

Sacarose e nitrogênio na multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen

Sucrose and nitrogen on *in vitro* multiplication of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen

Joseila Maldaner¹ Fernando Teixeira Nicoloso² Eneide Schutz dos Santos³
Rejane Flores⁴ Etiane Caldeira Skrebsky⁴

RESUMO

Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen, conhecida como ginseng brasileiro, é uma planta extensivamente usada na medicina popular em decorrência de possuir propriedades fitoterápicas. Este trabalho teve como objetivo determinar a melhor combinação de concentração da sacarose (30, 45 e 60 g L⁻¹) e do nitrogênio (50, 75, 100 e 125% da concentração padrão do meio MS) para a multiplicação *in vitro* de *P. glomerata*. Aos 30 dias de cultivo, verificou-se que concentrações entre 40 e 45 g L⁻¹ de sacarose e 50% de N propiciaram maior crescimento em altura e número de segmentos nodais por plântula. O número de brotações foi maior na concentração de 55 g L⁻¹ de sacarose combinada com 70% de N. A matéria seca de raízes, da parte aérea e do total da plântula foi maior na concentração de 45 g L⁻¹ de sacarose associada com 50% de N. No geral, a redução da concentração de N para 50% daquela padrão do meio MS, associada a um incremento na dose de sacarose para 45 g L⁻¹, favorece o crescimento em altura, número de segmentos nodais e brotações, bem como a produção de biomassa de *P. glomerata* cultivada *in vitro*, devido ao estímulo ao uso do carbono.

Palavras-chave: Ginseng brasileiro, Amaranthaceae, cultivo *in vitro*, carboidrato, nutriente mineral.

ABSTRACT

Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen, known as brazilian ginseng, is an extensively used plant in folk medicine due to its phytotherapeutic characteristics. This work aimed to determine the best combination of sucrose (30, 45 and 60 g L⁻¹) and nitrogen (50, 75, 100 and 125% of the strength of MS medium) on micropropagation of *P. glomerata*. In 30 days of cultivation, sucrose ranging from 40 to 45 g L⁻¹ and nitrogen at

50% increased the height and the number of nodes. The number of shoots was greater at concentration of 55 g L⁻¹ sucrose combined with 70% N. The dry matter of roots, aerial parts, and of the whole seedling was increased on 50% N and 45 g L⁻¹ sucrose. Altogether the halved concentration of nitrogen and the increased concentration of sucrose to 45 g L⁻¹ increase the height, the number of nodes and the shoots as well as biomass production improved due to an enhanced use of carbon.

Key words: Ginseng brasileiro, Amaranthaceae, *in vitro* culture, carbohydrate, mineral nutrient.

INTRODUÇÃO

Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen, conhecida como ginseng brasileiro, é uma das espécies da família Amaranthaceae de grande interesse comercial na forma de fitomedicamentos e de suplementos alimentares por possuir propriedades rejuvenescedoras, revitalizantes, inibidoras do crescimento de células cancerígenas, antidiabéticas, tônicas, afrodisíacas, entre outras. A intensa exploração predatória das reservas naturais justifica a elaboração de planos de manejo ou projetos de cultivo para *P. glomerata* (MONTANARI JÚNIOR, 1999). Neste sentido, várias pesquisas vêm sendo realizadas no intuito de desenvolver protocolos eficientes de micropropagação para essa espécie (NICOLOSO et al., 2001b; RUSSOWSKI & NICOLOSO, 2003; NICOLOSO et al., 2003; SKREBSKY et al., 2004).

¹Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

²Departamento de Biologia, UFSM, Campus Universitário, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: nicoloso@base.ufsm.br. Autor para correspondência.

³Curso de Especialização em Ciências Biológicas, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

⁴Programa de Pós-graduação em Agronomia, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

A propagação de *P. glomerata* via estaquia, em condições de viveiro e hidroponia, embora sendo viável, produz um número de mudas pouco expressivo (NICOLOSO et al., 1999, 2001a). Em função dessa limitação, NICOLOSO et al. (2001b) propuseram um protocolo altamente reproduzível para a micropropagação da espécie, quando obtiveram, a partir de um único segmento nodal cultivado em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com 30g L⁻¹ de sacarose, 15.000 plantas em seis meses.

As exigências nutricionais requeridas para um tecido em condições *in vitro* variam de acordo com o genótipo, necessitando-se, assim, otimizar os meios de cultura para a micropropagação. Essa otimização, em geral, é feita a partir de variações de três componentes essenciais: fitoreguladores, substâncias orgânicas e nutrientes minerais (NAGAO et al., 1994; LEIFERT et al., 1995; CALDAS et al., 1998).

O nitrogênio e a sacarose são os componentes em maior quantidade nos meios de cultura (NAGAO et al., 1994). O nitrogênio é essencial por fazer parte de inúmeras estruturas orgânicas, compondo os nucleotídeos, que formam os ácidos nucleicos (RNA e DNA), como também aminoácidos, que constituem as proteínas, estando presente ainda na própria molécula de clorofila. É o principal nutriente inorgânico de qualquer meio de cultura, independentemente da espécie e do objetivo do cultivo. A quantidade e a fonte de N pontualmente também influenciam o crescimento das culturas *in vitro*, seu metabolismo químico e a formação e produção de metabólitos (RUSSOWSKI, 2001).

Ao testar o efeito da variação isolada das concentrações de N e P do meio MS no crescimento de *P. glomerata*, foi verificado que o número de raízes por planta, bem como o percentual de enraizamento, foi maior na concentração de N equivalente a 50% daquela do meio de cultura MS. Contudo, a altura de brotações e o número de segmentos nodais por plântula foram maiores, respectivamente, em 100 e 65% de N do meio MS. Já a biomassa foi maior na concentração de 80% de N (RUSSOWSKI & NICOLOSO, 2003).

O fluxo fotônico fotossintético fornecido pelos sistemas convencionais de iluminação das câmaras de crescimento em cultivos *in vitro* é muito baixo (30 a 60 μmol m⁻² s⁻¹). Portanto, isto torna insuficiente o crescimento autotrófico dos tecidos vegetais e, assim, os carboidratos são suplementados aos meios nutritivos como fonte adicional de energia e como precursores para a formação de macromoléculas mais complexas (LEIFERT et al., 1995, CALDAS et al., 1998). Pesquisas de NICOLOSO et al. (2003) demonstraram que a presença de sacarose nas doses

de 30, 45 e 60g L⁻¹, dentre as cinco fontes de carbono utilizadas, proporcionou o maior crescimento em altura de brotações, número de segmentos nodais, biomassa de raiz e parte aérea de *P. glomerata* cultivada *in vitro*. Também tem sido caracterizada a existência de uma alta correlação, tanto em nível fisiológico como molecular, do metabolismo do carbono e do nitrogênio sobre o crescimento das plantas, sendo que a presença de carbono reduzido, principalmente sacarose, estimula a assimilação do nitrato (CORUZZI, 2003).

O objetivo deste trabalho foi determinar a melhor combinação de concentração da sacarose e do nitrogênio para a multiplicação *in vitro* de *P. glomerata*.

MATERIAL E MÉTODOS

Como fonte de explantes, foram utilizados segmentos nodais (1,0cm de comprimento e sem folhas) de plantas de *P. glomerata* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), segundo metodologia descrita por NICOLOSO et al. (2001b).

Os tratamentos consistiram de uma combinação bifatorial completa de quatro concentrações de N (50, 75, 100 e 125% da concentração padrão do meio MS) e de três concentrações de sacarose (30, 45 e 60g L⁻¹). Os demais nutrientes minerais e orgânicos do meio de cultura não foram alterados. Também foi mantida a proporção entre as fontes de N (2 NO₃⁻ : 1 NH₄⁺) em todos os tratamentos. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar (0,6%) e da autoclavagem (1atm, 120°C, 15min). A parcela experimental consistiu de um tubo de ensaio (25mm de diâmetro, 150mm de altura e 147,26cm³ de volume interno) contendo 10mL de meio de cultura MS, modificado nas concentrações de nitrogênio e sacarose, e um segmento nodal. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 30 repetições.

Após inoculação, os explantes foram cultivados em sala de cultivo com temperatura controlada de 25±2°C, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de 35 μmol m⁻² s⁻¹ por lâmpadas fluorescentes brancas-frias. O percentual de enraizamento foi avaliado aos 7, 8, 9, 10, 12 e 15 dias após a inoculação (DAI), e aos 30 DAI foram avaliadas a altura das brotações, o número de segmentos nodais de cada brotação, o número total de segmentos nodais e o número de brotações por planta, bem como a produção da massa seca da parte aérea, da raiz e do total da planta.

Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância. O comportamento individual dos parâmetros de crescimento das plantas foi avaliado por

regressões polinomiais em nível de 5% de probabilidade de erro. As variáveis de porcentagem foram transformadas previamente em arco seno $(x/100)^{1/2}$. Utilizou-se o software científico NTIA, desenvolvido pelo Centro Nacional de Pesquisa Tecnológica em Informática para Agricultura (EMBRAPA, 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até 15 dias após a inoculação (DAI), o maior percentual de enraizamento (55 a 56%) foi obtido na presença de duas situações opostas, ou seja: pela combinação da menor dose de sacarose associada à maior dose de nitrogênio ou com a maior dose de sacarose combinada à menor de nitrogênio (Figura 1a). Em função desses componentes nutritivos serem aqueles em maior concentração no meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), provavelmente, a combinação de altas doses de N e sacarose afetam negativamente o enraizamento através do aumento do potencial osmótico do meio, fator sabidamente conhecido como inibidor do desenvolvimento radicular durante o processo de propagação vegetativa. SKREBSKY et al. (2004), variando isoladamente a concentração de sacarose do meio de cultivo MS, verificaram que o maior número de raízes, aos 15 DAI, foi obtido entre as concentrações de 45 e 60g L⁻¹.

A altura da maior brotação também apresentou interação significativa entre as concentrações de N e sacarose no meio de cultivo, sendo que a dose de máxima eficiência técnica estimada (DMET) foi 45g L⁻¹ de sacarose e 50% de nitrogênio (Figura 1b). RUSSOWSKI & NICOLOSO (2003), testando o efeito isolado da variação de doses de N e P, registraram que o melhor crescimento em altura de plântulas de *P. glomerata* foi obtido na dose de 100% de N do meio MS. Já SKREBSKY et al. (2004), ao testarem o efeito isolado de doses de sacarose no meio de cultivo, observaram que a altura das brotações de *P. glomerata* apresentou DMET à sacarose de 30 a 45g L⁻¹ aos 10 DAI, e aos 25 e 32 DAI, entre 45 e 60g L⁻¹. GUIMARÃES et al. (1999) registraram maior comprimento de brotos de samambaia-espada (*Nephrolepis exaltata*) na ausência de sacarose e a 25% de N. No crescimento dos brotos de crisântemo (*Dendranthema grandiflora*), OLIVEIRA (1994) verificou que o melhor tratamento foi a combinação da baixa concentração de sacarose associada à baixa porcentagem de N no meio de cultura. Estes resultados demonstram que as respostas à interação entre doses reduzidas de N e C no meio de cultivo variam em função da espécie vegetal em questão.

O número de segmentos nodais da maior brotação (Figura 1c) e o total por plântula (Figura 1d)

foram maiores na presença de 40 a 50g L⁻¹ de sacarose associada a 50% de N. Quanto às respostas em relação à variação isolada da concentração de sacarose, NICOLOSO et al. (2003) verificaram que o número total de segmentos nodais, juntamente a outros parâmetros de crescimento da *P. glomerata*, aumentaram pelo acréscimo das concentrações de sacarose, e em 30, 45 e 60g L⁻¹ foi significativamente maior do que aquelas proporcionadas por outras fontes de carbono. Já SKREBSKY et al. (2004) verificaram que o aumento de 30 para 60g L⁻¹ de sacarose incrementou o número de segmentos nodais por brotação de *P. glomerata* em 27%. Quanto ao N, RUSSOWSKI & NICOLOSO (2003) constataram que a redução da concentração padrão do meio MS para 50% apenas alterou o número de segmentos nodais em 7%; entretanto, a produção de massa seca total da planta foi alterada em 35% nessa mesma condição. Estes resultados indicam que o ganho em número de segmentos nodais por plântula, sob o ponto de vista custo/benefício, pode trazer vantagens significativas porque é um importante parâmetro de crescimento; fundamental, portanto, quando se visa a uma alta taxa de multiplicação para produção de mudas em larga escala.

O número de brotações por planta também apresentou interação entre os fatores sacarose e N, sendo maior na presença de 70% da concentração de N e de 55g L⁻¹ de sacarose (Figura 1e). Este resultado demonstra que a variação de componentes essenciais do meio MS pode alterar o padrão de desenvolvimento das plantas. Em *P. glomerata* cultivada *in vitro*, NICOLOSO et al. (2001b) e RUSSOWSKI & NICOLOSO (2003) verificaram que o número de brotações tem sido o parâmetro de crescimento menos variável conforme as alterações dos nutrientes do meio MS.

As matérias secas de raízes, da parte aérea e do total das plantas apresentaram respostas semelhantes às variações das concentrações de N e sacarose para outros parâmetros de crescimento, sendo que o aumento da concentração de sacarose até 45g L⁻¹, combinado com 50% da concentração de N do meio MS, proporcionou o maior incremento em biomassa (Figura 2a, b, c). RUSSOWSKI & NICOLOSO (2003), variando isoladamente as concentrações de N e P do meio de cultivo, observaram que a massa seca das plântulas de *P. glomerata* foi maior na presença de 50% de N. Também variando isoladamente a concentração de sacarose do meio de cultivo, NICOLOSO et al. (2003) verificaram que a biomassa das plântulas de *P. glomerata* aumentou significativamente pelo incremento da concentração de sacarose de 30 para 60g L⁻¹. Já para a cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch), CALVETE (1998) observou que a biomassa radicular foi maior na dose de 45g L⁻¹.

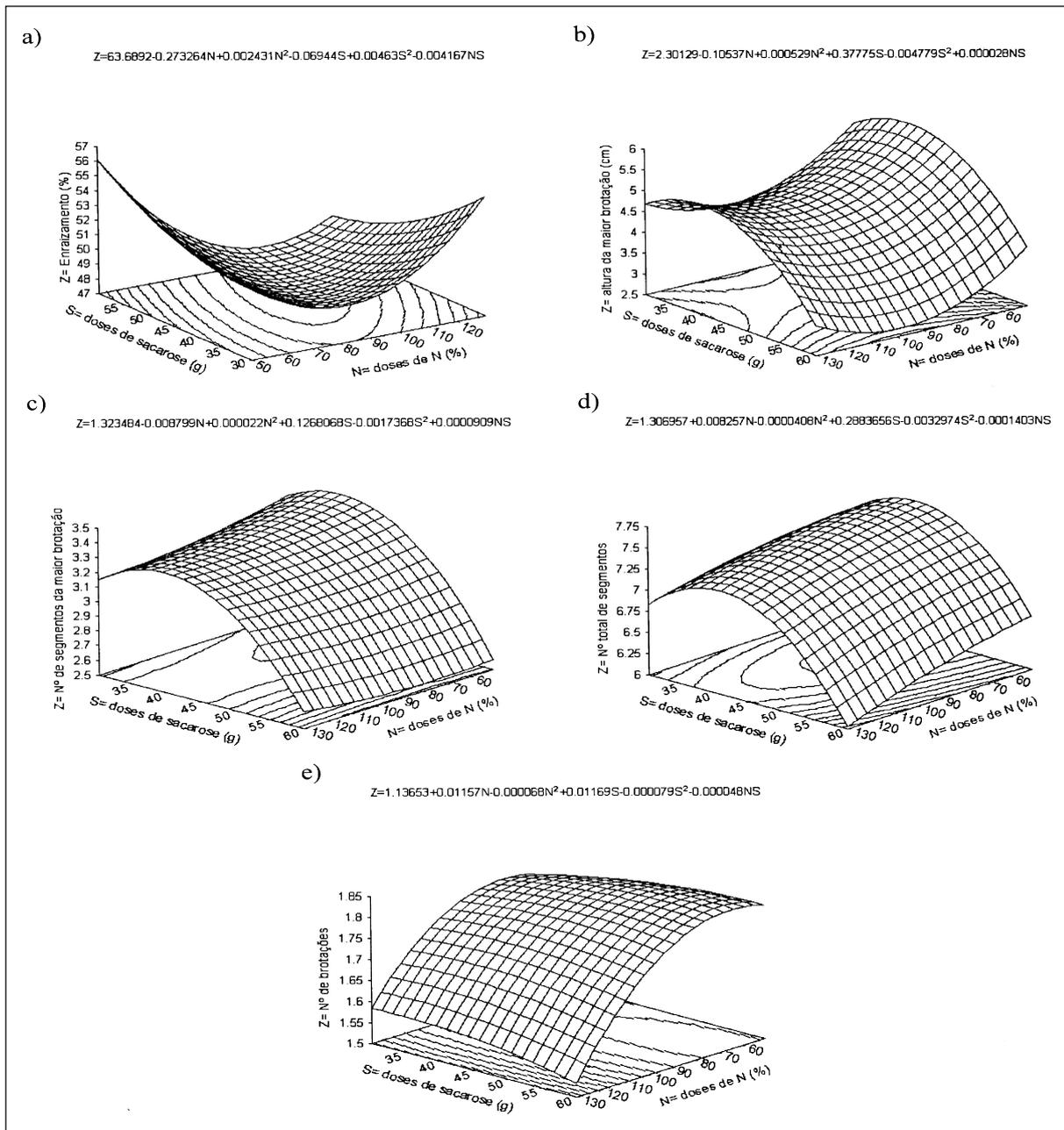


Figura 1 - Efeito de concentrações de nitrogênio e sacarose do meio MURASHIGE & SKOOG (1962) no percentual de enraizamento (a), altura da maior brotação (b), número de segmentos nodais da maior brotação (c), número total de segmentos (d) e número de brotações por plântula (e) de *Pfaffia glomerata* cultivada *in vitro* por 30 dias após a inoculação dos explantes.

O metabolismo do carbono e do nitrogênio, analisados sob aspectos moleculares e fisiológicos, interagem com forte correlação, na qual a presença de carbono reduzido estimula tanto a expressão gênica como a atividade de enzimas da assimilação do nitrato (CORUZZI, 2003). AVILA et al. (1998), analisando as respostas de três cultivares de batata (*Solanum tuberosum*) à concentração e fontes de N, constataram

que o número de segmentos nodais, o comprimento das brotações e a biomassa aumentaram na cv. "Spunta" quando a concentração de N foi diminuída à metade, fato que os autores atribuíram ao aumento da eficiência do uso do carbono.

Os níveis de nutrientes orgânicos e inorgânicos nos substratos de cultivo *in vitro* influenciam vários processos metabólicos nas culturas,

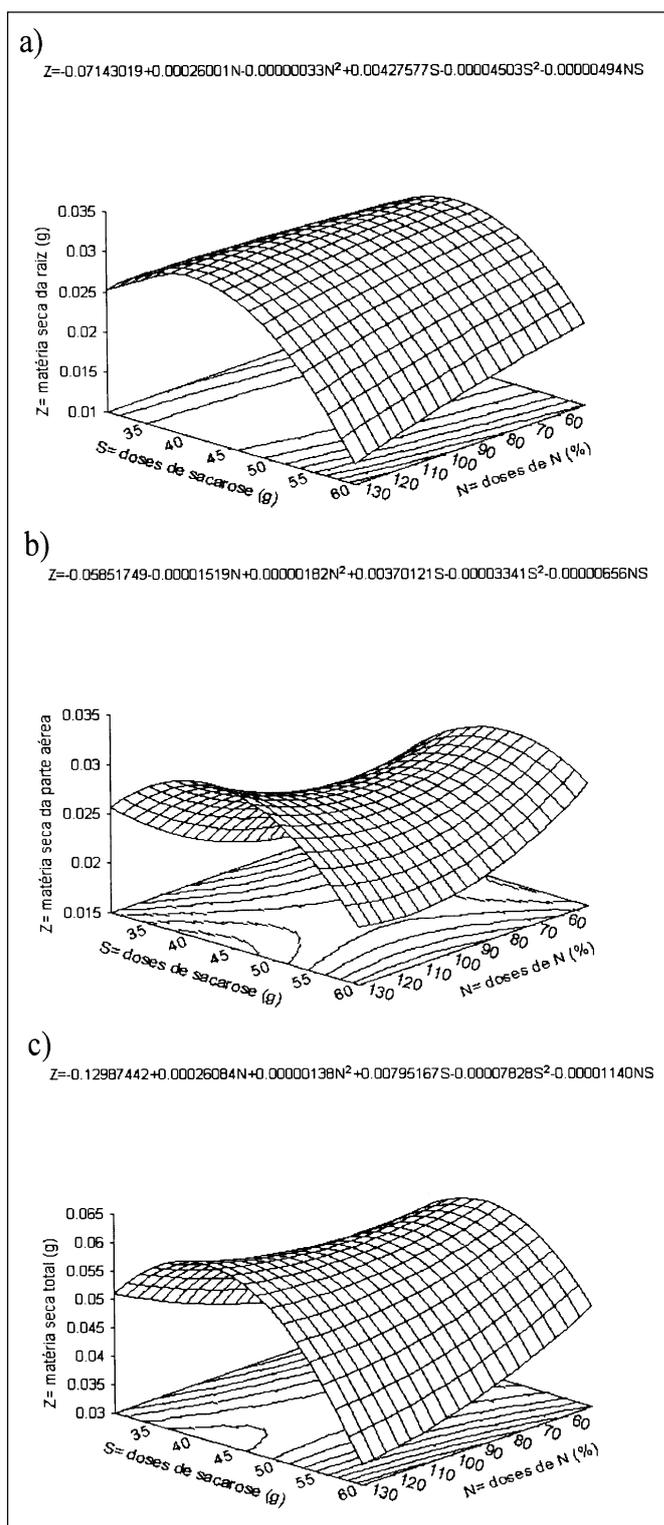


Figura 2 – Efeito de concentrações de nitrogênio e sacarose do meio MURASHIGE & SKOOG (1962) na produção de matéria seca da raiz (a), da parte aérea (b) e do total (c) de plântulas de *Pfaffia glomerata* cultivadas *in vitro* por 30 dias após a inoculação dos explantes.

apresentando efeito sobre o crescimento e a diferenciação dos tecidos. GEORGE (1996) verificou que o aumento na concentração de sacarose, de modo geral, estimula o crescimento e a formação de raízes de algumas espécies. Já em outros trabalhos, na fase de enraizamento, a redução da concentração de sacarose no meio de cultura vem sendo citada como benéfica na melhoria da qualidade do sistema radicular, bem como na sobrevivência das plântulas transplantadas (ANDRADE, 1998). Testando a influência de CO_2 e sacarose na fotossíntese e transpiração de explantes de *Actinidia deliciosa* cultivados *in vitro*, ARGITA et al. (2002) verificaram que os melhores resultados foram aqueles em que os explantes foram expostos a $600 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} + 20 \text{g L}^{-1}$ sacarose nos primeiros 20 dias, sendo, em seguida, transferidos para um meio sem sacarose até o final do período de cultivo. Esta condição proporcionou um completo desenvolvimento do aparato fotossintético, possibilitando uma maior eficiência na fase de transferência das plantas para condições *ex vitro*. Apesar disso, SKREBSKY et al. (2004) verificaram que plântulas de *P. glomerata* beneficiaram-se da maior disponibilidade de sacarose (50g L^{-1} ; suplementado no cultivo *in vitro*) durante a fase de aclimatização.

Considerando-se que as plantas matrizes utilizadas no presente experimento foram obtidas em meio MS padrão, suplementado com 30g L^{-1} de sacarose, permanece dúvida quanto à repetibilidade do ganho de biomassa e quanto ao número de segmentos nodais por plântula obtidos pela combinação da redução do N para 50% do padrão do MS, associada ao aumento do suprimento da sacarose para 45g L^{-1} , se fossem utilizadas plantas matrizes subcultivadas sucessivamente na nova composição de N e sacarose. Para tal, ensaios experimentais estão sendo realizados visando à comprovação dessa hipótese por testar (i) sucessivos subcultivos na nova condição nutricional indicada por este trabalho, bem como (ii) checar a eficiência do processo de aclimatização das plântulas nesta condição.

CONCLUSÃO

A redução da concentração de N para 50% daquela padrão do meio MS, associada a um incremento na dose de

sacarose até 45g L⁻¹, favorece o crescimento em altura, número de segmentos nodais e brotações, bem como a produção de biomassa de *P. glomerata* cultivada *in vitro*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro concedido.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, L.B. **Efeito do meio de cultura, tipos de explantes e períodos de escuro sobre a micropropagação da batata (*Solanum tuberosum* L.), cv. cristal.** 1998. 60f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Curso de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas.
- ARGITA, L. et al. Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transplantation of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Denmark, v.115, p.166-173, 2002.
- AVILA, A. de L. et al. Nitrogen concentration and proportion of NH₄⁺-N affect potato cultivar response in solid and liquid media. **HortScience**, Alexandria, v.33, n.2, p.336-338, 1998.
- CALDAS, L.S. et al. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa-SPI & Embrapa-CNPq, 1998. Parte II, p.87-132.
- CALVETE, E.O. **Concentração de sacarose *in vitro* e seleção de substratos para aclimatização *ex vitro* de morangueiro cv campinas (*Fragaria ananassa* Duch.).** 1998. 108f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- CORUZZI, G.M. Primary N-assimilation into amino acids in *Arabidopsis*. In: SOMERVILLE, C.R.; MEYERAWITZ, E.M. **The Arabidopsis book.** Rockville: American Society of Plant Biologists, 2003. p.1-17.
- EMBRAPA. **Ambiente de software NTIA**, versão 4.2.2: manual do usuário. Campinas: Centro Nacional de Pesquisa Tecnológica em Informática para a Agricultura, 1997. 258p.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture: part 2 in practice.** Somerset: Exegetics, 1996. 758p.
- GUIMARÃES, P.T.C. et al. Efeito de diferentes concentrações de nitrogênio e de sacarose sobre a propagação “*in vitro*” da samambaia-espada [*Nephrolepis exaltata* (L.) Schott]. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.2, p.309-316, 1999.
- LEIFERT, C. et al. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.14, n.2, p.83-109, 1995.
- MONTANARI JÚNIOR, I. **Aspectos do cultivo comercial do ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen).** São Paulo: CPQBA-UNICAMP, 1999. 3p. (Boletim Agroecológico, 12).
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NAGAO, E.O. et al. Efeitos de sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação *in vitro* de brotações de porta enxerto de citros. **Bragantia**, Campinas, v.53, n.1, p.25-31, 1994.
- NICOLOSO, F.T. et al. Influência da posição da estaca no ramo sobre o enraizamento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em dois substratos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.2, p.277-283, 1999.
- NICOLOSO, F.T. et al. Comprimento da estaca de ramo no enraizamento de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.1, p.57-60, 2001a.
- NICOLOSO, F.T. et al. Micropropagação do ginseng brasileiro. [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.3, n.2, p.11-18, 2001b.
- NICOLOSO, F.T. et al. Efeito de concentrações e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n.1, p.84-90, 2003.
- OLIVEIRA, P. D. de. **Propagação “in vitro” de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) cv. Orange Reagen.** 1994. 116f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Programa de Pós-graduação em Agronomia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
- RUSSOWSKI, D. **Nitrogênio e fósforo na micropropagação de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen.** 2001. 120f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria.
- RUSSOWSKI, D.; NICOLOSO, F.T. Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de Ginseng Brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.1, p.57-63, 2003.
- SKREBSKY, E.C. et al. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p.1471-1477, 2004.