

Micropropagação do Ginseng Brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]

Nicoloso, F. T.; Erig, A. C.; Martins, C. F.; Russowski, D.

Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE), UFSM, 97105-900. Santa Maria, RS. e-mail: nicoloso@base.ufsm.br, ³UFSM

RESUMO: *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen é uma das espécies de ginseng brasileiro usada como planta medicinal. Este trabalho teve como objetivo desenvolver um método de micropropagação desta espécie. No processo de desinfestação de brotações jovens coletados em condições *ex vitro*, o uso de HgCl₂ a 0,1% por 5min, é eficiente na obtenção de plântulas assépticas a partir de segmentos nodais. O ápice e base foliar, discos da região mediana da folha e segmento de entrenó, apresentaram, respectivamente, para os três primeiros, alto grau de contaminação fúngica e de sensibilidade ao HgCl₂, para o último, ausência de regeneração. Plântulas completas e bem desenvolvidas foram produzidas em meio MS, na ausência de fitorreguladores, num período de 35±5 dias. Segmentos nodais contendo 1 nó de brotações produzidas *in vitro* foram cultivadas em meio MS variando-se a concentração dos macronutrientes (1, 1/2 e 1/3 parte) e/ou a concentração de carvão ativado (0,0, 0,1, 0,2 e 0,3%). A concentração normal dos macronutrientes do meio MS e a ausência de carvão ativado favorecem o desenvolvimento das plântulas, sendo que cerca de 15.000 plantas podem ser obtidas de um único explante dentro de um período de seis meses. O protocolo é altamente reproduzível e eficiente para a multiplicação em larga escala, sem evidência de declínio, e após dois meses de aclimação das mudas obteve-se 95% de sucesso no transplante a campo.

Palavras Chave: Ginseng, Brasil, fisiologia vegetal, eutrofização.

ABSTRACT: Micropropagation of Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen). *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen is one of the Brazilian ginseng species used as medicinal plant. The aim of this work was to formulate a suitable protocol for its efficient micropropagation. Nodal segments collected from *ex vitro* shoots originated aseptic plants after disinfection with HgCl₂ at 0.1% concentration for 5 min. Other explants from young leaves (tip, middle, and basal portions) and the internodal segment show, for the first three, a high degree of fungic contamination and HgCl₂ sensibility, and for the last, absence of regeneration. Wholly developed plants were produced on MS basal medium within 35±5 days without growth regulators. *In vitro* produced shoots were cut into 1-node segments and cultured on MS media either with three concentrations of macronutrients (1/3, 1/2, and full strength) or with the macronutrient at the basal strength but containing four concentrations of activated charcoal (0.0, 0.1, 0.2, and 0.3%). MS medium with basal strength macronutrient and the absence of activated charcoal enhances seedling growth, and around 15,000 plants can be obtained from a single explant within 6 months. The protocol is highly reproducible and efficient for mass multiplication without any evidence of decline, and after a two month hardening phase, there is a 95% transplantation success in the field.

Key words: Ginseng, Brazil, Plant physiology, eutrophication.

INTRODUÇÃO

A *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, espécie pertencente à família Amaranthaceae, é conhecida como fáfia, corango-sempré-viva e ginseng brasileiro. É uma erva alta, encontrando-se em parte do território brasileiro, Guiana, Bolívia e Argentina, sendo uma espécie seletiva higrófila e heliófila bastante rara, que ocorre principalmente à beira de rios e nas orlas das matas de galerias, onde pode receber bastante luz (Smith & Downs, 1972).

Em extratos de raízes de *P. glomerata* várias substâncias foram identificadas, tais como: ácido glomérico e ácido famérico (dois novos nortriterpenóides), ecdisterona, rubrosterona, ácido oleanólico e oleanotato β-glicopiranosil

(Shiobara *et al.*, 1993). Recentemente, Michihiro *et al.* (1998) verificaram que o extrato de *P. glomerata*, de origem brasileira, administrado na dose de 1000mg kg⁻¹, induziu maior taxa de natalidade, bem como espermatogênese vigorosa, histologicamente analisada, em hamsters machos. Além disso, a síntese de DNA em espermatogonia de ratos, tratados com o extrato a 1000mg kg⁻¹, aumentou significativamente. Estes resultados indicam a presença de atividade estênica em *P. glomerata*.

Em condições de viveiro e em hidroponia sob ambiente controlado, foi verificado que a propagação vegetativa da *P. glomerata* via estaquia é viável. Contudo, o número de mudas obtidas é bastante reduzido em função da pequena disponibilidade de estacas (média de 30) de ramos/planta de dois anos de idade

Recebido para publicação em 18.11.00 e aceito para publicação em 19.01.01

(Nicoloso *et al.*, 1999 e 2001). Considerando essa limitação potencial da estaquia como método de produção de plantas em larga escala, acredita-se que a micropropagação *in vitro* possa resolver o problema da demanda de mudas, já que as técnicas de micropropagação têm sido úteis em programas de melhoramento genético, em estudos de eventos fisiológicos e na produção comercial de mudas de diversas espécies. Durante a micropropagação, subcultivos seqüenciais do material vegetal em um meio de cultivo novo podem resultar em taxas de multiplicação entre 2 e 10 novos explantes por cultura.

Alguns dos fatores que afetam o crescimento das plantas *in vitro* são similares àqueles limitantes do crescimento de plantas *ex vitro*. Estes incluem, por exemplo, a disponibilidade de nutrientes minerais (Lumsden *et al.*, 1990; Nicoloso, 1994; Karhu, 1997; Pierik, 1997; Sul & Korban, 1998; Pereira *et al.*, 1999), temperatura (Pierik, 1997), luz (Pierik, 1997; Gloria *et al.*, 1999) e pH (Leifert *et al.*, 1992).

Outros fatores são, às vezes, importantes no meio de cultivo *in vitro*, como a presença de carvão ativado, com a função de adsorver fenóis liberados pelo explante e/ou outras substâncias originadas da autoclavagem do meio de cultura (Linnington, 1991). De acordo com a espécie vegetal e as condições do processo de multiplicação, a adição de 0,1 a 0,5% de carvão ativado, melhora ou regula o crescimento das plântulas (George, 1996).

Portanto, o presente trabalho objetivou o desenvolvimento de um método de micropropagação *in vitro* da *Pfaffia glomerata*, estudando os efeitos da variação da concentração dos macronutrientes e da presença de carvão ativado no meio de cultivo.

MATERIAL E MÉTODO

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia Vegetal pertencente ao Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS.

O trabalho foi dividido em duas partes, sendo a primeira voltada a obtenção de plântulas assépticas, e na segunda, estudou-se as melhores condições de cultivo para a micropropagação.

O material vegetal utilizado na assepsia foi retirado de plantas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen cultivadas em canteiros no Jardim Botânico da UFSM, sendo que uma exsicata foi depositada no Herbário do Departamento de Biologia sob o número de SMDB 7606. Estas plantas apresentavam ramos jovens em pleno crescimento, onde foram escolhidas brotações axilares distantes 20cm do solo e

possuindo até dois segmentos nodais.

A desinfestação das brotações consistiu de três etapas sucessivas, como segue:

1º etapa - limpeza das brotações inteiras em água de torneira corrente por 30min e, posteriormente, em água com tween-20 ($0,7\text{mL L}^{-1}$) com agitação constante por 30min;

2º etapa - imersão em HgCl_2 por 1, 2, 4, 5, 10 e 15min (perfazendo seis tratamentos experimentais);

3º etapa - quatro lavagens, por 3min cada, em água deionizada e autoclavada.

Após os tratamentos de desinfestação, os ramos foram seccionados em quatro tipos de explantes, a saber: ápice e base foliares com 0,5cm de comprimento, discos foliares de $0,5\text{cm}^2$, segmentos nodais com 1 nó e entrenó com 1,0cm de comprimento. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 10 repetições por tratamento. A unidade experimental consistiu de um explante por recipiente com capacidade de 10mL, contendo 3mL de meio MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 30g L^{-1} de sacarose e 0,5% de ágar.

As avaliações do desempenho da desinfestação foram realizadas a cada três dias até completar um mês de incubação.

No estudo das melhores condições do meio de cultivo à micropropagação, realizou-se três experimentos, como segue:

Experimento nº 1 - Os tratamentos consistiram de três concentrações dos macronutrientes do meio MS (normal, 1/2 e 1/3 parte). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 40 repetições por tratamento. Aos 14 dias após a inoculação (DAI) foram avaliados a percentagem de enraizamento e o número de raízes primárias. Aos 39 DAI foram avaliados a altura da maior brotação, a altura média das brotações, o número de nós da maior brotação, o número médio de nós por brotação, o número médio de brotações e o peso da matéria seca das raízes e da parte aérea das plântulas.

Experimento nº 2 - Os tratamentos consistiram de quatro concentrações de carvão ativado (0,0, 0,1, 0,2 e 0,3%) adicionadas no meio MS não modificado. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 20 repetições por tratamento. Aos 32 DAI foram avaliados o número médio de brotações, o número de nós da maior brotação, o número médio de nós por brotação, a altura da maior brotação, a altura média por brotação, o peso da matéria seca da parte aérea, a percentagem de enraizamento e o desenvolvimento das raízes (atribuindo-se notas de 1 a 5, onde: a nota 1 - correspondeu a explantes sem raízes; 2 - poucas raízes, pequeno desenvolvimento e sem ramificações; 3 - raízes pouco desenvolvidas porém com ramificações; 4 - número médio de raízes, bem desenvolvidas

e sem ramificações, 5 - grande número de raízes, bem desen-volidas e com ramificações).

Experimento nº 3 - Os tratamentos consistiram de três concentrações dos macronutrientes do meio MS (normal, 1/2 e 1/3 parte) na presença de 0,1% de carvão ativado. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 30 repetições. Aos 60 DAI foram avaliados a altura da maior brotação, a altura média das brotações, o número de nós da maior brotação e o número médio de nós por brotação.

A parcela experimental, nos três experimentos, consistiu de um tubo de ensaio (25mm de diâmetro, 150mm de altura e 147,26cm³ de volume interno) contendo 10mL de meio MS, solidificado com 0,6% de ágar, e um segmento nodal contendo um nó, sem folhas e com 1,0cm de comprimento, obtidos de plantas assépticas cultivadas em meio MS não modificado. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (1atm, 120°C, 15min). O cultivo dos explantes foi realizado em câmara climatizada com temperatura a 25°C±2°C e fotoperíodo de 16 horas, sob intensidade luminosa de 1500lux fornecida por lâmpadas fluorescentes branca-frias. Os recipientes de cultivo foram fechados com folha de papel alumínio.

O parâmetro utilizado para o encerramento dos experimentos foi quando 25% das repetições do tratamento com melhor desempenho, quanto a altura da maior brotação, alcançou a altura máxima do recipiente de cultivo.

A análise dos dados foi realizada por regressão através do uso do software SOC/ EMBRAPA – Campinas, SP. Os dados sobre a percentagem de explantes enraizados foram transformados segundo arco seno raiz quadrada de x/100; os dados sobre o aspecto geral (notas) do desenvolvimento do sistema radicular, segundo log (x+1).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Desinfestação do material vegetal

Os explantes de plantas sob condições *ex vitro* apresentaram grau variado de suscetibilidade ao crescimento de fungos após as etapas de desinfestação e cultivo em condições assépticas. A presença de bactérias, como contaminantes dos explantes, não ultrapassou 5% dos casos. Estes resultados indicam que um tratamento preventivo com fungicida sistêmico e de contato poderia aumentar o grau de desinfestação.

Dos quatro tipos de explantes testados, as folhas apresentaram o maior grau de contaminação (100%) e de sensibilidade ao HgCl₂, sendo totalmente tóxico no tempo de 5min. O melhor

tratamento de desinfestação para segmentos nodais e de entrenó foi obtido a medida que o tempo de imersão em HgCl₂ prolongou-se, sendo de no máximo 20% até 4min. Contudo, aumentou para 80, 80 e 100%, respectivamente, nos tempos de 5, 10 e 15min. Entretanto, no tempo de imersão de 10 e 15min, verificou-se diminuição sensível na taxa de crescimento das brotações e das raízes, sendo que com 15min houve morte de 30% dos explantes.

O HgCl₂ tem sido utilizado em materiais vegetais provenientes do campo com alta probabilidade de contaminação (Rathore *et al.*, 1992), caso contrário, a combinação de álcool e hipoclorito de sódio apresenta-se suficientemente eficiente.

Os segmentos nodais desinfetados e sadios apresentaram crescimento aparente após duas semanas de cultivo. Aos 30 dias após a inoculação (DAI) dos explantes, fez-se a transferência dos explantes para tubos de ensaio (25 x 150mm) contendo 10mL de meio MS. Aos 60 DAI constatou-se a formação de plântulas completas, contendo em geral uma brotação bem desenvolvida com altura similar a do recipiente de cultivo. Segmentos nodais possuindo um nó destas plantas assépticas, após o subcultivo em um meio de cultura novo, apresentaram melhor taxa de crescimento, onde a emissão de raízes ocorreu a partir do oitavo dia e a parte aérea apresentou-se com crescimento mais lento nesse período, porém aos 15 DAI teve aumento rápido no crescimento das brotações e, aos 35±5 DAI alcançou o máximo em altura. Vários subcultivos subsequentes, atualmente por mais de dois anos, nas mesmas condições, têm apresentado o mesmo padrão de desenvolvimento das plântulas, indicando a estabilização das condições de crescimento no ambiente utilizado, bem como sem nenhuma evidência de declínio.

Cerca de 200 plântulas foram transferidas para condições *ex vitro* a campo (após 1 mês com iluminação indireta sob condições de laboratório e posteriormente para viveiro – sob sombrite a 2,0m de altura), obtendo-se 95% de sucesso no transplântio. Portanto, o protocolo descrito pode ser usado para a multiplicação de mudas, bem como à preservação de germoplasma.

A partir da obtenção de plântulas assépticas procedeu-se o estudo das melhores condições de cultivo para a micropropagação em larga escala.

Efeito da concentração de macronutrientes do meio MS

A percentagem de enraizamento (média = 91±5,75%) e o número de raízes primárias (média = 6,25±2,75 planta⁻¹) não foram influenciadas

dos significativamente pela variação da concentração dos macronutrientes do meio MS aos 14 DAi dos explantes. Karhu (1997) observou em *Lonicera caerulea* L. (Caprifoliaceae) que a redução da concentração de nutrientes minerais do meio MS proporcionou maior alongação das raízes, mas não afetou o número de raízes primárias. Já Pierik (1997), constatou que a percenta-

gem de enraizamento e o número de raízes de explantes de caule de *Rosa hybrida* E. H. L. Krause 'Motrea' (Rosaceae) *in vitro*, aumentou pela elevação da concentração (de zero a 1 parte) dos macronutrientes do meio MS, enquanto decresceu nas concentrações mais elevadas.

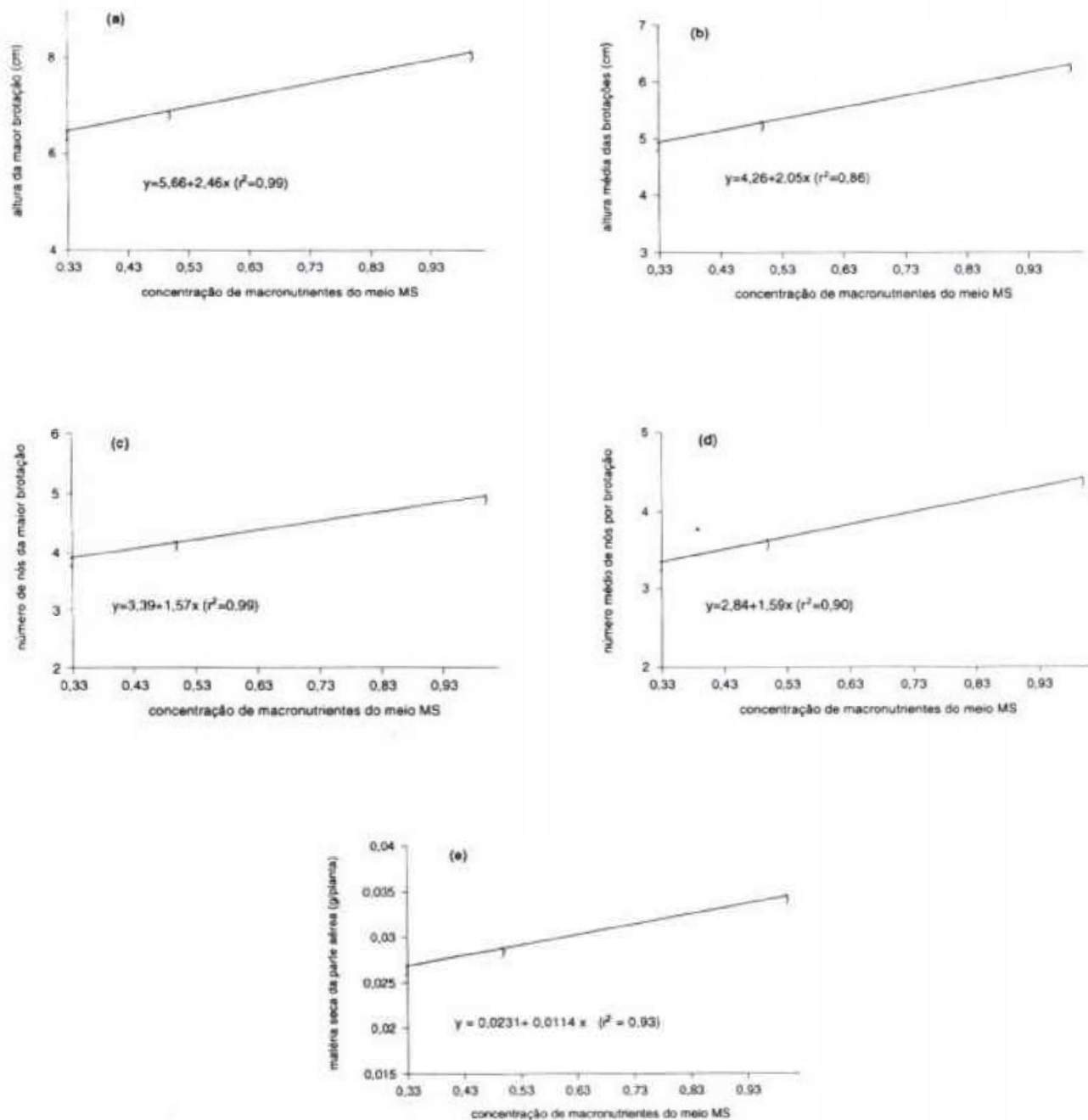


FIGURA 1 – Efeito da variação da concentração dos macronutrientes do meio MS (a) na altura da maior brotação, (b) na altura média das brotações, (c) no número de nós da maior brotação, (d) no número médio de nós por brotação e (e) no peso da matéria seca da parte aérea da *Pfallia glomerata* aos 39 dias após a inoculação.

Na avaliação aos 39 DAI, observou-se que a altura da maior brotação (Figura 1a), a altura média das brotações (Figura 1b), o número de nós da maior brotação (Figura 1c), o número médio de nós por brotação (Figura 1d) e o peso da matéria seca da parte aérea (Figura 1e) apresentaram resposta linear positiva ao aumento da concentração dos macronutrientes do meio MS. Por outro lado, não houve efeito significativo no número de brotações (média = $1,74 \pm 0,53$ planta⁻¹) e no peso da matéria seca das raízes (média = $0,016 \pm 0,009$ g planta⁻¹).

Estes resultados indicam que a redução da disponibilidade dos macronutrientes do meio MS afeta negativamente importantes parâmetros do crescimento da parte aérea da plântula e a melhor concentração dos macronutrientes testada corresponde a normal do meio MS. Entretanto, devido as respostas positivas terem sido de caráter linear, recomenda-se testar doses mais elevadas.

Na concentração normal de macronutrientes do meio MS, o quociente entre o peso da matéria seca de raízes e da parte aérea foi de 0,46, valor considerado adequado na produção de mudas de várias espécies.

Considerando-se a resposta observada na concentração normal dos macronutrientes do meio MS sobre o número médio de brotações por planta (média = $1,74 \pm 0,53$) e no número médio de nós por brotação (Figura 1d), obtém-se em média 7,71 novos segmentos nodais por plântula em cada cultivo (taxa de multiplicação = n° de segmentos nodais final \div n° de segmentos nodais inicial). Portanto, cerca de 15.000 plantas podem ser obtidas de um único explante dentro de um período de seis meses.

As possíveis causas às respostas observadas no crescimento da *Pfaffia glomerata*, em relação a variação da concentração dos macronutrientes do meio MS, devem ser semelhantes àquelas atribuídas a outras espécies vegetais, ou seja: o rápido esgotamento dos nutrientes N, P e K do meio de cultivo devido a alta taxa de crescimento. Folliot & Marchal (1993) verificaram que durante o período de crescimento de plântulas de *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) *in vitro*, houve uma relação direta entre o aumento da biomassa e a absorção dos nutrientes do meio de cultivo, sendo que aos 24 dias todo o K e N tinham sido exauridos do meio. Em cultura de células de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocynaceae), Nicoloso (1994) observou que o P do meio foi quase totalmente absorvido pelas células num período de 24 horas após a inoculação.

Pereira *et al.* (1999) verificaram que a redução da concentração de sais do meio MS, na micropropagação de morangueiro (*Fragaria x*

ananassa Duchesne; Rosaceae) aumentou o número de raízes nas duas cultivares estudadas, porém o comprimento de raízes e o desenvolvimento da parte aérea foi somente melhor em uma das cultivares. Portanto, as distintas respostas entre cultivares da mesma espécie podem ser atribuídas a diferenças genéticas entre elas.

A concentração de sais do meio de cultura pode influenciar o desenvolvimento dos explantes *in vitro* de modo isolado ou interagindo com outros fatores, como exemplo a presença de fitorreguladores e fontes de carboidratos. Deschamps & Pinto (1995) observaram que na ausência da benzilaminopurina (BAP), a porcentagem de explantes alongados foi maior no meio WPM (Wood Plant Medium), que apresenta baixa concentração de sais, que o meio MS, um dos meios mais ricos em sais. Por outro lado, na presença de BAP (até $4,4 \mu\text{M}$), o crescimento das brotações foi maior no meio MS. Já Sul & Korban (1998), verificaram a existência de interação significativa entre sete meios de cultura, em suas concentrações normais de sais, e três fontes de carbono na indução de brotos adventícios de embriões de *Pinus sylvestris* L. (Pinaceae); onde os explantes cultivados no meio Gresshoff & Doy, na presença de sacarose ($58,4 \text{mM}$), produziram a mais alta frequência de regeneração (81%) e com nenhuma hiperidricidade nas brotações em desenvolvimento. Portanto, fica caracterizado que o ajuste dos componentes do meio de cultura variam conforme a espécie e cultivar, bem como com a fase da micropropagação *in vitro*.

Efeito da concentração de carvão ativado

Observou-se aos 35 DAI dos explantes que o aumento da concentração de carvão ativado no meio de cultivo causou resposta quadrática na altura da maior brotação (Figura 2a), na altura média das brotações (Figura 2b), no número de nós da maior brotação (Figura 2c) e no número médio de nós por brotação (Figura 2d), com ponto de mínima eficiência técnica a 0,2%. O peso da matéria seca da parte aérea (Figura 2e) e o desenvolvimento do sistema radicular (Figura 2f) também decresceram na presença de carvão, porém ambos com resposta cúbica. Por outro lado, o número de brotações (média = $1,63 \pm 0,45$ planta⁻¹) e a porcentagem de enraizamento (média = $86 \pm 10,8\%$) não foram influenciados pela presença de carvão.

A adição de carvão ao meio de cultivo nem sempre tem se mostrado vantajosa. Lameira *et al.* (1997) observaram que a presença de 0,3% de carvão no meio MS sólido diminuiu significativamente o número e o tamanho de propágulos de *Cordia verbenacea* L. (Boraginaceae) propagadas *in vitro*. Em sarandi (*Sebastiania schottiana*

Muell. Arg.; Euphorbiaceae), Deschamps & Pinto (1995) também constataram efeito negativo do carvão ativado (0,1%) no número de explantes alongados sob influência da benzilaminopurina.

Devido o efeito negativo do carvão ativado no desenvolvimento das plântulas de *P. glomerata*, decidiu-se verificar se a presença do carvão estaria ligada a diminuição da disponibilidade dos macronutrientes no meio. Portanto, na presença de 0,1% de carvão procedeu-se a variação da concentração dos macronutrientes do meio MS para 1/3, 1/2 e 1 parte. Semelhante ao constatado anteriormente (Figura 1), o crescimento da parte aérea quanto

a altura da maior brotação (Figura 3a), a altura média das brotações (Figura 3b), o número de nós da maior brotação (Figura 3c) e o número médio de nós por brotação (Figura 3d) foi significativamente diminuído pela redução da concentração dos macronutrientes. Entretanto, o tempo necessário para que a brotação mais desenvolvida atingisse a altura máxima do tubo, na concentração normal dos macronutrientes, foi de 60 DAI, isto é 21 e 25 dias depois daquela observada na ausência de carvão, respectivamente, no experimento 1 (Figura 1) e no experimento 2 (Figura 2).

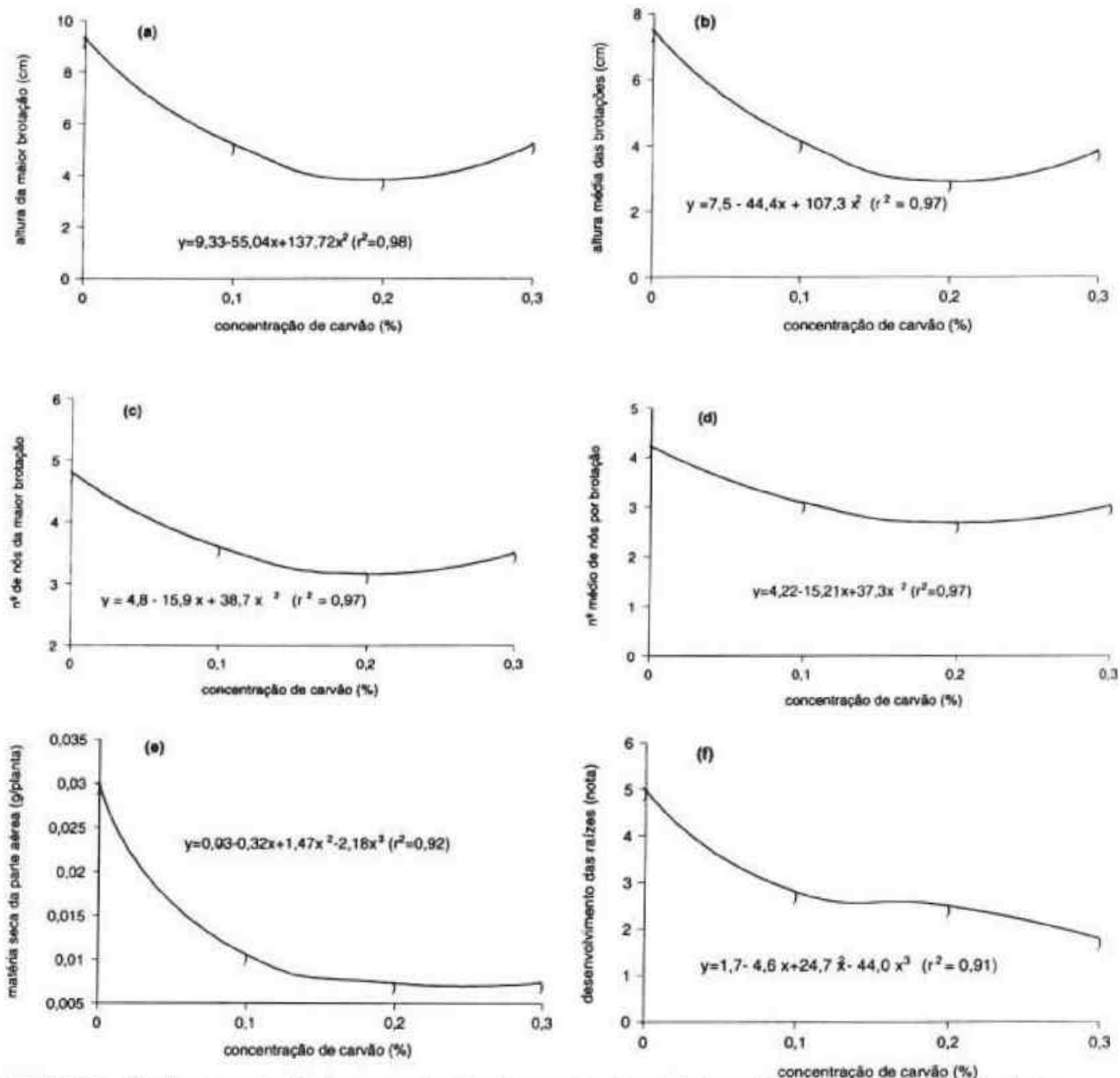


FIGURA 2 – Efeito da variação da concentração de carvão ativado (a) na altura da maior brotação, (b) na altura média das brotações, (c) no número de nós da maior brotação, (d) no número médio de nós por brotação, (e) no peso da matéria seca da parte aérea e (f) no desenvolvimento do sistema radicular da *Plaffia glomerata* aos 35 dias após a inoculação.

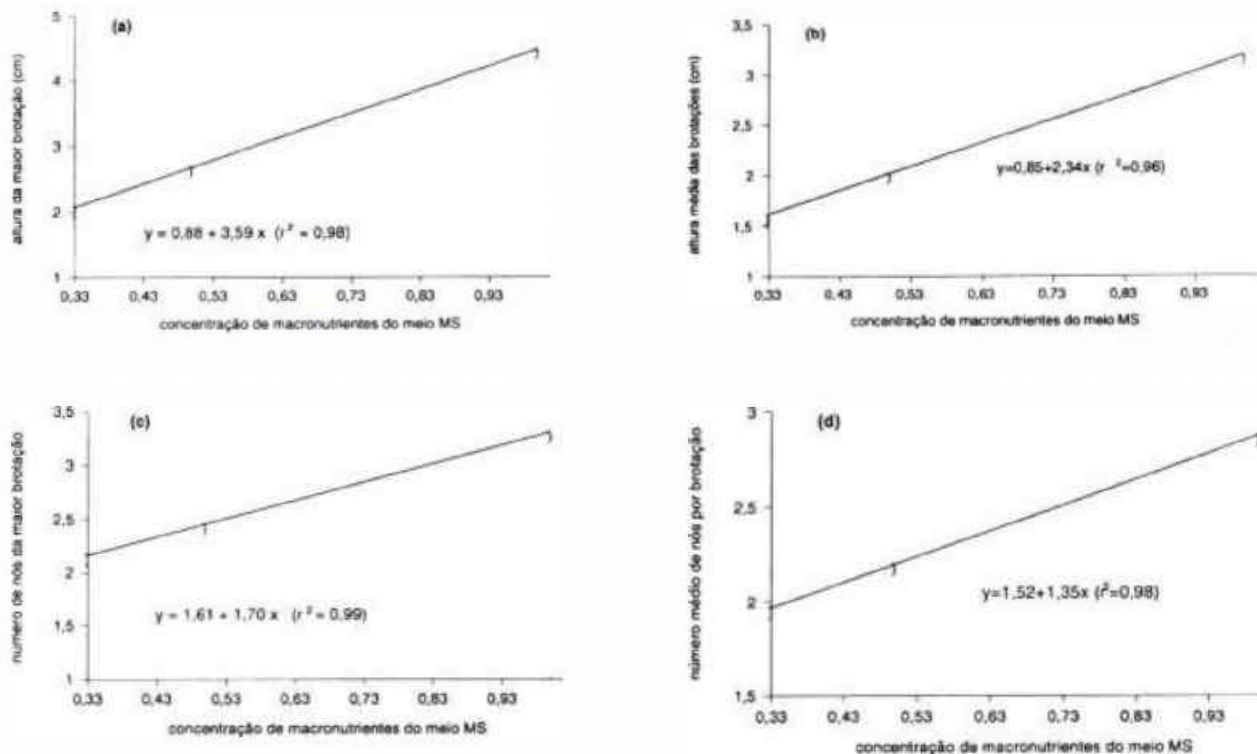


FIGURA 3 - Efeito da variação da concentração dos macronutrientes do meio MS, na presença de 0,1% de carvão ativado, sobre a (a) altura da maior brotação, (b) altura média das brotações, (c) número de nós da maior brotação e (d) número médio de nós por brotação da *Pfaffia glomerata* aos 60 dias após a inoculação.

Estes resultados indicam que o carvão ativado adsorve consideravelmente os elementos químicos presentes no meio, diminuindo desse modo a disponibilidade dos mesmos. Como todos os explantes utilizados nesse trabalho aparentemente não liberaram substâncias fenólicas no meio de cultivo, observação baseada pela ausência de mudanças de cor do meio, e o crescimento das plântulas foi diminuído pela presença de carvão (Figura 2 e 3) conclui-se que o uso de carvão ativado na micropropagação da *Pfaffia glomerata* é inapropriado.

CONCLUSÃO

O uso de $HgCl_2$ a 0,1% por 5min no processo de desinfestação de brotações jovens coletados em condições *ex vitro*, é eficiente na obtenção de plântulas assépticas a partir de segmentos nodais.

A clonagem de *Pfaffia glomerata* pelo cultivo de segmentos nodais *in vitro* é viável.

A concentração normal dos macronutrientes do meio MS e a ausência de carvão ativado favorecem o desenvolvimento das plântulas.

AGRADECIMENTO

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Incentivo à Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (FIPE/UFMS).

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- DESCHAMPS, C., PINTO, J.E.B.P. Enraizamento *in vitro* de microestacas e micropropagação de gemas axilares de sarandi (*sebastiana schottiana* MUELL. ARG.). *Ciência Rural*, v.25, n.3, p.389-393, 1995.
- FOLLIO, M., MARCHAL, J. *In vitro* growth of bananas (cv. Grande Naine): study of utilization of the carbon source and the main mineral elements of the culture medium. *Fruit Paris*, v.47, n.5, p.565-571, 1993.
- GLORIA, B.A.da, VIEIRA, M.L.C., DORNELAS, M.C. Anatomical studies of *in vitro* organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.34, n.11, p.2007-2013, 1999.
- GEORGE, E.F. *Plant propagation by tissue culture: part 2 in practice*. Somerset: Exegetics, 1996. 758p.
- KARHU, S.T. Rooting of blue honeysuckle microshoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.48, n.3, p.153-159. 1997.

- LAMEIRA, O.A., PINTO, J.E.B.P., ARRIGONI-BLANK, M.de F., CARDOSO, M.das G. Efeito de compostos fenólicos, carvão ativado e do meio físico no desenvolvimento de segmento nodal de *Cordia verbenacea* L. **Ciência Rural**, v.27, n.2, p.189-192, 1997.
- LEIFERT, C., PRYCE, S., LUMSDEN, P.J., WAITES, W.M. Effect of medium acidity on growth and rooting of different plant species growing *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.30, p.171-179, 1992.
- LININGTON, I.M. *In vitro* propagation of *Dipterocarpus alatus* and *Dipterocarpus intricatus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.27, p.81-88, 1991.
- LUMSDEN, P.J., PRYCE, S., LEIFERT, C. Effect of mineral nutrition on growth and multiplication of *in vitro* cultured plants. In: NIJDAMP, H.J.J., van der PLAS, L.H.W., van AARTRIJK, J. (Eds). **Progress in plant cellular and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990. p.108-114.
- MICHIHIRO, K., YASUHIRO, T., TOSHIHARU, H., SHIGEYUKI, A., MASAO, I., MASASHI, K. Enhancing effect of brazilian *Pfaffia glomerata* on reproductive ability of male golden hamsters and of male mice. **Natural Medicines**, v.52, n.1, p.68-73, 1998.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- NICOLOSO, F.T. **Influence of cell proliferation and phosphate on indole alkaloid metabolism in cultured *Catharanthus roseus* cells**. Leiden, 1994. 111p. Tese (PhD. em Biologia Celular e Molecular) – Leiden University, The Netherlands.
- NICOLOSO, F.T., FORTUNATO, R.P., FOGAÇA, M.A.F. Influência da posição da estaca no ramo sobre o enraizamento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em dois substratos. **Ciência Rural**, v.29, n.2, p.277-283, 1999.
- NICOLOSO, F.T., CASSOL, L.F., FORTUNATO, R.P. Comprimento da estaca de ramo no enraizamento de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*). **Ciência Rural**, v. 31, n.1, p. 57-60, 2001.
- PEREIRA, J.E.S., BIANCHI, V.J., DUTRA, L.F., FORTES, G.R.de L. Enraizamento *in vitro* do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duchesne) em diferentes concentrações do meio MS. **Ciência Rural**, v.29, n.1, p.17-20, 1999.
- PIERIK, R.L.M. Factors controlling adventitious root formation on stem explants of rose (*Rose hybrida* "Motrea") *in vitro*. ALTMANN, A. & WAISEL, Y. (Eds). In: **Biology of root formation and development**. New York: Plenum, 1997. v.65, p. 297-307.
- RATHORE, T.S., DEORA, N.S., SHEKHAWAT, N.S. Cloning of *Maytenus emarginata* (Willd.) Ding Hou – a tree of the Indian Desert, Through tissue culture. **Plant Cell Reports**, v.11, p.449-451, 1992.
- SHIOBARA, Y., INOUE, S., KATO, K., et al. A nortriterpenoid, triterpenoid and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v.32, n.6, p.1527-1530, 1993.
- SMITH, L.B., DOWNS, R.J. **Flora Ilustrada Catarinense: Amarantáceas**. Itajaí, 1972. 110p.
- SUL, I., KORBAN, S.S. Effects of media, carbon sources and cytokinins on shoot organogenesis in the Christmas tree Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.73, n.6, p.822-827, 1998.