

Procedimento simplificado para
descontaminação, introdução e multiplicação
in vitro de explantes de ginseng brasileiro
(*Pfaffia glomerata* [Spreng.] Pedersen)



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
335**

**Procedimento simplificado para
descontaminação, introdução e multiplicação
in vitro de explantes de ginseng brasileiro
(*Pfaffia glomerata* [Spreng.] Pedersen)**

*Daniela Vasconcelos de Oliveira
Izulmé Rita Imaculada Santos
Antonieta Nassif Salomão
Ildeu Soares Martins
Rosângela Caldas Mundim
Rosa de Belém das Neves Alves*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica
PqEB, Av. W5 Norte (final)
70970-717, Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-4700
Fax: +55 (61) 3340-3624
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Marília Lobo Burle

Secretário-Executivo
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Membros
Antonieta Nassif Salomão; Diva Maria Alencar Dusi; Francisco Guilherme V. Schmidt; João Batista Teixeira; João Batista Tavares da Silva Maria Cléria Valadares Inglis; Tânia da Silveira Agostini Costa

Supervisão editorial
Marília Lobo Burle

Revisão de texto
Marina Semeraro Rito

Normalização bibliográfica
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Tratamento das ilustrações
Adilson Werneck

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Adilson Werneck

Foto da capa
Acervo Embrapa

1ª edição
1ª impressão (ano): tiragem

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Procedimento simplificado para descontaminação, introdução e multiplicação in vitro de explantes de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* [Spreng.] Pedersen) / Daniela Vasconcelos de Oliveira [et al.] – Brasília, DF : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2018.

24 p. (Boletim de pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 335)

1. Fáfia. 2. Micropropagação. I. Oliveira, Daniela Vasconcelos de. II. Santos, Izulmé Rita Imaculada. III. Salomão, Antonieta Nassif. IV. Martins, Ildeu Soares. V. Mundim, Rosângela Caldas. VI. Alves, Rosa de Belém das Neves. Título.

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução.....	8
Material e Métodos	10
Resultados e Discussão	13
Conclusões.....	18
Referências	19

Procedimento simplificado para descontaminação, introdução e multiplicação *in vitro* de explantes de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* [Spreng.] Pedersen)

Daniela Vasconcelos de Oliveira¹

Izulmé Rita Imaculada Santos²

Antonieta Nassif Salomão³

Ildeu Soares Martins⁴

Rosângela Caldas Mundim⁵

Rosa de Belém das Neves Alves⁶

Resumo – *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, conhecida popularmente como ginseng brasileiro, é uma espécie medicinal nativa. Essa espécie se encontra em situação vulnerável devido à coleta predatória para uso fitoterápico. O objetivo desse trabalho foi estabelecer um procedimento simplificado para a introdução e multiplicação clonal *in vitro* de explantes de ginseng brasileiro. Segmentos nodais (SN) foram coletados de plantas em crescimento no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, submetidos a dois tratamentos de descontaminação utilizando hipoclorito de sódio e estreptomicina (Tratamento 1), ou apenas a estreptomicina (Tratamento 2), e cultivados *in vitro* em meio de cultura MS com 3% de sacarose e 0,7% de ágar, sem adição de reguladores de crescimento. Após cada tratamento os SN foram inoculados *in vitro* e as culturas foram mantidas em sala de crescimento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas de luz, e intensidade luminosa de $50 \mu\text{m.m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas.

¹ Estudante, Engenheira Florestal, Dra., Universidade de Brasília, Brasília - DF

² Pesquisadora, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília - DF

³ Pesquisadora, MsC, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília - DF

⁴ Professor, Dr., Universidade de Brasília, Departamento de Engenharia Florestal, Brasília - DF

⁵ Técnica, Geógrafa, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília - DF

⁶ Analista, Dra. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília - DF

Plântulas normais com parte aérea e sistema radicular bem desenvolvidos foram produzidas após trinta dias de cultivo in vitro. Os percentuais de regeneração foram de 92% e 80% para os SN submetidos ao Tratamento 1 ou Tratamento 2, respectivamente. A multiplicação in vitro foi realizada por subcultivo de ápices caulinares (AC) e SN coletados das plântulas obtidas in vitro em meio de cultura MS sem adição de reguladores de crescimento. O procedimento descrito é simples, econômico, permite a introdução, regeneração e multiplicação in vitro de *P. glomerata* para a produção de estoques de plântulas para estudos diversos como a criopreservação, a propagação clonal ou a conservação *ex situ* do seu germoplasma.

Termos para indexação: Fáfia, “ginseng” brasileiro, micropropagação, *Pfaffia glomerata*.

Simplified procedure for decontamination, introduction and multiplication *in vitro* of Brazilian-ginseng (*Pfaffia glomerata* [Spreng.] Pedersen) explants

Abstract – *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, popularly known as Brazilian “ginseng”, is a native medicinal species. It is a threatened species due to predatory harvest of branches for use in phytotherapy. The objective of this work was to establish a simplified technique for introduction and clonal multiplication *in vitro* of *P. glomerata* explants. Nodal segments (NS) were harvested from plants growing in the field at Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília-DF, and treated with two decontamination treatments with sodium hypochlorite and streptomycin (Treatment 1), or streptomycin alone (Treatment 2), and cultured *in vitro* using MS culture medium supplemented with 3% sucrose and 0,7% agar, without growth regulators. After each treatment NS were inoculated *in vitro* and the cultures were maintained in a growth room at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, with a 12 hours of light photoperiod, with a light intensity of $50 \mu\text{m}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ supplied by fluorescent white lights. Normal plantlets, with well-developed shoots and roots, were produced after 30 days of *in vitro* culture. Regeneration percentages average was 92% and 80% for NS decontaminated with Treatment 1 and Treatment 2, respectively. *In vitro* multiplication was carried out by subculture of shoot tips (ST) and NS collected from plantlets obtained *in vitro* in MS culture medium without growth regulators. The procedure described here is simple, economical, and ideal for introduction, regeneration and multiplication *in vitro* of *P. glomerata* explants for production of plantlet stocks for diverse research activities, such as cryopreservation, clonal propagation, *ex situ* germplasm conservation.

Key words: “Brazilian ginseng”, Cryopreservation, fáfia, , micropropagation, *Pfaffia glomerata*.

Introdução

O gênero *Pfaffia*, Amaranthaceae, inclui cerca de 90 espécies e possui ampla distribuição geográfica na América Central e América do Sul. No Brasil ocorrem 20 espécies desse gênero, encontradas desde a região Centro-oeste até o norte do Paraná (Alvim et al., 1999; Marchioretto, 2008; Souza e Lorenzi, 2005). A fáfia (*Pfaffia glomerata* [Spreng.] Pedersen) destaca-se pelo grande potencial de uso como fitoterápico pela indústria farmacêutica, um segmento que tem apresentado crescimento significativo. A espécie também é conhecida popularmente como “ginseng brasileiro” devido às semelhanças com o “ginseng” sul coreano (*Panax ginseng* C.A Meyer) quanto ao formato humanoide de suas raízes (Nicoloso et al., 2003). As raízes da fáfia são tradicionalmente utilizadas na medicina popular como tônico corporal (para tratamento de esgotamento físico e mental, falta de memória e estresse), como afrodisíaco e no controle de diabetes e reumatismo (Magalhães, 2000; Otofujii, 2005; Rates e Gosmann, 2002). Análises da composição química dos compostos isolados em extratos de raízes de fáfia detectaram a presença dos ácidos glomérico, pfamérico e oleanólico, ecdisterona e rubrosterona, substâncias bioativas de reconhecido efeito tônico e que promovem aumento da resistência física (Shiobara et al., 1993). Estudos farmacológicos também foram realizados e confirmaram as propriedades medicinais desses compostos (Nakai et al., 1984; Nishimoto et al., 1984, 1987, 1988; Shiobara et al., 1992, 1993).

A domesticação e a sistematização do cultivo do ginseng-brasileiro em escala comercial têm tido progressos limitados devido à carência de informações sobre a germinação das sementes, suas fenofases (época de brotação, floração e frutificação) e a produção de mudas. Portanto, a obtenção de matéria seca para consumo popular ou para produção comercial é baseada na coleta predatória em populações nativas. A confirmação das propriedades farmacológicas das substâncias bioativas presentes nas raízes da fáfia acentuou ainda mais a coleta predatória de plantas em populações nativas para uso popular ou comercial, levando à redução das mesmas, a disponibilidade de matéria prima e de variabilidade genética de populações naturais. Essa situação de fragilidade e o grande potencial econômico da fáfia desencadeou a proposição de políticas e ações de pesquisas em várias frentes, como planos para o manejo sustentável nas áreas de ocorrência e estratégias de propaga-

ção e cultivo para a produção comercial e conservação de germoplasma da espécie em bancos genéticos, em condições que garantam a preservação da sua integridade genética e biológica e sua disponibilidade para usos futuros (Alves et al., 2006; Vieira et al., 2002).

Dentre os métodos disponíveis para a propagação e a conservação de germoplasma vegetal, destaca-se a cultura de tecidos *in vitro*. Essa tecnologia compreende diversas técnicas de introdução e cultivo em condições asépticas de explantes (estruturas vegetativas ou reprodutivas diminutas), em frascos contendo meio de cultura nutritivo composto por diversos sais minerais, vitaminas, uma fonte de carbono (tipicamente a sacarose), reguladores de crescimento, antioxidantes (normalmente o carvão ativado), e um agente gelificante (geralmente o ágar) e fundamenta-se na totipotência da célula vegetal, princípio pelo qual, as células podem ser induzidas a voltar ao estado meristemático e seu padrão de diferenciação celular pode ser redefinido para dar origem a novos órgãos, embriões ou a uma planta completa (Termignoni, 2005). Usando essa tecnologia é possível produzir milhares de cópias exatas (clones) de plantas matrizes com mais rapidez do que seria possível usando métodos tradicionais de propagação, como a estaquia, enxertia, divisão de estruturas, entre outros. Após a introdução *in vitro*, as culturas são mantidas em condições controladas de luz e temperatura (George et al., 2008). Hoje, a cultura *in vitro* é uma tecnologia polivalente e de reconhecida importância para a pesquisa científica básica, e com muitas aplicações práticas em estudos bioquímicos, fisiológicos, fitopatológicos, citogenéticos, reprodutivos, limpeza clonal, transformação genética, entre outros (George et al., 2008; Engelmann, 2011; Sarasan et al., 2006).

A introdução e cultivo *in vitro* de explantes de *Pfaffia* em meio de cultura MS suplementado com combinações diversas de reguladores de crescimento foi realizada anteriormente com resultados satisfatórios, evidenciando que essa tecnologia é eficaz para induzir o estabelecimento, crescimento e desenvolvimento dos explantes testados, bem como para a micropropagação e produção de plântulas (Alves et al., 2008, 2010; Flores et al., 2009; Nicoloso et al., 2001, 2003; Maldaner et al., 2006; Murashigie e Skoog, 1962). Entretanto, os procedimentos testados são complexos e não há consenso quanto ao tratamento adequado para a descontaminação dos explantes procedentes de plantas de fáfia mantidas a campo.

Assim, o objetivo desse trabalho foi estabelecer um procedimento simplificado para descontaminação, introdução e multiplicação *in vitro* de *Pfaffia glomerata*.

Material e Métodos

Material vegetal

O material vegetal utilizado foi obtido de plantas do acesso 2209-09, disponível na coleção de germoplasma de fáfia do Banco Ativo de Plantas Medicinais, instalado no campo experimental da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Brasília – DF. Ramos jovens foram retirados de plantas adultas em crescimento no campo e transferidos imediatamente para frasco de vidro contendo água destilada esterilizada. O recipiente foi fechado com papel alumínio e levado ao Laboratório de Criobiologia Vegetal (LCV) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia onde todos os experimentos foram realizados. Segmentos caulinares (SC) com 1,0 cm de comprimento (Figura 1A) foram isolados dos ramos coletados e submetidos aos tratamentos de descontaminação descritos abaixo. A unidade experimental para introdução *in vitro* consistiu de segmentos nodais (SN) com 0,5 cm de comprimento, contendo uma gema lateral (Figura 1B).

Foto: Daniela Vasconcelos Oliveira, 2014.

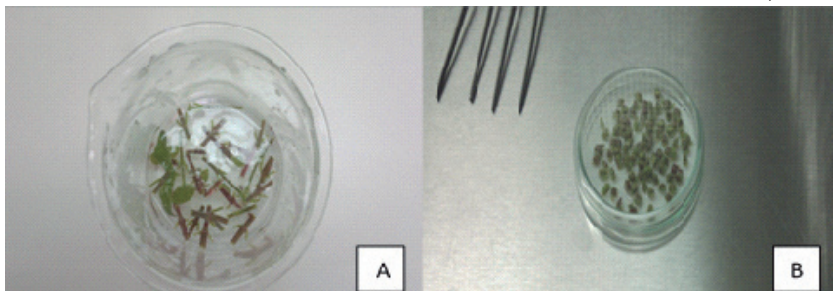


Figura 1 – Estrutura vegetal de *Pfaffia glomerata* utilizado para a introdução e o cultivo *in vitro*: (A) Segmentos caulinares (SC) e (B) segmentos nodais (SN) isolados de ramos de plantas em crescimento no campo.

Descontaminação

Foram testados dois tratamentos para a descontaminação dos SC.

Tratamento 1: 60 SC foram acondicionadas em frasco de vidro e lavados com 100 ml de água corrente com 5-8 gotas de detergente comercial em agitação manual por 2 - 4 min., para a remoção de poeira e outros detritos. Após três enxagues com água destilada esterilizada, os SC foram imersos em solução comercial de hipoclorito de sódio (2,0 – 2,5% de cloro ativo) acrescida de 5 - 8 gotas de Tween 80. O material permaneceu nessa solução por 15 minutos sob agitação em agitador horizontal tipo “shaker” (90 rpm). Após o descarte dessa solução, 100 ml de solução do antibiótico estreptomicina à concentração de 0,45g/50 ml (2,25 / 250 ml) foram adicionados ao frasco. Transcorridos 5 min., a solução de antibiótico foi descartada e os explantes foram enxaguados três vezes com água destilada esterilizada em autoclave (121°C, 1,5 atm, 15 min.), com agitação manual por 1 - 2 min. a cada troca.

Tratamento 2: 60 SC foram acondicionadas em frasco de vidro, lavados em água corrente de torneira e em seguida submersos com solução de antibiótico estreptomicina à concentração de 0,45g / 50 ml (2,25/250 ml) por 5 min. Em seguida, os SC foram enxaguados três vezes com água destilada esterilizada em autoclave (121°C, 1,5 atm, 15 min.) com agitação manual por 1 - 2 min. a cada troca.

A descontaminação foi realizada em cabine de fluxo laminar, tendo sido utilizadas duas amostras com 60 SC para cada tratamento de descontaminação.

Introdução e multiplicação *in vitro*

Após a descontaminação, segmentos nodais (SN) com 0,5 mm de comprimento contendo um gema lateral (GL) foram isolados dos segmentos caulinares (SC) e inoculados individualmente em tubos de ensaio (25 mm de largura, 150 mm de altura, 147,26 cm³ de volume interno) contendo 10 ml de meio de cultura MS-62 básico (Murshigue & Skoog, 1962), com pH ajustado para 5,8, seguindo-se com a adição de 7,0 g / L de ágar e a esterilização em autoclave (1,5 atm, 120°C, 15 min.). O cultivo dos explantes foi feito em sala de crescimento à temperatura de 25 ± 2°C, fotoperíodo de 12 horas luz e intensidade luminosa de 40 µm.m⁻²., s-1 foi fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas.

A ocorrência de contaminação e o desenvolvimento dos explantes de fáfia foram monitorados semanalmente e a avaliação final foi feita após 30 dias de cultivo.

Plântulas de fáfia regeneradas *in vitro* a partir das gemas laterais dos SN, com 30 dias de cultivo foram utilizadas para a multiplicação clonal e produção de estoque de plântulas para os testes de criopreservação realizados posteriormente. Ápices caulinares (AC) e SN (2,0-3,0 mm) dessas plântulas foram isolados e transferidos para tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura MS-62 e cultivados nas mesmas condições descritas acima. No primeiro subcultivo foram repicados 240 explantes. Esse material clonal foi repicado regularmente para a manutenção do estoque de plantas.

Aclimação e formação de mudas *in vivo*

Após 30 dias de cultivo *in vitro* a capacidade de aclimação e sobrevivência das plântulas obtidas em ambiente *in vivo* foi testada. O procedimento de aclimação foi conduzido gradualmente, e iniciou-se com a retirada do filme plástico que vedava os tubos de ensaio contendo as plântulas regeneradas a partir de SC submetidos aos dois tratamentos de descontaminação. Os tubos permaneceram abertos por cinco dias nas condições de temperatura e umidade do ambiente do LCV. Em seguida, as plântulas foram cuidadosamente retiradas dos tubos de ensaio, lavadas em água corrente para remoção de resíduos de meio de cultura e plantadas em copos plásticos (300 ml) contendo vermiculita saturada com água de torneira. Os copos foram colocados em bandejas, as quais foram cobertas com sacos plásticos transparentes e colocadas à meia sombra ao ar livre por um período de 20 dias. Transcorrido esse período, os sacos plásticos de cobertura foram removidos e as plantas foram transplantadas para sacos de polietileno contendo substrato esterilizado em autoclave preparado com quantidades iguais de terra vermelha (latossolo vermelho-amarelo), areia, esterco, calcário, adubo (Super Simples) para serem cultivadas ao ar livre. O crescimento e desenvolvimento dessas plântulas foram acompanhados por 30 dias. Durante esse período as plantas foram regadas diariamente com água de torneira.

Análise estatística

Os dados de sobrevivência e regeneração foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias de regeneração foram comparadas pelo Teste de Tukey, a 1% de significância. Os dados estatísticos foram analisados utilizando o programa estatístico SAEG 9.1 (Saeg, 2007).

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos no presente trabalho estão apresentados na Tabela 1 e nas Figuras, 2 e 3.

Os tratamentos de descontaminação testados foram eficientes para a erradicação de fungos, pois nenhum dos explantes inoculados apresentou contaminação fúngica. Porém, os tratamentos foram menos eficazes para a eliminação de bactérias, pois SN submetidos a ambos os tratamentos apresentaram contaminação bacteriana. A combinação de hipoclorito de sódio e de antibiótico (Tratamento 1) foi mais eficiente, sendo que apenas 8 % dos SN tratados apresentaram contaminação bacteriana. Por outro lado, SN submetidos ao Tratamento 2 (descontaminação somente com solução de antibiótico) apresentaram 20% de contaminação por bactérias ao fim do experimento (Tabela 1). Todos os explantes que apresentaram contaminação bacteriana não demonstraram crescimento de brotações. Vários trabalhos de introdução *in vitro* relatam efeitos similares do hipoclorito de sódio na redução da contaminação de explantes por microrganismos. Pereira et al. (2015) em estudo de enraizamento *in vitro* do abacaxizeiro, Chaves et al. (2004) na introdução *in vitro* de segmentos nodais do porta-enxerto cv. Mr. S. 2/5 de pessegueiro, Souza et al. (2006) após tratamento de explantes caulinares de goiabeira serrana e de pitangueira, Oliveira e Nino (2009) na desinfestação de quatro cultivares de framboeseira e Costa et al. (2007) em seu trabalho de micropropagação de alecrim-pimenta relataram a obtenção de maiores porcentagens de explantes limpos após o tratamento com hipoclorito de sódio. Entretanto, em alguns casos esse produto químico não mostrou a mesma eficiência para a descontaminação de explantes. Lima e Moraes (2006), por exemplo, não observaram redução significativa nos percentuais

de contaminação bacteriana em explantes de bananeira após a imersão em solução com 0,8 % de hipoclorito de sódio, tendo observado 70% de contaminação dos explantes. Os autores sugeriram que a baixa eficiência do produto se deve à sua ação superficial nos tecidos do explante, não sendo efetivo para eliminação de microrganismos presentes nas camadas de tecido mais internas do mesmo.

O crescimento e o desenvolvimento in vitro das GL contidas nos SN foi rápido, sendo que os primeiros indícios de crescimento das GL foram observados aos sete dias de cultivo. Após 15 dias de cultivo a maioria dos SN já apresentava um ou dois brotos com 1,0-1,5 cm de comprimento. O maior percentual de regeneração (92 %) foi obtido para os explantes tratados com hipoclorito de sódio e antibiótico (Tratamento 1) e os SN submetidos ao Tratamento 2 apresentaram 80% de regeneração. À primeira vista esses resultados sugerem que a regeneração de brotações a partir dos SN de fáfia teve uma correlação com os tratamentos de descontaminação. Entretanto, a análise estatística dos resultados indica que não houve diferença significativa ($P = 1\%$) entre os percentuais médios de regeneração dos explantes submetidos aos dois tratamentos de descontaminação (Tabela 1).

Tabela 1 – Percentuais de regeneração in vitro de gemas laterais de *Pfaffia glomerata* a partir de segmentos nodais submetidos a dois tratamentos de descontaminação antes da introdução e cultivo in vitro.

Tratamento	Regeneração média por tratamento (%)
1	92 A
2	80 A

Letras maiúsculas iguais nas linhas não diferem significativamente entre si, $P = 1\%$, pelo Teste de Tukey. T1: solução comercial de hipoclorito de sódio (2,0 – 2,5% de cloro ativo) por 15 minutos + solução de estreptomicina à concentração de 0,45g/50 ml (2,25 / 250 ml) por 5 min.; T2: solução de estreptomicina à concentração de a 0,45g / 50 ml (2,25 / 250 ml) por 5 min.

Transcorridos 15 dias de cultivo cada broto com 1,0-1,5 cm de comprimento apresentava pelo menos um par de folhas expandidas e uma ou duas raízes com comprimento aproximado de 0,5 – 1,0 cm (Figura 2B). Passados 30 dias da introdução in vitro, as plântulas encontravam-se bem formadas com

aspecto morfológico normal idêntico ao das plântulas mãe, com altura média de aproximadamente 10,0 cm, sistema radicular bem desenvolvido com raízes bem formadas, ramificadas e caule tipicamente dividido em entrenós e nós. Os nós caracteristicamente apresentavam um par de folhas expandidas lateralmente. Caules e folhas apresentavam coloração verde mesclada com coloração rosada, típica das plantas dessa espécie em condições *in vitro* (Figura 2A).

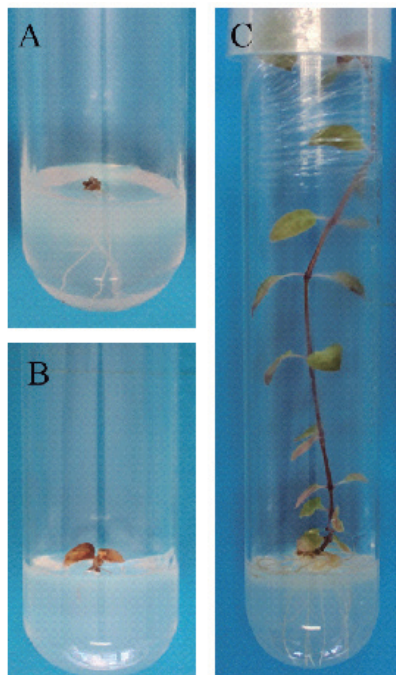


Figura 2 - Estágios de desenvolvimento de gemas laterais de *Pfaffia glomerata*: 7 (C), 15 (B) e 30 (A) dias após a sua introdução *in vitro*. Foto: Daniela Vasconcelos Oliveira 2014.

Após 30 dias do cultivo *in vitro* em meio de cultura MS básico suplementado apenas com 3% de sacarose foram obtidas plântulas normais e bem desenvolvidas a partir de SN submetidos aos dois tratamentos de descontaminação. Esses resultados indicam que o meio de cultura MS básico com 3% de sacarose é adequado para induzir a expressão da capacidade organogênica das gemas laterais de fáfia, resultando em altas taxas de regeneração, não sendo necessário fazer alterações na formulação básica

do meio de cultura (Murashigue e Skoog, 1962) e nem na suplementação com reguladores de crescimento exógenos, carvão ativado ou outro tipo de substância, conforme relatado previamente (Alves et al., 2010). Estudos de micropropagação de ginseng brasileiro realizados previamente em outros laboratórios reportam que há necessidade de alterar a formulação padrão do meio de cultura MS (Murashigue e Skoog, 1962) para incrementar a regeneração *in vitro* de fáfia, tendo sido testadas variações na concentração padrão de nitrogênio, fósforo, sacarose e a adição de reguladores de crescimento, como benzilaminopurina (BAP), thidiazuron (TDZ) e de carvão ativado, entre outros componentes (Flores et al., 2009; Nicoloso et al., 2001, 2003; Passos et al. 2016, 2018; Russowski e Nicoloso, 2003). O procedimento de cultivo *in vitro* usado no presente trabalho é bastante simples, tornando-o prático, econômico e com baixo potencial de indução de variação somaclonal durante o processo de cultivo *in vitro*, obtendo características desejáveis no estabelecimento de coleções de germoplasma vegetal *in vitro*.

A micropropagação permite a produção rápida de grande número de plantas com alta qualidade e livres de doenças, independente da estação do ano ou do clima (George et al., 2008). Durante o cultivo *in vitro*, as plantas são mantidas em condições de alta umidade, luminosidade, temperatura amena e nutrição ideal e por isso um dos maiores gargalos no uso dessa tecnologia para a produção de plantas em larga escala é a fase de aclimação, ou seja, a transferência dessas plantas das condições de laboratório para condições de casa de vegetação ou campo (condições *in vitro* para *ex vitro*), pois as plântulas transferidas para condições *ex vitro* em casas de vegetação ou no campo são expostas a estresses abióticos (temperatura, intensidade luminosa e umidade) e bióticos (microflora do substrato). A irradiação é muito mais alta e a umidade do ar muito mais baixa do que nos frascos de cultura, já o potencial hídrico do substrato é mais alto do que o potencial hídrico do meio de cultura, a condutividade hidráulica do sistema radicular é baixa e os estômatos foliares não funcionam adequadamente, resultando na rápida murcha das plantas. Muitas plantas não resistem às novas condições e a taxa de mortalidade nessa fase é alta (Deb e Imchen, 2010). Após 30 dias de cultivo *in vitro* as plântulas de fáfia obtidas a partir de SN submetidos a dois tratamentos de descontaminação mostraram alta capacidade de aclimação e sobrevivência em cultivo *in vivo* (Figura 3), sendo que a maioria das plantas retomou o crescimento evidenciado pelo aumento em altura e no tamanho das folhas (Figura 3A), não tendo sido observada influência do tratamento de descontaminação sobre a capacidade de aclimação das plântulas. As plantas apresentaram a morfologia normal da espécie e crescimento vigoroso conforme pode ser visualizado na Figura 3B. Esses resultados indicam que o procedimento de aclimação gradual adotado no presente

trabalho, foi adequado e permitiu a obtenção de altas taxas de sobrevivência e estabelecimento das plântulas produzidas in vitro nas novas condições de crescimento. A aclimação gradual como foi realizada nesse trabalho também se mostrou mais eficiente para outras espécies de plantas, como por exemplo no caso da aclimação de *Chlorophytum borivilianum* após a propagação clonal in vitro (Mathur et al., 2008).

Foto: Daniela Vasconcelos Oliveira, 2014.

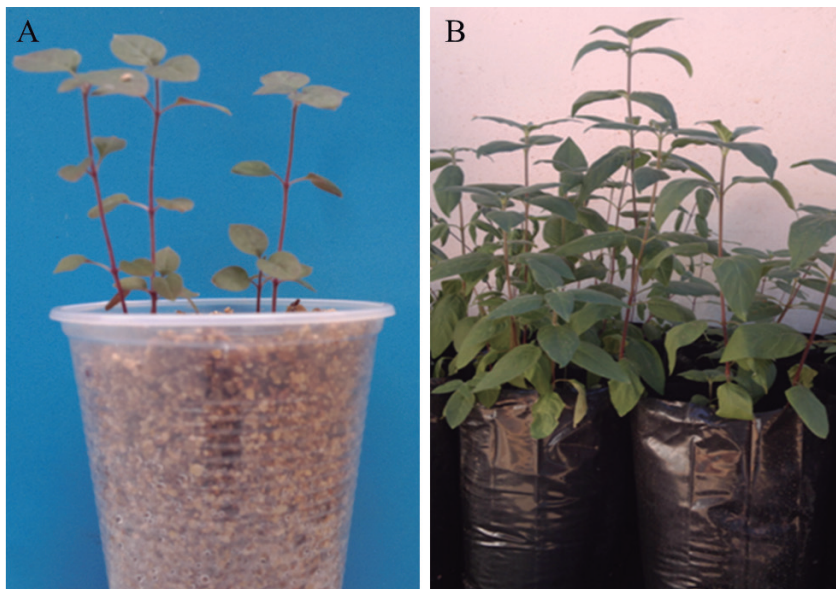


Figura 3. *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen: (A) Plântulas obtidas por cultivo in vitro e transferidas para vermiculita; (B) mudas estabelecidas em terra.

Conclusões

A Segmentos nodais de fáfia cultivados in vitro em meio de cultura MS básico apresentaram percentuais médios de regeneração variando de 80 a 92 %.

Os tratamentos testados para a descontaminação dos explantes mostraram-se eficientes para a erradicação de contaminação fúngica e para a redução da contaminação bacteriana. Os menores percentuais de contaminação bacteriana foram obtidos com a combinação de hipoclorito de sódio e antibiótico.

O procedimento descrito é simples e eficiente para a micropropagação de fáfia e após os 30 dias de cultivo in vitro, as plântulas obtidas podem ser aclimatadas com sucesso.

Referências Bibliográficas

ALVES, R. B. N. **Caracterização morfológica, química e conservação in vitro de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen**. Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, p. 112, il., 2008.

ALVES, R. B. N.; MENDES, R. A.; MENDES, M. A.; CARNEIRO, R. M. D. G.; SILVA, D. B.; CARDOSO, L. D.; SALOMÃO, A. N.; VIEIRA, R. F. Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] germplasm conservation. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, SP, v. 8, p. 1 - 4, 2006.

ALVES, R. B. N.; BERTONI, B. W.; VIEIRA, R. F.; FRANÇA, S. C.; MING, L. C.; PEREIRA, A. M. S. Influência de diferentes meios de cultura sobre o crescimento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) para conservação in vitro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, SP, v. 12, n. 4, p. 510 - 515, 2010.

ALVIM, N. R.; CUNHA, K. C. T.; CORTEZ, L. E. R.; BAZOTTE, R. B.; MARQUES, L. C.; CORTEZ, D. A. G. Efeitos biológicos da *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e da *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze (Amaranthaceae). **Acta Scientiarum**, v. 21, n. 2, p. 349 - 352, 1999.

CHAVES, A. C.; SCHUCH, M.; WALMOR, B. Desinfestação de explantes de *Prunus* cv. Mr. S. 2/5 com hipoclorito de sódio e cálcio. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 10, p. 249 - 250, 2004.

COSTA A. S.; ARRIGONI-BLANK M. F.; BLANK A. F.; MENDONÇA A. B.; AMANCIO V. F.; LEDO A. S. Estabelecimento de alecrim-pimenta in vitro. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 68-72, 2007.

DEB C. R.; IMCHEN T. An efficient in vitro hardening of tissue culture raised plants. **Biotechnology**, n. 9, p. 79–83, 2010.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro Cellular & Development Biology- Plant**, v. 47, p. 5 - 16, 2011.

FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J.; GARLET, T. M. B. Benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ) na propagação in vitro de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 292 - 299, 2009.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. Plant Tissue Culture Procedure - Background. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. (Ed.) **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3.ed. The Netherlands, Springer, 2008. p. 1-28.

LIMA, J. D.; MORAES, W. S. Controle de bactérias contaminantes em explantes de bananeira (*Musa* AAA cv. Caipira). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, GO, v. 36, n. 3, p. 181 - 186, 2006.

MAGALHÃES, P. M. Agrotecnologia para o cultivo de fáfia, o ginseng brasileiro. In: MARTÍNEZ, J. V.; BERNAL, H. Y.; CÁCERES, A. **Fundamentos de agrotecnologia de cultivo de plantas medicinais ibero-americanas**. Bogotá, Colômbia: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Subprograma de Química Fina Farmacéutica, 2000. 524 p.

MALDANER, J.; NICOLOSO, F. T.; SANTOS, E. S. dos; FAGUNDES, C. K.; FLORES, R.; JUCOSKIL, G. de O.; SKREBSKY, E. C. Crescimento de plântulas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen cultivadas in vitro sob dois níveis de nitrogênio e sacarose, durante seis subculturas sucessivas e aclimatização. **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 133 - 140, 2006.

MARCHIORETTO, M. S. *Pfaffia* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4329>>. Acesso em: agosto de 2017.

MARCHIORETTO, M. S. **Os gêneros *Hebanthe* Mart. e *Pfaffia* Mart. (Amaranthaceae) no Brasil**. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 252, il., 2008.

MATHUR, A.; MATHUR, A. K.; VERMA, P. Biological hardening and genetic fidelity testing of micro-cloned progeny of *Chlorophytum borivilianum*. **African Journal of Biotechnology**, n. 7, p. 1046–1053, 2008.

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

NAKAI, S.; TAKAGI, N.; MIICH, H.; HAYASHI, S.; NISHIMOTO, N.; TAKEMOTO, T.; KIZU, H. Pfaffosides, nortriterpenoid saponins, from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 1703 - 1705, 1984.

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C.; MARTINS, C. F.; RUSSOWSKI, D. Micropropagação do ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 3, n. 2, p. 11 - 18, 2001.

NICOLOSO, F. T.; ERIG, A. C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C. F. 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.; NAKAI, S.; TAKAGI, N.; HAYASHI, S.; TAKEMOTO, T.; ODASHIMA, S.; KIZU, H.; WADA, Y. Pfaffosides and nortriterpenoid saponins from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 139 - 142, 1984.

NISHIMOTO, N.; SHIOBARA, Y.; FUJINO, M.; INOUE, S-S.; TAKEMOTO, T.; OLIVEIRA, F. de; AKISUE, G.; AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G.; TANAKA, O.; KASAI, R.; MATSUURA, H. Ecdysteroids from *Pfaffia iresinoides* and reassignment of some C NMR chemical shifts. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2505- 2507, 1987.

NISHIMOTO, N.; SHIOBARA, Y.; INOUE, S-S.; FUJINO, M.; TAKEMOTO, T.; YEOH, C.L.; OLIVEIRA, F. de; AKISUE, G.; AKISUE, M. K.; HASHIMOTO, G. Three ecdysteroid glycosides from *Pfaffia iresinoides*. **Phytochemistry**, v. 27, p. 1665 - 1668, 1988.

OLIVEIRA, R. P.; NINO, A. F. P. Potencial de multiplicação in vitro de cultivares de framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 31, n. 1, p. 280 - 284, 2009.

OTOFUJI, G. M. Vias envolvidas no mecanismo de ação do efeito gastroprotetor das raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. Dissertação (Mestrado), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, p. 167, il., 2005.

PASSOS, M. S.; RODRIGUES, F. R.; OLIVEIRA, V. J. S.; ALMEIDA, L. V. da S.; ALMEIDA, W. A. B. de. Multiplicação in vitro de Ginseng-Brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 24. Belo Horizonte, MG, 21 a 24/09/2016. Disponível em: <<http://xxivspmb.ceplamt.org.br/cd/trabalhos/BC-04.pdf>> Acesso em Fev. 2018.

PEREIRA, M. R.; CARVALHO, V. S.; LUCAS, E. F.; GRAVINA, A. G. Amido de milho e hipoclorito de sódio no enraizamento in vitro do abacaxizeiro vitória e seu efeito na aclimatização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 2, p. 528 - 533, 2015.

RATES, S. M. K.; GOSMANN, G. Gênero *Pfaffia*: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para o seu emprego terapêutico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, p. 85 - 93, 2002.

RUSSOWSKI, D.; NICOLOSO, F. T. Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas in vitro. **Ciência Rural**, v. 33, n. 1, p. 57 - 63, 2003.

SAEG. **System for statistical analysis**. Fundação Arthur Bernardes, Viçosa, Minas Gerais, 2007.

SARASAN, V.; CRIPPS, R.; RAMSAY, M. M.; ATHERTON, C.; MCMICHEN, M.; PRENDERGAST, G.; ROWNTREE, J. K. Conservation in vitro of threatened plants - progress in the past decade. **In Vitro Cellular & Developmental Biology** - Plant, Columbia, v. 42, n. 3, p. 206 - 214, 2006.

SHIOBARA, Y.; INOUE, S-S; NISHIGUSHI, Y.; KATO, K.; TAKEMOTO, T.; NISHIMOTO, N.; de OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M-K.; HASHIMOTO, G. Iresinoides, a yellow pigment from *Pfaffia iresinoides*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 953 - 956, 1992.

SHIOBARA, Y.; INOUE, S-S.; KATO, K.; NISHIGUCHI, Y.; OISHI, Y.; NISHIMOTO, N.; OLIVEIRA, F. de; AKISUE, G.; AKISUE, M. K.; HASHIMOTO, G. A nortriterpenoid, triterpenoids and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 32, n. 6, p.1527 - 1530, 1993.

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

SOUZA, J. A.; SCHUCH, M. W.; SILVA, L. C.; SOARES, G. C. Desinfestação e estabelecimento in vitro de feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret) e pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). **Revista Científica Rural**, v. 11, p. 39 - 44, 2006.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**: morfogênese e crescimento in vitro. 1ª ed. Porto Alegre, RS: Editora da UFRGS, 2005. 184 p.

VIEIRA, R. D.; PENARIOL, A. L.; PERECIN, D.; PANOBIANCO, M. Condutividade elétrica e teor de água inicial das sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n. 9, p.1333 - 1338, 2002.



*Recursos Genéticos e
Biotecnologia*

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



CGPE 14543