

Indução de calos e produção de saponinas totais em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen *in vitro*

Kagiki, F.O.¹; Gonçalves, G.C.²; Oliveira, E.T.³; Crocomo, O.J.⁴; Gallo, L.A.⁵

^{1,2,3} Alunos do curso de PG em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, ^{4,5} Laboratório de Biotecnologia Agrícola/Depto. de Ciências Biológicas, ESALQ/USP

RESUMO: Foi estudada a influência de várias combinações de 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) x cinetina (CIN) e explantes de diferentes origens no crescimento e produção de saponinas em calos de *Pfaffia glomerata*. O conteúdo de saponinas foi determinado em cultura de calos obtidos a partir de explantes caulinares e radiciais, com a finalidade de verificar a produção de compostos secundários *in vitro*. Para avaliar o efeito de auxinas e citocininas no crescimento de calos e produção de saponinas, foram analisadas várias combinações de 2,4-D x CIN, sendo que 1,0 mg.L⁻¹ 2,4-D x 0,5 mg.L⁻¹ CIN apresentou o melhor resultado (explante caulinar: 4,09% e explante radicial: 3,81% de saponina total). O conteúdo de saponinas totais em raiz e caule de *P. glomerata* *in vivo* foi 3,74% e 2,69%, respectivamente. Concentrações altas de sacarose (60 g.L⁻¹) aumentaram o conteúdo de saponinas (5,92%).

Palavras-Chave: *Pfaffia glomerata*, indução de calos, saponinas, produtos secundários de plantas.

ABSTRACT: Callus induction and production of total saponins in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen *in vitro*. There was the influence of various media constituents on the growth and saponin production in *Pfaffia glomerata* callus. Chemical analysis of the saponin content in callus culture from shoot and root explants of *P. glomerata*, were carried out in order to determine whether it was possible to obtain secondary metabolites *in vitro*. The effects of auxin (2,4 D) and cytokinins (KIN) on saponin content and callus growth were examined; a better increased amounts of saponins was observed when combining 1,0 mg.L⁻¹ 2,4-D and 0,5 mg.L⁻¹ KIN (shoot explant: 4,09% and root explant: 3,81%). The total saponins content of *P. glomerata* roots and shoots *in vivo* was 3,74% and 2,69% respectively. High sucrose concentrations (60 g.L⁻¹) increased the content of total saponins (5,92%).

Key words: *Pfaffia glomerata*, callus induction, saponins, plant secondary products.

INTRODUÇÃO

Muitas plantas superiores produzem compostos orgânicos economicamente importantes, utilizáveis na indústria de alimentos, cosméticos, farmacêutica, pesticidas e outros. São compostos secundários do metabolismo das plantas, aparentemente sem função no metabolismo primário, mas desempenhando importante papel ecológico nas relações da planta com o ambiente em que vivem. Estes compostos são geralmente acumulados em pequenas quantidades, em células especializadas, durante certo estágio de desenvolvimento da planta (Balandrin *et al.*, 1985).

O reino vegetal tem sido fonte de medicamentos valiosos, como morfina, digoxina, ergotamina, leurocristina e outros. Estas substâncias naturais também têm servido de modelo químico para síntese de novos medicamentos. Entretanto, o alto

custo da síntese química; a impossibilidade de síntese, em alguns casos, devido à complexidade química da molécula (Balandrin *et al.*, 1985), aliada ao largo espectro dos efeitos colaterais tóxicos dos sintéticos (Mors, 1982) e a resistência de algumas doenças ao tratamento com sintéticos (Klayman, 1985), tem contribuído para uma valorização dos produtos naturais de plantas. O aumento da demanda por estes produtos, resultante desta tendência mundial de valorização, vem entretanto acompanhada por dificuldades em assegurar um bom suprimento de muitas plantas medicinais, devido ao decréscimo drástico nas reservas naturais resultante da exploração irracional a que algumas espécies vêm sendo submetidas, além de dificuldades técnicas em cultivar plantas selvagens e o encarecimento da mão de obra (Whitaker & Hashimoto, 1986).

Neste contexto, o cultivo *in vitro* de tecidos e células vegetais constitui uma alternativa promissora para suprimento constante e homogêneo de material vegetal. Além disso, a cultura de células e tecidos

Recebido para publicação em 03/10/2003

Aceito para publicação em 27/05/2004

vegetais constitui um sistema adequado para o estudo das vias biossintéticas, permitindo a otimização da produção *in vitro* de metabólitos secundários (Crocomo & Melo, 1991). A tecnologia do cultivo *in vitro* pode ser aplicada em plantas medicinais através da micropropagação, cultura de calos e de células em suspensão, visando a produção de compostos secundários de interesse farmacêutico, cosmético e alimentar. A exploração da capacidade biossintética de várias culturas celulares tem ocorrido em vários países nas últimas décadas, com resultados nem sempre satisfatórios; entretanto conhecimentos novos têm sido relatados para uma grande variedade de produtos naturais (Alfermann & Petersen, 1995).

Foi observado que apesar do meio Murashige-Skoog (MS) ser o mais utilizado no cultivo *in vitro*, os meios variavam de espécie para espécie atendendo a especificidade de cada cultura bem como o estágio de micropropagação desejado, sendo necessário um ajuste/adaptação na composição dos meios, principalmente na concentração dos macronutrientes, no sentido de proporcionar melhor suprimento nutricional aos explantes, viabilizando desta forma seu desenvolvimento (Morard & Henry, 1998; Morard *et al.*, 1999; Nicoloso *et al.*, 2003).

Pfaffia glomerata Spreng (Pedersen) Amaranthaceae, conhecida como ginseng brasileiro, tem sido objeto de estudos agrônômicos, químicos e farmacológicos. Espécies de *Pfaffia* são usadas como remédio para diabetes, colesterol alto, como tônico e afrodisíaco na medicina popular (Oliveira, 1986).

Saponinas e sapogeninas, como o ácido fático, e outras substâncias como estigmasterol, sitosterol, alantoina e ecdisterona, tem sido identificadas em muitas espécies de *Pfaffia* (Nishimoto *et al.*, 1988; Oliveira *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1994). As saponinas apresentam propriedades expectorantes e anti-inflamatórias, mas o seu efeito na concentração dos lipídeos no plasma é mais significativo, podendo reduzir o colesterol plasmático em animais (Mahato *et al.*, 1988).

Zhong (1998) observou diferenças na produção de saponinas e polissacarídeos em culturas de células de *Panax notoginseng* e *Panax ginseng*, quando se utilizavam diferentes reguladores de crescimento, sendo que o ácido naftaleno acético (NAA) e o ácido indol acético (IAA) foram os que demonstraram melhor resultado e altas concentrações de cinetina inibiram seriamente o crescimento das células. El Tigani *et al.* (2001); Ferita *et al.* (2000) e Srivastava *et al.* (2001) também empregaram cinetina na produção de calo de espécies medicinais.

A obtenção de saponina através da cultura de tecidos também tem sido observada em outras

espécies, tais como *Saponaria officinalis* L. e *Gypsophila paniculata* L. sendo que a concentração de macronutrientes e especialmente de micronutrientes dos meios MS foi alterada, o que resultou no crescimento da cultura e estímulo da produção de saponina triterpenóide (Fulcheri *et al.*, 1998). Trabalhos recentes com *Panax ginseng* tem demonstrado que o uso de alguns elicitores, extratos de leveduras e metil jasmonato quando inseridos no meio de cultura propiciam um aumento significativo na produção de saponina, sendo necessário que o ácido 2,4-D diclorofenoxiacético (2,4-D) seja retirado da composição do meio uma vez que o metil jasmonato, interage antagonicamente com o 2,4-D (Lu *et al.*, 2001).

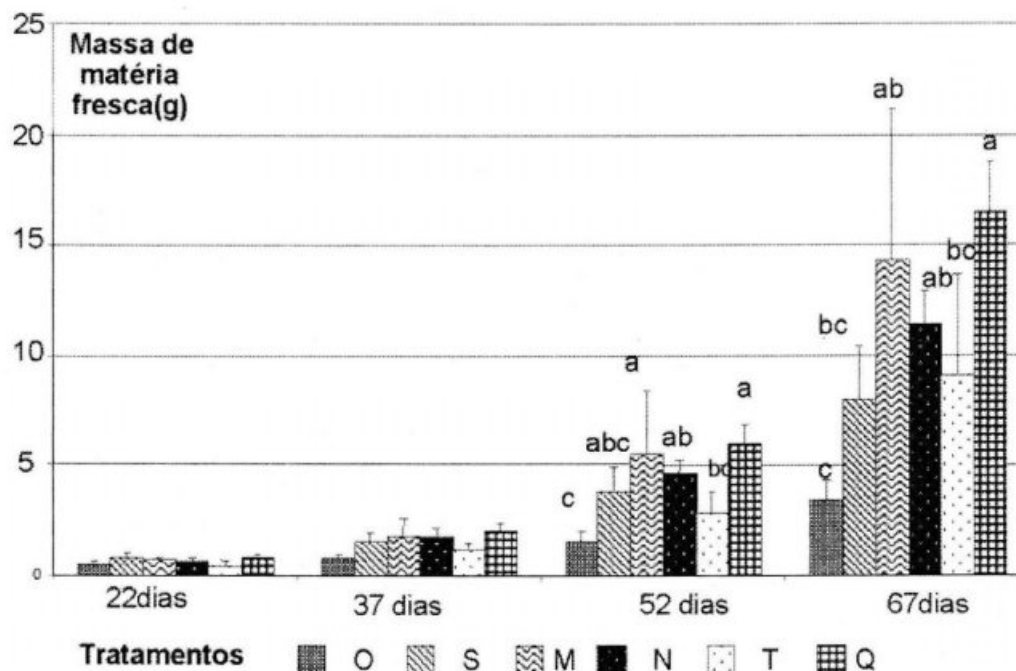
Neste trabalho, a utilização de diferentes fontes de carbono, teve por finalidade verificar o efeito da substituição da sacarose por glicose no meio para formação de calos e na produção de saponinas. Gallo (1994) obteve crescimento diferencial de embriões de feijão com o uso de fontes alternativas de carbono como glicose, frutose e maltose, mas um baixo crescimento com galactose. Teng *et al.* (1992); Ladyman & Girard (1992); Gunter & Ovodov (2003) e Irving *et al.* (2001) também empregaram diferentes fontes de carboidratos no meio de cultura, sendo que maltose inibiu a multiplicação em pepino. Em *Silene vulgaris*, Gunter & Ovodov (2003), encontrou que glicose, frutose e galactose deram crescimento positivo de calos. A adição de maltose ao meio de cultivo, produziu mais embriões somáticos em *Hevea brasiliensis* (Blanc *et al.*, 1999) e mais calos em *Lilium* cultivado com diferentes fontes de carboidrato (Han *et al.*, 2000).

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar as condições para indução de calos de *Pfaffia glomerata* e a produção saponinas, comparando-a com a biossíntese que ocorre na planta *in vivo*.

MATERIAL E MÉTODO

Micropropagação – Plantas de *Pfaffia glomerata* foram propagadas através de estacas na casa de vegetação do Laboratório de Biotecnologia Agrícola, Departamento de Ciências Biológicas, USP/ESALQ, em Piracicaba/SP. Ápices caulinares de brotos das plantas propagadas, com cerca de 3 cm de altura, foram desprovidos das folhas mais externas e colocados em solução de hipoclorito de sódio (0,4%) a 20% (v/v), contendo 2 gotas de Tween 20, durante 15 minutos, sob agitação freqüente. Após a desinfecção, foram lavados 3 vezes com água destilada esterilizada, retirando-se em seguida o restante das folhas. Ápices de 1,0 cm foram imediatamente inoculados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) modificado, sem regulador de crescimento e em presença de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 7,5 g.L⁻¹ de ágar, sendo o pH ajustado para 5,8. A

FIGURA 1 - Incremento de massa de matéria fresca de calos derivados de segmentos radiciais, cultivados em meio MS modificado, suplementado com 2,4-D x CIN (mg.L^{-1}). Tratamentos O: 1,0 x 2,5; S: 2,5 x 1,0; M: 1,0 x 0,5; N: 1,0 x 1,0; T: 2,5 x 2,5; Q: 2,5 x 0,1. Letras distintas indicam diferenças significativas ao nível de 5% (Teste de Tukey).



Letras distintas indicam diferenças significativas ao nível de 5% (Teste de Tukey).

desinfecção e a inoculação dos explantes foram conduzidas em câmara de fluxo laminar, em condições assépticas. As culturas foram mantidas em câmaras de crescimento sob temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; sob irradiância total de 10 W/m^2 e fotoperíodo de 16/8 horas.

Indução de calos – Após 40 dias em cultura, explantes medindo cerca de 1,0 cm, foram excisados dos entre-nós da região mediana de caules e raízes de mesmo diâmetro, e inoculados separadamente em meio MS modificado, suplementado com ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D) e cinetina (CIN). As concentrações de 2,4-D utilizadas foram 0,0; 0,1; 1,0; 2,5 mg.L^{-1} e as de cinetina foram: 0,0; 0,1; 0,5; 1,0; 2,5 mg.L^{-1} . As combinações entre os dois reguladores resultaram em 20 tratamentos, conduzidos no escuro à $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com 10 repetições. Os tratamentos foram identificados com letras de A a T.

Após 50 dias, os calos foram avaliados através da frequência da indução de calos (%) e diâmetro dos mesmos. Os calos foram classificados atribuindo-lhes uma nota segundo o seu diâmetro: nota 1: até 0,2 cm; nota 2: até 0,5 cm; nota 3: até 1,0 cm; nota 4: até 1,5 cm e nota 5: mais de 1,5 cm.

Foram selecionados 6 tratamentos (M, N, O, Q, S, T) que apresentaram alta frequência de

indução e os maiores calos, os quais foram utilizados para os ensaios de incremento de massa de matéria fresca. Em condições assépticas, foram pesados (massa $0,10\text{g} \pm 0,02$) e imediatamente inoculados em meios de composição correspondente, mantidos no escuro, a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com 10 repetições para cada tratamento. Nos 22^o, 37^o, 52^o e 67^o dias foram retiradas amostras dos calos para a determinação da massa de matéria fresca, seguindo-se a secagem em estufa a 60°C até peso constante, obtendo-se o valor do resíduo seco. Após a medida do 37^o dia, os calos foram imediatamente transferidos para meios recém preparados, de mesma composição.

Após a análise de incremento de massa de matéria fresca e determinação do resíduo seco, foram selecionados os calos dos dois melhores tratamentos (M e T), para os ensaios de células em suspensão.

Suspensão celular – Calos provenientes dos tratamentos M e T foram transferidos para meios líquidos com os mesmos teores de cinetina e 2,4-D em presença das seguintes doses de sacarose ou glicose, em g.L^{-1} : sacarose 40 (S 1); sacarose 60 (S 2); glicose 40 (G 1). Os frascos contendo as suspensões celulares foram mantidos em câmaras de crescimento em ausência de luz e temperatura de $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

As transferências para meios de mesma

TABELA 1 - Porcentagem de resíduo seco de calos cultivados em meio MS modificado, suplementado com 2,4-D x CIN

Tratamento 2,4-D x CIN (mg.L ⁻¹)	Resíduo seco (%)	
	raiz*	caule*
M: 1,0 x 0,5	3,18	3,87
N: 1,0 x 1,0	3,47	3,88
O: 1,0 x 2,5	4,46	4,40
Q: 2,5 x 0,1	2,64	3,57
S: 2,5 x 1,0	3,62	3,52
T: 2,5 x 2,5	3,43	3,52

* calos derivados de explantes radiciais e caulinares
Os resultados constituem a média de 4 determinações

composição foram realizadas em intervalos de 30 dias, por um período de 3 meses. As suspensões celulares foram filtradas a vácuo, sendo o resíduo celular pesado, liofilizado e armazenado em dissecador sob vácuo, para análises químicas.

Análise gravimétrica de saponinas totais

– Foram analisadas amostras de calos e de caules e raízes de plantas de *P. glomerata* mantidas em casa de vegetação. A determinação de saponina bruta foi realizada utilizando-se o método gravimétrico de Namba *et al.* (1974). A amostra pulverizada (8g) foi submetida à extração com metanol em aparelho de Soxhlet, durante 8 horas, o extrato sendo evaporado até securo. O resíduo foi dissolvido em água destilada, lavado 3 vezes com éter etílico, sendo que, após cada lavagem, a mistura resultante foi aquecida em banho maria até eliminação total do éter etílico e em seguida submetida à extração com várias porções de butanol saturado com água. A camada butanólica, após lavagem com água, foi evaporada até securo, obtendo-se assim, o resíduo de saponinas totais bruta.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Incremento de massa de matéria fresca

Foram selecionadas as seis combinações de 2,4-D x CIN que apresentaram os melhores resultados (% de indução e tamanho dos calos): **M:** 1,0 mg.L⁻¹ 2,4-D x 0,5 mg.L⁻¹ CIN; **N:** 1,0 mg.L⁻¹ 2,4-D x 1,0 mg.L⁻¹ CIN; **O:** 1,0 mg.L⁻¹ 2,4-D x 2,5 mg.L⁻¹ CIN; **Q:** 2,5 mg.L⁻¹ 2,4-D x 0,1 mg.L⁻¹ CIN; **S:** 2,5 mg.L⁻¹ 2,4-D x 1,0 mg.L⁻¹ CIN; **T:** 2,5 mg.L⁻¹ 2,4-D x 2,5 mg.L⁻¹ CIN.

As Figuras 1 e 2 mostram os resultados dos incrementos de massa de matéria fresca dos calos oriundos de explantes radiciais e dos calos formados a partir dos explantes caulinares, respectivamente. Nos 37 primeiros dias não houve diferença significativa de crescimento dos calos nos diferentes tratamentos (Figura 1). Aos 52 dias, os tratamentos **M** e **Q** determinaram melhor crescimento dos calos, tendo o maior crescimento (tratamento **Q**) ocorrido nos

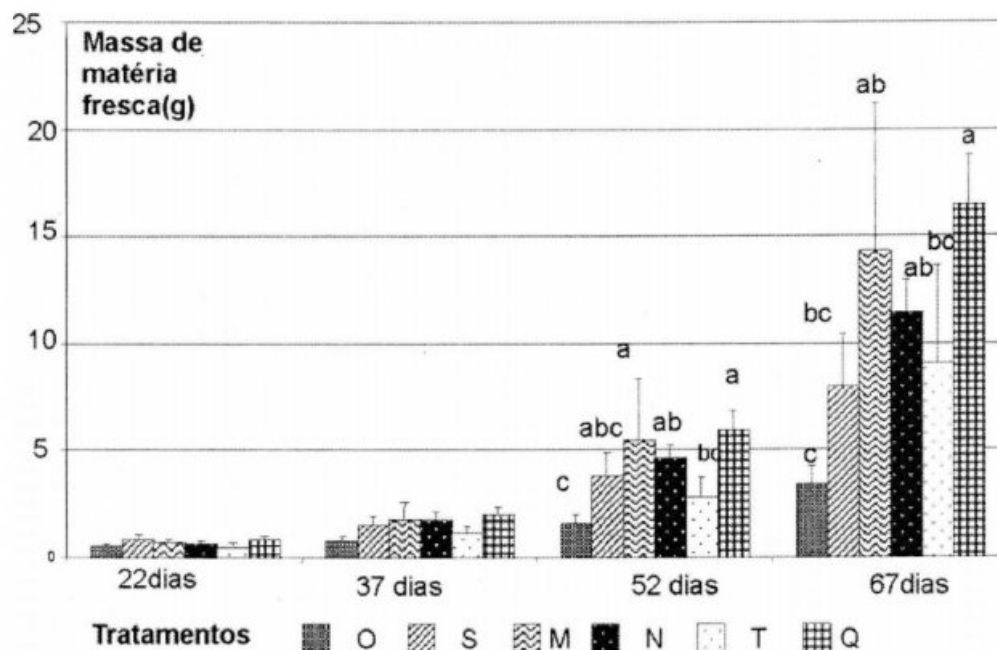
últimos 15 dias do experimento. Nesses tratamentos, os explantes radiciais ficaram expostos a uma razão auxina/citocinina elevada. Quanto aos calos originados a partir de explantes caulinares, o melhor crescimento dos mesmos ocorreu nos tratamentos **S** e **T** (Figura 2), nos quais a alta concentração de citocinina (tratamento **T**) não impediu o crescimento dos calos.

A relação auxina/citocinina é crítica para o controle do crescimento e morfogênese (Skoog & Miller, 1957). Geralmente alta concentração de auxina e baixa concentração de citocinina presentes no meio de cultura promovem abundante proliferação de células com a formação de calos (Flick *et al.*, 1986). Entretanto, não é apenas a relação entre reguladores de crescimento supridos exogenamente que afeta a organogênese, pois muitos tecidos cultivados *in vitro* são capazes de sintetizar citocininas e auxinas (Kerbaudy *et al.*, 1988). Outros fatores exógenos, como níveis e fontes de nitrogênio, de açúcares e vitaminas são de importância para a promoção da organogênese de muitas espécies vegetais (Handro & Floh, 1990). Além disso, a instabilidade genética que ocorre em tecidos mantidos em cultura de tecidos pode afetar o crescimento e o padrão morfogenético das culturas.

Resíduo seco

A Tabela 1 mostra os resultados da porcentagem de resíduo seco nos calos originados de explantes radiciais e caulinares cultivados no escuro. Pode-se observar que o tratamento **Q** (2,5 mg.L⁻¹ 2,4-D x 0,1 mg.L⁻¹ CIN) determinou a menor porcentagem de resíduo seco dos calos oriundos de explante radicial, embora tenha apresentado o maior incremento de massa de matéria seca. O contrário ocorreu com o tratamento **O** (2,5 mg.L⁻¹ 2,4-D x 2,5 mg.L⁻¹ CIN) no qual foi observada a maior porcentagem de resíduo seco, tanto nos calos provindos de segmentos radiciais, quanto nos de segmentos caulinares, embora tenha apresentado o menor incremento de massa de matéria fresca.

FIGURA 2 - Incremento de massa de matéria fresca de calos derivados de segmentos caulinares, cultivados em meio MS modificado, suplementado com 2,4-D x CIN (mg.L^{-1}). Tratamentos - O: 1,0 x 2,5; S: 2,5 x 1,0; M: 1,0 x 0,5; N: 1,0 x 1,0; T: 2,5 x 2,5; Q: 2,5 x 0,1. Letras distintas indicam diferenças significativas ao nível de 5% (Teste de Tukey).



Saponinas

Nas raízes de plantas intactas de *Pfaffia glomerata* foi detectado 3,74% de saponinas, semelhante ao observado por Oliveira *et al.* (1980) em *Pfaffia paniculata*, enquanto que nos caules, o teor do esteróide foi de 2,69% (Figura 3). Esses dados corroboram a utilização preferencial de raízes de ginseng brasileiro, por produzirem mais saponinas do que o caule, na prática da medicina popular.

Entretanto, nas condições do presente trabalho observou-se que nas células em suspensão provenientes de calos de explantes radiciais e de calos de explantes caulinares, os teores de saponinas totais não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($P > 0.05$). Tabata & Hiraoka (1976) analisando a produção de alcalóides em calos oriundos de folhas, raízes e sementes de *Nicotiana rustica*, também não observaram diferenças qualitativas ou quantitativas entre os mesmos, resultado este dentro do esperado, pois, segundo aqueles autores, é pouco provável que diferentes órgãos de uma planta possam originar cultura de calos com diferentes capacidades biossintéticas.

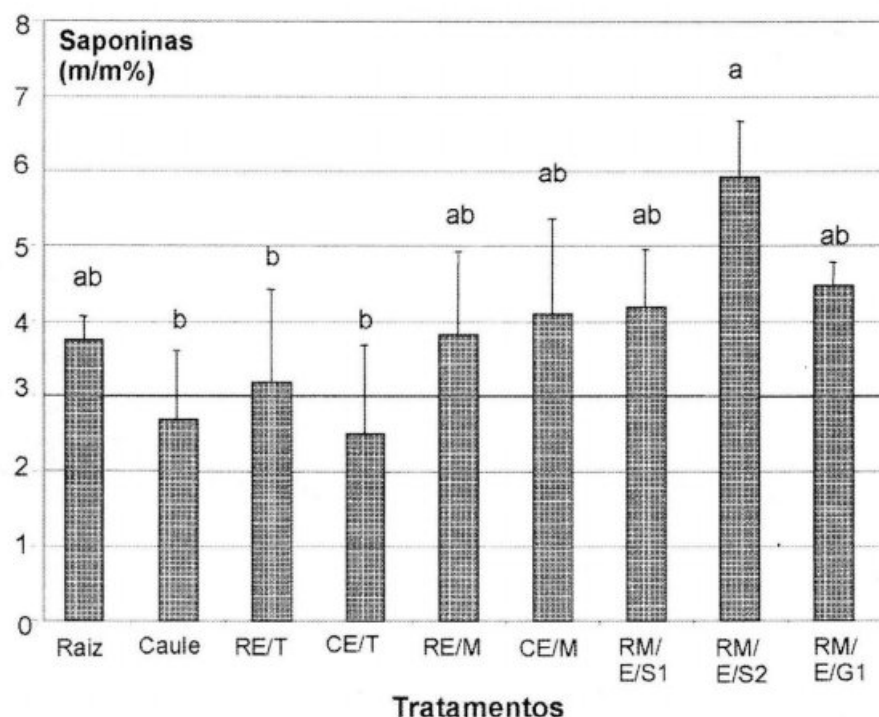
Apesar de pouco desenvolvidas, as suspensões celulares advindas de calos caulinares mantidas no escuro e em meio de cultura contendo $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ 2,4-D e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de CIN (meio **CM/E**) (Figura 2), apresentaram nível bem maior de saponinas totais (4,09%) do que aquelas crescendo também em ausência de luz e em meio contendo $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de CIN (meio **RT/E**) (2,50%)

(Figura 3), com diferença estatística significativa ($P > 0.05$). Por outro lado, o desenvolvimento das suspensões celulares de calos radiciais em meio **M** e no escuro (**RM/E**) foi elevada com teor de saponinas totais maior (3,81%) do que em meio **T** e no escuro (**RT/E**) (3,18%), com diferença estatística significativa ($P > 0.05$) (Figura 3): O desenvolvimento de culturas de células *in vitro* e a produção e armazenamento de compostos secundários pelas mesmas, seriam processos antagônicos, como relatam Lindsey & Yeomam (1983), os quais detectaram baixos níveis de alcalóides em células de diversas espécies de solanáceas que apresentavam crescimento muito rápido e desorganizado.

O efeito inibitório do 2,4-D na produção de metabólitos secundários em sistemas celulares *in vitro* é fato conhecido (Berlin, 1988; Ganapathi & Kargi, 1990). Tabata & Hiraoka (1976) verificaram que o crescimento de calos de *Nicotiana rustica* aumentou com o aumento da concentração de 2,4-D, o qual, em concentrações mais elevadas, inibiu a produção do alcalóide. Por outro lado, não foi observado aumento na produção de nicotina na ausência de 2,4-D, sendo, ao que parece, improvável que 2,4-D seja o único responsável pela redução da nicotina no meio de cultura. Entretanto, em culturas *in vitro* de *Panax quinquefolium*, Zhong *et al.* (1996) detectaram alta produção de saponinas utilizando combinação de ácido indolbutírico e cinetina sem adição de 2,4-D.

Alguns autores (Profumo *et al.*, 1991) afirmam que há antagonismo entre crescimento e

FIGURA 3 - Saponinas totais em células em suspensão de *P. glomerata* (m/m massa de matéria seca) em porcentagem. Raiz e Caule: determinações *in vivo*. R: explante radicial; C: explante caulinar; T: 2,5 mg.L⁻¹ 2,4-D x 2,5 mg.L⁻¹ CIN; M: 1,0 mg.L⁻¹ 2,4-D x 0,5 mg.L⁻¹ CIN; E: escuro; S1: 40 g.L⁻¹ sacarose; S2: 60 g.L⁻¹ sacarose; G1: 40 g.L⁻¹ glicose. Os resultados são médias de 3 determinações. Letras distintas indicam diferenças significativas em nível de 5% (Teste de Tukey).



armazenamento de metabólitos, enquanto que outros encontram paralelismo entre crescimento e concentração de princípio ativo. O antagonismo seria devido ao fato de que não ocorreria diferenciação morfológica em culturas de rápido crescimento (Whitaker & Hashimoto, 1986) e que haveria necessidade da diferenciação das células em tecidos especializados para a produção de compostos secundários (Yasaki & Okuda, 1990). Contudo, tem sido relatada a produção de compostos secundários em cultura de células desdiferenciadas (Tabata & Hiraoka, 1976; Pauthe-Dayde *et al.*, 1990; Yazaki & Okuda, 1990; Profumo *et al.*, 1994). Provavelmente, a necessidade de tecidos especializados para síntese não é válida para todos os compostos.

Em relação à influência da concentração e natureza do açúcar na produção de saponinas totais, pode-se observar na Figura 3 que calos de *Pfaffia glomerata* crescendo no escuro em presença de sacarose 40 g.L⁻¹ (RM/E/S1) ou 60 g.L⁻¹ (RM/E/S2), produziram respectivamente 4,19% e 5,92% do esteróide, com diferença estatisticamente significativa ($P > 0.05$) entre si. Na presença de glicose 40 g.L⁻¹, o teor de saponinas (4,47%) foi menor do que em presença do nível mais elevado de sacarose, com diferença estatisticamente significativa ($P > 0.05$) entre ambas, entretanto não diferiu significativamente do

nível mais baixo do dissacarídeo. Sacarose é uma das principais fontes de carbono mais efetiva na produção de produtos secundários. Ganapathi & Kargi (1990) observaram que a presença de concentrações crescentes de sacarose no meio de cultura de *Catharanthus roseus* aumentou a síntese de alcalóides. Anteriormente, Mizukami *et al.* (1977) tinham observado aumento significativo de shikonina em cultura de calos de *Lithospermum* mantidos em presença de sacarose.

CONCLUSÃO

O conteúdo de saponinas totais em raiz e caule de *P. glomerata* *in vivo* foi 3,74% e 2,69%, respectivamente. Concentrações altas de sacarose (60 g.L⁻¹) aumentaram o conteúdo de saponinas (5,92%). Entretanto, nas condições do presente trabalho observou-se que nas células em suspensão provenientes de calos de explantes radiciais e de calos de explantes caulinares, os teores de saponinas totais não apresentaram diferenças estatísticas significativas. Sacarose 40 g.L⁻¹ (RM/E/S1) ou 60 g.L⁻¹ (RM/E/S2), produziram respectivamente 4,19% e 5,92% do esteróide. Na presença de glicose (40 g.L⁻¹), o teor de saponinas foi menor (4,47%) do que em presença do nível mais elevado de sacarose.

Apesar de pouco desenvolvidas, as

suspensões celulares advindas de calos caulinares mantidas no escuro e em meio de cultura contendo $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ 2,4-D e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de CIN (meio CM/E) (Figura 2), apresentaram nível bem maior de saponinas totais (4,09%) do que aquelas crescendo também em ausência de luz e em meio contendo $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D e $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de CIN (meio RT/E) (2,50%)

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALFERMANN, A.W., PETERSEN, M. Natural product formation by plant cell. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.43, p.199-205, 1995.
- BALANDRIN, M.F., KLOCKE, J.A., WURTELE, E.S., *et al.* Natural plants chemicals: sources of industrial and medicinal materials. **Science**, v.228, p.1154-60, 1985.
- BERLIN, J. **Formation of secondary metabolites in cultured plant cell and its impact on pharmacy**. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed). Biotechnology in agriculture and forestry (4) Medicinal and aromatic plants I. Berlin: Springer Verlag, 1988, p.37-55.
- BLANC, G., MICHAUX, F.N., TEISSON, C., *et al.* Effects of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.59, n.2, p.103-12, 1999.
- CROCOMO, O.J., MELO, M. Practical aspects of the production of secondary metabolites by plant cell cultures. In: CROCOMO, O.J., SHARP, W.R., MELO, M. (Eds). **Biotecnologia para produção vegetal**. Piracicaba: Cebtec/Fealq, 1991, p.373-89.
- EL-TIGANI, S., ALI, Y.H. Organ and tissue culture of *Acacia senegal* (L.) wild. **Sudan Journal of Natural Sciences** (Sudan), n.1, p.69-88, 2001.
- FERITA, I., SATRIA, B., DJAFARUDDIN, Propagation of gambir (*Uncaria gambir*) by callus induction in vitro. **Jurnal Stigma** (Indonesia), v.8, n.1, p.12-6, 2000.
- FLICK, C.E., EVANS, D.A., SHARP, W.R. Organogenesis. In: EVANS, D.A., SHARP, W.R., AMMIRATO, P.V. **Handbook of plant cell culture**. Nova York: Macmillan Publishing Company. cap.2, p.13-67. 1986.
- FULCHERI, C., MORARD, P., HENRY, M. Stimulation of the growth and the triterpenoid saponin accumulation of *Saponaria officinalis* cells and *Gypsophila paniculata* root suspension cultures by improvement of the mineral composition of the media. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.46, n.5, p.2055-61, 1998.
- GALLO, L.A. **Estudo do metabolismo do nitrogênio em embriões de feijão *Phaseolus vulgaris* L. cultivados in vitro** 1994, 150p. Tese (doutorado) Universidade de São Paulo, São Paulo.
- GANAPATHI, B., KARGI, F. Recent advances in indole alkaloid production by *Catharanthus roseus*. **Journal of Experimental Botany**, v.41, n.224, p.259-67, 1990.
- GUNTER, E.A., OVODOV, Y.S. Production of polysaccharides by *Silene vulgaris* callus culture depending on carbohydrates of the medium. **Biochemistry-Moscow**, v.68, n.8, p.882-9, 2003.
- HANDRO, W., FLOH, E.I.S. Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro*. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S. (Eds.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/ Embrapa/CNPq, 1990, p.203-12.
- HAN, D.S., NIIMI, Y., NAKANO, M. Formation of calli from isolated microspore cultures of Asiatic hybrid lily 'Connecticut King'. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v.69, n.1, p.52-6, 2000.
- KERBAUY, G.B., MONTEIRO, W.R., KRAUS, J.E., *et al.* Some physiological and structural aspects of cytokinin autonomy in the callus of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) **Journal of Plant Physiology**, v.132, p. 218-22, 1988.
- KLAYMAN, D.L. Qinghaosu (artemisinina) an antimalarial drug from China. **Science**, v.228, p.1049-55, 1985.
- LADYMAN, J.A.R., GIRARD, B. Cucumber somatic embryo development on various gelling agents and carbohydrate sources. **HortScience**, v.27, n.2, p.164-5, 1992.
- LEE, J.S., KO, K.M., AHN, J.C., *et al.* High yield saponin production by mass cultures of ginseng transformed tissue (1) – Induction, culture of transformed tissue and selection of high-saponin-producing clones in ginseng. **Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering** (Korea Republic), v.9, n.2, p.157- 64, 1994.
- LINDSEY, K., YEOMAN, M.M. The relation ship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. **Journal Experimental Botany**, v.34, n.145, p.1055- 65, 1983.
- LU, M.B., WONG, H.L., TENG, W.L. Effects of elicitation on the production of saponin in cell culture of *Panax ginseng*. **Plant Cell Reports**, v.20, n.7, p.674-7, 2001.
- MAHATO, S.B., SARKAR, S.K., PODDAR, G. Triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, v.27, n.10, p.3037-67, 1988.
- MIZUKAMI, H., KONOSHIMA, M., TABATA, M. Effect of nutritional factors on Shikonin derivative formation in *Lithospermum* callus culture. **Phytochemistry**, v.16, p.1183-86, 1977.
- MORARD, P., HENRY, M. Optimization of the mineral composition of *in vitro* culture media. **Journal of**

- Plant Nutrition**, v.21, n.8, p.1565-76, 1998.
- MORARD, P., FULCHERI, C., HENRY, M. Mineral nutrition of *Gypsophila in vitro* root culture. **Journal of Plant Nutrition**, v.22, n.4-5, p.717-30, 1999.
- MORS, W. Plantas medicinais. **Ciência Hoje**, v.1, n.3, p.14-9, 1982.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, v.15, p.473-97, 1962.
- NAMBA, T., YOSHIZAKI, M., TOMOMORI, T., *et al.* Fundamental studies on the evaluation of the crude drugs. **Planta Medica**, v.25, n.1, p.28-38, 1974.
- NICOLOSO, F.T., ERIG, A.C., MARTINS, C.F., *et al.* Micropropagação de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.3, n.2, p.11-8, 2001.
- NICOLOSO, F.T., ERIG, A.C., RUSSOWSKI, D., *et al.* Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.1, p.84-90, 2003.
- NISHIMOTO, N., SHIOBARA, Y., INOUE, S., *et al.* Three ecdysteroid glycosides from *Pfaffia iresinoides*. **Phytochemistry**, v.27, n.6, p.1665-8, 1988.
- OLIVEIRA, F. *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze - O ginseng brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.1, n.1, p.86-92, 1986.
- OLIVEIRA, F., AKISUE, G., AKISUE, M.K. Contribuição para o estudo farmacognóstico do ginseng brasileiro *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze. **Anais de Farmacia Quimica** (São Paulo) v.20, n.1/2, p.261-77, 1980.
- PAUTHE-DAYDE, D., ROCHD, M., HENRY, M. Triterpenoid saponin production in callus and multiple shoot cultures of *Gypsophila* spp. **Phytochemistry**, v.29, n.2, p.483-7, 1990.
- PROFUMO, P., CAVIGLIA, A.M., GASTALDO, P. Aescin formation in calli and Embryoids from cotyledon and stem plants of *Aesculus hippocastanum*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.46, p.924-5, 1994.
- PROFUMO, P., CAVIGLIA, A.M., GASTALDO, P., *et al.* Aescin content in embryogenic callus and in embryoids from leaf explants of *Aesculus hippocastanum*. **Planta Medica**, v.57, p.50-2, 1991.
- SKOOG, F., MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. **Symposium of Society of Experimental Biology**, v.11, p.118-30, 1957.
- SRIVASTAVA, S., DWIVEDI, U.N. Plant regeneration from callus of *Cuscuta reflexa* - an angiospermic parasite - and modulation of catalase and peroxidase activity by salicylic acid and naphthalene acetic acid. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.39, n.6, p.529-38, 2001.
- TABATA, M., HIRAOKA, N. Variation of the alkaloid production in *Nicotiana rustica* callus cultures. **Plant Physiology**, v.38, p.19-23, 1976.
- TENG, W.L., LIU, Y.J., SOONG, T.S. Rapid regeneration of lettuce from suspension culture. **HortScience**, v.27, n.9, p.1030-2, 1992.
- WHITAKER, R.J., HASHIMOTO, T. Production of secondary metabolites. In: EVANS, D.A., SHARP, W.R., AMMIRATO, P.V. (Eds.) **Handbook of Plant Cell Culture**. New York: Macmillan Publishing Company, 1986, v.4, p.264-86.
- YASAKI, K., OKUDA, T. Condensed tannin production in callus and suspension cultures of *Cinnamomum cassia*. **Phytochemistry**, v.29, n.5, p.1559-62, 1990.
- ZHONG, J.J., BAI, Y., WANG, S.J. Effects of plant growth regulators on cell growth and ginsenoside saponine production by suspension culture of *Panax quinquefolium*. **Journal of Biotechnology**, v.45, p.227-34, 1996.
- ZHONG, J.J. Production of ginseng saponin and polysaccharide by cell cultures of *Panax notoginseng* and *Panax ginseng*: effects of plant growth regulators. **Applied biochemistry and biotechnology**, v.75, n.2/3, p.261-8, 1998.