

## Indução de calos e aspectos morfogenéticos de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken

FLORES, R.<sup>1</sup>; NICOLOSO, F.T.<sup>1</sup>; VASCONCELLOS, N.J.S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE), UFSM, 97105-900. Santa Maria, RS;

<sup>2</sup>Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, RS. e-mail: nicoloso@base.ufsm.br

**RESUMO:** Diferentes explantes de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken foram cultivados em meio suplementado com benzilaminopurina (BAP) (1 mM) juntamente com 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) ou ácido naftalenoacético (ANA) (1 ou 10 mM) objetivando o estudo do potencial morfogenético de calos. Após 40 dias de cultivo, verificou-se que a formação dos calos, bem como a indução da rota organogenética ou embriogenética foram fortemente dependentes do tipo de explante e das combinações hormonais testadas. Melhores resultados quanto a formação de calos friáveis e a regeneração de brotos via organogênese indireta foram obtidos a partir de segmentos nodais cultivados em meio suplementado com 10 e 1 mM de 2,4-D, respectivamente. Explantes provenientes de raízes formaram calos embriogênicos na presença de 1 ou 10 mM de 2,4-D ou 10 mM de ANA. O presente estudo demonstrou os melhores explantes e combinações hormonais para estudos que tenham como propósito o estabelecimento de calos friáveis e a regeneração de plantas via organogênese ou embriogênese somática.

**Palavras-chave:** Panax, organogênese, embriogênese somática, fitoreguladores, Amaranthaceae

**ABSTRACT: Callus induction and morphogenetic aspects of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken.** Different explants of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken were cultivated on medium supplemented with benzylaminopurine (1.0mM) combined with 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D) or a-naphthalene acetic acid (ANA) (1.0 or 10.0mM) aiming to study the morphogenetic potential of callus. Forty days after inoculation, both callus formation as well as either the organogenetic or embryogenetic induction route were dramatically dependent on the explant type and on phytohormone combination used. The best results for the production of friable callus and regeneration of shoots using indirect organogenesis were obtained from nodal segments cultivated on media supplemented with 10.0 and 1.0mM 2,4-D, respectively. Explants from roots formed embryogenetic callus in the presence of 1.0 or 10.0mM 2,4-D or 10.0mM ANA. The actual study included the best explant and combination of phytohormones for studies that aim to obtain friable callus and the regeneration of plants via organogenesis or somatic embryogenesis.

**Key words:** Panax, organogenesis, somatic embryogenesis, phytohormones, Amaranthaceae

### INTRODUÇÃO

*Pfaffia tuberosa* (Amaranthaceae) é uma espécie medicinal conhecida popularmente como corango-de-batata, sendo distribuída de forma uniforme desde Goiás até o Rio Grande do Sul (Smith & Downs, 1972). Atualmente, o gênero *Pfaffia* compreende algumas espécies conhecidas como ginseng brasileiro devido ao uso popular de suas raízes como tônico, afrodisíaco e estimulante (Magalhães, 2002); além do fato de suas raízes serem morfológicamente semelhantes às do ginseng coreano (*Panax ginseng* C.A. Meyer). De fato, estudos

fitoquímicos têm revelado a presença de diversos compostos com efeitos adaptógenos nas raízes de várias espécies de *Pfaffia* (Nishimoto et al., 1986; Shiobara et al., 1993).

Ao contrário de outras espécies, a propagação de *P. tuberosa* não é viável através de estacas e o cultivo via sementes, provavelmente origina plantas muito heterogêneas, haja vista a alta variabilidade genética presente nesta espécie (Taschetto et al., 2003). Neste sentido, a aplicação de técnicas biotecnológicas como a cultura de tecidos tem auxiliado na propagação clonal de

genótipos de plantas medicinais, bem como na obtenção de novas fontes de variabilidade através do cultivo de calos e células e na engenharia genética (Pletsch, 1998). A morfogênese *in vitro* resulta da interação entre os processos de indução, competência celular, determinação e diferenciação celular (Christianson & Warnick, 1983), que culminam na obtenção de órgãos ou embriões somáticos. A indução da rota embriogênica ou organogênica é influenciada e determinada pelo tipo de explante, genótipo, fitoreguladores, meio de cultura e condições de cultivo (Hou & Jia, 2004; Paramageetham et al., 2004). A embriogênese somática *in vitro* contribui para estudos fisiológicos, genéticos e bioquímicos que norteiam o desenvolvimento embrionário (Zimmerman, 1993), além de ser um método apropriado quando se deseja manter a estabilidade genética, o que é importante para a propagação clonal e transformação genética (Parrot et al., 1991). Em outro contexto, a organogênese indireta desperta o interesse dos melhoristas como uma nova fonte de variabilidade genética, fornecendo perspectivas de seleção *in vitro* ou *ex vitro* de plantas superiores (Tabares et al., 1991). Adicionalmente, o cultivo de calos e células têm facilitado a elucidação dos fatores que interferem no metabolismo secundário, tendo em vista a produção de compostos de importância medicinal *in vitro* (Oksman-Caldentey & Inzé, 2004).

Recentemente, Martins & Nicoloso (2004) estudaram a propagação clonal de *P. tuberosa* *in vitro* através do cultivo de segmentos nodais em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), no entanto, não há relatos sobre indução de calos e regeneração de plantas via organogênese ou embriogênese somática nesta espécie. Em função disso, este estudo teve como propósito verificar a melhor fonte de explante e tipo de auxina no estabelecimento de calos e na expressão morfogenética de *P. tuberosa*.

## MATERIAL E MÉTODO

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, pertencente ao Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS. O material vegetal utilizado constou de plantas de *Pfaffia tuberosa* coletadas no Campus da UFSM, sendo uma exsiccata depositada no Herbário do Departamento de Biologia sob o número de SMDB 7818.

Utilizaram-se plantas de *Pfaffia tuberosa* estabelecidas *in vitro* e com 30 dias de idade. O meio de cultura básico para a multiplicação do material vegetal e condução do ensaio foi o MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar, conforme metodologia proposta por Martins & Nicoloso (2004). O pH foi ajustado para 5,9 antes da adição do ágar e da autoclavagem. A esterilização do meio foi realizada

em autoclave por 20 minutos a 120°C e 1,0 atm de pressão.

Para o ensaio de calogênese e morfogênese, o meio de cultura foi suplementado com ácido naftalenoacético (ANA) ou 2,4-diclorofenoacético (2,4-D) em duas concentrações (1 ou 10 mM). Testaram-se quatro fontes de explantes (folha, segmento nodal, entrenó e raiz), conforme esquema fatorial 2x2x4. Em todos os tratamentos, o meio de cultura foi suplementado com 1 mM de 6-benzilaminopurina (BAP). O material foi cultivado em frascos (100 mL) contendo 20 mL de meio, onde foram inoculados cinco explantes, com cerca de 1 cm, na posição horizontal. Os explantes foliares foram cultivados com a porção adaxial em contato com o meio de cultura. Utilizou-se a região mediana das folhas.

Após, o material foi mantido no escuro, em sala de crescimento, com temperatura de 25±2°C, durante o período de uma semana. Posteriormente, foram expostos a uma intensidade luminosa de 35 mmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas.

As avaliações foram feitas após 40 dias de cultivo, considerando-se as seguintes variáveis:

**1) Indução de calos:** intensidade de calo formado, intensidade de oxidação e características dos calos (consistência, textura e coloração). Para a variável intensidade de calo, utilizou-se uma escala de 1 à 4, onde: 1= ausência de calo; 2= calo com pequeno tamanho (<1 cm); 3= médio tamanho (1-1,5 cm) e 4= calo grande (> 1,5 cm). Para a variável intensidade de oxidação, utilizou-se uma escala de 1 à 5, onde: 1= ausência de oxidação; 3= calos parcialmente oxidados e 5= calos totalmente oxidados (Flores et al., 2000).

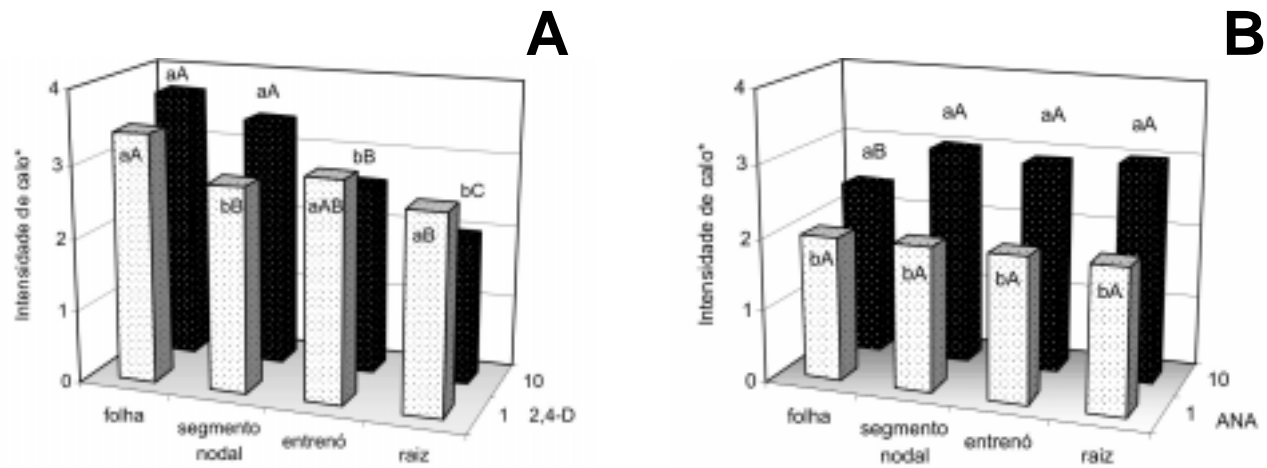
**2) Morfogênese:** percentagem de calos embriogênicos, percentagem de calos com brotos e percentagem de calos com raízes adventícias.

O delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso com quatro repetições, sendo cada repetição formada por um frasco com cinco explantes. Os dados foram submetidos a análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan, com a 0,01.

## RESULTADO E DISCUSSÃO

### 1. Indução de calos

Houve formação de calos em todos os tratamentos, os quais variaram em tamanho, textura e potencial morfogênico de acordo com as combinações hormonais e explantes utilizados. As diferenças observadas na proliferação dos calos ocorrem porque os explantes podem variar em sua sensibilidade para os fitoreguladores e/ou devido a diferenças no teor endógeno de hormônios (Karp, 1995).



**FIGURA 1.** Intensidade média de calo em *P. tuberosa* após 40 dias de cultivo *in vitro* em meio MS acrescido de BAP e concentrações de 2,4-D ou ANA. **A)** Intensidade média de calo em explantes cultivados com 1 ou 10 mM de 2,4-D; **B)** Intensidade média de calo em explantes cultivados com 1 ou 10 mM de ANA. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem quanto as concentrações de auxinas e maiúsculas quanto aos explantes, pelo Teste de Duncan (a 0,01). \* Onde: 1= ausência de calo ; 2=calo com pequeno tamanho; 3=calo médio e 4= calo grande.

O crescimento dos calos foi influenciado significativamente pela interação entre tipo de explante, concentrações de auxina e tipo de auxina. A Figura 1-A e 1-B mostra o efeito da interação entre os explantes e concentrações de 2,4-D e ANA, respectivamente, na intensidade de calo. Os dados demonstraram que os explantes foliares seguido pelos entrenós produziram calos mais desenvolvidos quando cultivados em meio contendo 1 mM de 2,4-D. Em meio contendo 10 mM de 2,4-D os segmentos foliares e nodais formaram calos com maior intensidade em relação aos demais explantes (Figura 1-A).

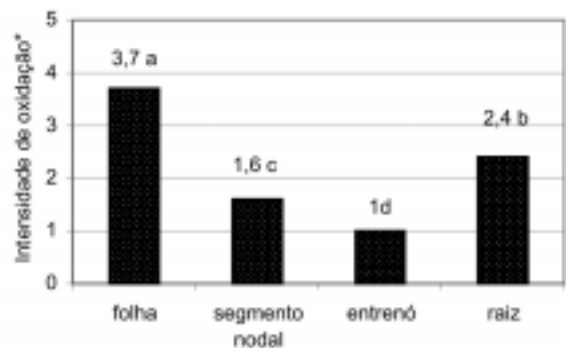
Os melhores resultados no que diz respeito a intensidade de calo com o uso do ANA foram registrados com a concentração 10 mM utilizando-se como explantes os segmentos nodais, entrenós e raízes, os quais não diferiram estatisticamente entre si. Em todos os explantes estudados o uso de 10 mM de ANA mostrou-se superior a concentração 1 mM. Esta concentração mostrou-se ineficiente, não estimulando de forma satisfatória a proliferação celular em todos os explantes testados (Figura 1-B). Apesar de o ANA ser mais utilizado na indução de calos em outras espécies de Amarantháceas, como *Gomphrena* e *Amaranthus* (Mercier et al., 1992; Vieira et al., 1995; Bennici et al., 1997), em *P. tuberosa*, a análise do efeito isolado das auxinas, mostrou que o 2,4-D (intensidade = 3,0) foi estatisticamente superior ao ANA (intensidade = 2,4) no que diz respeito a intensidade média de calo.

Os calos obtidos foram friáveis, de fácil desagregação e coloração predominante albina. Contudo, apesar de o material ter sido cultivado inicialmente no escuro, níveis variados de oxidação foram observados nos calos provenientes de diferentes explantes. Uma maior intensidade de oxidação foi

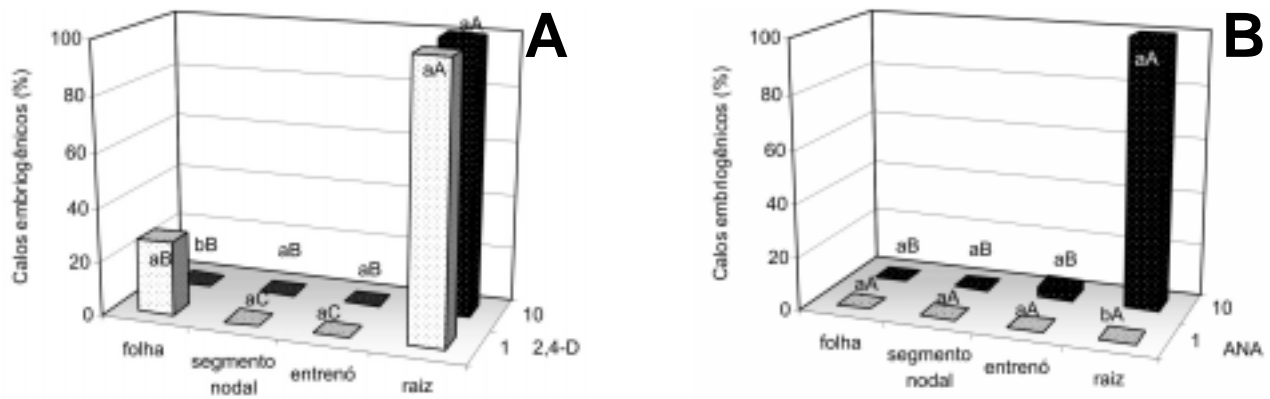
observada nos calos oriundos de explantes foliares seguido por aqueles formados a partir de raízes (Figura 2). Entretanto, nestes, a presença de oxidação deteve-se apenas aquelas áreas do explante não substituídas pelo calo. Além do tipo de explante, a oxidação é influenciada pelo genótipo, componentes do meio nutritivo e condições de cultivo *in vitro* (Grattapaglia & Machado, 1998).

## 2. Morfogenese

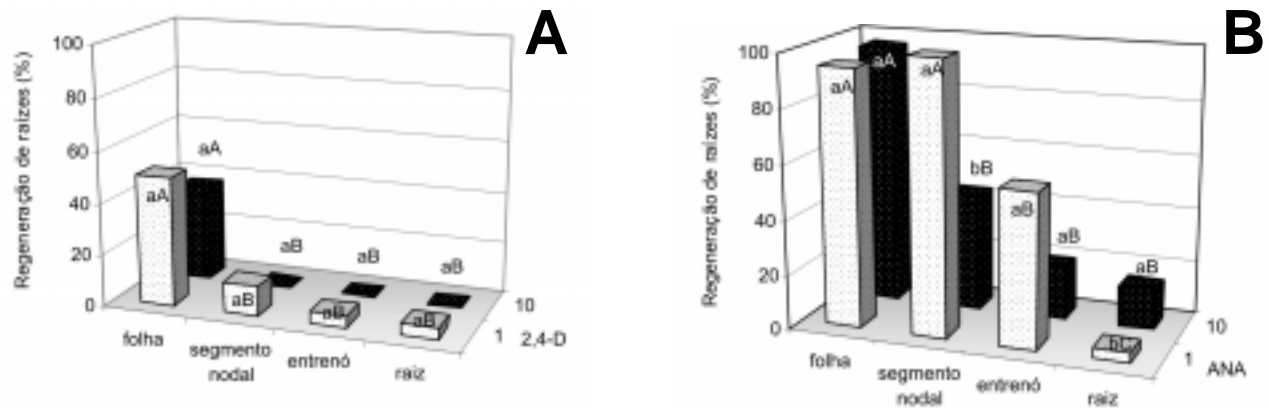
Os calos apresentaram expressões morfogênicas distintas de acordo com o explante e meio nutritivo, o que concorda com as observações de George & Sherrington (1984), os quais relataram que, de forma geral, o tipo de calo formado em um determinado genótipo, seu grau de diferenciação celular e potencial morfogênico dependem do explante e dos constituintes do meio de cultura.



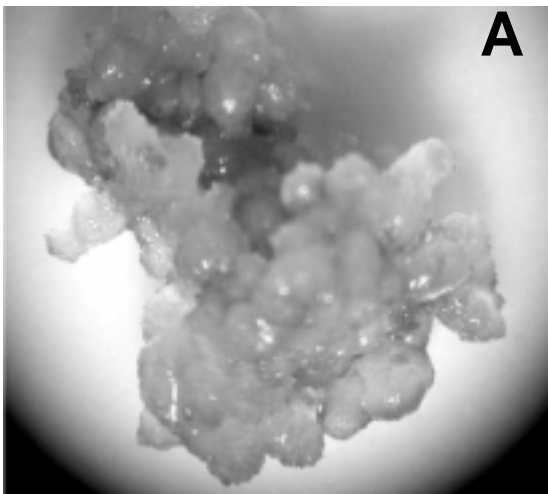
**FIGURA 2.** Intensidade média de oxidação fenólica em calos de *P. tuberosa* em função do tipo de explante. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre os explantes, pelo Teste de Duncan (a 0,01). \* Onde: 1= calos não oxidados; 2=calos parcialmente oxidados; 3=calos totalmente oxidados.



**FIGURA 3** – Percentagem média de calos embriogênicos em *P. tuberosa*, após 40 dias de cultivo *in vitro* em meio MS suplementado com BAP e concentrações de 2,4-D ou ANA. **A)** Efeito de concentrações de 2,4-D e tipos de explantes na percentagem de calos embriogênicos; **B)** Efeito de concentrações de ANA e tipos de explantes na percentagem de calos embriogênicos. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem quanto as concentrações de auxinas e maiúsculas quanto aos explantes, pelo Teste de Duncan (a 0,01).



**FIGURA 4.** Percentagem média de regeneração de raízes em calos de *P. tuberosa*, após 40 dias de cultivo *in vitro* em meio acrescido de BAP e concentrações de 2,4-D ou ANA. **A)** Efeito de concentrações de 2,4-D e tipos de explantes na regeneração de raízes em calos; **B)** Efeito de concentrações de ANA e tipos de explantes na regeneração de raízes em calos. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem quanto as concentrações de auxinas e maiúsculas quanto aos explantes, pelo Teste de Duncan (a 0,01).



**FIGURA 5.** Características de calos de *P. tuberosa* após 40 dias de cultivo em meio MS suplementado com 2,4-D, ANA e BAP. **A)** Calo friável com textura nodular e com embriões somáticos, obtido a partir de segmento radicular cultivado em meio acrescido de 10 µM de ANA e 1 µM de BAP (3,0X). **B)** Broto regenerado a partir de células superficiais de calo friável induzido a partir de segmento nodal na presença de 1 µM de 2,4-D e 1 µM de BAP (5,0X).

Adicionalmente, Paramageetham et al. (2004) induziram a formação de calos organogênicos ou embriogênicos dependendo dos tipos e concentrações de auxinas e citocininas adicionadas ao meio nutritivo. O efeito da fonte de explantes e combinações hormonais na morfogênese também foi constatado por Hou & Jia (2004).

### 2.1. Embriogênese

A formação de calos nodulares embriogênicos ocorreu como resposta a uma interação entre auxina, concentração e tipo de explante. Os explantes provenientes de raízes apresentaram alta competência embriogênica (Figura 3-A; 3-B). Independente da concentração de 2,4-D, esses explantes formaram 100% de calos embriogênicos. Apesar dos órgãos reprodutivos serem os explantes mais utilizados para a indução de embriogênese somática, em algumas espécies, como no ginseng coreano (*Panax ginseng* C.A. Meyer), raízes cultivadas em meio com o 2,4-D também formaram embriões somáticos (Chang & Hsiang, 1980). Recentemente, a indução de embriões somáticos a partir de raízes também foi constatada em *Oncidium* 'Gower Ramsey' (Wu et al., 2004).

A rota embriogênica também foi induzida em 27% dos explantes foliares quando cultivados em meio com 1 mM de 2,4-D (Figura 3-A). Resultados similares foram observados por Paramageetham et al. (2004), onde explantes foliares de *Centella asiatica* L. formaram embriões somáticos quando cultivados em meio MS acrescido de 2,4-D em combinação com o BAP.

Adicionalmente, calos nodulares embriogênicos foram registrados nas raízes cultivadas com 10 mM de ANA em uma frequência de 100% (Figura 3-B; 5-A). Essa concentração de ANA também induziu embriogênese nos entrenós, porém em baixa frequência (3,8%). Independente do tipo de explante, não houve formação de calos embriogênicos em meio suplementado com 1 mM de ANA (Figura 3-B). O efeito de concentrações de 2,4-D, ANA e BAP foram estudadas na embriogênese de *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC por Dutta Gupta et al. (1997), sendo os melhores resultados obtidos com 0,2 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Os autores verificaram que a substituição do ANA pelo 2,4-D não induziu embriogênese. Ao contrário, no presente trabalho, apenas a concentração mais elevada (10 mM) de ANA favoreceu a embriogênese. Além disso, os dados demonstraram o efeito positivo do ANA como do 2,4-D na indução de calos nodulares embriogênicos a partir de explantes radiculares, o que concorda com as observações de Parrot et al. (1991) e Zimmerman (1993), de que o 2,4-D seguido pelo ANA são as auxinas mais efetivas na indução de embriogênese somática.

### 2.2. Organogênese

Dependendo do explante, tipo e concentração de auxina, registrou-se a regeneração de raízes e brotos via organogênese indireta. A regeneração de raízes foi influenciada pela interação entre explantes e concentrações de auxinas (Figura 4-A; 4-B). Em meio suplementado com o 2,4-D, uma maior porcentagem de calos rizogênicos foi observada nos explantes foliares, o qual diferiu significativamente dos demais explantes. Não houve diferença estatística entre as concentrações de 2,4-D na regeneração de raízes (Figura 4-A). Ao contrário, em meio contendo o ANA, todos os explantes regeneraram raízes, porém em diferentes frequências. Independente da concentração de ANA, os explantes foliares também mostraram-se muito responsivos. Além disso, uma alta porcentagem de raízes foi observada nos segmentos nodais cultivados com 1 mM de ANA seguido pelos entrenós. Em meio contendo 10 mM desta auxina, os explantes foliares mostraram-se superiores e diferiram significativamente dos demais explantes (Figura 4-B). De fato, a análise isolada das auxinas evidenciou que o ANA (60,8%) induziu uma maior regeneração de raízes nos calos em relação ao 2,4-D (7,5%). Dutta Gupta et al. (1997) salientaram que explantes foliares de *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC cultivados em meio contendo altas concentrações de ANA e baixas concentrações de BAP produziram calos com pequeno tamanho e alta produção de raízes. Da mesma forma, Thao et al. (2003) registraram a regeneração de raízes em calos de *Alocasia* cultivados em meio contendo BAP e ANA.

Houve regeneração de brotos a partir de células superficiais dos calos provenientes de segmentos nodais cultivados na presença de 1 mM de 2,4-D (Figura 5-B). A porcentagem de calos regenerativos foi 10%, os quais formaram 1 a 2 brotos/calco. O uso de uma combinação hormonal que favorece o crescimento do calo e ao mesmo tempo a regeneração indireta também foi relatado em *Cuminum cyminum* L. (Ebrahimmie et al., 2003). Estes autores verificaram que, nessa espécie, os explantes contendo tecidos meristemáticos produzem calos mais rapidamente e apresentam maior potencial para a regeneração de brotos quando comparado com explantes que não apresentam regiões meristemáticas. Desta forma, em *P. tuberosa*, a maior eficiência na regeneração de brotos via organogênese indireta, a partir de segmentos nodais, quando comparado com os demais explantes (entrenó, folha e raiz) pode ser explicado pelo fato dos primeiros apresentarem gemas. De fato, a região das gemas respondeu mais rapidamente em relação às demais regiões do explante, formando calos friáveis competentes para a rota organogênica. Por outro

lado, em outras espécies pertencentes à família Amarantaceae, entrenós e segmentos de folhas cultivados em meio MS suplementado com ANA e BAP regeneraram brotos de forma indireta (Mercier et al., 1992; Bennici et al., 1997). Em *P. tuberosa*, não se observou a regeneração de brotos em meio com o ANA, o que pode ser devido ao uso de concentrações muito elevadas deste fitoregulador, pois em *Gomphrena officinalis* Mart., a presença do ANA em concentrações superiores a 0,5 mM inibiu a regeneração (Mercier et al., 1992). Por outro lado, em *Amaranthus cruentus*, Bennici et al. (1997) constataram que a melhor combinação hormonal para estimular a produção de brotos em calo foi 2,7 mM de ANA e 4,4 mM BAP, onde foram obtidos 54% de calos regenerativos.

Os resultados obtidos no presente trabalho relataram importantes fatores que interferem no estabelecimento de calos friáveis, bem como na determinação da rota organogenética ou embriogenética em *P. tuberosa*. Resultados superiores em relação a proliferação de calos friáveis e organogênese indireta foram obtidos a partir de segmentos nodais na presença de 10 e 1 mM de 2,4-D, respectivamente. Estes calos, juntamente com aqueles formados a partir de entrenós, utilizando 1 mM de 2,4-D ou 10 mM de ANA podem ser úteis para o cultivo de células de *P. tuberosa*, haja vista a alta friabilidade obtida. Além disso, os resultados obtidos com o uso do 2,4-D são importantes para trabalhos que tenham como objetivo a regeneração indireta de brotações, tendo em vista a obtenção de somaclones. Adicionalmente, o efeito do 2,4-D na regeneração de brotos e do ANA na regeneração de raízes a partir dos calos, fornecem subsídios para estudos fitoquímicos em calos organogênicos, uma vez que, a diferenciação de órgãos a partir dos calos tem sido uma alternativa para aumentar a produção de metabólitos de interesse em plantas medicinais (Oksman-Caldentey & Inzé, 2004). Furuya et al. (1986) verificaram que as raízes de *Panax ginseng* C.A. Meyer, regeneradas *in vitro*, produziram mais saponinas quando comparadas com calos ou com as raízes da planta matriz.

Por outro lado, os explantes radiculares mostraram-se ideais para trabalhos que tenham como propósito a indução de embriogênese somática. Apesar da regeneração de plantas ser possível via embriogênese ou organogênese, atualmente os esforços estão concentrados na regeneração de plantas a partir de embriões somáticos, os quais possuem ápices caulinares e radiculares conectados diretamente. Ao contrário, a formação de brotos e raízes a partir dos calos ocorre de forma independente em relação ao tempo e à localização, sendo necessário a formulação de meios específicos para a regeneração indireta, isolamento, multiplicação e

enraizamento dos brotos. Até o presente momento, não há registros de outros relatos referentes à organogênese indireta e embriogênese somática em *P. tuberosa*. No entanto, posteriores estudos serão necessários para estudar a origem, a ontogenia e a conversão dos embriões somáticos em plantas completas, bem como, testar combinações hormonais que favoreçam a regeneração brotos a partir de calos.

De modo geral, constatou-se que os segmentos foliares apresentaram resultados inferiores em relação aos demais explantes dado a elevada taxa de oxidação. Desta forma, o uso viável desse explante depende do desenvolvimento de estratégias que minimizem a oxidação fenólica, como a substituição do BAP por outra citocinina e o uso de agentes antioxidantes no meio de cultura (Grattapaglia & Machado, 1998).

## CONCLUSÃO

Os segmentos nodais e as raízes apresentaram melhores respostas quanto a proliferação de calos friáveis e morfogênese em relação aos entrenós e segmentos foliares.

Uma maior proliferação de calos friáveis é obtida cultivando-se segmentos nodais com 1 mM de BAP e 10 mM de 2,4-D. A regeneração de brotos via organogênese indireta ocorre quando esses explantes são cultivados com 1 mM de BAP e 1 mM de 2,4-D. Por outro lado, o ANA mostra-se mais efetivo que o 2,4-D na regeneração de raízes adventícias.

Explantes radiculares induzem calos nodulares embriogênicos quando cultivados em meio contendo 1 mM BAP juntamente com 1 ou 10 mM de 2,4-D ou 10 mM de ANA.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- BENNICI, A.; GRIFONI, T.; SCHIFF, S.; BOVELLI, R. Studies on callus growth and morphogenesis in several species and lines of *Amaranthus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.49, p.29-33, 1994.
- CHANG, W.C.; HSIANG, Y.I. Plant regeneration through somatic embryogenesis in root derived callus of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). **Theoretical and Applied Genetic**, v.43, p.133-5, 1980.
- CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK, D.A. Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis. **Development Biology**, v.35, p.288-93, 1983.
- DUTTA GUPTA, S.; AHMED, R.; DE, D.N. Direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration from seedling leaves of winged bean, *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC. **Plant Cell Report**, v.16, p.628-31, 1997.
- EBRAHIMIE, E. et al. A rapid and efficient method for regeneration of plantlets from embryo explants of cumin (*Cuminum cyminum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.75, p.19-25, 2003.
- FLORES, R. et al. Morfogênese a partir de discos foliares

- de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. Vila Nova. **Científica Rural**, v.5, n.1, p.8-12, 2000.
- FURUYA, T. et al. Formation of plantlets from callus cultures of ginseng (*Panax ginseng*). **Experientia**, v.42, p.193-4, 1986.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture**. Edington: Exegetics, 1984. p.576-1361.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.) **Cultura de Tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998. p.183-260.
- HOU, S.W.; JIA, J.F. High frequency plant regeneration from *Astragalus melilotoides* hypocotyl and stem explants via somatic embryogenesis and organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.79, p.95-100, 2004.
- KARP, A. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. **Euphytica**, v.85, p.295-302, 1995.
- MAGALHÃES, P.M. **Agrotecnologia para o cultivo da Pfaffia**. Campinas: CPQBA-UNICAMP, 2002. 5p.
- MARTINS, C.F.; NICOLOSO, F.T. Micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, n.3, p.53-61, 2004.
- MERCIER, H.; VIEIRA, C.C.J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Tissue culture and plant propagation of *Gomphrena officinalis* - a Brazilian medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.28, p.249-54, 1992.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-97, 1962.
- NISHIMOTO, N. et al. Ecdisterone from *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.1, n.2, p.188-91, 1986.
- OKSMAN-CALDENTEY, K.; INZÉ, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. **Trends in Plant Science**, v.9, n.9, p.433-40, 2004.
- PARAMAGEETHAM, C. BABU, G.P.; RAO, J.V.S. Somatic embryogenesis in *Centella asiatica* L. na important medicinal and nutraceutical plant of India. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.79, p.19-24, 2004.
- PARROT, W. A.; MERKLE, S. A.; WILLIAMS, E. G. Somatic embryogenesis: potencial for use in propagation and gene transfer systems. In: MURRAY, D.R. **Advanced methods in plant breeding and biotechnology**. Melkham: Redwood, 1991. p.158-200.
- PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia Ciência de Desenvolvimento**, n. 4, v.1, jan./fev., 1998.
- SHIOBARA, Y. et al. A nortriterpenoid, triterpenoid and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v.32, n.6, p.1527-30, 1993.
- SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. **Flora ilustrada catarinense - Amarantáceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1972. 110p.
- TABARES, E.; PACHÓN, I.; ROCA, W.M. Variación somaclonal y su aplicación al mejoramiento de cultivos. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. (Eds.) **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1991. cap. 14. p.339-60.
- TASCHETTO, O.M.; PAGLIARINI, M.S. Occurrence of 2n and jumbo pollen in the Brazilian ginseng (*Paffia glomerata* e *P. tuberosa*). **Euphytica**, v.133, p.139-45, 2003.
- THAO, N.T.P.; OZAKI, Y.; OKUBO, H. Callus induction and plantlet regeneration in ornamental *Alocasia micholitziana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.73, p.285-289, 2003.
- VIEIRA, C.C.J.; BRAGA, M.R.; FIGUEREDO-RIBEIRO, R.C.L. Fructans in callus of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.42, p.233-8, 1995.
- WU, I.F.; CHEN, J.T.; CHANG, W.C. Effects of auxins and cytokinins on embryo formation from root-derived callus of *Oncidium 'Gower Ramsey'*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.77, p.107-9, 2004.
- ZIMMERMAN, J.L. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. **Plant Cell**, v.5, p.1411-23, 1993.