

Micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken

Martins, C.F.¹; Nicoloso, F.T.¹

¹ Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE), UFSM, 97105-900. Santa Maria, RS.
E-mail: nicoloso@base.ufsm.br.

RESUMO: *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken, conhecida como uma das espécies de ginseng brasileiro, pertencente a família Amaranthaceae, é uma planta medicinal comum nos campos brasileiros. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de micropropagação desta espécie, bem como avaliar os efeitos da variação conjunta da concentração de todos os sais e dos macronutrientes (33, 50 e 100% da concentração padrão do meio de cultura MS) sobre o crescimento das plantas cultivadas *in vitro*. Os resultados indicam que: (i) a desinfestação de segmentos nodais de plantas crescendo *ex vitro* depende de limpezas sucessivas com HgCl₂ a 0,1%; (ii) segmentos nodais de brotações coletados no inverno (junho) apresentam potencialmente menor grau de contaminação por fungos; (iii) a concentração padrão dos macronutrientes do meio de cultura MS favorece o crescimento das plântulas; e (iv) cerca de 100 plantas podem ser obtidas de um único explante dentro de um período de seis meses.

Palavras-chave: nutrientes, Amaranthaceae, HgCl₂, Ginseng, plantas medicinais

ABSTRACT: Micropropagation of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken, belonging to Amaranthaceae family, known as one of Brazilian ginseng species, is a common medicinal plant in the Brazilian fields. The aim of this work was to develop a suitable protocol for its micropropagation, as well as to evaluate the effects of salts and macronutrients concentrations (33%, 50%, and full strength) from the MS medium on growth of *P. tuberosa* *in vitro* cultured plants. The results indicate that: (i) the disinfection of nodal segments from plants grow on *ex vitro* conditions depends on successive disinfection procedures with HgCl₂ at 0,1%; (ii) nodal segments from shoots collected in winter (June) show potentially less degree of fungi contamination; (iii) MS medium with basal strength macronutrient enhances seedling growth; and (iv) around 100 plants can be obtained from a single explant within 6 months.

Key words: nutrients, Amaranthaceae, HgCl₂, Ginseng, plants medicinal

INTRODUÇÃO

A *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken, pertencente a família Amaranthaceae, é conhecida como corango-de-batata e ginseng brasileiro. É uma erva perene de porte herbáceo encontrada em Goiás, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, estendendo-se pelo Uruguai, Argentina, Paraguai e Colômbia, sendo uma espécie seletiva xerófila e heliófila, bastante freqüente nos campos limpos, secos, enxutos e pedregosos, onde sua distribuição é uniforme, sem, contudo, formar agrupamentos densos (Smith & Downs, 1972).

Diversas espécies do gênero *Pfaffia* são muito utilizadas na medicina popular, devido suas propriedades medicinais marcantes. Dentre estas espécies pode-se destacar as pesquisas realizadas com *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze por Takemoto *et al.* (1983), que descrevem a presença de saponinas com atividades marcantes sobre certos tipos de

tumores malignos. Já Shiobara *et al.* (1993) revelaram a presença de dois nortriterpenóides, ecdisterona, ácido oleanólico e oleanato b-glicopiranosil nas raízes de *Pfaffia glomerata*. Nishimoto (1986) encontrou ecdisterona nas raízes de *P. tuberosa*, substância existente em outras espécies do gênero *Pfaffia*, tais como *P. glomerata*, *P. irisinoides* e *P. pulverulenta*, que são empregadas usualmente no processamento de fitoterápicos.

Diferentemente do observado em *P. glomerata* por Nicoloso *et al.* (1999 e 2001a), a *P. tuberosa*, devido a possuir caule extremamente frágil, parece possuir pouca potencialidade para a propagação vegetativa via estaquia *ex vitro*. Portanto, a micropropagação *in vitro* parece ser um método viável à produção de mudas em larga escala, já que as técnicas de micropropagação têm sido úteis na produção comercial de mudas de diversas espécies, bem como em programas de melhoramento genético e nos estudos de eventos fisiológicos.

Recentemente, Nicoloso *et al.* (2001b) obtiveram um protocolo altamente reproduzível e eficiente para a multiplicação em larga escala da *P.*

Recebido para publicação em 16/06/03
Aceito para publicação em 04/12/03.

glomerata, sendo que o melhor tratamento de desinfestação de segmentos nodais foi conseguido com o uso de HgCl_2 a 0,1% por 5 min. Já para a obtenção de plantas enraizadas e bem desenvolvidas, ficou evidenciado que a concentração padrão dos macronutrientes do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) e a ausência de carvão ativado favoreceram o crescimento.

Segundo as observações relatadas por Murashige (1974) e Thorpe *et al.* (1991), vários fatores influenciam o comportamento dos explantes em cultura *in vitro*, sendo que muitos deles são similares àqueles que limitam o crescimento de plantas *ex vitro*, como por exemplo a disponibilidade de nutrientes minerais (Pereira *et al.*, 1999; Nicoloso *et al.*, 2001b; Russowski, 2001).

Apesar do meio de cultura MS ser um dos mais utilizados no cultivo *in vitro*, a exigência de nutrientes específicos varia conforme a espécie e o estágio da micropropagação (Torres *et al.*, 1998). Segundo Morard & Henry (1998), a cultura de tecidos vegetais requer, geralmente, a otimização e adaptação na composição dos constituintes do meio de cultura, sendo que na maioria das vezes, a otimização se baseia no ajuste da concentração dos macronutrientes, a fim de proporcionar o melhor suprimento nutricional às necessidades das plantas (Morard *et al.*, 1999; Nicoloso *et al.*, 2003).

O presente trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de um método de micropropagação *in vitro* de *P. tuberosa*, bem como avaliar os efeitos da variação da concentração conjunta de todos os sais e dos macronutrientes do meio de cultura MS.

MATERIAL E MÉTODO

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

O trabalho foi dividido em duas partes, sendo a primeira voltada a obtenção de plântulas *in vitro*, e a segunda, estudando as melhores condições nutricionais minerais para a micropropagação.

O material vegetal utilizado na assepsia foi retirado de plantas de *Paffia tuberosa* (Spreng.) Hicken existentes no Campus e/ou Jardim Botânico da UFSM, sendo que uma exsiccata foi depositada no Herbário do Departamento de Biologia sob o número de SMDB 7818. Estas plantas apresentavam ramos jovens em pleno crescimento e em 20% dos casos ramos reprodutivos. Procurou-se dar preferência às brotações jovens, sem inflorescências e possuindo até três segmentos nodais.

A desinfestação das brotações consistiu de quatro etapas, como segue:

1ª etapa: limpeza das brotações inteiras em água de torneira acrescida de tween 20 (0,07%) com agitação constante por 30min. No final dessa etapa, os ramos foram seccionados em dois tipos de explantes, a saber: segmentos nodais apicais e basais, ambos contendo 1 nó e com 1,0 cm de comprimento.

2ª etapa: imersão dos explantes em HgCl_2 (0,1%) por 1, 2, 3, 4 e 5 min (perfazendo cinco tratamentos experimentais).

3ª etapa: quatro lavagens, por 1min cada, em água deionizada e autoclavada.

4ª etapa: nos explantes que apresentaram infestação por fungos, realizou-se uma ou duas assepsias subseqüentes através da imersão dos explantes em HgCl_2 (0,1%) por 1min cada, seguida de três lavagens, por 1 min cada, em água deionizada e autoclavada.

Realizaram-se dois testes experimentais de assepsia, nos quais utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado. O experimento I, com 17 repetições, consistiu da desinfestação de segmentos nodais coletados na estação de verão (janeiro), e o experimento II, com 20 repetições, de segmentos nodais coletados no inverno (junho). Cada unidade experimental consistiu de um explante num recipiente com capacidade de 10 mL, contendo 3 mL de meio MS (Murashige & Skoog, 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ sacarose e 0,6% de ágar. Em ambos experimentos não se utilizou fitoreguladores.

As avaliações da eficiência da desinfestação foram realizadas a cada dois dias até completar 28 dias de incubação. Entretanto, nos explantes que apresentaram reincidência de contaminação por fungos, as parcelas experimentais foram avaliadas a contar da data da última assepsia, a cada dois dias até completar 28 dias de incubação.

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

Experimento nº 1: os tratamentos consistiram de três concentrações de todos os sais do meio de cultura MS (33, 50 e 100% da concentração padrão). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 36 repetições por tratamento. Aos 25 dias após a inoculação (DAI), foi avaliado o número de raízes por explante. Aos 35 DAI, foram avaliadas a altura média das brotações, altura da maior brotação, matéria fresca da parte aérea, matéria seca da parte aérea, de raízes e total da plântula, comprimento dos entrenós, número de segmentos nodais por plântula, número de segmentos nodais por brotação e número de raízes por plântula.

Experimento nº 2: os tratamentos consistiram de três concentrações dos sais de macronutrientes do meio de cultura MS (33, 50 e

100% da concentração padrão). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 50 repetições por tratamento. Aos 49 DAI, foram avaliadas a altura média das brotações, altura da maior brotação, matéria fresca da parte aérea, matéria seca da parte aérea, de raízes e total da plântula, número de segmentos nodais por plântula, número de segmentos nodais por brotação e número de raízes.

Nestes dois experimentos, a parcela experimental consistiu de um tubo de ensaio (25 mm de diâmetro, 150 mm de altura e 147,26 cm³ de volume interno) contendo 10 mL 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 dos meios de cultivo utilizados em todo trabalho foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem (1 atm, 120 °C, 15 min). O cultivo dos explantes foi realizado em câmara climatizada com temperatura de 25±2 °C e fotoperíodo de 16 h, sob intensidade luminosa de 35 mmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes extra luz do dia (Philips). Os recipientes de cultivo foram fechados com folha de papel alumínio e filme plástico de PVC.

A análise dos dados foi realizada por regressão utilizando o "software" SOC/EMBRAPA - Campinas, SP.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Observou-se nos experimentos de desinfestação que a contaminação por fungos foi relativamente alta (máximo de 60% no inverno e de 76,6% no verão) após três procedimentos sucessivos de limpeza (Tabela 1). A presença de bactérias não

ultrapassou 15% dos casos.

Dentre os tipos de segmentos nodais testados, observou-se que os apicais apresentaram o menor grau de contaminação (dados não mostrados), porém foram os que apresentaram menor grau de desenvolvimento, do qual sugere-se que este tipo de explante foi o que apresentou o maior grau de sensibilidade ao HgCl₂. O uso de HgCl₂ para materiais vegetais provenientes do campo com alta probabilidade de contaminação tem sido aconselhado (Rathore *et al.*, 1992). Nicoloso *et al.* (2001b) verificaram que o uso de HgCl₂ a 0,1% por 5min, no processo de desinfestação de brotações jovens de *P. glomerata* coletadas em condições *ex vitro*, foi eficiente na obtenção de plântulas *in vitro* a partir de segmentos nodais, mas a medida que o tempo de imersão em HgCl₂ prolongou-se, ocorreu uma sensível diminuição na taxa de crescimento das brotações e das raízes, ou até mesmo a morte do explante.

As diferenças entre as estações climáticas podem também influenciar o comportamento fisiológico dos explantes em cultura. Chang *et al.* (1992) verificaram que para obter uma maior sobrevivência e uma baixa percentagem de contaminação é recomendado que os explantes sejam coletados no verão. No entanto, em *P. tuberosa* observou-se um maior grau de contaminação nos explantes coletados no verão, onde obteve-se ausência de desinfestação no primeiro procedimento de limpeza, independente do tempo de imersão na solução de HgCl₂. Já nos explantes coletados no inverno, onde na primeira assepsia os melhores tratamentos renderam no máximo 15% de desinfestação, verificou-se que as duas assepsias subsequentes aumentaram a desinfestação para 40% (Tabela 1).

TABELA 1 - Desinfestação de segmentos nodais de brotações de plantas de *Pfaffia tuberosa*, coletados durante as estações de verão (Janeiro) e inverno (Junho), através de assepsias sucessivas usando HgCl_2 (0,1%).

Tempo de imersão na solução de HgCl ₂ (1ª assepsia)	Número de assepsias			Somatório de desinfestação de todas assepsias
	1	2*	3*	
Explantos coletados no verão (Janeiro)				
Minutos	Porcentagem de limpeza.....			
1	0	5,8	0	5,8
2	0	5,8	17,64	23,4
3	0	0	0	0
4	0	0	5,8	5,8
5	0	5,8	0	5,8
Explantos coletados no inverno (Junho)				
Minutos	Porcentagem de limpeza.....			
1	15	20	5	40
2	5	0	5	10
3	5	5	5	15
4	15	15	10	40
5	5	15	5	25

*Nos explantes infestados após a 1ª assepsia, procedeu-se sucessivamente, de acordo com o resultado da desinfestação, uma segunda e terceira assepsias pela imersão dos explantes em HgCl_2 durante 1min.

Com base nestes dados, sugere-se um tratamento preventivo das plantas matrizes de explantes com fungicida sistêmico e de contato, bem como, nas condições *in vitro*, o uso de fungicidas e antibióticos acrescidos ao meio de cultura.

Os segmentos nodais desinfestados e sadios apresentaram crescimento aparente após 15 dias de cultivo. Aos 28 dias após a inoculação (DAI) dos explantes, fez-se a transferência destes explantes para tubos de ensaio (25 x 150 mm) contendo 10 mL de meio de cultura MS. Na base da maioria dos explantes, observou-se o surgimento de um calo mucilaginoso a partir do 5º DAI e as primeiras raízes e folhas apareceram aos 7 DAI. Constatou-se que o crescimento da parte aérea esteve dependente da presença do calo ou da formação das primeiras raízes. Aos 40±5 DAI, as plântulas apresentaram-se contendo em geral duas brotações, sendo uma brotação bem desenvolvida, com altura similar a do recipiente de cultivo, e a outra brotação menor. Vários subcultivos subsequentes por mais de dois anos, nas mesmas condições, têm apresentado o mesmo padrão de desenvolvimento das plântulas.

Cerca de 100 plântulas com 50 DAI foram transferidas para condições *ex vitro* a campo (após um mês com iluminação indireta sob condições de laboratório e posteriormente para viveiro – sob sombrite a 2,0 m de altura), obtendo-se apenas 30% de sucesso no transplantio. Portanto, o presente

protocolo descrito para o cultivo *in vitro* da *P. tuberosa* pode ser usado para a multiplicação de mudas, porém estudos detalhados sobre a aclimatização destas plantas são necessários.

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

Efeito da concentração de sais do meio MS

Aos 35 DAI, o percentual de enraizamento (média = 88%) apresentou resposta quadrática à variação da concentração de sais do meio de cultura, no qual a dose de máxima eficiência técnica estimada (DMET) foi de 80% daquela do meio MS (Figura 1a). Similarmente ao percentual de enraizamento, o número de raízes também foi afetado, porém com resposta linear positiva à variação da concentração de sais (Figura 1b), sendo que aos 35 DAI (Figura 1b) verificou-se 11 raízes por plântula. Resultados similares a estes têm sido registrados para outras espécies. Pierik (1997) constatou que o percentual de enraizamento e o número de raízes por explante de caule de *Rosa hybrida*, cultivados *in vitro*, aumentou pela elevação da concentração de zero a 100% da concentração padrão dos macronutrientes do meio MS e decresceu a partir daí até a dose equivalente a 150%. Por outro lado, Centellas *et al.*

(1999) verificaram maior formação de raízes pelo emprego da metade da concentração dos sais do meio MS, independente dos fitoreguladores utilizados, atingindo a média de 5,9 raízes por explante de macieira (*Malus domestica* cv. Fred Hough).

O número de brotações por plântula, aos

35 DAI, não diferiu significativamente pela variação da concentração dos sais, cuja média foi de $1,22 \pm 0,34$. De acordo com os trabalhos em *P. glomerata*, por Nicoloso *et al.* (2001b) e Russowski (2001), este parâmetro de crescimento não parece apresentar plasticidade pela variação da concentração dos nutrientes minerais no meio de cultura.

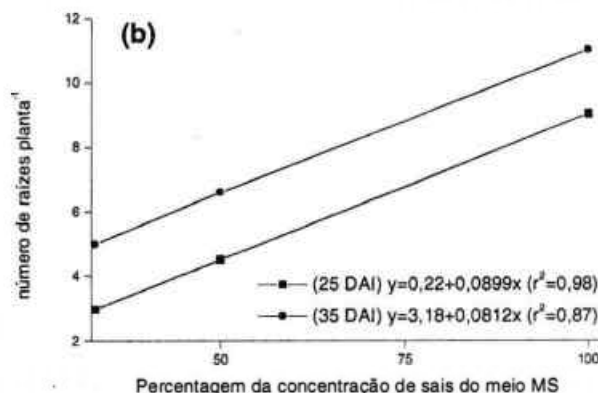
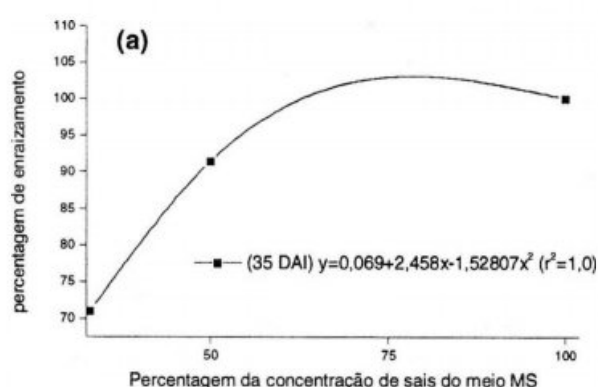


FIGURA 1 – Efeito da variação da concentração de sais do meio de cultura MS na percentagem de enraizamento (a) e no número de raízes por planta (b) de *Pfaffia tuberosa* aos 25 e 35 dias após a inoculação.

A altura média das brotações (Figura 2a), altura da maior brotação (Figura 2b), número de segmentos nodais por brotação (Figura 2c) e o número total de segmentos nodais por plântula

(Figura 2d) apresentaram respostas quadráticas à variação da concentração dos sais, com DMET, respectivamente, de 73, 75, 86 e 81% daquela do meio de cultura MS.

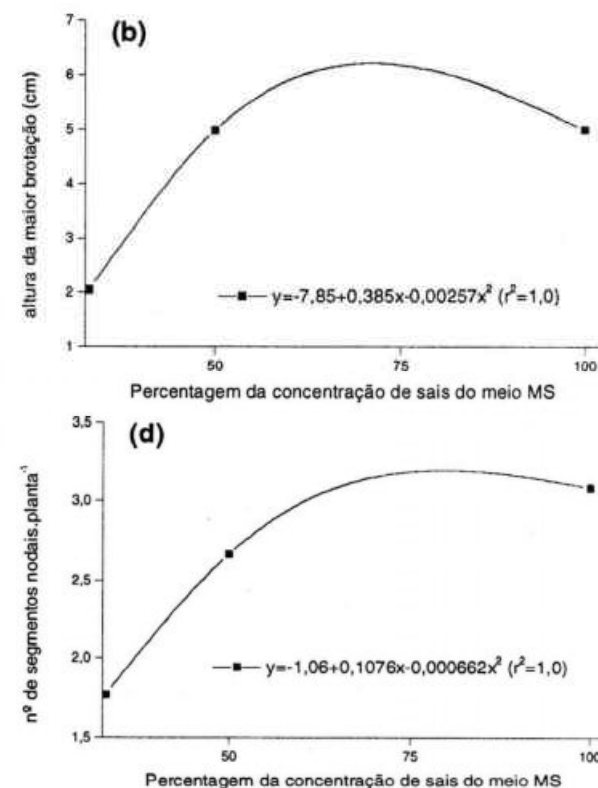
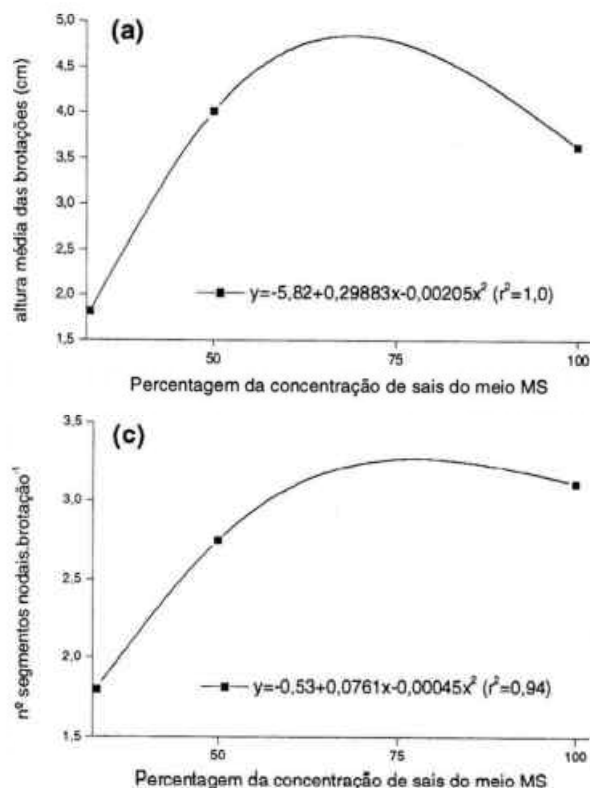


FIGURA 2 - Efeito da variação da concentração de sais do meio de cultura MS na altura média das brotações (a), altura da maior brotação (b), número de segmentos nodais por brotação (c) e número de segmentos nodais por planta (d) de *Pfaffia tuberosa* aos 35 dias após a inoculação.

O tamanho dos entrenós também variou em função da concentração dos sais, sendo que uma dose inferior à padrão do meio de cultura MS dificultaria o uso do segmento nodal basal em função do seu reduzido comprimento (Figura 3). Já os segmentos nodais apicais e medianos, apesar de ter mostrado resposta quadrática à variação da concentração de sais, apresentaram tamanho adequado ($\pm 1,0$ cm) mesmo na presença de 40% da concentração padrão de sais do meio de cultura MS.

A matéria fresca da parte aérea (Figura 4a), matéria seca da parte aérea (Figura 4b), matéria seca de raízes (Figura 4c) e matéria seca total da plântula (Figura 4d) também apresentaram respostas quadráticas à variação da concentração dos sais, com DMET, respectivamente, de 100, 76, 72 e 77% daquela do meio de cultura MS. Estes resultados corroboram os estudos de Folliot & Marchal (1995), no qual verificaram que durante o período de crescimento de plântulas de banana (*Musa paradisiaca*) *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.

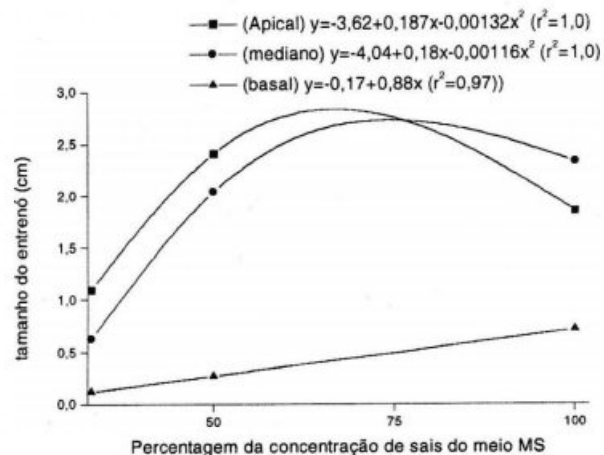


FIGURA 3 – Efeito da variação da concentração de sais do meio de cultura MS no tamanho dos entrenós das plantas de *Pfaffia tuberosa* aos 35 dias após a inoculação.

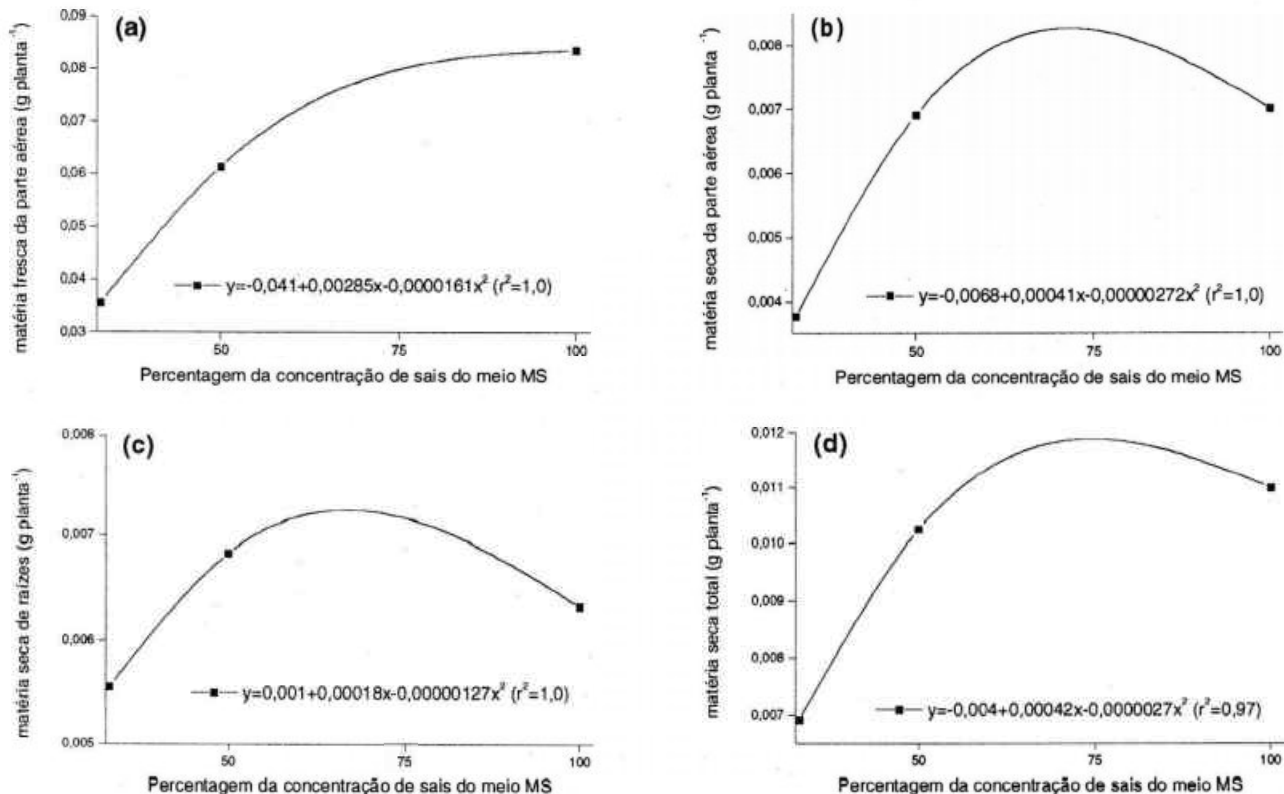


FIGURA 4 - Efeito da variação da concentração de sais do meio de cultura MS na matéria fresca da parte aérea (a), matéria seca da parte aérea (b), matéria seca de raízes (c) e matéria seca total por planta (d) de *Pfaffia tuberosa* aos 35 dias após a inoculação.

Efeito da variação da concentração de macronutrientes do meio MS

Aos 49 DAI dos explantes, dentre os parâmetros de crescimento analisados, o percentual de enraizamento (média = 96%) e o número de brotações por plântula (média = 1,57) não foram influenciados significativamente pela variação da concentração dos macronutrientes do meio de cultura MS. Esses resultados também foram observados em *P. glomerata* por Nicoloso *et al.* (2001b). Karhu (1997) também observou em *Lonicera caerulea* que a percentagem de enraizamento foi independente da concentração dos nutrientes minerais do meio MS. Entretanto, vários estudos mostram que a redução de sais do meio MS incrementou positivamente a percentagem de explantes enraizados (Chang *et al.*, 1992; Rarthore *et al.*, 1992; Sahoo & Chand 1998; Kathiravan & Ignacimuthu, 1999; Pereira *et al.*, 1999 e Centellas *et al.*, 1999). Leifert *et al.* (1995) relataram que a redução da concentração de nutrientes do meio MS

pela metade, é largamente usado como procedimento de enraizamento.

A altura média das brotações (Figura 5a) e o número de segmentos nodais por brotação (Figura 5c) responderam significativamente à variação da concentração de macronutrientes, sendo que a DMET foi, respectivamente, de 73 e 75% daquela do meio de cultura MS. Já a altura da maior brotação (Figura 5b), número de segmentos nodais por plântula (Figura 5d), matéria fresca da parte aérea (Figura 6a), matéria seca da parte aérea (Figura 6b), matéria seca de raízes (Figura 6c) e matéria seca total (Figura 6d) apresentaram resposta linear positiva ao aumento da concentração dos macronutrientes. Estes resultados são diferentes daqueles do experimento onde variou-se conjuntamente a concentração de todos sais do meio de cultura. Portanto, a redução da concentração dos macronutrientes tem efeito maior sobre o crescimento das plantas de *P. tuberosa*. Além disso, devido as respostas terem sido de caráter linear, recomenda-se testar doses mais elevadas de macronutrientes.

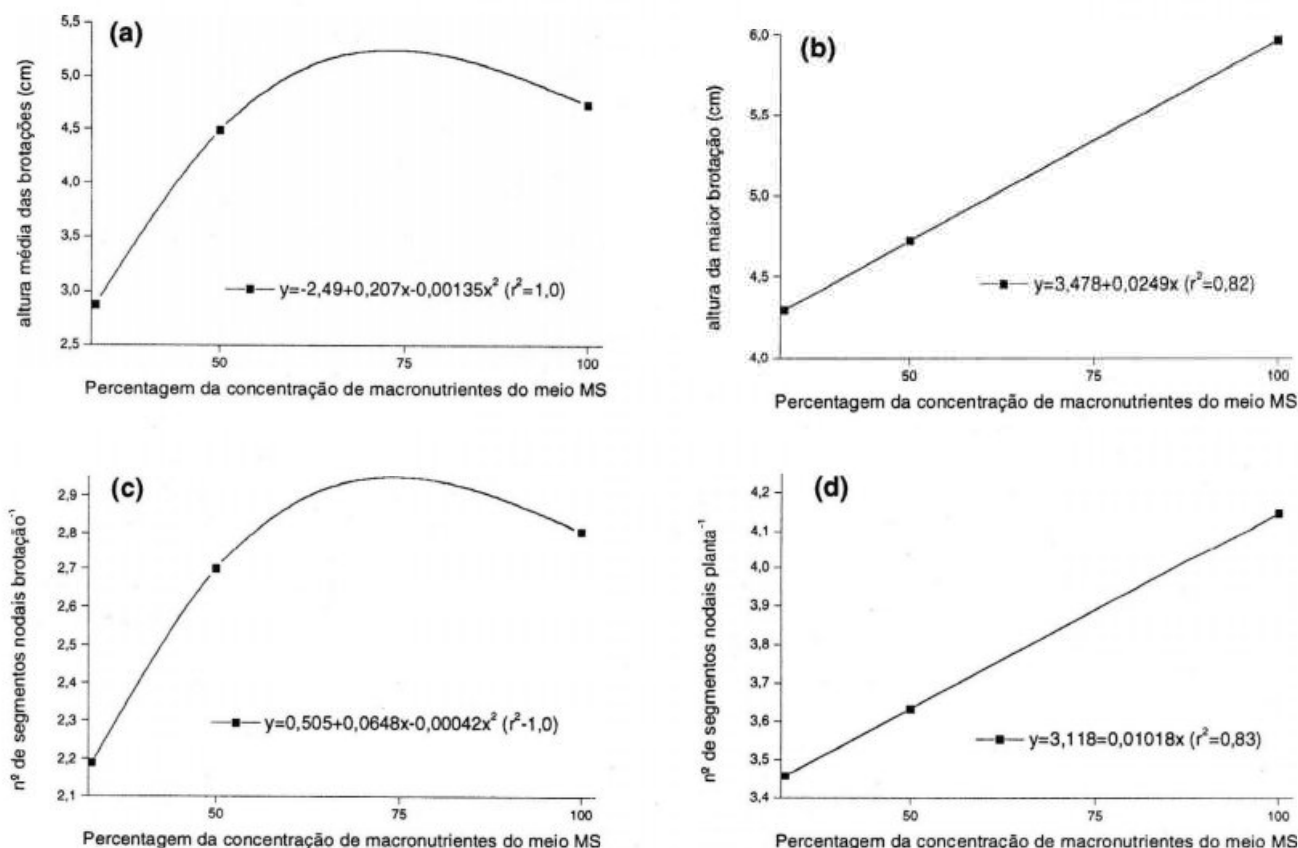


FIGURA 5 - Efeito da variação da concentração de macronutrientes do meio de cultura MS na altura média das brotações (a), altura da maior brotação (b), número de segmentos nodais por brotação (c) e número de segmentos nodais por planta (d) de *P. tuberosa* aos 49 dias após a inoculação.

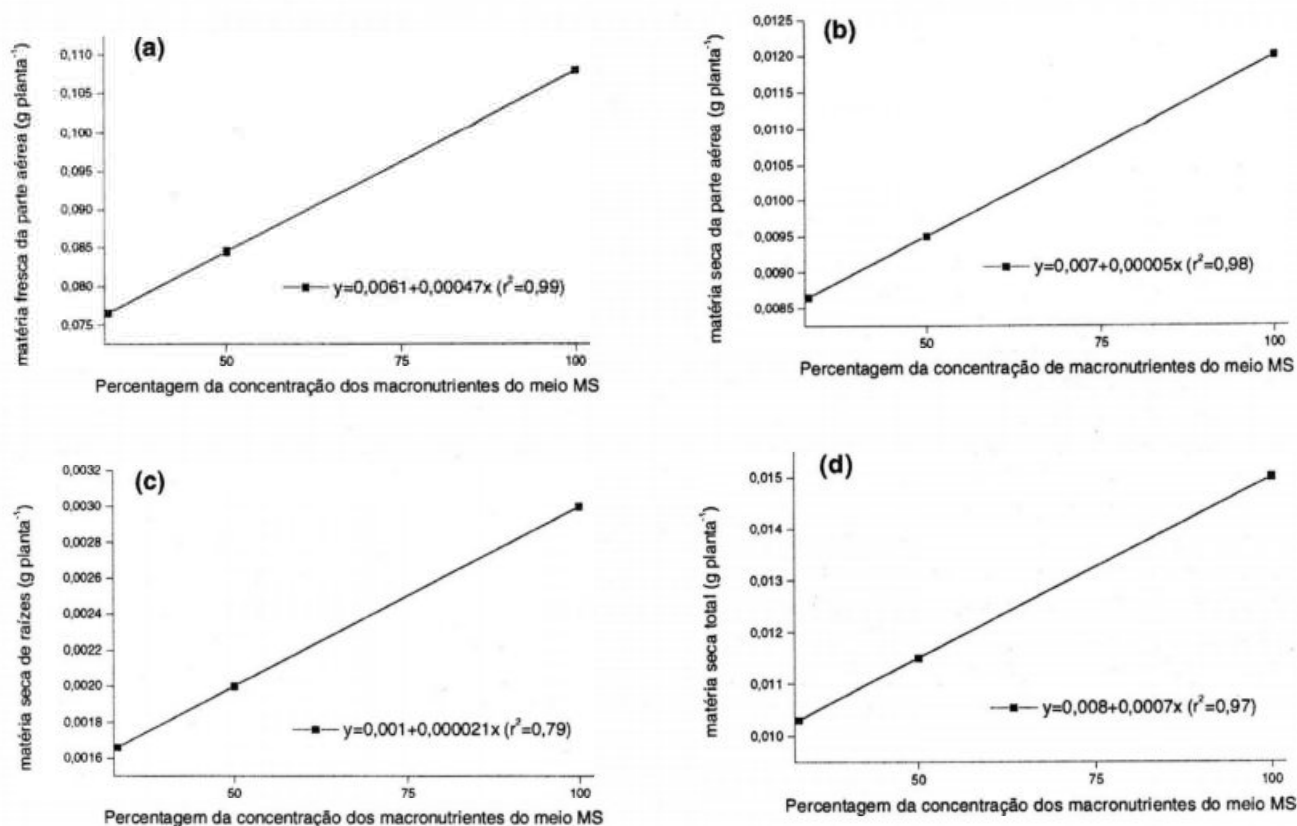


FIGURA 6 - Efeito da variação da concentração de macronutrientes do meio de cultura MS na matéria fresca da parte aérea (a), matéria seca da parte aérea (b), matéria seca de raízes (c) e matéria seca total por planta (d) de *Pfaffia tuberosa* aos 49 dias após a inoculação.

As possíveis causas às respostas observadas no crescimento de *P. tuberosa*, em relação a variação da concentração de sais ou apenas dos macronutrientes do meio MS, devem ser semelhantes àquelas atribuídas a outras espécies herbáceas, ou seja, o rápido esgotamento dos nutrientes N, P e K do meio de cultivo. Diniz *et al.* (1997) observaram que aos 60 dias do cultivo de explantes de banana (*Musa paradisiaca*) cv. Prata Anã ainda permanecia remanescente no meio de cultura MS 66,3% do S, 52% do Mg, 49% do Ca, 41% do K, 23% do N e 9% do P aplicados inicialmente. Entretanto, as quantidades absorvidas de nutrientes pelos propágulos seguiram uma ordem diferente, como segue: $K > N > Ca \geq P > Mg \sim S$, além disso, o P foi o nutriente absorvido mais rapidamente, sendo extraído 75% do P inicial do meio, nos primeiros 30 dias.

Considerando-se as respostas pela variação da concentração padrão dos macronutrientes sobre a produção de segmentos nodais por plântula (Figura 5d) e o tempo médio de cultivo para se obter plântulas completas (45 ± 5 dias), estima-se a obtenção de cerca de 100 novas plantas a partir de um único explante dentro de um período de 6 meses. Esta taxa de multiplicação é muito inferior àquela obtida em *P.*

glomerata em condições similares de cultivo (Nicoloso et al., 2001b). Isto demonstra a existência de grandes diferenças fisiológicas entre estas duas espécies de ginseng brasileiro.

CONCLUSÃO

A desinfestação de segmentos nodais de plantas de *P. tuberosa* crescendo *ex vitro* depende de limpezas sucessivas com $HgCl_2$ a 0,1%.

Segmentos nodais de brotações coletados no inverno (junho) apresentam potencialmente menor grau de contaminação por fungos.

A concentração padrão dos macronutrientes do meio de cultura MS favorece o crescimento das plântulas.

A clonagem da *P. tuberosa* pelo cultivo de segmentos nodais *in vitro* é viável.

AGRADECIMENTO

Este trabalho foi financiado pela fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Fundação de Incentivo à Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (FIPE/UFSM).

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- CENTELLAS, A.Q., FORTES, G.R.L., MÜLLER, N.T.G. *et al.* Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.2, p.181-86, 1999.
- CHANG, S.H., DONALD, D.G.M., JACOBS, G. Micropropagation of *Eucalyptus radiata* ssp. *radiata* using explants from mature and coppice material. **South Africa Forestry Journal**, n.162, p.43-7, 1992.
- DINIZ, J.D.N., GONÇALVES, A.N., MINAMI, K. Absorção de macronutrientes em explantes de bananeira cv. Prata Anã, *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 6., 1997., Belém. **Anais...** Belém: SBFV, 1997. p.128.
- KARHU, S.T. Rooting of blue honeysuckle microshoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.48, n.3, p.153-9, 1997.
- KATHIRAVAN, K., IGNACIMUTHU, S. Micropropagation of *Canavalia virosa* (Roxb.) Wight & Arn. A medicinal plant. **Phyтомorphology**, v.49, n.1, p.61-6, 1999.
- LEIFERT, C., MURPHY, K., LUMSDEN, P.J. Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. **Critical Reviews In Plant Sciences**, v.14, n.2, p.83-109, 1995.
- MORARD, P., HENRY, M. Optimization of the mineral composition of *in vitro* culture media. **Journal of Plant Nutrition**, v.21, n.8, p.1565-76, 1998.
- MORARD, P., FULCHERI, C., HENRI, M. Mineral nutrition of *Gypsophila in vitro* root culture. **Journal of Plant Nutrition**, v.22, n.4-5, p.717-30, 1999.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, v.25, p.135-166, 1974.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-97, 1962.
- 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.277-83, 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, 2001a.
- NICOLOSO, F.T., ERIG, A.C., MARTINS, C.F., *et al.* RUSSOWSKI, D. Micropropagação de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Planta Medicinal**, v.3, n.2, p.11-8, 2001b.
- NICOLOSO, F.T., ERIG, A.C., RUSSOWSKI, D., *et al.* Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.1, p.84-90, 2003.
- NISHIMOTO, N., SHIOBARA, Y., INOUE, S.-S., *et al.* Ecdisterone from *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.1, n.2, p.188-91, 1986.
- PEREIRA, J.E.S., BIANCHI, V.J., DUTRA, L.F., *et al.* 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*. In: ALTMANN, A., WAISEL, Y. (Eds). In: **Biology of root formation and development**. New York: Plenum, 1997. v.65, p.297-307.
- RATHORE, T.S., DEODORA, 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.449-51, 1992.
- RUSSOWSKI, D. **Nitrogênio e Fósforo na micropropagação de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen**. 2001. 120p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- SAHOO, Y., CHAND, P.K. *In vitro* multiplication of a medicinal herb, *Tridax procumbens* L. (Mexican Daisy, Coatbuttons): Influence of explanting season, growth regulator synergy, culture passage and planting substrate. **Phyтомorphology**, v.48, n.2, p.195-205, 1998.
- SHIOBARA, Y., INOUE, S., KATO, K. *et al.* OISHI, Y.; NISHIMOTO, N.; DE OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. AKISUE, M.K.; HASHIMOTO, G. A nortriterpenoid, triterpenoids and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v.32, n.6, p.1527-30, 1993.
- SMITH, L.B. DOWNS, R.J. **Flora ilustrada catarinense: Amaranáceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1972. 110p.
- TAKEMOTO, T., NISHIMOTO, N., NAKAI, S., *et al.* Pfaffic acid, a novel nortriterpene from *P. paniculata* Kuntze. **Tetrahedron Letters**, v.24, n.10, p.1057-60, 1983.
- THORPE, T., HARRY, I.S., KUMAR, P.P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P.C. & ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation: technology and application**. Dordrecht.: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.311-36.
- TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Serviço de Produção de Informação-SPI, 1998. v.1, 509p.