

pH do meio de cultivo e crescimento de plântulas de ginseng brasileiro cultivadas *in vitro*

Culture medium pH and growth of brazilian ginseng *in vitro* cultured plantlets

Fernando Teixeira Nicoloso^I Gregori da Encarnação Ferrão^{II} Gabriel Y Castro^{III}

- NOTA -

RESUMO

O presente trabalho objetivou avaliar o efeito do pH do meio de cultivo sobre alguns parâmetros de crescimento da *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen cultivada *in vitro*, bem como checar se o crescimento dos explantes altera o pH do meio ao longo do período de cultivo. Foram testados quatro tratamentos constituídos de distintos valores de pH (3,7; 5,0; 6,0 e 7,5) do meio de cultivo. O pH do meio de cultivo foi ajustado antes da inclusão do agar (6g L⁻¹ – Merck) e da autoclavagem. Como fonte de explantes foram utilizadas segmentos nodais de plantas previamente estabelecidas *in vitro* em meio MS. Dos nove aos 15 dias após a inoculação (DAI) dos segmentos nodais, verificou-se maior número de raízes em pH 6,0 e o menor no pH 7,5. Aos 35 DAI, o comprimento da maior brotação e o número total de segmentos nodais por planta foram maiores em torno de pH 6,0. Aos 35 DAI, observou-se menor crescimento em biomassa de raízes em pH 3,7. Já a parte aérea apresentou menor biomassa em pH 7,5. Aos 35 DAI, a produção de matéria fresca e seca total da plântula foi maior em pH próximo a 6,0. Concluiu-se que valores de pH do meio de cultivo próximos a 6,0, ajustados antes da autoclavagem, são ideais para o crescimento da *P. glomerata* cultivada *in vitro*. Também se verificou que o crescimento da plântula modificou significativamente o pH do meio de cultivo.

Palavras-chave: *Pfaffia glomerata*, Amaranthaceae, cultura de tecidos, cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

The present research aimed to evaluate the effect of culture medium pH on some growth parameter of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen *in vitro* cultured plantlets, as

well as to check whether the explant's growth alters the culture medium pH. Four treatments consisted of different values (3.7; 5.0; 6.0 and 7.5) of culture medium pH were tested. The culture medium pH was adjusted prior to the addition of agar (6g L⁻¹ – Merck) and autoclaving. Nodal segments from aseptic plants grown in MS medium were used as explants. From 9 to 15 days after inoculation (DAI) of nodal segments, the higher number of roots was obtained at pH 6.0, and the lower at pH 7.5. At 35 DAI, both length of the higher sprout and total number of nodal segments per plantlet were greater at about pH 6.0. At 35 DAI, roots biomass was lower at pH 3.7. On the other hand, shoots biomass was lower at pH 7.5. Fresh and dry matter of the whole plantlet was greater at pH around 6.0. In conclusion, values of culture medium pH near to 6.0, adjusted prior to autoclaving, are ideal for the growth of *P. glomerata in vitro* cultured plantlets. Moreover, the *in vitro* growth of plantlet modified significantly the culture medium pH.

Key words: *Pfaffia glomerata*, Amaranthaceae, tissue culture, *in vitro* culture.

A *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) é uma espécie de grande interesse comercial devido sua ampla utilização na indústria de fitoterápicos e fitocosméticos. Em razão disso, tem ocorrido uma intensa exploração predatória das reservas naturais desta espécie, justificando a elaboração de planos de manejo ou projetos de cultivo (MONTANARI JÚNIOR, 1999).

A maioria das culturas *in vitro* de tecidos vegetais tolera uma ampla faixa de pH do meio de cultivo,

^IDepartamento de Biologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Campus Universitário, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: ftnicoloso@yahoo.com. Autor para correspondência.

^{II}Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Universidade de São Paulo (USP), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Piracicaba, SP, Brasil.

^{III}Programa de Pós-graduação em Agronomia, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: gabrycastro@gmail.com.

o qual geralmente é ajustado antes da autoclavagem. Além dos fatores físicos que influenciam as alterações do pH do meio de cultivo *in vitro*, é conhecido o fato que a presença de tecidos vegetais também pode alterar o mesmo. SKIRVIN et al. (1986) verificaram que o crescimento de calos de *Cucumis melo* alterou significativamente o pH do meio de cultivo já nas primeiras 48 horas de cultivo.

Geralmente, os meios de cultivo de tecidos vegetais têm baixa capacidade de tamponamento (LEIFERT et al., 1995) e, por isso, algumas espécies são capazes de ajustar o pH do meio para valores entre 3,7 e 6,2 durante o período de crescimento da planta, independentemente do pH inicial do meio (LEIFERT et al., 1992). Diferenças marcantes foram encontradas entre sete espécies vegetais (*Choisya ternata*, *Daphne blagayana*, *Delphinium* "11", *Hemerocallis* "Stella d'Oro", *Hosta* "Halcyon", *Íris germânica*, e *Photinia fraseri*) quanto ao requerimento de pH para obter ótimas taxas de crescimento e enraizamento, as quais foram induzidas pelas próprias plantas (LEIFERT et al., 1992). Portanto, as interações entre o desempenho do crescimento e as variações do pH do meio de cultivo parecem ser dependentes do genótipo vegetal.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da variação do pH do meio de cultivo sobre alguns parâmetros de crescimento de plântulas de *Pfaffia glomerata* cultivada *in vitro*, bem como checar se o crescimento dos explantes altera o pH do meio ao longo do período de cultivo.

Como fonte de explantes, foram utilizados segmentos nodais (1,0cm de comprimento e sem folhas) de plantas de *Pfaffia glomerata* cultivadas *in vitro* em meio de cultivo MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido de 30g L⁻¹ de sacarose, 100mg L⁻¹ de mio-inositol, 6g L⁻¹ de agar (Merck) e sem fitoreguladores, conforme metodologia descrita por NICOLOSO et al. (2001).

Foram testados quatro tratamentos constituídos de distintos valores de pH (3,7; 5,0; 6,0 e 7,5) do meio de cultivo. O pH do meio de cultivo foi ajustado com HCl ou NaOH (0,1M) antes da inclusão do agar e da autoclavagem (1atm, 120°C, 15min). Após a inoculação, os explantes foram cultivados em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16h e intensidade luminosa de 35µmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes branca-frias.

O delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso com 85 repetições. A parcela experimental consistiu de um tubo de ensaio (15cm de altura x 2,5cm de φ, volume interno 147,26cm³) contendo 10mL de meio de cultivo MS, modificado nos valores de pH, com um segmento nodal como explante.

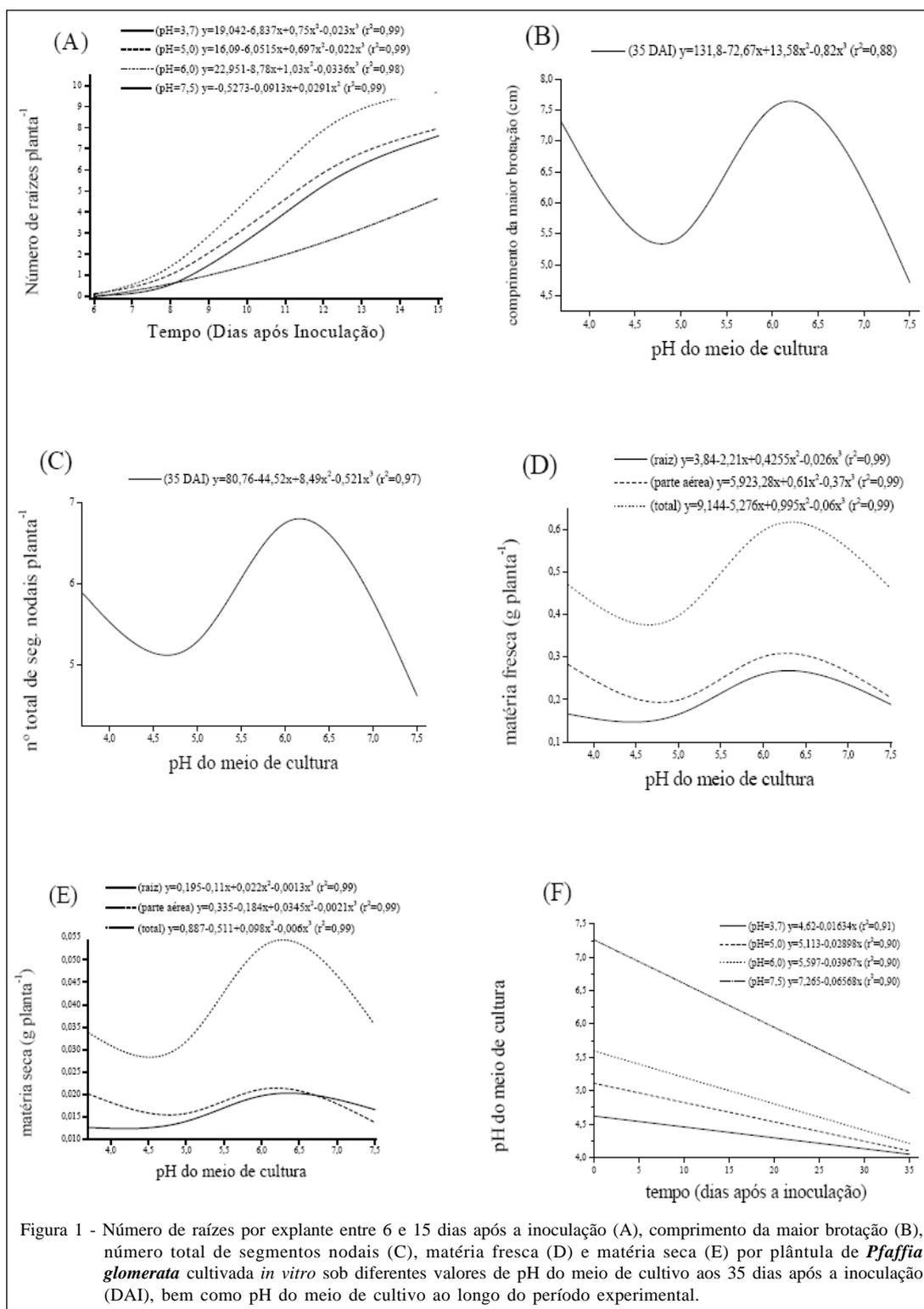
As avaliações do crescimento das plântulas foram realizadas em diferentes períodos após a inoculação dos explantes. De 35 repetições, aos seis, oito, nove, 10, 11, 12 e 15 dias após a inoculação (DAI), foi avaliado o número de raízes emitidos por plântula. Dessas mesmas unidades experimentais, aos 35 DAI, foram avaliados a altura da maior brotação, o número total de segmentos nodais por plântula e a matéria fresca e seca das raízes, da parte aérea e do total das plântulas. O pH dos meios de cultivo foi avaliado nos tempos zero, três, seis, oito, 12, 15, 20, 25, 30 e 35 DAI, utilizando-se cinco repetições em cada tempo.

Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância. O comportamento individual dos parâmetros de crescimento das plantas foi avaliado por regressões em nível de 5% de probabilidade de erro. Para o número de raízes por planta, foi realizada a análise por regressões polinomiais para o fator épocas de avaliação e comparação de médias (Teste Tukey) para o fator tratamentos de pH, em nível de 5% de probabilidade de erro.

O número de raízes por plântula aumentou ao longo do período de cultivo indistintamente do tratamento, apresentando resposta cúbica aos valores de pH 3,7, 5,0 e 6,0, bem como resposta quadrática ao pH 7,5 (Figura 1A). Apesar desse comportamento, o número de raízes somente começou a diferir, em função do pH do meio de cultivo, a partir dos nove dias após a inoculação (DAI), sendo que neste momento o melhor tratamento foi o de pH 6,0. Aos 10 DAI, todos os tratamentos diferiram entre si, apresentando o pior resultado em pH 7,5. Aos 11, 12 e 15 DAI, o maior número de raízes por explante foi obtido em pH 6,0 e o menor no pH 7,5.

Aos 35 DAI, o comprimento da maior brotação (Figura 1B) e o número total de segmentos nodais por plântula (Figura 1C) apresentaram resposta cúbica à variação do pH, com máxima resposta em torno de pH 6,0. Para estes parâmetros, salienta-se que a elevação do pH para 7,5 reduziu o crescimento.

A biomassa fresca e seca dos órgãos da plântula respondeu distintamente à variação do pH aos 35 DAI. Foi observado menor crescimento em matéria fresca (Figura 1D) e seca (Figura 1E) de raízes em pH 3,7. Já a parte aérea apresentou menor matéria seca em pH 7,5 (Figura 1E). Aos 35 DAI, momento em que as plantas atingiram o máximo comprimento da maior brotação (Figura 1B) e o número total de segmentos nodais por plântula (Figura 1C), a produção de matéria fresca (Figura 1D) e seca (Figura 1E) total da plântula foi máxima em pH próximo a 6,0. Diferentemente ao encontrado para outros parâmetros de crescimento, salienta-se que tanto a redução do pH para 3,7 como a



elevação deste para 7,5 não foram benéficas à produção de biomassa total da planta (Figuras 1D e 1E). Essa influência negativa, provavelmente, se deve às modificações na disponibilidade dos nutrientes no

substrato, fato largamente conhecido nos cultivos em solo (MARSCHNER, 1995).

O padrão de crescimento baseado na produção de biomassa, no comprimento da brotação e

no número de segmentos nodais, observado no tratamento de pH 6,0, é semelhante àqueles relatados para *P. glomerata* por NICOLOSO et al. (2001), que utilizaram meio de cultivo MS com pH ajustado para 5,8. Portanto, fica demonstrado que o ajuste do pH do meio de cultivo para valores próximos a 6,0, antes da autoclavagem, proporciona a melhor condição para o crescimento dessa espécie quando multiplicada *in vitro*.

Ao longo do período experimental, foi observado que os meios de cultivo sofreram alterações no pH (Figura 1F). Portanto, a presença de plântulas, indistintamente do valor original do pH do meio de cultivo, provocou significativa diminuição do pH, sendo que aos 35 DAI foram observadas diferenças de 0,29, 0,41, 0,83 e 1,51 unidades de pH, respectivamente para os tratamentos de pH 3,7, 5,0, 6,0 e 7,5, em relação ao valor original (Figura 1F). SKIRVIN et al. (1986) também observaram que a direção e a quantidade da variação do pH (aumento ou decréscimo) foram significativamente correlacionadas com o pH original do meio de cultivo.

Considerando-se que o tratamento de pH original igual a 6,0 proporcionou a partir dos 9DAI o maior número de raízes por planta (Figura 1A) e que foi nesse tratamento que foram constatadas as maiores alterações de pH, já a partir dos 6DAI (Figura 1F), sugere-se que houve uma participação marcante do processo de absorção de nutrientes pelas raízes nestas alterações. Observações nesse sentido foram relatadas por vários autores (LEIFERT et al., 1992; LEIFERT et al., 1995). Tem sido observado que o cultivo de tecidos *in vitro* reduz o pH do meio de cultivo MS, o qual apresenta baixa capacidade de tamponamento (LEIFERT et al., 1995). A acidificação da rizosfera de plantas *in vivo* ou *in vitro* é dependente da liberação de ácidos orgânicos ou prótons durante a absorção,

principalmente, do N-NH^+ (MARSCHNER, 1995; MORARD & HENRY, 1998).[†]

Em conclusão, valores de pH do meio de cultivo MS próximos a 6,0, ajustados antes da autoclavagem, são ideais para o crescimento da *P. glomerata* cultivada *in vitro*. Além disso, destaca-se que o crescimento das plântulas modificaram significativamente o pH inicial do meio de cultivo.

REFERÊNCIAS

- LEIFERT, C. et al. Effect of medium acidity on growth and rooting of different plants growing in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.30, p.171-179, 1992.
- 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.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. San Diego: Academic, 1995. 889p.
- MORARD, P.; HENRY, M. Optimization of the mineral composition of *in vitro* culture media. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.21, n.8, p.1565-1576, 1998.
- 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.
- 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, 2001.
- SKIRVIN, R.M. et al. Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.5, p.292-294, 1986.