

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES AUXINAS NA INDUÇÃO E CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE CALOS DE *Uncaria guianensis* J. F. GMEL. (UNHA DE GATO)

INFLUENCE OF DIFFERENT AUXINS ON THE INDUCTION AND KINETIC GROWTH OF *Uncaria guianensis* J. F. GMEL. (CAT'S CLAW) CALLUS

RITA DE CASSIA ALVES PEREIRA¹, JOSÉ EDUARDO BRASIL PEREIRA PINTO², ÉRIKA SOARES REIS³, RICARDO MONTEIRO CORRÊA⁴, SUZAN KELLY VILELA BERTOLLUC¹

¹Engenheira Agrônoma, Pesquisadora Embrapa Agroindústria Tropical – R. Dra. Sara Mesquita 2270 – Bairro Pici – Cx. P. 3761 – Fortaleza, CE – cassia@cnpat.embrapa.br.

²Professores do Departamento de Agricultura/DAG – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – jeduardo@ufla.br; suzan@ufla.br

³Mestre em Fitotecnia, Departamento de Agricultura/DAG – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – erikasreis@yahoo.com.br

⁴Doutorando em Fitotecnia, Departamento de Agricultura – Universidade Federal de Lavras/UFLA – Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais – Cx. P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – ricardomonc7@yahoo.com.br

RESUMO

Entre as diversas plantas medicinais encontradas na Amazônia destaca-se a *Uncaria guianensis* J. F. GMEL., popularmente conhecida por unha de gato. Suas propriedades medicinais são atribuídas a efeitos imuno-estimulantes, anti-inflamatórios e inibidores do crescimento de células cancerígenas. A espécie está sendo ameaçada de extinção principalmente por causa das coletas indiscriminadas. Objetivou-se, no trabalho, avaliar a influência de diferentes auxinas (Picloram, ANA, 2,4-D e AIB) na indução e na cinética de crescimento de calos de *Uncaria guianensis*. Segmentos foliares (1 cm²) de plantas *in vivo* e *in vitro*, após desinfestados, foram cultivados em meio MS, suplementado com várias concentrações de auxinas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (4x4), sendo 4 reguladores de crescimento e 4 concentrações de cada regulador (0, 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹). A melhor resposta na indução de calos foi obtida com picloram na concentração de 1,47 mg L⁻¹, obtida de acordo com a curva de regressão quadrática ajustada. O início da estabilização da curva de crescimento de calos entre as diferentes auxinas foi diferenciado, ou seja, calos cultivados com picloram estabilizaram o crescimento aos 25 dias de cultivo e calos cultivados em meio com 2,4-D, ANA e AIB estabilizaram aos 30 dias de cultivo.

Termos para indexação: Reguladores de crescimento, Cultura de tecido, Planta medicinal.

ABSTRACT

Among several medicinal plants from the Amazon, *Uncaria guianensis* J. F. GMEL. specie known as "Cat's claw" is considered prominent. Its medicinal properties are attributed to immunostimulating effect, antiinflammatory and cancerogenic cells growth inhibitors. This species is considered as undangerous due to its indiscriminate harvest. The objective of this work was to evaluate the effect of different auxins (Picloram, NAA, 2,4-D and IBA) on the induction and at the kinetic growth of *Uncaria*

guianensis callus. Leaf segments (1 cm²) harvested from plants grown *in vivo* and *in vitro* were cultivated in MS medium supplemented with different concentrations of auxins. The best callus induction was obtained using 1.47 mgL⁻¹ picloram according with the adjusted square regression curve. Stabilization of the initial callus growth curve was differentiated within the used auxins. While callus cultivated with picloram stabilized growth with 25 days of culture, callus cultivated in the presence of 2,4-D, NAA and IBA stabilized growth with 30 days of culture.

Index terms: Growth regulators, tissue culture, medicinal plant.

INTRODUÇÃO

Uncaria guianensis J. F. GMEL. destaca-se por sua comprovada atividade anti-inflamatória e antioxidante. As cascas do caule e folhas são comercializadas *in natura* e apresentam alcalóides oxindólicos, N-oxi-oxindólicos e indólicos, triterpenos glucosilados, taninos e flavonóides (LAUS & KEPLINGER, 2003).

A comercialização em larga escala dessa espécie, através de coleta natural da planta torna-se inviável, pelo risco de extinção, pois a mesma ocorre na floresta amazônica, sendo coletada com 8 anos de idade (VILCHES, 1997).

Sistemas de cultura de calos e células vegetais representam uma fonte potencial renovável de valiosos metabólitos medicinais, flavorizantes, essências e corantes que não podem ser produzidos por células microbianas ou

(Recebido em 08 de dezembro de 2005 e aprovado em 20 de novembro de 2007)

síntese química. Porém, atualmente poucas culturas produzem esses compostos em quantidades úteis comercialmente (DORNEMBURG & KNORR, 1995).

Pesquisas têm demonstrado sucesso na produção de metabólitos secundários em diferentes órgãos e culturas não organizadas como calos e suspensão de células (SCHRIPEMA & VERPOORTE, 1994; KARAM et al., 2003; FURDEN et al., 2005; GYORGY et al., 2005).

Portanto, por causa da escassez de trabalhos com a espécie *Uncaria guianensis*, há necessidade de estudos sobre indução de calos e estabelecimento da curva de crescimento, visando estudos futuros na ativação de moléculas secundárias *in vitro*.

Objetivou-se, aqui, verificar a influência de diferentes auxinas, sob diferentes concentrações na indução, manutenção e cinética de crescimento de calos de *Uncaria guianensis*, provenientes de segmentos foliares *in vivo* e *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Efeito de diferentes concentrações e tipos de auxina na indução de calos, em explantes foliares oriundos de plantas *in vivo*

A espécie em estudo foi classificada como *Uncaria guianensis* J. F. GMEL. e as exsicatas estão depositadas no herbário do Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre, sob registro N° 15.640.

Segmentos foliares (1 cm²) foram retirados de mudas obtidas através da germinação *in vivo* de sementes de *Uncaria guianensis*, coletadas no município de Boca do Acre-AM. As sementes foram colocadas para germinar em bandejas de isopor com substrato Plantmax[®] em casa de vegetação.

As mudas foram pulverizadas com solução de benomil (2 g L⁻¹) e as folhas foram imersas em hipoclorito de sódio (1,25% de princípio ativo), por 15 minutos e em seguida lavadas com água destilada esterilizada.

Das folhas desinfestadas foram retirados segmentos foliares de 1 cm² e inoculadas em frascos de 300 mL, em câmara de fluxo laminar contendo meio MS (MURASHIGE

& SKOOG, 1962), com 3% de sacarose solidificado com 0,6% de ágar, onde posteriormente os frascos foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de 25 ± 1°C, densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de 15 mmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

Os tratamentos consistiram de quatro auxinas (2,4-D, Picloram, AIB e ANA) sob várias concentrações (0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (4x4), sendo 4 reguladores de crescimento e 4 concentrações de cada regulador. A parcela experimental foi constituída por cinco repetições, sendo uma delas constituída de quatro frascos, com quatro segmentos foliares cada.

Após 50 dias de cultivo, avaliou-se a porcentagem de indução e matéria seca de calos.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando software Sisvar[®] (FERREIRA, 2000).

Concentrações de Picloram na indução de calos oriundos de explantes foliares *in vitro*

Sementes de unha de gato foram lavadas em água corrente, por 10 minutos e posteriormente desinfetadas em câmara de fluxo laminar com solução de hipoclorito de sódio (1,25%), durante 15 minutos. Após a desinfestação, as sementes foram lavadas quatro vezes com água destilada e autoclavada para remoção do excesso da solução desinfetante. Os embriões foram excisados e inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS, solidificado com 6,0 g L⁻¹ de ágar e 15 g L⁻¹ de sacarose. O pH do meio foi ajustado em 5,7, antes da autoclavagem. Após a inoculação, os embriões foram mantidos em sala de crescimento à temperatura de 25 ± 1°C, densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de 15 mmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas.

Segmentos foliares (1 cm²) retirados de plântulas com 45 dias, foram excisados e inoculados em frascos contendo 15 mL de meio básico MS com 6 g L⁻¹ de ágar, 30 g L⁻¹ de sacarose, suplementado com 0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ de picloram.

Após 50 dias de cultivo, avaliou-se a área dos explantes coberta com calos atribuindo-se as notas 1, 2, 3, 4, correspondendo a 25, 50, 75 e 100% respectivamente da área coberta e matérias fresca e seca.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos (níveis de picloram) e cinco repetições, sendo cada repetição constituída de quatro frascos, com quatro explantes/frasco. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando software Sisvar® (FERREIRA, 2000).

Efeito de diferentes auxinas no crescimento cinético da cultura de calos de *Uncaria guianensis*

Calos de 1cm² e matéria fresca média de 2,6 g obtidos a partir de explantes foliares, cultivados em meio MS, suplementado com diferentes auxinas (2,4-D, Picloram, ANA e AIB), na concentração de 1,5 mg L⁻¹ foram subcultivados quatro vezes, em intervalos de 30 dias.

Após a quarta repicagem, estabeleceu-se a curva de crescimento dos calos através da determinação da matéria fresca e seca dos calos, respectivamente em intervalos de cinco dias, durante 40 dias.

O índice de crescimento dos calos foi estabelecido através da seguinte relação:

$$I.C = \frac{\text{Matéria seca final} - \text{Matéria seca inicial}}{\text{Matéria seca inicial}}$$

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial, constituído por 4 reguladores de crescimento e 8 intervalos de avaliação (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, e 40 dias).

Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando software Sisvar® (Ferreira, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferentes concentrações e tipos de auxina na indução de calos em explantes foliares oriundos de plantas *in vivo*

Houve efeito significativo da interação auxinas e concentrações na porcentagem de indução e matéria seca de calos ($p < 0,05$).

Observou-se que não houve indução de calos em meios de cultura sem auxinas, indicando a importância dos

reguladores de crescimento exógenos para indução da divisão celular e, conseqüentemente, a formação de calos para essa espécie.

Houve a formação de calos em explantes de *U. guianensis*, sob todas as auxinas testadas. As respostas na indução variaram conforme o tipo e concentração de auxina no meio. As diferentes respostas na calogênese em meios suplementados com as diferentes auxinas demonstraram a importância desses reguladores na indução e crescimento de calos. As melhores respostas na porcentagem de indução foi obtida com a utilização de 2,4-D e picloram no meio de cultura. O 2,4-D proporcionou resposta linear na indução de calos, ou seja, à medida que aumentaram as concentrações desse fitoregulador, aumentou também a porcentagem de indução de calos. Já o picloram proporcionou resposta quadrática na indução de calos, ou seja à medida que aumentaram as concentrações de picloram aumentou a porcentagem de indução até a concentração de 1,2 mg L⁻¹ que correspondeu ao ponto de máximo da curva (52% de indução). As concentrações superiores a 1,2 mg L⁻¹ de picloram tenderam a reduzir significativamente a porcentagem de indução de calos. Para as demais auxinas, não houve efeito significativo na indução de calos, embora tenha ocorrido pequena porcentagem de indução, que variou de 0 a 10% (Figura 1).

Em relação à matéria seca de calos observou-se resposta semelhante à obtida na porcentagem de indução. As melhores respostas na matéria seca de calos foi obtida em meios com 2,4-D e picloram, sendo melhor resposta a obtida na presença de picloram. Maior matéria seca de calos foi obtida em meio acrescido de picloram, sendo 1,1 mg L⁻¹ a concentração que proporcionou máximo peso seco de calos (0,31 g). Concentrações superiores a 1,1 mg L⁻¹ de picloram reduziram significativamente a matéria seca de calos. 2,4-D também proporcionou significativa matéria seca de calos, embora inferior ao picloram (Figura 1). Já as auxinas ANA e AIB proporcionaram os menores valores de matéria seca de calos sendo o efeito dos níveis de reguladores não significativos para essa variável.

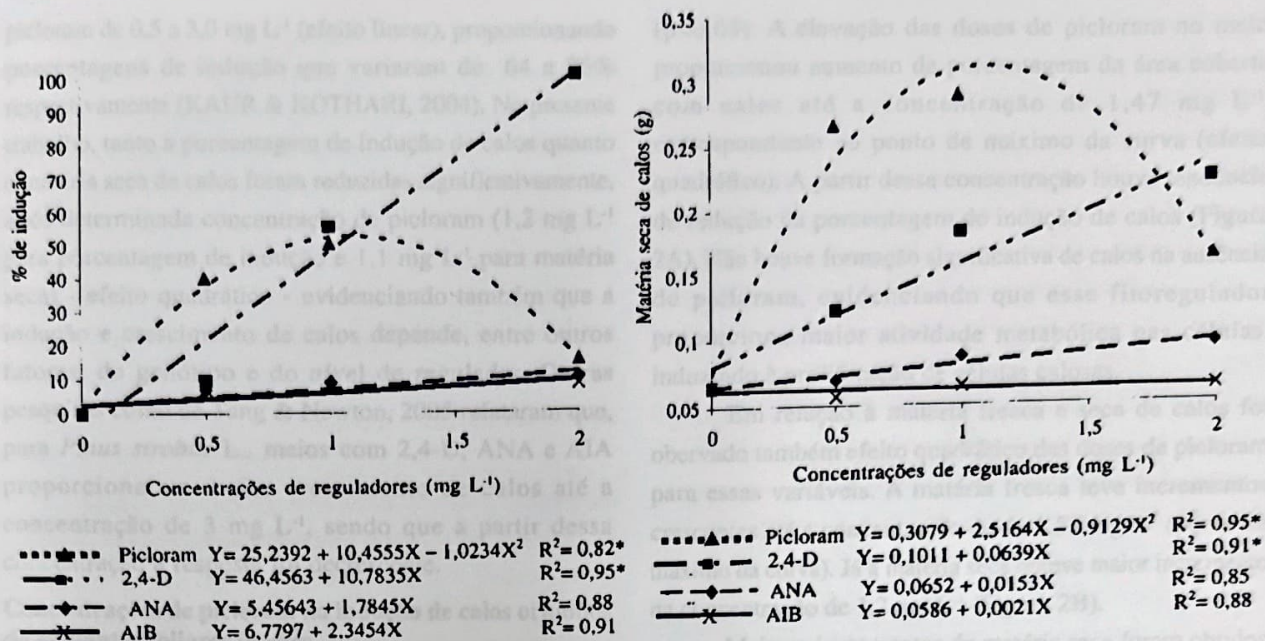


FIGURA 1 – Percentagem de indução e matéria seca de calos induzidos a partir de explantes foliares oriundos de plantas *in vivo* em função de tipos e níveis de auxinas.

* Significativo ao nível de 5%, pelo teste de F.

Segundo Stella (2002) as auxinas têm efeitos biológicos diferentes no explante, sendo ANA e AIB mais efetivas na indução de raiz, enquanto 2,4-D e picloram mais eficientes na indução de calos. Assim, a escolha do fitoregulador ou da concentração dependerá do tipo de crescimento e do desenvolvimento requerido, do nível endógeno de auxina no explante, da capacidade do tecido em sintetizar naturalmente a auxina e da interação entre auxinas sintética e endógena no tecido.

Os calos obtidos na presença de auxinas variaram em coloração e consistência (dados não apresentados). Observou-se que o meio com picloram proporcionou a formação de calos com aspecto friável, enquanto nos meios com 2,4-D, ANA e AIB ocorreu a formação de calos com aspecto compacto. Quanto à coloração, os calos oriundos de meios com picloram tiveram a cor verde-clara. No meio com 2,4-D os calos foram de cor verde-escuro; no meio com ANA, os calos foram de cor creme e no meio com AIB os calos foram de cor marrom.

Pesquisa de Mok e Mok (1977) relataram maior porcentagem de indução e matéria seca de calos em diferentes espécies e variedades de *Phaseolus*, onde melhores respostas foram obtidas na presença de picloram do que com 2,4-D no meio de cultivo. Isto evidencia que as respostas na indução e crescimento de calos, em diferentes espécies, é função do tipo e concentração de fitoregulador utilizado no meio.

Thengane et al. (2003) obtiveram resultados semelhantes ao do presente trabalho para a espécie *Nothapodytes foetida* (Wight) Sleumer, onde eles observaram que a adição de diferentes auxinas como ANA, picloram e 2,4-D, no meio de cultura, influenciou significativamente na porcentagem de indução, coloração e consistência dos calos evidenciando também que essas respostas variam conforme o genótipo, tipo e níveis de fitoreguladores.

Em milho foi observado aumento na porcentagem de indução de calos com o aumento da concentração de

picloram de 0,5 a 3,0 mg L⁻¹ (efeito linear), proporcionando porcentagens de indução que variaram de 64 a 96% respectivamente (KAUR & KOTHARI, 2004). No presente trabalho, tanto a porcentagem de indução de calos quanto a matéria seca de calos foram reduzidas significativamente, após determinada concentração de picloram (1,2 mg L⁻¹ para porcentagem de indução e 1,1 mg L⁻¹ para matéria seca) - efeito quadrático - evidenciando também que a indução e crescimento de calos depende, entre outros fatores, do genótipo e do nível de regulador. Outras pesquisas como de Tang & Newton, 2005 relataram que, para *Pinus strobus* L., meios com 2,4-D, ANA e AIA proporcionaram maior crescimento de calos até a concentração de 3 mg L⁻¹, sendo que a partir dessa concentração a resposta foi decrescente.

Concentrações de picloram na indução de calos oriundos de explantes foliares *in vitro*

Observou-se efeito significativo das doses de picloram na percentagem da área foliar coberta com calos

($p < 0,05$). A elevação das doses de picloram no meio proporcionou aumento da porcentagem da área coberta com calos até a concentração de 1,47 mg L⁻¹, correspondente ao ponto de máximo da curva (efeito quadrático). A partir dessa concentração houve tendência de redução da porcentagem de indução de calos (Figura 2A). Não houve formação significativa de calos na ausência de picloram, evidenciando que esse fitoregulador proporciona maior atividade metabólica nas células, induzindo à proliferação de células calosas.

Em relação à matéria fresca e seca de calos foi observado também efeito quadrático das doses de picloram para essas variáveis. A matéria fresca teve incrementos crescentes até a concentração de 1,52 mg L⁻¹ (ponto de máximo da curva). Já a matéria seca obteve maior incremento na concentração de 1,2 mg L⁻¹ (Figura 2B).

Maiores incrementos de matéria seca foram obtidos na concentração de 2,07 µM de picloram, conforme ilustra a Tabela 2.

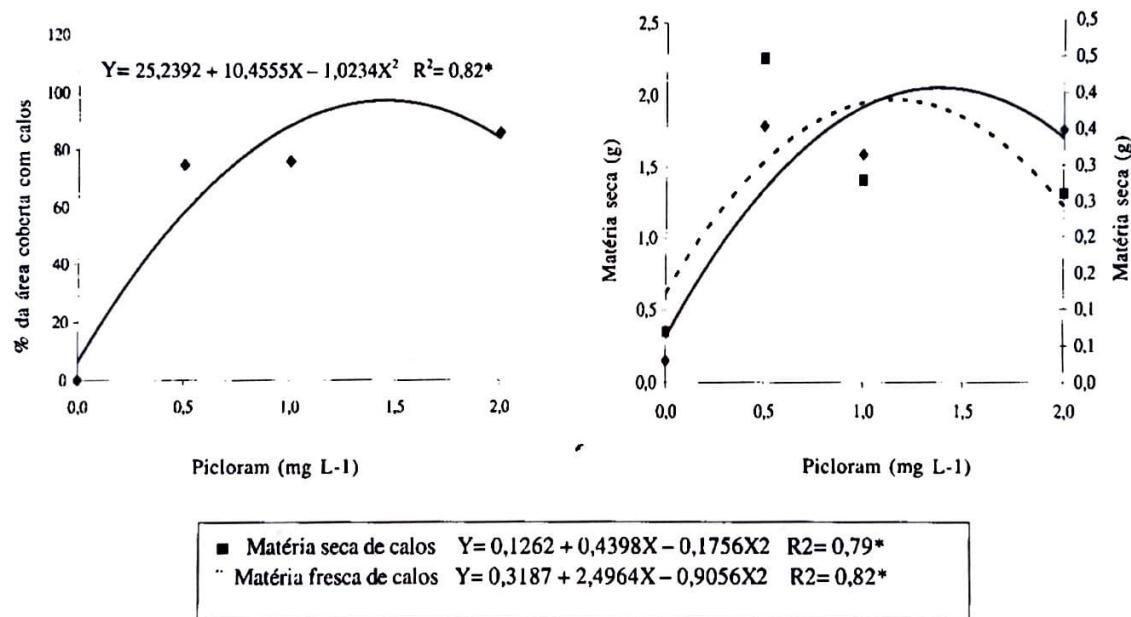


FIGURA 2 – Percentagem da área foliar coberta com calos (A) e matéria seca de calos (B) de *U. guianensis*, induzidos em explantes foliares de plantas *in vitro* em função de concentrações de picloram.

* Significativo ao nível de 5%, pelo teste de F.

Com relação à coloração dos calos, observou-se que os calos obtidos nos tratamentos correspondentes às diversas concentrações de picloram foram de cor verde-claro e consistência friável (dados não apresentados).

Calos com coloração clara e aspecto friável também foi observado por Stella & Braga (2002), em *Rudgea jasminoides* (Cham.) Mull. Arg. (Rubiaceae), onde os explantes foliares foram cultivados em meio contendo 4 mg L⁻¹ de picloram, evidenciando que o picloram é eficiente na indução de calos de muitas espécies.

Efeito de auxinas no crescimento cinético da cultura de calos de *Uncaria guianensis*

O crescimento das células de *Uncaria guianensis* em meio MS, suplementado com 1,5 mg L⁻¹ das auxinas 2,4-D, picloram, ANA e AIB tenderam a desenvolver crescimento sigmóide (Figuras 3 e 4).

A auxina 2,4-D proporcionou entre os dias 0 e 5 pós inoculação crescimento ascendente da cultura de células de *U. guianensis*, evidenciando pequena fase lag. Maior matéria seca de calos foi obtida próximo aos 30 dias após a inoculação dos explantes foliares, ocorrendo após essa fase tendência de redução de matéria seca (Figura 3A). A estabilização da curva de crescimento foi observada aos 30 dias pós-inoculação, demonstrando que, nessa fase, faz-se necessária a repicagem dos calos para novo meio de cultivo.

Observou-se que a matéria seca de calos, cultivados em meio com picloram, entre o dia zero até o dia cinco de cultivo teve um crescimento lento (menor inclinação da curva). Os calos, cultivados em meio com picloram, tenderam a uma maior fase lag, demonstrando que as células estavam em fase de preparação para a divisão celular (Figura 3 A). Após 25 dias de cultivo observou-se a estabilização da curva de crescimento de calos.

No entanto, no meio suplementado com AIB e ANA, a fase lag das matérias seca e fresca tenderam a ser mais inclinada em relação às curvas para 2,4-D e picloram, evidenciando que as células já estavam em fase de maior preparação para divisão celular. Semelhante à resposta obtida para o 2,4-D, observou-se que a curva de crescimento de calos das auxinas AIB e ANA tenderam a estabilizar-se próximo aos 30 dias de cultivo (Figura 4).

A curva de crescimento de calos varia em função da espécie e tipo de regulador de crescimento. Calos induzidos a partir de explantes foliares de plântulas *in vitro* têm tendência para desenvolver curva de crescimento acelerada e com aspecto sigmóide. A identificação correta do período de repicagem dos calos, de acordo com a curva de crescimento, é importante para maximizar o processo de multiplicação das células visto que, na fase de crescimento (crescimento ascendente da curva), as células mantêm alta

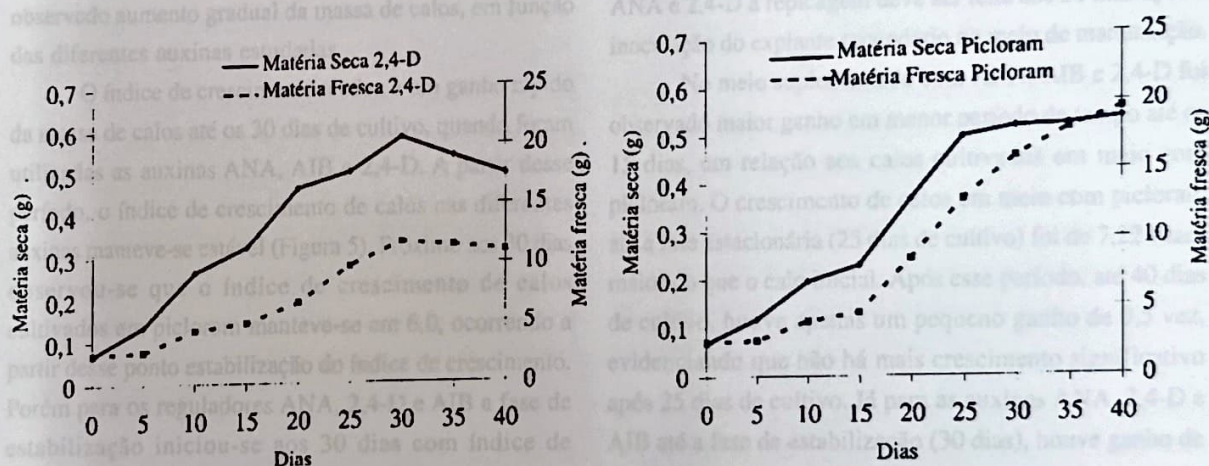


FIGURA 3 – Crescimento cinético de calos de *Uncaria guianensis* a partir da matéria fresca e seca cultivados em (A) 2,4-D e (B) Picloram, ambos na concentração de 1,5 mg L⁻¹.

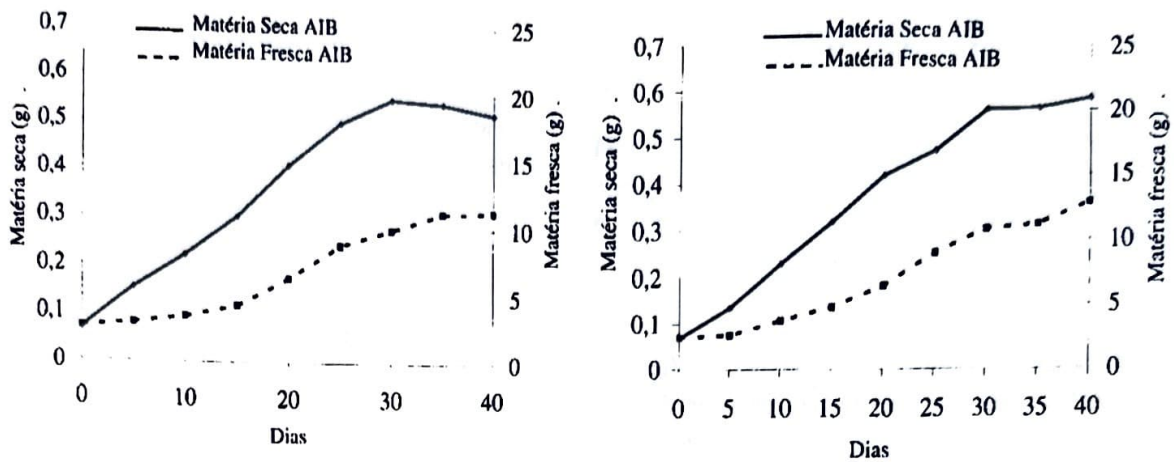


FIGURA 4 – Crescimento cinético de calos de *Uncaria guianensis* a partir de matéria fresca e seca cultivados em (A) AIB e (B) ANA, ambos na concentração de 1,5 mg L⁻¹.

capacidade de divisão. Após o período de crescimento, as células entram na fase estacionária onde há um maior número de células com menor capacidade de divisão celular, e a célula entra em estágio de diferenciação celular.

A matéria fresca é um indicador da friabilidade dos calos. A matéria fresca de calos, cultivados em meio com picloram, foi superior em relação aos calos obtidos em meio com 2,4-D, AIB e ANA (Figuras 3 e 4), evidenciando que os calos obtidos em meio com picloram foram mais friáveis que calos cultivados com as demais auxinas.

Com relação ao índice de crescimento de calos foi observado aumento gradual da massa de calos, em função das diferentes auxinas estudadas.

O índice de crescimento tendeu a um ganho rápido da massa de calos até os 30 dias de cultivo, quando foram utilizadas as auxinas ANA, AIB e 2,4-D. A partir desse período, o índice de crescimento de calos nas diferentes auxinas manteve-se estável (Figura 5). Próximo aos 30 dias observou-se que o índice de crescimento de calos cultivados em picloram manteve-se em 6,0, ocorrendo a partir desse ponto estabilização do índice de crescimento. Porém para os reguladores ANA, 2,4-D e AIB a fase de estabilização iniciou-se aos 30 dias com índice de crescimento 6,5; 6,5, e 6,9 para ANA, 2,4-D e AIB, respectivamente.

O ganho de massa de calos varia conforme a espécie vegetal. Calos da espécie *Nathapodytes foetida* cultivados com picloram desenvolveram aumento gradual da massa de calos até 60 dias pós-inoculação (THENGANE et al., 2003). Pesquisas com a espécie *Salvia fruticosa* tiveram um ganho de massa até os 35 dias (KARAM et al., 2003). Isso sugere diferentes estágios de repicagem para manutenção de calos ao utilizar-se diferentes auxinas. Nesse trabalho com unha de gato, a utilização de picloram no meio de cultivo evidenciou que a repicagem dos calos deve ser feita próximo aos 25 dias de cultivo. Para AIB, ANA e 2,4-D a repicagem deve ser feita aos 30 dias após a inoculação do explante secundário no meio de manutenção.

No meio suplementado com ANA, AIB e 2,4-D foi observado maior ganho em menor período de tempo até os 15 dias, em relação aos calos cultivados em meio com picloram. O crescimento de calos em meio com picloram até a fase estacionária (25 dias de cultivo) foi de 7,22 vezes maior do que o calo inicial. Após esse período, até 40 dias de cultivo, houve apenas um pequeno ganho de 0,5 vez, evidenciando que não há mais crescimento significativo após 25 dias de cultivo. Já para as auxinas ANA, 2,4-D e AIB até a fase de estabilização (30 dias), houve ganho de 8,24; 8,49 e 8,08 vezes, respectivamente em relação ao calo inicial. Após esse período, até 40 dias, houve também

ganho não significativo de crescimento para ANA, 2,4-D e AIB (0,36 vez). Assim, foi observado que para *U. Guianensis*, a suplementação das auxinas picloram, 2,4-D, AIB e ANA, no meio de cultura, não proporcionou crescimento significativo de calos após 30 dias de cultivo.

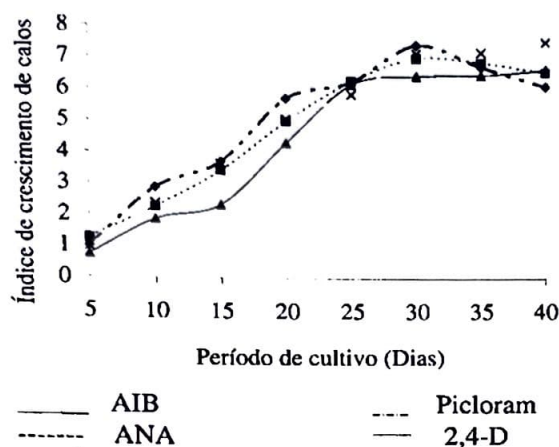


FIGURA 5 – Índice de crescimento de calos de *Uncaria guianensis* para a matéria seca de calos (g) cultivados nas seguintes auxinas: Picloram, AIB, 2,4-D e ANA na concentração de 6,2 μ M durante 40 dias de cultivo.

CONCLUSÕES

Meios de cultura sem reguladores de crescimento não induzem calos em *Uncaria guianensis*.

A melhor auxina para indução e manutenção de calo friável é o picloram.

A repicagem do calo utilizando picloram deve ser feita aos 25 dias e para as demais auxinas deve ser realizada aos 30 dias após a inoculação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DORNEMBURG, H.; KNORR, D. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, Woburn, v.17, n.8, p.674-685, 1995.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. Anais... São Carlos:UFSCar, 2000. p.255-258.
- FURDEN, B. V.; HUMBURG, A.; FUSS, E. Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin accumulation in *Linum album* cell suspension cultures. **Plant Cell Reports**, v. 24, p. 312-317, 2005.
- GYORGY, Z.; TOLONEN, A.; NEUBAUER, P.; HOHTOLA, A. Enhanced biotransformation capacity of *Rhodiola rosea* callus cultures for glycosid production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 83, p. 129-135, 2005.
- KARAM, N. S.; JAWAD, M. F.; ARIKAT, N. A.; SHIBLI, R. A. Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa*. **Plant Cell, Tissue and organ culture**, Dordrecht, v.73, p. 117-121, 2003.
- KAUR, P.; KOTHARI, S.L. *In vitro* culture of kodo millet: influence of 2,4-D and picloram in combination with kinetin on callus initiation and regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 77, p. 73-79, 2004.
- LAUS, G.; KEPLINGER, K. Alkaloids of Peruvian *Uncaria guianensis* (Rubiaceae). **Phyton Annales Rei Botanicae**, v. 43, p.1-8, 2003.
- MOK, M. C; MOK, D. W. Genotypic responses to auxins in tissue culture of *Phaseolus*. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.40, p.261-264, 1977.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-493, 1962.
- SCHRIPSEMA, J.; VERPOORTE, R. Primary and secondary metabolism of plants and plant cell cultures III Special Issue. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.38, n.2, p23-28, 1994.

STELLA, A.; BRAGA, M. R. Callus and cell suspension culture of *Rudgea jasminoides*, a tropical woody Rubiaceae. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 68, n. 3, p. 271-276, 2002.

TANG, W.; NEWTON, R.J. Plant regeneration from callus cultures derived from mature zygotic embryos in white pine (*Pinus strobus* L.). **Plant Cell Reports**, v.24, p.1-9, 2005.

THENGANE, S.R.; KULKARNI, D.K.; SHRIKHANDE, V.A.; JOSHI, S.P.; SONAWANE, K.B.; KRISHNAMURTHY, K.V. Influence of medium composition on callus induction and camptothecin(s) accumulation in *Nothapodytes foetida*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 72, p. 247-251, 2003.

VILCHES, L. E. O. Uña de Gato. Género *Uncaria*. **Estudios Botánicos, Químicos y Farmacológicos de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis***. 3ª. ed. Lima: Instituto de Fitoterapia Americano, 1997. 169 p.