

Avaliação de diferentes concentrações de auxinas e tipos de explantes na indução e crescimento de calos de *Cissus sicyoides* L., uma planta medicinal¹

Abreu, I.N.¹; Pinto, J.E.B.P.²; Bertolucci, S.K.V.³; Geromel, C.⁴; Castro, E.M.⁵

¹Bolsista CAPES - Depto Fisiologia Vegetal – UNICAMP. inabreu@obelix.unicamp.br; ²Prof. Titular - Depto Agricultura – UFLA. jeduardo@ufla.br (autor para correspondência); ³Profa. Assistente - Depto de Agricultura - UFLA; ⁴Iniciação Científica - CNPq - UFLA; ⁵Prof. Adjunto - Depto Biologia – UFLA, Universidade Federal de Lavras, Cx. P. 37, Lavras, MG, 37200-000, Brasil.

RESUMO - *Cissus sicyoides* L. é uma espécie da região amazônica utilizada no controle de estados epilépticos e diabetes. Foi estabelecido um protocolo *in vitro* para a indução e manutenção de calos desta espécie, que permitirão estudos posteriores sobre regulação e produção de compostos de interesse. Para possibilitar a cultura de calos, procedeu-se à escolha do melhor tipo de explante bem como do melhor tipo e concentração de auxina. Posteriormente, foram determinadas as condições para a manutenção dos mesmos e especificou-se as fases de crescimento celular. Folhas de plântulas estabelecidas *in vitro*, foram os explantes que promoveram os melhores calos, em meio MS suplementado com 21,9 mM de ANA, no escuro, os quais apresentaram-se amarelados e friáveis. A curva de crescimento de calos avaliada até o trigésimo dia, apresentou as fases lag, log, linear e desaceleração e, não foi necessário reduzir as concentrações de sacarose para a manutenção dos mesmos.

Palavras Chave: auxinas, plantas medicinais

ABSTRACT - *Cissus sicyoides* L. is an amazonic species and it is used to control diabetes and epileptic. A protocol for callus induction and maintenance was established for this species and can now be used for further studies on the regulation and production of secondary metabolites *in vitro*. To turn the callus production possible it was choose the better explant type as well as the better type and better auxin concentration. It were found the condition to maintain those callus and was specified the growth phases. The leaves from plantlets were the explants who gave better callus on MS medium supplemented with 21.9 μ M of NAA in the dark, which showed yellow color and friable. The callus showed three growth phases and it was not necessary to lower sucrose concentrations to maintain callus growth.

Key words: auxins, plants medicinal

INTRODUÇÃO

Cissus sicyoides L., também conhecida como insulina vegetal, cipó-pucá e anil trepador, é uma trepadeira da América Tropical pertencente à família Vitaceae. É encontrada na Região Amazônica. Esta espécie é usada, popularmente, no tratamento de diabetes, controle de estados epilépticos, sudorífico, hipotensor e no tratamento de doenças do coração (Silva, 1995). Dos seus frutos podem ainda ser extraídos pigmentos utilizados como corantes alimentícios (Toledo, 1983). Esta espécie contém alcalóides, flavonóides (Albuquerque, 1989), esteróides, saponinas, compostos fenólicos (Silva, 1995) e antocianinas (Toledo, 1983) e tem atividade farmacológica comprovada no tratamento de convulsão, doenças do coração (Costa, 1990) e no controle de diabetes crônica (Pepato, 1998).

Calos é um tecido relativamente indiferenciado consistindo, principalmente, de células

parenquimatosas. O tecido do calos é usado para estudos em citologia de plantas, fisiologia, morfologia, anatomia, bioquímica, patologia, genética e produção e acúmulo de metabólitos secundários (Trigiano & Gray, 2000). Um dos fatores mais importantes para se obter a calogênese, é a escolha do explante, uma vez que o potencial morfogenético para induzir o calos, geralmente, varia com o tipo e origem do explante (Bhau & Wakhlu, 2001).

Não há referências sobre a produção de calos *in vitro* desta espécie. Portanto, o principal objetivo do presente trabalho foi verificar os efeitos de diferentes concentrações de auxinas e diferentes tipos de explantes na indução e crescimento de calos, que poderão ser utilizados, posteriormente, para o estudo da biossíntese de metabólitos com importância farmacológica.

MATERIAL E MÉTODO

CONDIÇÕES GERAIS DOS EXPERIMENTOS

O presente trabalho foi realizado no La-

Recebido para publicação em 12/12/2001 e aceito para publicação em 27/08/2002.

boratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras (MG), Brasil, no período de junho de 1996 à outubro de 1997. Exsiccatas estão depositadas no Herbário ESAL do Departamento de Biologia da UFLA, sob registro número 10976

Para a condução dos experimentos foram obtidas plantas matrizes propagadas por meio de estacas de ramos, utilizando-se substrato comercial Plantmaxã, em casa de vegetação.

Para a inoculação de materiais vegetais provenientes da casa de vegetação, os explantes foram desinfestados sob lavagem em água corrente, por 30 minutos e imersos em hipoclorito de sódio comercial a 30% (pH 6,0) por 15 minutos e, posteriormente, em condições assépticas, os explantes foram lavados por seis vezes em água destilada esterilizada.

Em todos os experimentos, os explantes foram inoculados em frascos de 250 mL, contendo 30 mL de meio. As culturas foram mantidas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, sendo que aquelas cultivadas na presença de luz foram submetidas a 16 horas de irradiância a $12,5 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Após 30 dias, as culturas foram avaliadas quanto à matéria seca dos calos formados, coloração, friabilidade e número de raízes. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando os níveis de significância de 1%.

EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D E ANA NA INDUÇÃO DE CALOS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE LUZ

Folhas jovens obtidas das plantas matrizes, com um ano de idade, mantidas em casa de vegetação, foram utilizadas como explante. Após a desinfestação, os explantes foram excisados em tamanhos de 1cm^2 e inoculados em meio de cultura de Murashige & Skoog (1962) - MS, contendo 3% de sacarose, 0,65% de ágar sendo suplementado com: 0,0; 0,44; 2,2; 4,4 e 9,0 mM de 2,4-D e 0,0; 0,54; 2,7; 5,4; 10,8 e 21,6 mM de ANA. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. As culturas foram então, mantidas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ no escuro e na luz. O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado num fatorial de 5×6 , com sete repetições, sendo cada parcela composta por três frascos com três explantes cada.

EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D E ANA E DIFERENTES TIPOS DE EXPLANTES NA INDUÇÃO DE CALOS

Foram utilizadas folhas jovens, gemas apicais e internódios jovens obtidos das plantas matrizes. Após desinfestação os explantes foram inoculados (1cm^2) em meio de cultura MS com sacarose 3%, solidificado com ágar 0,65% e suplementado com a interação: 0,0; 0,22; 0,45 e 0,9 mM de 2,4-D e 0,0; 10,8 e 21,6 mM de ANA,

mantidas no escuro. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial de $4 \times 3 \times 3$, com quatro repetições, sendo cada parcela composta por dez frascos, contendo três explantes em cada recipiente.

EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE ANA E SACAROSE NO CRESCIMENTO DE CALOS

Calos com 30 dias foram repicados e inoculados, com um tamanho de 1cm^2 , em meio de cultura MS, 0,65% de ágar, sendo suplementado com a interação: 0,0; 10,8 e 21,6 mM de ANA com 2 e 3% de sacarose, mantidas no escuro. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial de 3×2 , com sete repetições, sendo cada parcela composta por vinte frascos, contendo três explantes em cada recipiente.

EFEITO DA FONTE DE ORIGEM DO EXPLANTE NA INDUÇÃO DE CALOS

Calos foram induzidos a partir de folhas jovens retiradas das plantas matrizes mantidas em casa de vegetação e de plântulas pré-estabelecidas *in vitro*. Os explantes foram excisados no meio da nervura central e, individualizados em tamanho aproximado de 1cm^2 . Posteriormente, foram inoculados em meio de cultura de MS, contendo 0,65% de ágar, 3% de sacarose e suplementado com 21,6 mM de ANA. As culturas foram mantidas no escuro.

CURVA DE CRESCIMENTO DE CALOS

Para o estabelecimento da curva de crescimento celular foram utilizados calos induzidos a partir de folhas de plântulas de *C. sicyoides* estabelecidas *in vitro*, com tamanho de 1cm^2 em meio de cultura de MS, contendo 3% de sacarose, solidificado com 0,65% de ágar e, suplementado com 21,6 mM de ANA, sob regime de escuro. Os calos foram mantidos no mesmo meio de indução. Após o segundo subcultivo foi determinada a curva de crescimento dos calos, os quais foram pesados em intervalos de 3 em 3 dias, durante 30 dias. A determinação da matéria seca foi obtida após permanecerem em uma estufa de circulação forçada de ar com uma temperatura de 45°C por 36 horas. Foram utilizados 12 repetições para cada intervalo.

ANATOMIA FOLIAR

Folhas de *C. sicyoides* foram fixadas em F.A.A. (fenol, ácido acético glacial e álcool etílico 70°GL), por 72 horas (Johansen, 1940) e, posteriormente, conservadas em álcool etílico 70°GL . As lâminas permanentes das folhas, foram preparadas segundo técnicas usuais de inclusão em parafina, após desidratação em série alcoólica etílica (Johansen, 1940; Sass, 1951). Os cortes

foram seccionados com auxílio de micrótomo rotatório, em séries orientadas transversalmente e, submetidos ao processo de coloração com safrablau (safranina – azul de astra) (Bukatsh, 1972).

RESULTADO E DISCUSSÃO

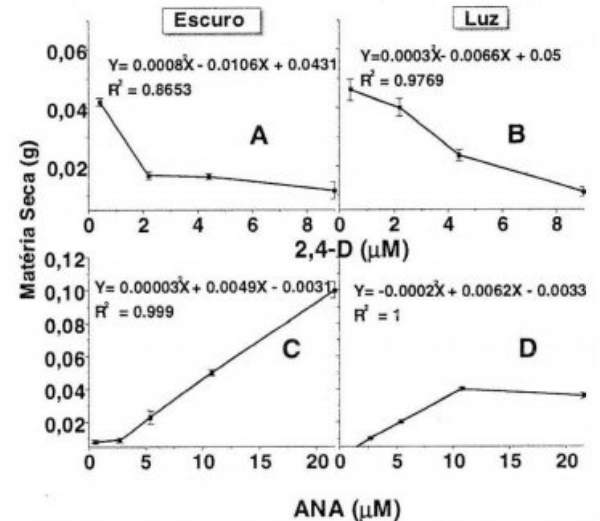
EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D E ANA NA INDUÇÃO DE CALOS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE LUZ

Quando uma parte da planta é danificada, uma resposta ao ferimento é induzida para reparar a porção danificada. Esta resposta consiste, inicialmente, na indução da divisão das células adjacentes à lesão, as quais repararão o ferimento. Isto é seguido pelo depósito de lignina, suberina, cera, dentre outras substâncias; para dar proteção à planta. Se, entretanto, este fragmento for inoculado em meio de cultura definido, a resposta ao início da divisão celular pode ser estimulada e induzida através da influência exógena de reguladores de crescimento. Assim, fragmentos de folhas jovens de *Cissus sicyoides* foram inoculados em meio de cultura, a fim de determinar uma indução na divisão celular. Verificou-se que dentre as auxinas estudadas, o ANA foi a mais efetiva na indução de calos, no entanto, notou-se que esse regulador em baixas concentrações (0,54 e 2,7 mM) inibiu a formação de calos em folhas jovens de *C. sicyoides*. Foram observados cobertura total dos explantes pelos calos, nas concentrações de 10,8 mM de ANA, tanto na luz como no escuro e, 21,6 mM de ANA somente no regime de escuro. Observou-se, também que a maior indução ocorreu com a auxina ANA no regime de escuro. Os calos apresentaram-se com uma consistência friável e, com uma coloração branco-amarelada, ao contrário dos calos induzidos na luz que apresentaram uma coloração marrom e pouco friáveis. Nos tratamentos com 2,4-D, apesar de ocorrer indução de calos em todas as concentrações, na presença ou não de luz, estes apresentaram-se pouco friáveis, com uma coloração marrom, com exceção da menor concentração (0,4mM).

Os calos que cresceram na presença de ANA, revelaram maior ganho de matéria seca quando expostos a concentração de 21,6 mM no regime de escuro, enquanto que na presença de luz a concentração mais eficiente foi de 10,8 mM de ANA (Figuras 1C e 1D). Os calos induzidos nos tratamentos com 2,4-D, obtiveram um maior ganho de matéria seca na concentração de 0,4 mM, sendo que nas concentrações mais elevadas ocorreu um decréscimo (Figuras 1A e 1B). Os reguladores de crescimento mostraram uma diferença no ganho de matéria seca. Os calos induzidos na melhor concentração de 2,4-D, na presença ou não de luz, tiveram um menor ganho de matéria seca

quando comparados com os melhores tratamentos contendo ANA no regime de escuro.

FIGURA 1. Matéria seca de calos de folhas jovens de *Cissus sicyoides* com 30 dias, induzidos em diferentes concentrações de 2,4-D (A e B) e ANA (C e D) no escuro e na luz.



A cultura de calos é uma forma de estudar a regulação da síntese de uma série de metabólitos secundários. Durante a indução de calos, em espécies com potencial medicinal, deve-se ter a preocupação em utilizar reguladores de crescimento que não interfiram na síntese de metabólitos secundários de interesse. O regulador de crescimento 2,4-D, é considerado o mais eficiente para a indução de calos, mas há vários relatos da sua interferência na síntese de diversos compostos secundários de interesse. O regulador de crescimento ANA, é eficiente na indução de calos e, há poucos relatos da sua interferência na síntese de compostos de interesse (Guang-Zhi, 1989 e Jonard, 1991).

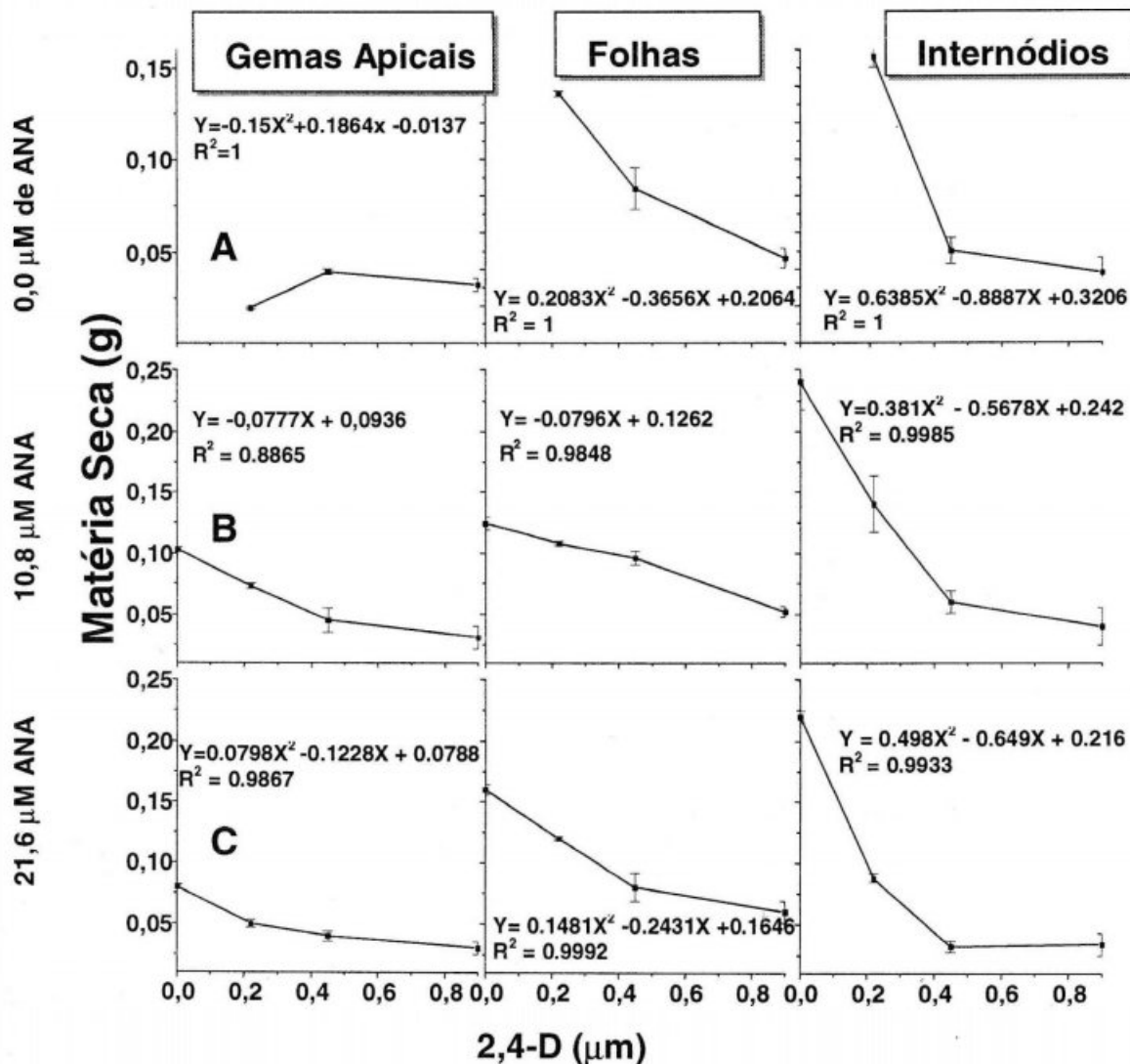
EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE 2,4-D E ANA E DIFERENTES TIPOS DE EXPLANTES NA INDUÇÃO DE CALOS

Um dos fatores mais importantes para se obter calogênese é a escolha do explante, uma vez que o potencial morfogênético dos calos, geralmente, varia com a origem do explante. A variação na habilidade de diferentes explantes formarem calos tem sido reportada por Bhau & Wakhlu, 2001.

Observou-se a formação de calos em todos os tratamentos, no entanto, à medida que a concentração de 2,4-D aumentou, houve um início de necrose nos calos formados.

Os explantes caracterizados por internódios e folhas mostraram-se os mais eficientes para a formação de calos, do que as gemas apicais tanto na ausência de ANA, como na interação

FIGURA 2. Matéria seca de calos de *Cissus sicyoides*, obtidos a partir de diferentes explantes (gema, folha e internódios) e submetidos a diferentes interações de 2,4-D com 0,0 (A), 10,8 (B) e 21,6 (C) mM de ANA com 30 dias.



ANA/2,4-D (Figura 2). Nas concentrações de 10,8 e 21,6 mM de ANA, os maiores ganhos de matéria seca dos calos ocorreram na ausência de 2,4-D nos três explantes testados (Figuras 2B e 2C). Os calos formados nestas concentrações apresentaram consistência friável e coloração branco-amarelada.

O ganho de matéria seca dos calos, no explante folha, foi crescente com o aumento das concentrações de ANA para a maioria dos tratamentos e, decrescente com o aumento das concentrações de 2,4-D. Resultado semelhante foi obtido por Roberts (1989), que obteve um crescimento máximo de calos de *Ailanthus altissima* em meio de cultura contendo 21,6 mM de ANA e, em trabalhos posteriores, foi mostrado que esta concentração não afetou a síntese do composto poliacetileno, produzido em suspensão celular.

O explante segmento internodal, apesar de ter proporcionado calos com maior ganho de matéria seca, não é ideal para a indução de ca-

los, para a espécie em estudo, pois ocorre o crescimento e desenvolvimento de raízes. A folha, portanto é o explante mais adequado para a indução de calos em *C. sicyoides* na presença de 21,6 mM de ANA no escuro.

EFEITO DE CONCENTRAÇÕES DE ANA E SACAROSE NO CRESCIMENTO DE CALOS

A permanência dos calos, por muito tempo, no meio de indução pode favorecer a ocorrência de diferenciação celular ou ocasionar um início de necrose, devido à exaustão de nutrientes e acúmulo de substâncias tóxicas. Uma forma de manter os calos num estado não - diferenciado, mas em plena proliferação e, evitar a formação de necrose é através das repicagens destes para um novo meio de cultura.

Na avaliação da interação entre ANA e sacarose, foi verificado que com 2% de sacarose, o maior ganho de matéria seca ocorreu na concentração de 10,8 mM de ANA, onde os calos

TABELA 1. Matéria seca (g) e coloração de calos de *Cissus sicyoides*, produzidos a partir de diferentes concentrações de ANA e sacarose com 30 dias.

Tratamentos		Matéria seca (g)	Coloração
ANA (μ M)	Sacarose (%)		
0	2	0,022c	Marron
10,8	2	0,079b	Branco-amarelado
21,6	2	0,039c	Marron
0	3	0,034c	Marron
10,8	3	0,098a	Branco-amarelado
21,6	3	0,097a	Branco-amarelado

apresentaram-se com uma coloração branco-amarelada e consistência friável. Com 3% de sacarose, o ganho de matéria seca foi maior e, não diferiu nas concentrações de 10,8 e 21,6 mM de ANA (Tabela 1), os quais apresentaram-se branco-amarelados e friáveis. Embora, as concentrações de 10,8 e 21,6 mM de ANA não tenha mostrado diferença estatística no ganho de matéria seca com 3% de sacarose, a menor concentração mostrou-se mais adequada para manter os calos com poder de proliferação, visto que estes apresentaram melhor aparência, além de ser mais vantajoso, do ponto de vista econômico. Resultados semelhantes foram obtidos por Bajaj & Simola (1991) para a manutenção de calos de *Atropa belladonna* L. (Solanaceae).

Normalmente, a indução de calos requer concentrações mais elevadas de auxinas para ocasionar a divisão celular ao redor da região lesionada no explante primário. Entretanto, para a manutenção de calos, não é necessária a adição de elevadas concentrações de auxinas, mas apenas o necessário para a manutenção do metabolismo celular. Além disso, na fase de manutenção, as células estão mais homogêneas e as condições de crescimento (meio de cultura e fatores de crescimento físico) continuam sendo as mesmas da indução. Em uma planta medicinal da Índia, *Coleus forskohlii* Briq. (Lamiaceae), Reddy *et al.* (2001) observaram que, quando aumentaram a concentração do regulador de crescimento, a taxa de crescimento do calos decrescia. Assim, a manutenção de calos de *C. sicyoides* poderá ser realizada em meio de cultura contendo 10,8 mM de ANA com 3% de sacarose e no regime de escuro.

EFEITO DA FONTE DE ORIGEM DO EXPLANTE NA INDUÇÃO DE CALOS E ANATOMIA FOLIAR

Não somente o tipo de explante pode influenciar na indução de calos, mas a fonte e a época de colheita do material. A partir das diferentes origens dos explantes, observou-se que o ganho médio de matéria seca foi de 56 mg para o explante proveniente de casa de vegetação e 245 mg para os explantes oriundos de plântulas obtidas *in vitro*. Este aumento na matéria seca obtido

da fonte *in vitro*, correspondeu um ganho de 437% a mais do que o explante proveniente da casa de vegetação. Uma explicação para isto, é a hipótese que o nível de auxina endógena tenha aumentado no explante durante o cultivo *in vitro*. Jain & Datta (1992) usaram explantes de *Morus bombycis* Koidz, provenientes da cultura *in vitro* e, também, obtiveram um maior ganho.

Os calos oriundos de plântulas estabelecidas *in vitro*, apresentaram uma massa celular mais uniforme, do que os calos obtidos a partir de plantas mantidas em casa de vegetação. No tecido proveniente de casa de vegetação, foi possível visualizar uma diferenciação das células do parênquima, as quais apresentaram tamanhos diferenciados com presença de rafídeos e drusas. O tecido foliar proveniente de cultura de tecidos, apresentou uma formação de células não diferenciadas, as quais possuem tamanhos semelhantes (dados não mostrados).

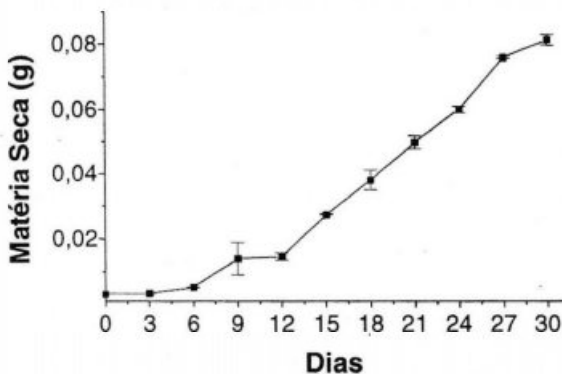
Em teoria, para a indução de calos, qualquer tecido pode ser utilizado como explante, devido à totipotência dos tecidos vegetais. Mas, na prática, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou menos diferenciado (Grattapaglia e Machado, 1990). Uma vez que, segundo Kerbauy (1998), para o estabelecimento de culturas a partir de células maduras (vacuoladas) é necessário que estas sofram desdiferenciação. No entanto, se no tecido houver apenas células não diferenciadas, estas estarão aptas a entrarem em divisão celular imediatamente.

O explante oriundo de plântulas estabelecidas *in vitro* sobressaiu em relação ao ganho de matéria seca, uma vez que estes apresentaram um tecido menos diferenciado quando comparado com o tecido proveniente de casa de vegetação. O tecido menos diferenciado apresenta maior potencial para ocorrer a divisão celular, porque não há a necessidade das células desdiferenciarem-se e, estas apenas multiplicaram-se. Dessa forma, a utilização de explantes oriundos de casa de vegetação, durante os períodos de inverno, para a indução de calos, deve ser evitada dando-se prioridade para folhas de plântulas estabelecidas *in vitro*.

CURVA DE CRESCIMENTO DE CALOS

Através da Figura 3, observa-se a curva de crescimento dos calos de *Cissus sicyoides* avaliados dentro de um período de 30 dias. A fase lag, na qual as células preparam-se para a divisão celular e, onde são metabolizadas uma série de enzimas para originar novos substratos, ocorreu até o sexto dia. A fase logarítmica (crescimento exponencial) iniciou-se no sexto dia estendendo-se até vigésimo sétimo dia. Após esse período, o crescimento dos calos mostraram uma tendência a entrar na fase de desaceleração de crescimento, sendo que não foi possível evidenciar o final da fase de declínio do crescimento celular, pois tornou-se impossível realizar as avaliações, devido os calos terem revelado uma aparência física característica de senescência, bem como modificação na coloração, apresentando-se bastante escurecidos.

FIGURA 3. Curva de crescimento, a partir da matéria seca de calos de *Cissus sicyoides* até aos 30 dias de cultivo.



Segundo Hirose *et al.* (1990), esse declínio mitótico contrasta com a propriedade das células, de algumas espécies, produzirem algum tipo de metabólito secundário. Por isso, é importante definir os períodos das fases de desaceleração e estacionária, pois são nestas fases que podem ocorrer o acúmulo de metabólitos secundários na maioria das espécies com potencial medicinal. Como por exemplo, em *Catharanthus roseus* o acúmulo dos alcalóides ajmalicine e serpentine é máximo durante a fase estacionária (Sakuta e Komamine *et al.*, 1987) mas, isto não é regra geral, porque na fase logarítmica, também, pode ocorrer a produção de metabólitos secundários (Jayakumar, 1992).

A partir dos resultados obtidos neste trabalho sugerimos a realização de análises fitoquímicas, nas diferentes fases de crescimento, para se saber em qual delas ocorre o acúmulo de substâncias de interesse e, em função destes resultados, será possível a determinação da época em que as repicagens de manutenção deverão ser realizadas nos calos desta espécie.

AGRADECIMENTO

À CAPES, CPNq e FAPEMIG pelo apoio financeiro (bolsas e auxílio-pesquisa).

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALBUQUERQUE, J. M. D. **Plantas medicinais de uso popular**. Brasília: ABEAS, 1989. 96p. (Programa de agricultura nos Trópicos, 6)
- BAJAJ, Y.P.S., SIMOLA, L.K. *Atropa belladonna* L. *in vitro* culture, regeneration of plants, cryopreservation and the production of tropane alkaloids. In: BAJAJ, Y.P.S. **Medicinal and aromatic plants II**. Berlin: Springer – Verlag, 1991. p. 1-21. (Agriculture and Forestry, 3)
- BHAU, B.S., WAKHLU, A.K. Effect of genotype, explant type and growth regulators on organogenesis in *Morus alba*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.66, p 25-9, 2001.
- BUKATSH, F. Benerkungen Zur doppelfarbung astrablau-sefranina. **Microkosmos**, v.61, p.255-9, 1972.
- COSTA, C. M. M. **Cipó-pucá** (*Cissus sicyoides*). Rio de Janeiro: UFRJ, 1990. (Curso de Especialização em Medicamentos)
- GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA – CNPH, 1990. p. 99 – 169.
- GUANG-ZHI, Z. *Anisodus acutangulus*: production of scopolamine and hyoscyamine in cell culture. In: BAJAJ, Y.P.S. **Medicinal and Aromatic Plants I**. Berlin: Springer – Verlag, 1989. p. 23-46. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 1)
- HIROSE, M., YAMAKAWA, T., KODAMA, T. et al. Accumulation of betacyanin in *Phytolacca americana* cells and of anthocyanin in *Vitis* sp. cells in relation to cell division in suspension culture. **Plant Cell Physiology**, v. 31, p. 267-1, 1990.
- JAIN, A. K., DATTA, R. K. Shoot organogenesis and plant regeneration mulberry (*Morus bombycis* Koiz.): Factors influencing morphogenetic potential in callus cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.29, p.43-50, 1992.
- JAYAKUMARAN, A., SUDHAKARAN, P.R., RAO, M. et al. Berberine synthesis by callus and cell suspensions cultures of *Coscinium fenestratum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.29, p.7-10, 1992.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw-Hill, 1940. 523p.
- JONARD, R. *Jasminum spp* (Jasmine): micropropagation and the production of essential oils. In: BAJAJ, Y.P.S. **Medicinal and Aromatic Plants I**. Berlin: Springer-Verlag, 1991. p.315-30. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 1)
- KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação de plantas**. 2.ed. Brasília: Embrapa, 1998. p.519-31.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v.15, p.473-97, 1962.

- PEPATO, M.T., KELLER, E.H., SILVA, M.P.M. et al. Efeito da administração crônica de *Cissus sicyoides* no metabolismo de carboidratos. SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS, 1998, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia, 1998.
- REDDY, P.S., RODRIGUES, R., RAJASEKHARAN, R. Shoot organogenesis and mass propagation of *Coleus forskohlii* from leaf derived callus, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.66, p. 183-8, 2001.
- ROBERTS, M.F. *Ailanthus altissima* (The tree of heaven): In vitro culture and the formation of alkaloids and quassinoids. In: BAJAJ, Y.P.S. **Medicinal and aromatic plants III**. Berlin: Springer-Verlag, 1989. p.39-72. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 1)
- SAKUTA, M., KOMAMINE, A. Cell growth and accumulation of secondary metabolites. In: CONSTABEL, F., VASIL, I.K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. Flórida: Academic Press, 1987. v.4, p.597-614.
- SASS, J. **Botanical microtechnique**. IOWA: College Press, 1951. 228p.
- SILVA, G.A. **Caracterização e padronização farmacognóstica da droga e extrato fluído de *Cissus sicyoides* L.** 1995. 167p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo.
- TOLEDO, M.C.F., REYS, F.G.R., IADEROZA, M. et al. Anthocyanins from anil trepador (*Cissus sicyoides*). **Journal Food Science**, v. 48, p. 1368 -9, 1983.
- TRIGIANO, R.N., GRAY, D.J. **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. Boca Raton: CRC Press, 2000. 454p.