

Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken

Optimization of the micropropagation of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken

Rejane Flores¹ Joseila Maldaner² Fernando Teixeira Nicoloso³

RESUMO

Este trabalho objetivou otimizar o protocolo de micropropagação de *Pfaffia tuberosa*, uma espécie medicinal encontrada em várias regiões do Brasil. O tratamento da planta matriz com benomyl (0,1%) e o uso sucessivo de soluções com detergente comercial (duas gotas 100mL⁻¹ de água, durante dois minutos), etanol (70%, por 10 segundos), hipoclorito de sódio (1%) + detergente comercial (duas gotas 100mL⁻¹ de água, por 10 minutos) e HgCl₂ (0,1%, por 5 minutos) na etapa de desinfestação dos explantes foram eficazes para a limpeza e regeneração de plantas. As plantas devem ser subcultivadas para um novo meio MS a cada 30 dias de cultivo. Explantes provenientes de segmentos nodais apresentaram uma maior taxa de multiplicação quando comparados com os apicais. Não foi observado declínio na taxa de propagação no decorrer de cinco subcultivos *in vitro*. As mudas apresentaram um índice elevado de sobrevivência durante a fase de aclimatização.

Palavras-chave: planta medicinal, cultura de tecidos, Amaranthaceae, ginseng brasileiro, desinfestação.

ABSTRACT

This work aimed at optimizing the micropropagation protocol of *Pfaffia tuberosa*, a medicinal species found in several regions of Brazil. The treatment of donor plants with benomyl (1%), successively followed with solutions of commercial bleach (2 drops 100mL⁻¹ water; for 2 min), ethanol (70%; for 10 seconds), sodium hypochloride (1%) + commercial bleach (2 drops 100mL⁻¹ water; for 10 minutes) and HgCl₂ (0.1%; for 5 min) on the disinfection step of explants were suitable for disinfection and plant regeneration. *In vitro* plantlets must be subcultivated to a new MS medium at 30 days intervals. Explants from nodal segments showed a higher multiplication rate when compared to apical segments.

A decline was not observed on the propagation rate during five successive subcultives *in vitro*. Plantlets showed an elevated index of survival in the acclimatization step.

Key words: medicinal plant, tissue culture, Amaranthaceae, brazilian ginseng, disinfection.

INTRODUÇÃO

Pfaffia tuberosa (Amaranthaceae) é uma espécie medicinal conhecida como corango-de-batata ou ginseng brasileiro, utilizada popularmente para o tratamento da infertilidade. Em estudo fitoquímico com esta espécie, NISHIMOTO et al. (1986) relataram a presença de compostos medicinais com efeitos adaptógenos (aumento da resistência frente ao estresse) nas raízes de *P. tuberosa*, indicando o grande potencial desta planta para a indústria farmacêutica.

Assim como a maior parte das espécies nativas, *P. tuberosa* vem sendo coletada por processos extrativos, sendo o material vegetal colhido heterogêneo e de baixa qualidade. Apesar disso, atualmente, não há dados disponíveis quanto às técnicas de cultivo utilizadas para a produção de mudas nesta espécie. Em outras espécies de *Pfaffia*, a propagação através de estacas é viável (NICOLOSO et al., 1999), contudo, em condições ambientais, *P. tuberosa* apresenta caules frágeis com entrenós muito curtos, o que dificulta este tipo de propagação. Semelhante ao observado em *P. glomerata*

¹Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGA), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

²Curso de Ciências Biológicas da UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

³Departamento de Biologia, UFSM, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: nicoloso@base.ufsm.br. Autor para correspondência.

(MAGALHÃES, 2002), a propagação de *P. tuberosa* através de sementes deve originar plantas muito heterogêneas, visto que ambas as espécies apresentam grande variabilidade morfológica e genética (TASCETTO & PAGLIARINI, 2003). Tendo em vista a necessidade de plantas para estudos químicos e a crescente demanda de matéria-prima para a indústria de fitoterápicos, torna-se fundamental o desenvolvimento de técnicas que tenham como propósito a produção de mudas de qualidade de *P. tuberosa*.

A micropropagação de plantas medicinais tem se difundido devido à possibilidade de produzir um grande número de plantas homogêneas e com elevada qualidade sanitária, à possibilidade de conservar o germoplasma, garantindo a manutenção da biodiversidade, além de auxiliar no melhoramento genético. Dentre os fatores biológicos que afetam a propagação clonal *in vitro*, destacam-se o genótipo, o tipo de explante e as condições fisiológicas e sanitárias dos mesmos, a manutenção da totipotência e a estabilidade genética (HUSSEY, 1986). Tendo em vista a propagação de plantas homogêneas e geneticamente estáveis, os explantes ideais para a regeneração são aqueles contendo gemas pré-existentes, como os segmentos nodais e apicais (DEBERGH & READ, 1991), uma vez que, não sendo necessária a dediferenciação celular, há uma menor probabilidade de regeneração de plantas com variação somaclonal. Em geral, sob condições ideais, esses explantes regeneram plantas por longos períodos de tempo; porém, em algumas espécies, há uma redução na organogênese ao longo dos subcultivos (HUSSEY, 1986; MANTELL et al., 1994). Além disso, a determinação da duração da cultura e do intervalo entre os subcultivos são aspectos essenciais para evitar a regeneração de plantas com alterações genéticas e/ou epigenéticas (KLERK, 1990).

Recentemente, estudos referentes à propagação clonal *in vitro* de *P. tuberosa* foram conduzidos por MARTINS & NICOLOSO (2004), os quais demonstraram uma elevada contaminação (60%) na fase de inicial de cultivo, um bom desenvolvimento de segmentos nodais em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e uma baixa sobrevivência (10%) na fase de aclimatização. Dessa forma, o elevado índice de contaminação e a dificuldade de estabelecimento *ex vitro* das plantas micropropagadas inviabilizam o uso dessa metodologia para a produção de *P. tuberosa* em escala comercial. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi otimizar a micropropagação de *P. tuberosa*.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas jovens de *P. tuberosa*, existentes no campus da UFSM, foram transplantadas para

recipientes contendo solo e mantidas no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS. Uma excisada da planta foi depositada no Herbário do Departamento de Biologia, sob o número SMDB 9840.

Os brotos de uma mesma planta foram tratados com Benomyl (0,1%) antes da desinfestação dos explantes. O processo de desinfestação dos brotos consistiu de seis etapas realizadas sucessivamente, como segue: 1) lavagem em água com detergente comercial (2 gotas 100mL⁻¹) durante 2 minutos; 2) imersão em solução de álcool 70% por 10 segundos; 3) imersão dos segmentos caulinares em solução de hipoclorito de sódio a 1% acrescido de detergente (2 gotas 100mL⁻¹) por 10 minutos; 4) três lavagens em água; 5) imersão em solução de bicloreto de mercúrio (HgCl₂) a 0,1%, durante um período de cinco minutos; 6) seis lavagens consecutivas em água. Todas as etapas foram feitas sob agitação constante. Todos os explantes foram submetidos ao mesmo processo de desinfestação.

Segmentos nodais (1cm) foram cultivados em meio MS acrescido de 30g L⁻¹ de sacarose, 100mg L⁻¹ de mio-inositol e 6g L⁻¹ de ágar, conforme metodologia estabelecida MARTINS & NICOLOSO (2004). O pH foi ajustado para 5,9. O material foi mantido em sala de crescimento sob temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 35µmol m⁻²s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes branca-frias.

Os brotos desenvolvidos *in vitro* foram subcultivados (1º subcultivo) em novo meio nutritivo, quinze dias após a desinfestação, devido aos sintomas de toxidez observados na base dos explantes. Subseqüentemente, as plantas foram subcultivadas a cada 30 dias, totalizando cinco subcultivos.

As avaliações foram realizadas ao final de cada subcultivo mediante as seguintes variáveis: presença de contaminação microbiana (fúngica e bacteriana), percentagem de explantes com sintomas de toxidez devido às soluções utilizadas na desinfestação, percentagem de regeneração e sobrevivência dos explantes, número médio de brotações, número médio de segmentos nodais por planta, comprimento médio dos brotos (cm), comprimento médio da maior brotação, percentagem de enraizamento, número médio de raízes por planta.

Adicionalmente, avaliou-se o potencial morfogênico de segmentos nodais e segmentos apicais ao longo de 32 dias de cultivo, tendo em vista o estabelecimento do tempo de permanência *in vitro* para esta espécie. Os explantes foram cultivados nas mesmas condições descritas anteriormente, sendo

avaliados a cada quatro dias mediante a percentagem de regeneração e enraizamento, número médio de brotos, número médio de segmentos nodais, tamanho médio dos brotos e número médio de raízes.

Plântulas completas, com 30 dias, pertencentes ao quinto subcultivo, foram transferidas para recipientes plásticos (2000cm³) contendo 1000cm³ de substrato comercial Plantmax Hortaliças e mantidas em casa de vegetação sob condições de luminosidade parcial (sombra), temperatura e fotoperíodo naturais. A umidade do substrato foi mantida entre 45 e 60% da capacidade de campo, através de irrigações com água destilada, conforme recomendações de SKREBSKY et al. (2004). Cada recipiente de cultivo foi coberto com plástico transparente. Sete dias após o plantio, a cobertura de plástico começou a ser retirada durante um período de duas horas dia⁻¹, aumentando-se gradativamente uma hora dia⁻¹ até completar doze horas, quando as plantas foram mantidas cobertas apenas durante a noite. Subseqüentemente, aos 25 dias após o plantio, a cobertura foi retirada por completo. As folhas das plantas foram mantidas úmidas com o auxílio de um aspersor contendo água destilada e autoclavada, principalmente nos primeiros vinte dias. A percentagem de sobrevivência das plantas foi avaliada após 30 dias do transplantio para o substrato.

O delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso com cinco repetições, sendo cada repetição formada por cinco a dez plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância e analisados pelo teste de Duncan em nível de 1% de probabilidade de erro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia de desinfestação adotada foi considerada muito eficiente devido à ausência de contaminações fúngicas ou bacterianas no decorrer do ensaio. Após a desinfestação, verificou-se que a maioria das plantas (61,5%) desenvolveu brotos normalmente; porém, 23,1% mostraram sintomas de toxidez na porção basal do explante e 15,4% na parte aérea. Na base dos explantes, os sintomas mais comuns foram necrose, engrossamento e curvatura. Já na parte aérea, foram observadas folhas malformadas, pouco desenvolvidas ou apresentando curvatura anormal.

Contudo, como pode ser observado na figura 1, apesar de 38,5% dos explantes demonstrarem sensibilidade aos tratamentos utilizados na desinfestação, constatou-se 100% de sobrevivência e regeneração já nos primeiros quinze dias do primeiro subcultivo. No segundo subcultivo, verificou-se que,

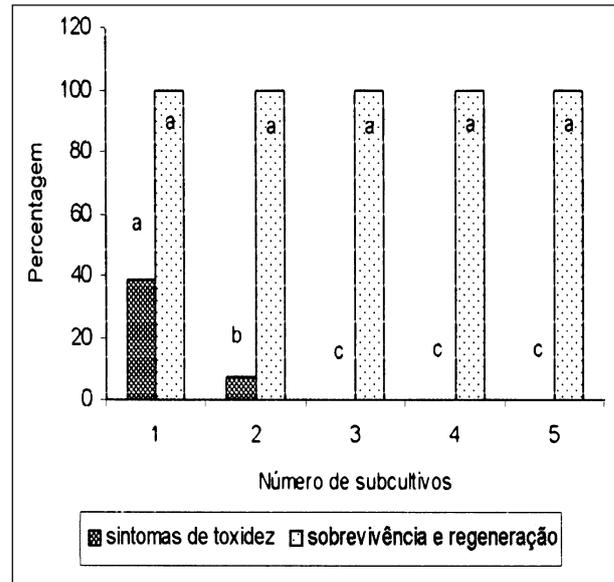


Figura 1 - Percentagem de explantes com sintomas de toxidez às soluções utilizadas durante a desinfestação e percentagem de explantes vivos e regenerativos de *P. tuberosa* no decorrer de cinco subcultivos *in vitro*. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan em nível de 1% de probabilidade de erro. Santa Maria, RS, 2005.

exceto pela ausência de raízes em 22,2% das plantas (Figura 2d), os sintomas de sensibilidade ao processo de desinfestação observados anteriormente mostraram-se insignificantes (7,4%) e não foram constatados nos cultivos subsequentes (figura 1). Os danos observados nos explantes de *P. tuberosa* ocorreram devido ao uso do HgCl₂. Contudo, de uma maneira geral, estas anomalias não comprometeram o desenvolvimento das plantas.

Apesar de o HgCl₂ ser muito utilizado na desinfestação de espécies com problemas de contaminação, GEORGE (1993) relata que este produto é tóxico e deve ser utilizado com muita cautela. Um outro estudo realizado por MARTINS & NICOLOSO (2004) em *Pfaffia tuberosa* concluiu que apenas o uso de HgCl₂ (0,1%) durante cinco minutos não foi eficiente para a limpeza dos explantes, sendo necessária a realização de várias limpezas sucessivas para a obtenção de 40% dos explantes desinfestados. Neste trabalho, os fatores que podem ter contribuído para o sucesso na limpeza e regeneração dos explantes foram o uso sucessivo de várias soluções desinfestantes, a época de retirada dos explantes e a qualidade fisiológica e sanitária da planta matriz. O início da fase ativa de crescimento de *P. tuberosa* ocorre preferencialmente na primavera, época em que os brotos, neste estudo, foram estabelecidos com sucesso *in vitro*.

O início do desenvolvimento dos brotos a partir das gemas axilares ocorreu cerca de cinco dias após a desinfestação dos explantes. Ao contrário dos resultados obtidos neste trabalho, segmentos nodais de *P. tuberosa* (MARTINS & NICOLOSO, 2004) e de *P. glomerata* (NICOLOSO et al., 2001) desinfestados com $HgCl_2$ (0,1%) durante cinco minutos apresentaram desenvolvimento aparente após duas semanas de cultivo.

No início do cultivo, observou-se uma taxa de proliferação de segmentos nodais na razão de 1:2 (Figura 2a), sendo que todos os explantes desenvolveram dois brotos (Figura 2b), em geral, uma brotação mais desenvolvida e outra menor (Figura 2c). A partir do início do cultivo, houve um declínio no número de brotos regenerados por explantes; porém, este parâmetro permaneceu estável ao longo dos subcultivos (Figura 2b). Por outro lado, houve um aumento no número de segmentos nodais por planta, os quais mantiveram uma taxa de multiplicação na razão de 1:4 no decorrer dos subcultivos (Figura 2a). O número de subcultivos afetou o crescimento das brotações, observando-se uma redução no tamanho dos brotos a partir do terceiro subcultivo (Figura 2c).

Observou-se que, apesar de haver uma redução no crescimento dos brotos, os sucessivos subcultivos não prejudicaram a taxa de propagação de plantas de *P. tuberosa*. De acordo com MANTELL et al. (1994), as taxas de multiplicação, em geral, de 5-10x, variam de acordo com o genótipo e tipo de explante e refletem a capacidade de produção de novos segmentos nodais a cada subcultivo.

No início do cultivo, a formação de raízes ocorreu após a formação dos brotos em apenas 7,7% dos explantes (Figura 2d), os quais apresentaram uma média de 0,1 raízes por planta (Figura 2e). Provavelmente, esta baixa taxa de enraizamento seja devida aos efeitos nocivos das soluções utilizadas durante a desinfestação, as quais certamente afetaram a regeneração das raízes. NICOLOSO et al. (2001) verificaram que a desinfestação de explantes de *P. glomerata* com solução de $HgCl_2$ pode interferir no crescimento de brotos e raízes.

Além disso, constatou-se que, a maioria das plantas apresentou um pequeno calo mucilaginoso (1-3mm) na porção basal dos explantes, o qual precedeu a formação das raízes. As raízes formaram-se na região do calo e/ou na porção do explante situada acima desta estrutura, contudo, a presença do calo não foi um fator determinante na formação do sistema radicular.

No segundo subcultivo, a porcentagem de enraizamento aumentou significativamente (77,8%), sendo que cada planta formou uma média de 3,3 raízes

(Figura 2d e 2e). A presença do calo na base precedeu a formação das raízes na maioria das plantas (77,8%), sendo que apenas 7,4% das plantas formaram raízes na ausência desta estrutura. Verificou-se ainda que o desenvolvimento do sistema radicular foi favorecido ao longo dos cultivos, sendo observado um incremento na porcentagem e no número de raízes por planta (Figuras 2d e 2e).

O potencial morfogênico dos segmentos nodais e apicais foi avaliado no decorrer de 32 dias de cultivo *in vitro*, tendo em vista o estabelecimento do melhor explante para a propagação e o tempo médio de residência *in vitro*. Em ambos os explantes, verificou-se que a indução de brotos iniciou 3-4 dias após a inoculação, seguido pela formação das raízes adventícias (Figura 3a e 3b). A indução das brotações e das raízes ocorreu primeiramente nos explantes apicais; contudo, após 32 dias, estes parâmetros não diferiram entre os explantes (Figura 3a e 3b).

A maior velocidade de crescimento das gemas apicais em relação às axilares ocorre pelo fato de as primeiras estarem sob efeito da dominância apical, enquanto que, nos segmentos nodais, uma alteração no balanço auxina/citocinina faz-se necessária para estimular o desenvolvimento das gemas (DAVIES, 1995). Desta forma, em *P. tuberosa*, o crescimento das gemas axilares presentes nos segmentos nodais deve-se, provavelmente, ao aumento na relação citocinina/auxina.

Os explantes não diferiram entre si no que diz respeito ao tamanho médio dos brotos (média de 4,1cm) e quanto ao número de raízes (média de 5,6 raízes por planta). Contudo, os segmentos nodais mostraram-se superiores aos apicais quanto ao número de brotos e ao número de segmentos nodais produzidos (Figura 3c), o que certamente ocorreu devido ao desenvolvimento de ambas as gemas presentes naqueles explantes. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por NICOLOSO & ERIG (2002) em *P. glomerata*.

Observou-se um bom desenvolvimento das plantas até 30 dias de cultivo *in vitro*. Após este período, algumas plantas apresentaram folhas senescentes, murchamento dos brotos, mudanças de coloração nas folhas e escurecimento do sistema radicular. Dentre os fatores que favorecem a senescência das plantas *in vitro*, destacam-se a redução dos nutrientes e de água no meio nutritivo e o acúmulo de gases. Conforme GRATTAPAGLIA & MACHADO (1998), o ideal é que um novo subcultivo seja realizado antes do início da fase de senescência. Em função disso, 30 dias foi determinado como sendo o tempo id médio ideal de intervalo entre os subcultivos.

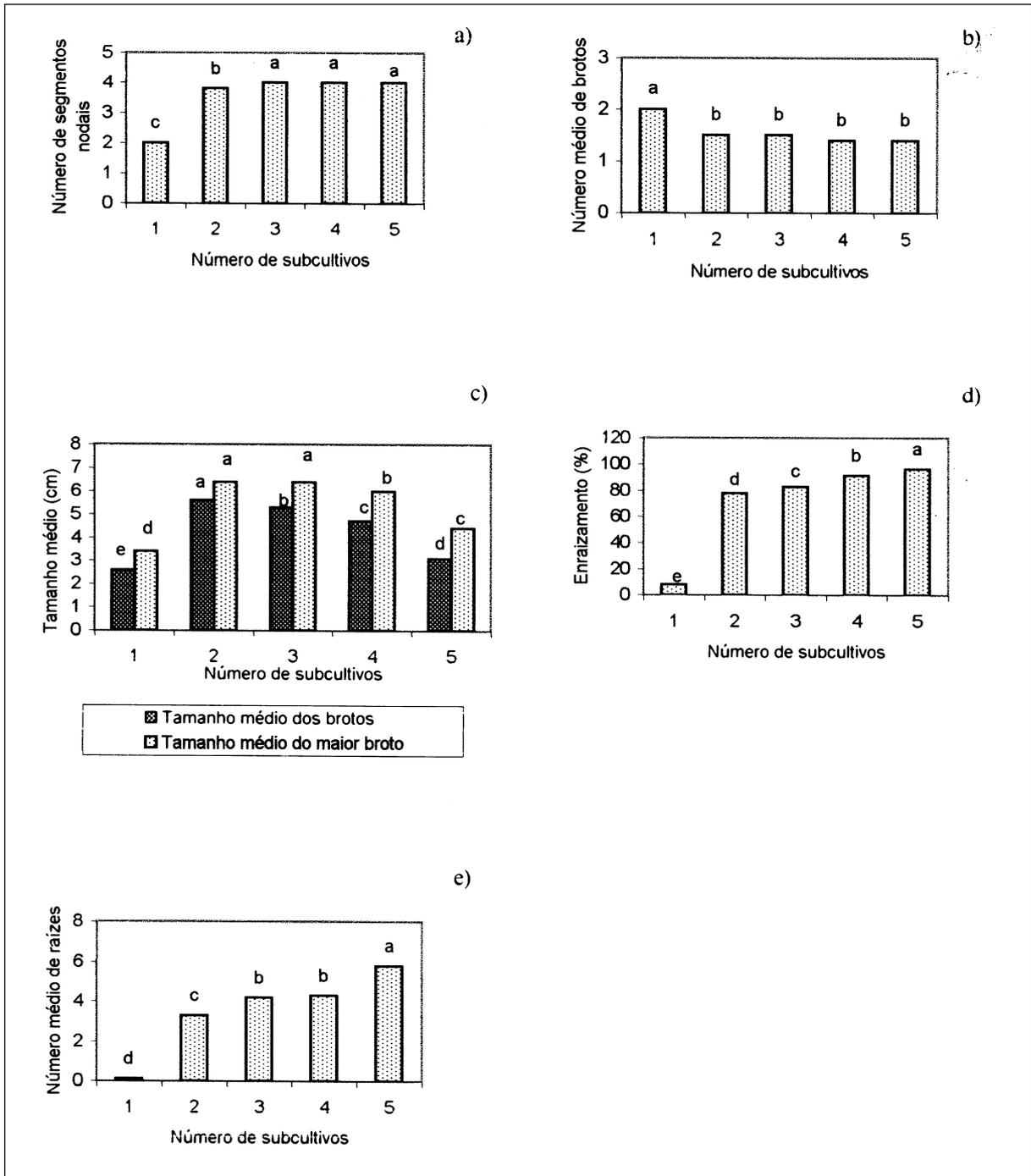


Figura 2 - Aspectos morfológicos de *P. tuberosa* no decorrer de cinco subcultivos *in vitro*. a) Efeito do subcultivo no número médio de segmentos nodais/explante; b) Efeito do subcultivo no número médio de brotações/explante; c) Tamanho médio dos brotos e tamanho médio do maior broto (cm) em função dos subcultivos; d) Percentagem média de explantes enraizados ao longo de cinco subcultivos; e) Efeito do subcultivo no número médio de raízes/explante. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan em nível de 1% de probabilidade de erro. Santa Maria, RS, 2005.

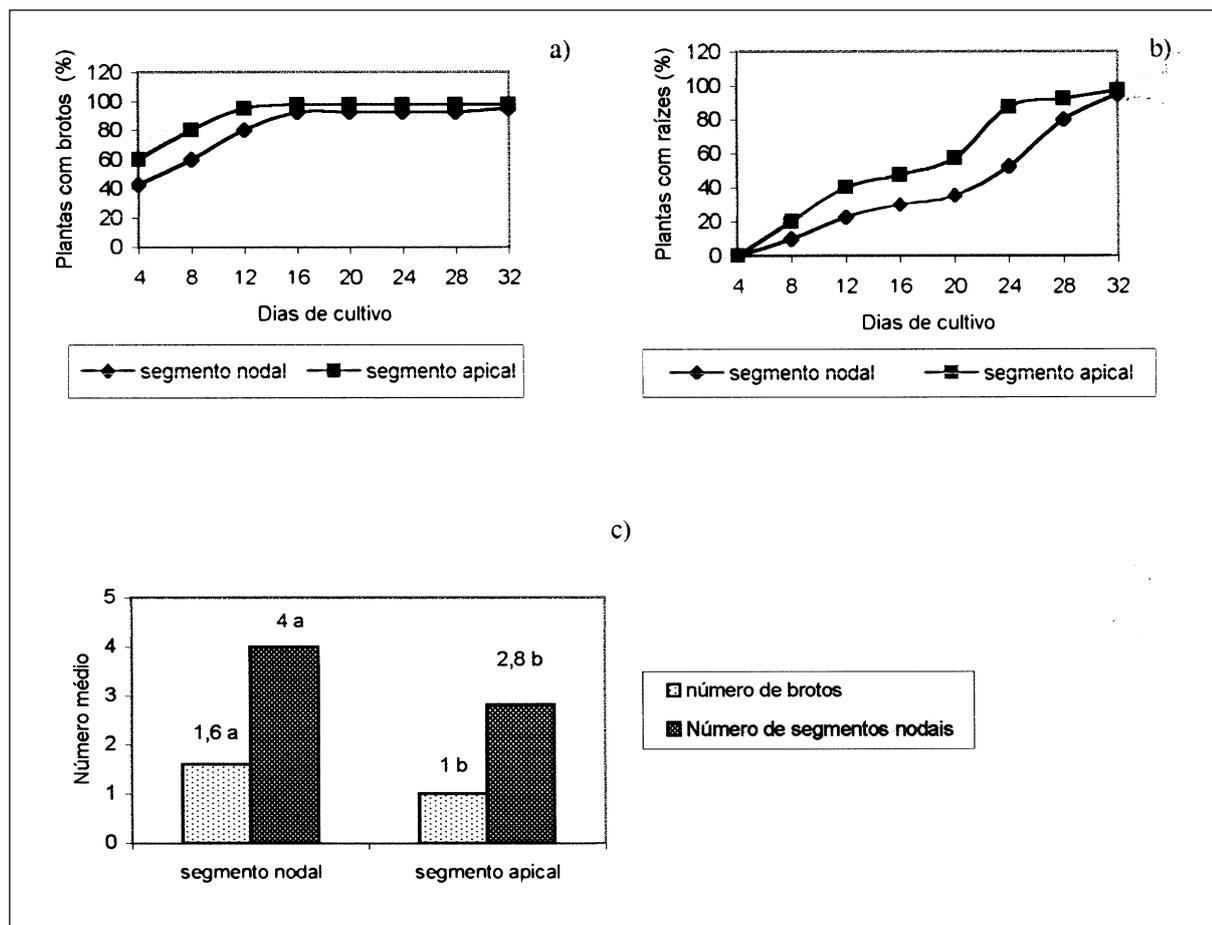


Figura 3 - Aspectos morfogênicos de segmentos nodais e segmentos apicais de *P. tuberosa*. a) Percentagem de regeneração de brotações em segmentos nodais e apicais ao longo de 32 dias de cultivo *in vitro*; b) Percentagem de regeneração de raízes em segmentos nodais e apicais ao longo de 32 dias de cultivo *in vitro*; c) Número médio de brotos e de segmentos nodais produzidos *in vitro* em função do tipo de explante, após 30 dias de cultivo. Média seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Duncan em nível de 1% de probabilidade de erro. Santa Maria, RS, 2005.

Plantas completas, pertencentes ao quinto subcultivo, foram utilizadas para a fase de aclimatização. Durante o período de avaliação, verificou-se que as mudas apresentaram uma intensa sensibilidade às novas condições ambientais, principalmente no que diz respeito às variações na umidade do ar. Conforme ZIV (1986) e CAMPOSTRINI & OTONI (1996), o estresse hídrico é geralmente o maior problema observado durante os procedimentos de transplante e aclimatização. Contudo, após 30 dias do transplante, registrou-se que 80% das plantas encontravam-se bem adaptadas às novas condições ambientais, iniciando o desenvolvimento de novas brotações. Não foram observadas alterações morfológicas nas plantas. Estes resultados mostraram-se superiores aos da metodologia proposta por MARTINS & NICOLOSO (2004), os quais obtiveram apenas 10% de sucesso na aclimatização de *P. tuberosa*.

De forma geral, a composição do meio e o ambiente *in vitro* alteram o desenvolvimento anatômico e fisiológico das plantas, levando a uma alta taxa de transpiração após o plantio. Estudos conduzidos por FABBRI et al. (1986) relataram que o crescimento vigoroso após o plantio depende do desenvolvimento de novas folhas mais adaptadas às condições *ex vitro*. De fato, o processo de adaptação de *P. tuberosa* foi intensificado à medida que novas brotações foram se desenvolvendo a partir da segunda semana após o transplante.

A metodologia desenvolvida é pioneira para a espécie e possibilitou com sucesso a propagação clonal. O protocolo de desinfestação descrito foi eficiente no estabelecimento de explantes assépticos e regenerativos. Segmentos apicais e nodais apresentaram excelente regeneração e desenvolvimento em meio MS. Considerando que cada

segmento nodal apresenta uma taxa de multiplicação de 4, dentro de um período de cinco meses de cultivo, o sistema utilizado produziria 1024 plantas completas. O processo de aclimatização de *P. tuberosa* deve ser conduzido em ambientes com alta umidade relativa, devido às plântulas serem muito suscetíveis à desidratação. O desenvolvimento das gemas apicais e laterais, bem como das raízes adventícias, ocorreu sem a necessidade de adição de fitoreguladores no meio de cultura, indicando que os explantes utilizados apresentaram um balanço hormonal adequado à organogênese.

CONCLUSÃO

Soluções do fungicida benomyl, álcool, hipoclorito de sódio e bicloreto de mercúrio foram eficazes para a desinfestação e regeneração de plantas a partir de segmentos nodais, os quais apresentaram uma maior taxa de multiplicação *in vitro* quando comparada à dos explantes apicais. A taxa de multiplicação não foi afetada no decorrer dos subcultivos, os quais devem ser feitos a cada 30 dias.

Na etapa de aclimatização, as mudas de *P. tuberosa* apresentaram um elevado índice de sobrevivência.

REFERÊNCIAS

- CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W.C. Aclimação de plantas: abordagens recentes. **ABCPT Notícias**, Brasília, n.25, p.2-10, 1996.
- DAVIES, P.J. **Plant hormones: and their role in plant growth and development**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. 679p.
- DEBERGH, P.C.; READ, P.E. Micropropagation. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation: technology and application**. London: Kluwer Academic, 1991. p.1-13.
- FABBRI, A. et al. Anatomical changes in persistent leaves of tissue-cultured strawberry plants after removal from culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.28, p.331-337, 1986.
- GEORGE, E. **Plant propagation by tissue culture – the technology**. Eversley : Exegetics, 1993. V.1.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. et al. (Ed). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1998. p.183-260.
- HUSSEY, G. Problems and prospects in the *in vitro* propagation of herbaceous plants. In: WITHERS, L.A.; ALDERSON, P.G. **Plant tissue culture and its agriculture applications**. London: Butterwoths, 1986. p.69-84.
- KLERK, G.J. How to measure somaclonal variation. **Acta Botanica Neerlandica**, Oxford, v.38, n.2, p.129-144, 1990.
- MAGALHÃES, P.M. **Agrotecnologia para o cultivo da Pfaffia**. Campinas: CPQBA-UNICAMP, 2002. 5p.
- MANTELL, S.H. et al. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: SBG, 1994. 344p.
- MARTINS, C.F; NICOLOSO, F.T. Micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.6, n.3, p.53-61, 2004.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C. Efeito do tipo de segmento nodal e tamanho do recipiente no crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, Edição especial, p.1499-1506, 2002.
- NICOLOSO, F.T. et al. Influência da posição da estaca no ramo sobre o enraizamento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em dois substratos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.2, p.277-283, 1999.
- NICOLOSO, F.T. et al. Micropropagação do Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.3, n.2, p.11-18, 2001.
- NISHIMOTO, N. et al. Ecdisterone from *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v.1, n.2, p.188-191, 1986.
- SKREBSKY, E.C. et al. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p.1471-1477, 2004.
- TASCETTO, O.M.; PAGLIARINI, M.S. Occurrence of 2n and jumbo pollen in the brasilian ginseng (*Paffia glomerata* e *P. tuberosa*). **Euphytica**, Dordrecht, v.133, p.139-145, 2003.
- ZIV, M. *In vitro* hardening and acclimatization of tissue culture plants. In: WITHERS, L.A.; ALDERSON, P.G. **Plant tissue culture and its agriculture applications**. London: Butterwoths, 1986. p.167-196.