3, p. 724-730, 2007.

- NASS, L. L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. DE; VALADARES-INGLIS, M.A. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 29-55.
- NELSON, F. K.; RIDDLE, D.L. Functional study of the *Caenorhabditis elegans* secretory-excretory system using laser microsurgery. **Journal Experimental Zoology**, v. 231, p. 45-56, 1984.
- NICOLOSO, F. T.; CASSOL, L. F.; FORTUNATO, R. P. Comprimento da estaca de ramo no enraizamento de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*). **Ciência Rural**, v. 31, n. 1, p. 57-60, 2001.
- NICOLOSO, F. T.; ERIG, A.C.; MARTINS, C. F.; RUSSOWSKI, D. Micropropagação do ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.3, n.2, p.11-18, 2001.
- NIMER, E. **Climatologia do Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE, 1977. 421p. (Série Recursos Naturais e Meio Ambiente, 4).
- NISHIMOTO, N.; SHIOBARA, N.; INOUE, S. S. Ecdysterone from *Pfaffia tuberosa* (Sprengel.) Hicken. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, n. 2, p. 188-191, 1986.
- NISHIMOTO, N. et al. Ecdysteroids from *Pfaffia iresinoides* Sprengel. and reassignment of some <sup>13</sup>C NMR chemical shifts. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2505-2507, 1987.
- PEREIRA, A M. S.; SILVA, D. B.; ALVES, R. B. N.; VIEIRA, R. F. Recursos genéticos de plantas medicinais do Cerrado. In: PEREIRA, A M. S. (Org.). **Recursos genéticos e conservação de plantas medicinais do Cerrado**. Ribeirão Preto: Legis Summa Ltda, 2007. p. 37-73.
- PINTO, R. M. S.; DANTAS, J. L. L.; LIMA, J. F. Avaliação e caracterização agronômica de germoplasma de mamão. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 13, n. 1, p. 29-36, 2001.
- POTT, A.; POTT, V. S. **Plantas do pantanal**. Corumbá: Embrapa-SPI, 1994. 320 p.
- QUEROL, D. **Recursos Genéticos, nosso tesouro esquecido: abordagem socio-econômica**. Rio de Janeiro: AS-PTA, 1993. 206 p.
- REIXACH, N. et al. Biosynthesis of ecdysteroids *in vitro* prothalli cultures of *Polypodium vulgare*. **Phytochemistry**, v. 43, n.3, p.597-602, 1996.
- RENNER, G. D. R; CAMACHO, F.; PEIXE, S. Ação da temperatura, ácido giberélico e luz na germinação de sementes de fáfia – *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Semina**, Londrina, v. 28, n. 3, p. 349-354, jul./set. 2007

RIBEIRO, P. G. F.; PEREIRA, E. F. Estudo da germinação das sementes de *Pfaffia glomerata*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 13., 1994, Fortaleza. **Anais...**Fortaleza: UFC, 1994. 206p.

ROHMER, M. Mevalonate-independent methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. Elucidation and distribution. **Pure Applied Chemistry**, v. 75, p. 375-387, 2003.

ROSNES, K.; JUNTILA, O.; ERNSTEN, A.; SANDLI, N. Development of cold tolerance in white clover (*Trifolium repens* L.) in relation to carbohydrate and free amino acid content. Acta Agriculturae Scandinavica Section B. **Soil and Plant Science**, v. 43, p.151-155, 1993.

SANTOS, D. Y. A. C. O uso de metabólitos secundários na taxonomia. In: CAVALCANTI, T. B.; WALTER, B. M. T. (Ed.). **Tópicos Atuais em Botânica**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Sociedade Botânica do Brasil, 2000. p. 287-291.

SCHEFFER, M.C.; ARAUJO, A. J.; C. MING, L.C. Conservação de Recursos Genéticos de Plantas Medicinais. In: QUEIRÓS, M. A. (Org.) **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. Petrolina, 1 ed. Petrolina: Embrapa/Cenargen, 1999, p. 1-25.

SCHUBERT, R. Root research in natural ecosystem. In: MICHAEL, M.; PERSSON, H. (Eds.). **Plant roots and their environment**. Amisterdam: Elsevier Science Publishers, 1991. p. 344-349.

SHIOBARA, Y.; INOUE, S.; NISHIGUCHI, Y. Iresinoide, a yellow pigment from *Pfaffia iresinoides*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 953-956, 1992.

SHIOBARA, Y.; INQUE, S. S.; KEATO, K. NISHIGUSHI, Y.; OISHI, Y. NISHIMITO, N.; OLIVEIRA, F.; AKSUE, G.; AKISUE, M. K.; HASHIMOTO, G. A. A nortriterpenoid, triterpenoid and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 1527-1530, 1993.

SILVA, A. T. **Estudo da divergência genética em acessos de arroz através de marcadores morfológicos e moleculares (RAPD)**. 1999. 185f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fototecnia) - Departamento de Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

SILVA JÚNIOR, A.; OSAIDA, C. C. Ginseng-brasileiro – novo estímulo para o campo e para o corpo. **Agropecuária catarinense**, Florianópolis, v.18, n.2, p.41-44, 2005.

SIQUEIRA, J. C. Fitogeografia das amarantaceae brasileiras. **Pesquisas Botânica**, v. 45, p. 5-21, 1994.

SKORUPA, L. A ; VIEIRA, R. F. Coleta de germoplasma de plantas medicinais. In: WALTER, B. M. T.; CAVALCANTI, T. B. **Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. p. 435-468.

SKOULA, M.; ABBES, J. E.; JOHNSON, C. B. Genetic variation of volatile oils and rosmarinic acid in populations of *Salvia sufruticosa* Mill. growing in Greece. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, p. 551-561, 2000.

SLÁMA, K. et al. Hormonal activity of ecdysteroids from certain Asiatic plants. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 23, p. 181-183, 1993.

SLOTEN, D. H van. **The role of curators, breeders and other users of germplasm in characterization and evaluation of crop genetic resources**. Roma: IBPGR, 1987. p. 3-8. Special issue.

SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. **Amaranthaceae de Santa Catarina**. Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1972. p. 35-50.

SORIANO, I. R.; RILEY, I. T.; POTTER, M. J.; BOWERS, W. S. Phytoecdysteroids: a novel defense against plant-parasitic nematodes. **Journal of Chemical Ecology**, v. 30, n. 10, 2004.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 291p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Tradução: Santarém, E. R. et al. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TASCETTO, O. M.; PAGLIARINI, M. S. Chromosome numbers in Brazilian and Argentine populations of *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae). **Cytologia**, v. 68, n. 2, p. 147-152, 2003.

TOWILL, L. E. Germoplasm preservation. In: TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. 2ª Edição, Boca Raton: CRC Press, 2000. p. 337-353.

VALLS, J. M. F. Caracterização morfológica, reprodutiva e bioquímica de germoplasma vegetal. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1., 1998, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: FCAV/Unesp, 1988. p. 106-128.

VALLS, J. M. F. Caracterização de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L. L. (Ed. tec.) **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p.281-305.

VALOIS, A. C. C.; NASS, L. L.; GOES, M. Conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. DE; VALADARES-INGLIS, M.A. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 29-55.

VANEK, T.; MACEK, T.; VAISAR, T.; BREZNOVITS, A. Production of ecdysteroids by plant cell culture of *Pteridium aquilinum*. **Biotechnology Letters**, v. 12, n. 10, p. 727-730, 1990.

VASCONCELOS, J.M.O. **Estudo taxonômico sobre Amaranthaceae no RS, Brasil**. 1982. 277p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1982.

VASCONCELOS, J. M. O. Amaranthaceae do Rio Grande do Sul, V – Gêneros de *Pfaffia* Mart. e *Gomphrena* L. **Roessléria**, v. 8, p. 75-94, 1986.

VIEIRA, R. F.; GRAYER, R.; PATON, A.; SIMON, J. E. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. **Bioch. Syst. Ecol.**, v. 29, n. 3, p. 287-304, 2001.

VIEIRA, R. F. et al. **Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas**: resultados da primeira reunião técnica. Brasília: Embrapa/Ibama/CNPq, 2002. 184p.

VIEIRA, R. F. Importância da variabilidade genética para a produção de metabólitos secundários. In: CAVALCANTI, T. B.; WALTER, B. M. T. (Ed.). **Tópicos Atuais em Botânica**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Sociedade Botânica do Brasil, 2000. p. 287-291.

VIEIRA, R. F. Conservação de Recursos Genéticos de Plantas Medicinais e Aromáticas Brasileiras: um desafio para o futuro. **Acta Horticulturae**, ISHS, v. 569, p. 61-68, 2002.

VIEIRA, R. F.; ALVES, R. B. N. Desafios para a conservação de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas no Brasil. In: COELHO, M. F. B.; COSTA JUNIOR, P.; DOMBROSKI, J. L. D. (Org.). **Diversos olhares em etnobiologia, etnoecologia e plantas medicinais**. Cuiabá: Unicen, 2003. p. 121-136.

VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Caracterização química de metabólitos secundários em germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (Ed. téc.) **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa/Cenargen, 2007. p. 343-376.

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, supl. 2, p. 46-49, 2003.

VIGO, C. L. S.; NARITA, E.; MILANEZE-GUTIERRE, M. A. MARQUES, L. C. Caracterização farmacognóstica comparativa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Hebanthe paniculata* Martius – Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 6, n. 2, p. 7-19, 2004.

VILLALOBOS, V. M.; ENGELMANN, F.: *Ex situ* conservation of plant germoplasm using biotechnology. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 11, p. 375-382, 1995.

WALLNER, E.; WEISING, K.; ROMPF, R.; KAHL, G.; KOPP, B. Oligonucleotides fingerprinting and RAPD analysis of *Achillea* species: characterization and long-term monitoring of micropropagated clones. **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 647-652, 1996.

WALTER, B.M.T.; CAVALCANTI, T.B.; BIANCHETTI, L. B.; VALLS, J. F. M. Coleta de germoplasma: relevância e conceitos básicos. In: WALTER, B.M.T.; CAVALCANTI, T.B.(Ed.tec.) **Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. p. 27-55.

WITHERS, L.A; WILLIAMS, J.T. Conservação *in vitro* de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A.[ed.]. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. p. 297-330. 2v.

ZIMMER, A R.; BASSANI, V. L.; GOSMANN, G. Caracterização química de matéria-vegetal e desenvolvimento de extrato seco nebulizado a partir de solução extrativa de *Pfaffia glomerata*. **Caderno de Farmácia**, Porto Alegre, v. 21, n. 1, p. 40-41, 2005.

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

**APÊNDICE**

## Apêndice 1

**Tabela 21.** Quadrados médios dos parâmetros AP (altura da planta), DC (diâmetro do caule), CE (comprimento do entrenó), NC (número de caules) e IC (índice de colheita) de plantas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen de oito populações diferentes. Ribeirão Preto, SP, 2007.

Fontes de variação	G.L.	AP	DC	CE	NC	IC
Populações	7	0,190223*	5,348124**	6,270062*	1,995536*	0,0077*
Blocos	3	0,029925 <sup>ns</sup>	4,436072 <sup>ns</sup>	55,562899 <sup>ns</sup>	1,781250 <sup>ns</sup>	0,0110*
Resíduo	21	0,013995	0,440716	1,613462	0,281250	0,0007
C.V. (%)		5,46	7,37	8,61	12,21	9,77

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

<sup>ns</sup> Não significativo

**Tabela 22.** Quadrados médios dos parâmetros DRP (diâmetro da raiz principal), MFPA (matéria fresca da parte aérea), MFR (matéria fresca da raiz), MSPA (matéria seca da parte aérea) e MSR (matéria seca da raiz) de plantas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen de oito populações diferentes. Ribeirão Preto, SP, 2007.

Fontes de variação	G.L.	DRP	MFPA	MFR	MSPA	MSR
Populações	7	4,254948*	261988,84*	25088,970**	23054,0619*	2114,1027*
Blocos	3	0,540493 <sup>ns</sup>	28928,76 <sup>ns</sup>	14509,129*	2086,3215 <sup>ns</sup>	1157,5420*
Resíduo	21	0,134764	9213,4052	756,562	1082,8239	52,198115
C.V. (%)		4,35	15,13	12,00	16,62	11,16

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

\*\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

<sup>ns</sup> Não significativo

**Tabela 23.** Quadrados médios dos parâmetros explantes com brotações (EB), altura da plântula (AP), número de brotos por explante (NBE), número de segmentos nodais por explante (NSNE) de plantas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen cultivadas em meio MS em seis tratamentos para estabelecimento de banco de germoplasma *in vitro*. Ribeirão Preto, SP, 2007.

Fontes de variação	G.L.	EB	AP	NBE	NSNE
Tratamento	5	0,928889*	167,155556*	2,462222*	159,112222*
Repetições	5	0,022222 <sup>ns</sup>	1,075556 <sup>ns</sup>	0,488889**	0,978889 <sup>ns</sup>
Resíduo	148	0,077055	4,142832	0,213746	1,266002
C.V. (%)		32,5	60,6	24,3	24,4

\* significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

\*\* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

## Apêndice 2

**Tabela 24.** Identificação dos indivíduos e das populações de *Pfaffia glomerata* introduzidas no Banco de germoplasma *in vitro* da Universidade de Ribeirão Preto, Unaerp, 2007.

Nº do indivíduo	Nº de coleta	População	Nº do indivíduo	Nº de coleta	População
1	2202-1	1	41	2211-20	
2	2202-2	1	42	2207-1	
3	2202-4	1	43	2207-2	
4	2202-5	1	44	2207-4	
5	2202-7	1	45	2207-5	
6	2202-8	1	46	2207-6	
7	2202-11	1	47	2207-7	
8	2202-16	1	48	2207-14	
9	2202-18	1	49	2207-19	
10	2202-22	1	50	2217-13	
11	2205-6	2	51	LRC -3	6
12	2205-7	2	52	LRC -4	6
13	2205-8	2	53	LRC -7	6
14	2205-10	2	54	LRC-17	6
15	2205-12	2	55	LRC-18	6
16	2205-18	2	56	LRC-21	6
17	2205-20	2	57	LRC-26	6
18	2205-23	2	58	LRC-29	6
19	2205-24	2	59	LRC-33	6
20	2205-25	2	60	LRC-35	6
21	2209-2	3	61	LRC-43	7
22	2209-5	3	62	LRC-46	7
23	2209-8	3	63	LRC-48	7
24	2209-10	3	64	LRC-56	7
25	2209-11	3	65	LRC-50	7
26	2209-12	3	66	LRC-52	7
27	2209-13	3	67	LRC-53	7
28	2209-15	3	68	LRC-60	7
29	2209-16	3	69	LRC-61	7
30	2209-23	3	70	LRC-63	7
31	2216-6	4	71	LRC-70	8
32	2216-7	4	72	LRC-73	8
33	2216-10	4	73	LRC-74	8
34	2216-13	4	74	LRC-76	8
35	2216-14	4	75	LRC-77	8
36	2216-15	4	76	LRC-79	8
37	2216-17	4	77	LRC-80	8
38	2216-18	4	78	LRC-90	8
39	2216-19	4	79	LRC-95	8
40	2216-20	4	80	LRC-98	8