

Sucrose and sorbitol on the *in vitro* conservation of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae).

Rejane Flores^{1,*}, Suzi Cerezer Uliana², Nathalia Pimentel², Tanea Maria Bisognin Garlet²

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the effect of sucrose and sorbitol during the *in vitro* conservation of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. Therefore, nodal segments derived from *in vitro* cultures were inoculated in a culture medium supplemented with sucrose concentrations (0, 20 and 30 g L⁻¹) combined with sorbitol concentrations (10, 20 and 40 g L⁻¹) plus the control treatment (30 g L⁻¹ sucrose). The results showed the possibility to maintain of the *P. tuberosa* plants for a 120 days period under slow growth in a medium supplemented with 10 g L⁻¹ of sorbitol, without sucrose.

Key-words: *In vitro* conservation, micropropagation, germoplasm, *Pfaffia*.

Sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae).

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. Para isso, segmentos nodais provenientes de plantas cultivadas *in vitro* foram inoculados em meio de cultura suplementado com concentrações (0, 20 e 30 g L⁻¹) de sacarose em combinação com concentrações (10, 20 e 40 g L⁻¹) de sorbitol, mais um tratamento controle (30 g L⁻¹ de sacarose). Os resultados mostraram a viabilidade de manter plantas de *P. tuberosa*, por um período de 120 dias, sob condições de crescimento reduzido, em meio acrescido de 10 g L⁻¹ de sorbitol, na ausência de sacarose.

Palavras-chave: conservação *in vitro*, micropropagação, germoplasma, *Pfaffia*.

Autora para correspondência.

^{1*} Professora do Instituto Federal Farroupilha, São Vicente do Sul, RS

² Departamento de Biologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS

INTRODUÇÃO

Atualmente, as plantas medicinais nativas estão sujeitas a uma intensa erosão genética devido principalmente à destruição de habitats, causado pela expansão das atividades agropecuárias, pela exploração predatória e outros fatores relacionados à ocupação humana. Diante disso, a conservação de germoplasma de espécies vegetais vem sendo muito utilizada, evitando-se assim o risco de extinção e permitindo que vários genótipos estejam disponíveis para utilização futura. Dentre os diferentes métodos de preservação de germoplasma, destaca-se a conservação *in vitro*, onde coleções de plantas são mantidas em condições laboratoriais, por longos períodos (Nass, 2001; Sarasan, et al., 2006), constituindo-se um dos métodos mais importantes para a conservação de recursos genéticos vegetais (Sarasan et al., 2006). Dentre as vantagens da conservação *in vitro*, destacam-se a manutenção dos genótipos em condições assépticas, a redução nos custos e mão-de-obra, a otimização do espaço físico, além da facilidade de intercâmbio do material vegetal (Engelmann, 2011).

Em geral, dois métodos vêm sendo adotados na conservação de plantas *in vitro*: a criopreservação e o crescimento lento. Na criopreservação, as plantas são conservadas em temperaturas ultra-baixas e, assim, há uma supressão completa do crescimento. Já no método crescimento lento, as plantas são submetidas a condições que reduzem ou suprimem o metabolismo das plantas *in vitro*, aumentando-se assim o intervalo entre os subcultivos, o que leva a uma redução da mão de obra, do espaço e custos para a manutenção das plantas (Scherwinski-Pereira, 2010). Dependendo do genótipo, a redução do crescimento pode ser feita através de modificações nas condições físicas de cultivo (redução na luminosidade /ou na temperatura da sala de crescimento) em conjunto ou não com modificações no meio de cultura (redução de sais, adição de osmorreguladores, adição de inibidores de crescimento e/ou inibidores de etileno) (George, 1996; Conceição et al., 1998; Sarasan et al., 2006).

Os carboidratos adicionados ao meio nutritivo afetam significativamente o crescimento e as respostas fisiológicas das plantas *in vitro*, atuando tanto como fonte de energia e de carbono como regulador osmótico do meio de cultura. Dependendo da concentração, osmorreguladores, como manitol, sorbitol, sacarose, dentre outros, ao serem adicionados ao meio de cultura, atuam removendo o excesso da água intracelular, por gradiente osmótico, fazendo com que o crescimento da cultura ocorra de

forma mais lenta (Dumet et al., 1993; Shibli et al., 2006) e, assim, possibilitando sua conservação. Recentemente, protocolos para a conservação *in vitro* de germoplasma de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, utilizando sacarose e sorbitol, foram desenvolvidos por Alves et al. (2006; 2010). Contudo, nos dias atuais, há poucas pesquisas referentes à conservação *in vitro* do gênero.

Pfaffia tuberosa, conhecida como corango-debatata, é uma espécie herbácea, com folhas opostas, caules retos pilosos ou quase glabros e inflorescência cimosa paleácea formada por flores pequenas e hermafroditas (Marchioretto et al., 2010). É uma planta perene, xerófita e heliófita, encontrando-se distribuída uniformemente em vários estados do Brasil, especialmente no bioma pampa. Adaptada às condições climáticas do sul do Brasil, esta espécie tolera bem o frio e a geada, porém se mantém bem desenvolvida e em florescimento durante a primavera e verão. Assim como outras espécies do gênero, *P. tuberosa* contem vários metabólitos secundários de interesse medicinal, como saponinas triterpênicas e o fitoecdisteróide β -ecdisona (Nishimoto et al., 1986), o qual se encontra em maior quantidade nas partes aéreas da planta (Flores et al., 2010).

Vários estudos já foram desenvolvidos tendo em vista a propagação clonal de *P. tuberosa* (Flores et al, 2006; Flores et al.; 2007; Flores et al., 2010), entretanto dados sobre a conservação de germoplasma da espécie são inexistentes até o momento. Desta forma, com este trabalho objetivou-se estudar o efeito de concentrações de sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* dessa espécie.

MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizaram-se plantas jovens de *P. tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae), coletadas no município de São Pedro do Sul, RS. Exsicatas encontram-se depositadas no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria, sob o número de SMDB 9840.

Brotos jovens oriundos de plantas adultas foram desinfestados como segue: 1) lavagem em água com detergente comercial (2 gotas/100mL) 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) por 10 minutos; 4) cinco lavagens consecutivas em água. Todas as etapas foram feitas sob agitação constante. Em seguida, segmentos nodais (com cerca de 1 cm) foram cultivados em meio MS (Murashige e Skoog, 1962), acrescido de sacarose (30 g L⁻¹), mio-inositol (100 mg L⁻¹) e ágar (6 g L⁻¹), segundo metodologia de micropropagação descrita por Flores et al. (2006).

Tendo em vista a conservação das plantas *in vitro*, segmentos nodais (1,0 cm) de plantas, pertencentes ao quarto subcultivo em meio de multiplicação, foram cultivados em meio MS com sais reduzidos a metade (MS/2) e suplementado com concentrações de sacarose (0, 20 e 30 g L⁻¹) e sorbitol (10, 20 e 40 g L⁻¹), além de um tratamento controle (30 g L⁻¹ de sacarose), totalizando dez tratamentos. A escolha do meio de cultivo, bem como dos carboidratos utilizados neste estudo baseou-se nos melhores resultados obtidos na conservação *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Alves et al., 2010).

Os explantes foram inoculados verticalmente em tubos de ensaio, contendo 10 mL de meio nutritivo. O pH foi ajustado para 5,8 e o meio foi autoclavado (1 atm, 121 °C) durante 20 minutos. A inoculação e a repicagem das culturas foram realizadas em câmara de fluxo laminar, em condições assépticas, colocando-se um explante por tubo de ensaio (25 mm de diâmetro, 150 mm de altura e 147,26 cm³ de volume interno). As plantas foram cultivadas em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C, 16 horas de fotoperíodo e 35 µM m⁻² s⁻¹ de luminosidade.

As avaliações foram realizadas aos 30, 60, 90 e 120 dias, observando-se a porcentagem de regeneração e crescimento dos brotos, o número de segmentos nodais e a coloração das folhas. A variável crescimento dos brotos (relação entre o tamanho final e inicial) foi realizada conforme metodologia de Fortes e Pereira (2001). Para a avaliação da coloração das folhas, utilizou-se a seguinte escala de notas: 1 - folha com coloração amarela/marrom (sintomas severos); 2 - folhas com coloração vermelho-violácea (sintomas intermediários); 3 - folhas com coloração verde e/ou vermelho-violácea (sintomas leves) e 4 - folhas com coloração verde (coloração normal, sem sintomas), conforme metodologia adaptada de Faria et al. (2006).

Após 120 dias de cultivo, segmentos nodais das plantas regeneradas no tratamento que apresentou os melhores resultados em relação ao crescimento lento, além do tratamento controle, foram subcultivadas em meio MS contendo 30 g L⁻¹ de

sacarose, conforme metodologia de propagação para essa espécie (Flores et al., 2006). Após 30 dias, as plantas foram avaliadas em relação aos parâmetros porcentagem de regeneração e crescimento, número de segmentos nodais, coloração das folhas e porcentagem de enraizamento.

Plantas completas foram aclimatizadas conforme metodologia de Flores et al. (2006) e a porcentagem de sobrevivência foi avaliada após 30 dias do transplantio para o substrato.

Utilizaram-se seis repetições, sendo cada repetição formada por cinco plantas. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso. A porcentagem de crescimento das plantas ao longo dos subcultivos foi avaliada através de regressão polinomial. Para os demais dados considerou-se somente a última avaliação, os quais foram submetidos à análise de variância e analisados pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. Os dados expressos em porcentagem foram transformados segundo arco seno raiz quadrada de (X/100), onde X significa o valor percentual obtido. Para a variável número de segmentos nodais, os dados foram transformados segundo a raiz quadrada de (X+1), onde X é o valor obtido por contagem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

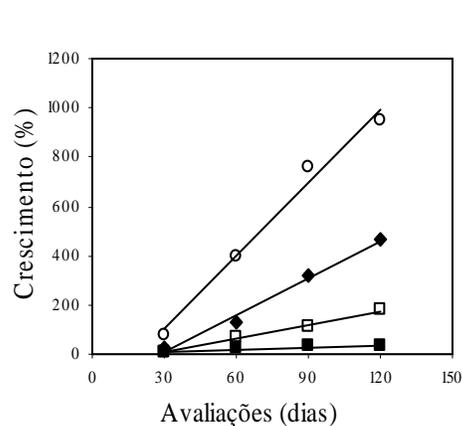
Da mesma forma que observado em *P. glomerata* por Alves et al. (2010), neste estudo, verificou-se que as concentrações de sacarose e sorbitol influenciaram significativamente o crescimento das plantas *in vitro* (Figura 1, Tabela 1). As plantas cultivadas em meio contendo somente sorbitol como fonte de carboidrato apresentaram as menores taxas de crescimento ao longo do tempo (Figura 1a). Apesar de a sacarose ter favorecido o crescimento das plantas na presença de 10 e 20 g L⁻¹ de sorbitol, essas apresentaram crescimento inferior ao controle (Figura 1b, 1c). O tratamento contendo 40 g L⁻¹ de sorbitol foi o que mais afetou negativamente o crescimento das plantas, sendo observado um leve incremento neste parâmetro com a adição de 30 g L⁻¹ de sacarose ao meio nutritivo (Figura 1c). De fato, outros estudos também relatam que a adição de sacarose tem um efeito benéfico no crescimento e desenvolvimento de plantas *in vitro* (Fortes e Pereira, 2001; Faria et al., 2006). Além de favorecer o crescimento das plantas, a

adição da sacarose no meio nutritivo mostrou-se benéfica para a regeneração de brotações naqueles tratamentos contendo 20 e 40 g L⁻¹ de sorbitol (Tabela 1). Em adição, independente da concentração de sacarose, registrou-se uma redução no crescimento das plantas com o aumento da concentração de sorbitol no meio nutritivo (Figura 1, Tabela 1). Da mesma forma, observou-se que o aumento da concentração de sorbitol reduziu a taxa de multiplicação *in vitro*, exceto no tratamento contendo 20 g L⁻¹ de sorbitol e 30 g L⁻¹ de sacarose, cuja taxa de multiplicação não diferiu significativamente em relação ao controle (Tabela 1).

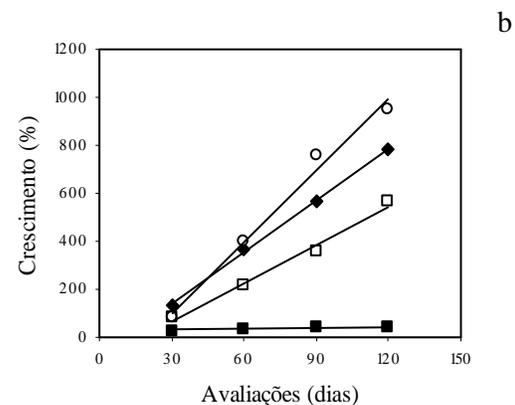
As células e tecidos *in vitro* normalmente requerem um carboidrato para suprir suas demandas energéticas, sendo a sacarose, a fonte de carbono mais amplamente utilizada *in vitro*, inclusive com o gênero *Pfaffia* (Maldaner et al., 2006). Na maioria das espécies, a sacarose influencia fortemente o potencial morfogênico (Al-Khateeb, 2008), favorecendo o desenvolvimento das plantas até uma determinada concentração, onde o crescimento e as respostas fisiológicas alteram-se em função do

potencial osmótico do meio. Então, conforme salienta Marino et al. (2010), a sacarose tem duplo papel na regulação da organogênese, atuando como fonte de energia/carbono e como osmorregulador.

Já o sorbitol (um açúcar álcool) é um dos carboidratos mais efetivos na indução do crescimento *in vitro* de espécies pertencentes à família Rosaceae, tendo nesta família de plantas um papel similar ao da sacarose (Li et al., 2012). Contudo, diferentemente das rosáceas, não são todas as espécies de plantas que possuem mecanismos para metabolizar o sorbitol. Assim, a redução no crescimento e nas respostas morfológicas das plantas de *P. tuberosa* em meio suplementado somente com sorbitol pode ser explicado pela possibilidade desta espécie não possuir o mecanismo bioquímico necessários para metabolizar o sorbitol. Neste caso, em *P. tuberosa*, o sorbitol atuaria exclusivamente como regulador osmótico, reduzindo o potencial hídrico do meio conforme o aumento da sua concentração, minimizando assim, o crescimento das plantas.



- ◆ 10 g L⁻¹ de sorbitol ($y = -138,8 + 4,9953x$ $R^2 = 0,9899$)
- 20 g L⁻¹ de sorbitol ($y = -52,4 + 1,908x$ $R^2 = 0,9918$)
- 40 g L⁻¹ de sorbitol ($y = 4,6 + 0,2727x$ $R^2 = 0,9217$)
- controle ($y = -196,4 + 9,912x$ $R^2 = 0,9852$)



- ◆ 10 g L⁻¹ de sorbitol ($y = -76,2 + 7,1873x$ $R^2 = 0,9989$)
- 20 g L⁻¹ de sorbitol ($y = -93,2 + 5,32x$ $R^2 = 0,9873$)
- 40 g L⁻¹ de sorbitol ($y = 25,7 + 0,1453x$ $R^2 = 0,8432$)
- controle ($y = -169,4 + 9,912x$ $R^2 = 0,9852$)

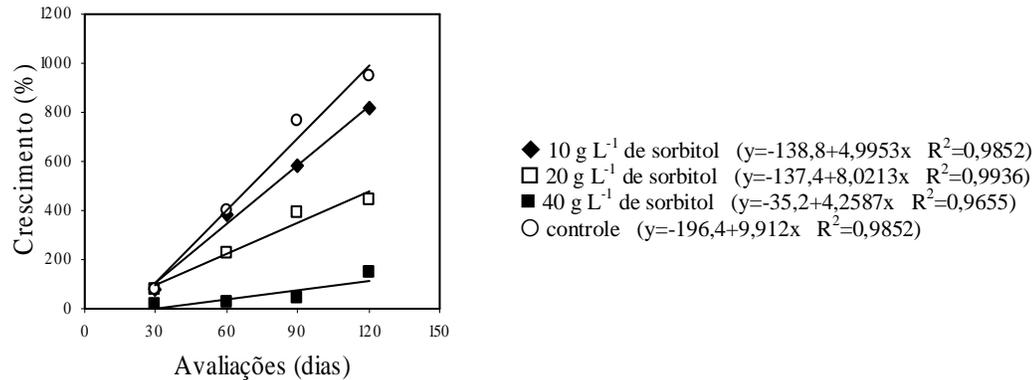


FIGURA 1. Efeito de concentrações de sorbitol e sacarose na percentagem de crescimento de brotações de *Pfaffia tuberosa*, ao longo de 120 dias de cultivo *in vitro*. a) Percentagem de crescimento dos brotos em função das concentrações de sorbitol em meio isento de sacarose; b) Percentagem de crescimento dos brotos em função das concentrações de sorbitol na presença de 20 g L⁻¹ de sacarose; c) Percentagem de crescimento em função das concentrações de sorbitol na presença de 30 g L⁻¹ de sacarose. Controle: meio nutritivo contendo somente 30 g L⁻¹ de sacarose.

Neste estudo, apesar de o sorbitol reduzir o crescimento das plantas e assim, favorecer sua conservação *in vitro*, o aumento da concentração desse carboidrato induziu sintomas de toxidez. Estes sintomas caracterizaram-se por modificações na coloração das folhas, as quais se alteraram de verdes para uma coloração vermelho-violácea, seguido de tons amarelos e marrons, além da presença de necrose e abscisão foliar. Conforme mostra a Tabela 1, maiores alterações na coloração das folhas foram observadas com o aumento da concentração de sorbitol, independente das concentrações de

sacarose. Por outro lado, em *P. glomerata*, melhores resultados em relação à redução do crescimento das plantas foram registrados com 4% de sorbitol (correspondente a maior concentração utilizada neste estudo) juntamente com 2% de sacarose, não sendo relatada a presença de sintomas de toxidez nas plantas (Alves et al. 2010). Da mesma forma, em *Passiflora giberti* N. E. Brown, o aumento na concentração de sorbitol não afetou a qualidade das plantas *in vitro* (Faria et al., 2006).

TABELA 1 – Percentagem de regeneração e crescimento das brotações, taxa de multiplicação e coloração das folhas de *Pfaffia tuberosa* em função de concentrações de sacarose e sorbitol, após 120 dias de cultivo *in vitro*.

Sacarose (g L ⁻¹)	Sorbitol (g L ⁻¹)	Regeneração (%)*	Crescimento (%)*	Número de segmentos nodais*	Coloração das folhas**
0	10	100,0 a	462,4 cd	7,9 ab	3,8 a
	20	84,1 ab	182,0 de	3,7 b	3,1 a
	40	77,0 ab	34,8 e	0,3 c	1,4 b
20	10	100,0 a	785,6 ab	11,6 a	3,4 a
	20	100,0 a	567,4 bc	13,7 a	3,0 a
	40	100,0 a	41,0 e	0 c	1,4 b
30	10	100,0 a	814,4 ab	9,0 ab	3,0 a
	20	100,0 a	466,6 cd	10,1 a	2,8 a
	40	96,6 ab	143,6 e	0 c	1,4 b
Controle		100,0 a	949,6 a	9,5 a	3,3 a

*Valores médios seguidos de mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro. **Onde: 1-folha com coloração amarela/marrom; 2-folha com cor vermelho-violácea; 3-folha verdes e/ou vermelho-violácea e 4-folhas com coloração verde.

De forma geral, observou-se que as plantas regeneradas nos tratamentos com 40 g L^{-1} de sorbitol apresentaram as menores taxas de crescimento, o que é desejável para a conservação *in vitro*, contudo essa concentração de sorbitol levou a uma redução significativa na taxa de multiplicação e na viabilidade (avaliada através da variável coloração das folhas) das plantas (Tabela 1). Outros estudos com o objetivo de conservar plantas em meio contendo sorbitol também registraram sintomas de toxidez (Lemos et al., 2002). Efeitos negativos de altas concentrações de carboidratos no crescimento *in vitro* também foram registrados por Al-Khateeb (2008).

Deve-se levar em consideração que durante a conservação *in vitro*, a planta deve se manter viável e com capacidade de retomar o crescimento normal após ser cultivada em meio que promova seu crescimento e multiplicação. Diante disso, neste estudo com *P. tuberosa*, os melhores resultados foram obtidos em meio contendo 10 g L^{-1} de sorbitol, onde os explantes apresentaram 100% de regeneração, as plantas apresentaram crescimento inferior a 50% em relação às plantas controle e, além disso, a maioria dos brotos não apresentaram sintomas de toxidez após 120 dias de cultivo (Tabela 1, Figura 2). Da mesma forma, melhores resultados em relação à conservação *in vitro* *Passiflora giberti* N. E. Brown foram registradas em meio suplementado com sorbitol e isento de sacarose (Faria et al., 2006), onde as plantas apresentaram um

menor crescimento *in vitro*.

Após o subcultivo das plantas conservadas, durante 120 dias em meio com 10 g L^{-1} de sorbitol, para um novo meio nutritivo utilizado para a micropropagação desta espécie (Flores et al., 2006), observou-se que os parâmetros percentagem de regeneração, coloração das folhas e percentagem de enraizamento não diferiram estatisticamente em relação ao controle (Tabela 2). Entretanto, as plantas cultivadas com 10 g L^{-1} de sorbitol apresentaram um leve declínio no crescimento e no número de segmentos nodais quando comparadas com o tratamento controle (meio de propagação suplementado 30 g L^{-1} de sacarose) (Tabela 2). Estes resultados indicam que as plantas cultivadas em presença do sorbitol sofreram um maior estresse fisiológico em relação àquelas regeneradas em meio com sacarose, o que se refletiu em um menor crescimento e formação de segmentos nodais após a transferência das plantas para um meio de propagação. No entanto, estes parâmetros não afetaram a viabilidade das plantas, as quais foram aclimatizadas com sucesso, apresentando 90% de sobrevivência.



FIGURA 2. Aspecto de plantas de *Pfaffia tuberosa* cultivadas em meio MS/2 acrescido de 30 g L^{-1} de sacarose (controle) (a) ou suplementado com 10 g L^{-1} de sorbitol (b), após 120 dias de cultivo *in vitro*.

TABELA 2. Percentagem de regeneração e crescimento, taxa de multiplicação, coloração das folhas e enraizamento de plantas regeneradas em meio contendo 10 gL⁻¹ de sorbitol e 30 gL⁻¹ de sacarose (controle), após subcultivo em meio MS por 30 dias.

Tratamentos	Regeneração (%)*	Crescimento (%)*	Nº segmentos nodais*	Coloração das folhas**	Enraizamento (%)*
Sorbitol (10 g L ⁻¹)	100 a	130 b	3,5 b	4,0 a	90,0 a
Controle	99 a	150 a	3,7 a	4,0 a	92,5 a

*Valores médios seguidos de mesma letra não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro. **Onde: 1-folha com coloração amarela/marrom; 2-folha com cor vermelho-violácea; 3-folha verdes e/ou vermelho-violácea e 4-folhas com coloração verde.

Após transferência das plantas para o solo, estas se mostraram bem adaptadas às novas condições ambientais, iniciando o desenvolvimento de novas brotações. Não foram observadas alterações morfológicas nas plantas. A metodologia descrita é pioneira para a espécie e poderá ser utilizada para a conservação de germoplasma *in vitro* de *P. tuberosa*, além de servir como subsídios para pesquisas com outras espécies pertencentes à família Amaranthaceae.

CONCLUSÃO

Pfaffia tuberosa pode ser conservada *in vitro*, sob condições de crescimento mínimo, durante 120 dias, em meio MS isento de sacarose e acrescido de 10 g L⁻¹ de sorbitol. As plantas voltam a se desenvolver quando se estabelece as condições normais de cultivo *in vitro*. Na etapa de aclimatização, as mudas conservadas apresentam um elevado índice de sobrevivência.

REFERÊNCIAS

Al-Khateeb AA. Regulation of *in vitro* bud formation of data palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Khanezi by different carbon sources. **Bioresource technology**, 2008; 99: 6550-6555.

Alves RBN. Brazilian ginseng [*pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] gemoplasm conservation. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2006, 8: p.1-4.

Alves, RBN, Bertoni BW, Vieira RF, França SC, Ming LC, Pereira MAS. Influência de diferentes meios de cultura sobre o crescimento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) para a conservação *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2010, 12: 510-515.

Conceição AM. Conservação *in vitro* de batata (*Solanum tuberosum*) cvs. Baronesa e santo amor: efeito sobre a formação de gemas e brotações dos segmentos caulinares. **Agropecuária Clima Temperado**, 1998, 1: 67-71.

Dumet D. Importance of source for de acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-letters**, 1993, 14: 243-250.

Engelmann F. Use of biotechnologies for the conservation on plant biodiversity. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, 2011, 47: 5-16.

Faria GA, Costa MAPC, Junghans TG, Ledo CAS, Souza AS. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N.E. Bronw. **Revista brasileira de Fruticultura**, 2006, 28: 267-270.

Flores R, Brondani D, Cezarotto V, Giacomelli SR, Nicoloso FT. Micropropagation and β -ecdysone content of the brazilian ginsengs *Pfaffia glomerata* and *Pfaffia tuberosa*. **In vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, 2010, 46: 210-217.

Flores R, Maldaner J, Nicoloso FT. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Ciência Rural**, 2006, 36: 845-851.

Flores R, Nicoloso FT, Maldaner J. Propagação clonal rápida de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. utilizando thidiazuron. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2007, 9: 1-7.

Fortes GRL, Scherwinski-Pereira JE. Preservação *in vitro* de batata com ácido salicílico e duas fontes de carboidrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 2001, 36: 1261-1264.

George E. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. Eversley: Exegetics Limited; 1996.

Lemos EEP, Ferreira MS, Alencar LMC, Neto CER, Albuquerque MM. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 2002, 37: 1359-1364.

Li F, Lei H, Zhao X, Tian R, Li T. Characterization of three sorbitol transporter genes in micropropagated apple plants grown under drought stress. **Plant Molecular Biology Reporter**, 2012, 30: 123-130.

Marchioretto MS, Miotto STS, Siqueira JC. O gênero *Pfaffia* Mart. (Amaranthaceae) no Brasil. **Hoehnea**, 2010, 37: 461-511.

Marino G, Negri P, Cellini A, Masia, A. Effect of carbohydrates on *in vitro* low-temperature storage of shoot cultures of apricot. **Scientia Horticulturae**, 2010, 126: 434-440.

Murashige T; Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 1962, 15: 473-497.

Nass LL. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: Nass LL, Valois ACC, Melo IS, Valadares-inglis MC, Editores. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT; 2001. p.30-55.

Nishimoto N. et al. Ecdisterone from *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 1986, 1: 188-191.

Sarasan, V. et al. Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in the past decade. **In vitro cellular developmental biology-plant**, v.42, p.206-214, 2006.

Sherwinski-Pereira JE, Costa FHS, Camillo J, Silva DB, Alves RBN, Vieira RF. Tissue cultures storage of Brazilian medicinal plants germoplasm. **Acta horticulturae**, 2010, 860: 211-241.

Shibli RD, Shatnawi MA, Subaih WS, Ajlouni MM. *In vitro* conservation and cryopreservation of plant genetic resources: a review. **World journal of agricultural sciences**, 2006, 2: 372-382.

Recebido: 25/05/2013
Received: 05/25/2013

Aprovado: 28/07/2013
Approved: 07/28/2013