

**Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais****MORAIS, T.P.; LUZ, J.M.Q.; SILVA, S.M.\*; RESENDE, R.F.; SILVA, A.S.***Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Instituto de Ciências Agrárias, Campus Umuarama, Avenida Amazonas, s/n, CEP: 38400-902, Uberlândia-Brasil \*sergiomacedosilva@yahoo.com.br*

**RESUMO:** Esta revisão tem por objetivo levantar dados de literatura sobre o histórico e a situação atual das técnicas de cultura de tecidos em plantas medicinais. Para tanto, foi realizada uma revisão de publicações do período de 1976 a 2009. A cultura de tecidos é muito utilizada em pesquisas envolvendo plantas medicinais, com destaque para a técnica de micropropagação. A aplicação das técnicas de cultura de tecidos em plantas medicinais tem como perspectivas a obtenção de germoplasma competitivo e adaptado a diversos métodos de cultivo, escolha de novas espécies que servirão como fonte de compostos biologicamente ativos e aprimoramento da produção de fitofármacos, a fim de assegurar exploração sustentável destas espécies.

**Palavras-chave:** cultura de tecidos, micropropagação, plantas medicinais, biotecnologia

**ABSTRACT: Applications of tissue culture in medicinal plants.** The aim of this literature review is to conduct a survey concerning the history and current situation of tissue culture techniques in medicinal plants. Therefore, a review was done considering the period from 1976 to 2009. Tissue culture is widely applied in medicinal plants researches, especially micropropagation. The perspectives of tissue culture techniques in medicinal plants are related to the development of competitive germoplasm adapted to diverse methods of cultivation, the election of new species that will serve as source of biological active composts, and the improvement of phytochemicals production, in order to assure sustainable exploration of these species.

**Key words:** tissue culture, micropropagation, medicinal plants, biotechnology

Apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna, as plantas medicinais ainda desempenham importante papel na saúde mundial. Estima-se que cerca de 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivados de produtos naturais (Calixto, 2005; Veiga-Junior & Mello, 2008).

No entanto, alguns fatores podem comprometer o uso das plantas medicinais para propósitos farmacêuticos, como a heterogeneidade dos indivíduos, devido a variabilidades genética e bioquímica (Vieira, 2009), e dificuldade de multiplicação (Pereira, 2009). Neste contexto, torna-se imprescindível a realização de estudos mais aprofundados de âmbito farmacológico, terapêutico e agrônomo, para o cultivo em larga escala e a conservação destas espécies.

Atualmente, as aplicações da biotecnologia na área agrícola e de plantas medicinais têm sido bastante difundidas. Kerbauy (2003) descreve várias dessas aplicações, como clonagem, cultura de

células, tecidos e órgãos, obtenção de plantas haplóides a partir de cultura de anteras, produção de metabólitos secundários em biorreatores, geração de variantes somaclonais, microenxertia, tecnologia dos protoplastos e criopreservação.

A cultura de células e tecidos pode resolver ou minimizar pontos na multiplicação sistematizada de plantas elites pelo processo de micropropagação. Além disso, pode ser empregada na produção de metabólitos secundários que tenham relevância do ponto de vista terapêutico e que, por algum tipo de impedimento, não são sintetizados (Arnaldos et al., 2001; Pereira, 2009).

Muitas referências das aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais são encontradas na literatura abordando diversas espécies tropicais, como cúrcuma (*Curcuma* sp.) (Yasuda et al., 1988; Mello et al., 2000), espinheira santa (*Maytenus* sp.) (Rathore et al., 1992; Pereira et al., 1994; 1995), babosa [*Aloe vera* (L.) Burm.] (Araújo et al., 2002), ginseng brasileiro [*Pffafia glomerata* (Spreng.)

Pedersen.] (Nicoloso et al., 2001; Skrebsky et al., 2004), barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman* Mart.) (França et al., 1995; Nicioli et al., 2008), erva cidreira (*Melissa officinalis* L.) (Ribeiro et al., 2007b; Reis et al., 2008), dentre outras. Um breve histórico da aplicação das técnicas de cultura de tecidos em plantas medicinais é apresentado na Tabela 1.

O objetivo desta revisão foi levantar dados de literatura sobre o histórico e a situação atual das técnicas de cultura de tecidos em diferentes espécies vegetais, comumente empregadas na produção de fitoterápicos, permitindo assim auxiliar pesquisas em relação ao aperfeiçoamento desta ferramenta biotecnológica no estudo das plantas medicinais e seus mecanismos de ação que sustentam a atuação terapêutica.

### Micropropagação

A micropropagação de plantas representa uma alternativa para a propagação comercial de espécies de interesse econômico, entre as quais as medicinais com valor farmacológico reconhecido. Embora esta técnica tenha como desvantagem o custo elevado, a crescente demanda da indústria farmacêutica por plantas indexadas, livres de vírus, com alta qualidade fitossanitária e fisiológica, bem como com capacidade de síntese de metabólitos secundários potencializada, por meio do melhoramento genético, justificam a sua utilização (Lima et al., 2007).

Vários protocolos de micropropagação têm sido estudados para diversas espécies. No entanto, o sucesso deste processo depende de alguns fatores, como tipo de explante, meio de cultura, regulador de crescimento, condições de incubação, dentre outros (Deschamps, 1993; Komalavalli & Rao, 2000).

Porém, para desenvolvimento de protocolos de micropropagação de uma dada espécie, é necessário primeiro estabelecê-la *in vitro*. Espécies nativas e lenhosas apresentam certa dificuldade no estabelecimento *in vitro*, em decorrência principalmente da oxidação e da contaminação (Sato et al., 2001). Para isso, várias substâncias com ação germicida, antibiótica e antioxidante têm sido utilizadas. Em trabalho com espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.), baixo índice de oxidação foi obtido mediante desinfestação dos explantes em solução contendo álcool 70% durante 15 segundos e solução de hipoclorito de sódio 1% com duas gotas de detergente durante 15 minutos (Flores et al., 1998). Em alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) a contaminação e oxidação dos explantes foi reduzida com a imersão em solução de hipoclorito de sódio a 0,8% durante 12 e 16 minutos, 200 mg L<sup>-1</sup> de cefotaxima sódica e 3,0 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado ou 0,5 g L<sup>-1</sup> de PVP (polivinilpirrolidona) (Costa et al.,

2007). Em estudos com segmentos nodais de urucum (*Bixa orellana* L.) e ginkgo (*Ginkgo biloba* L.), Mantovani (2007) conseguiu eliminar contaminantes fúngicos dos explantes ao desinfestá-los com soluções de hipoclorito de sódio (10 minutos a 1,25%) e PPM™ (Plant Preservative Mixture) (20 minutos a 20%).

Diversas partes da planta-matriz podem ser utilizadas como fonte de explante para estabelecimento *in vitro* e rápida regeneração das plantas medicinais, como segmentos nodais (Rech & Pires, 1986; Patnaik & Debata, 1996; Sahoo & Chand, 1998; Abreu et al., 2003; Campos et al., 2007), hipocótilos (Murch et al., 2000), ápices caulinares (Sen & Sharma, 1991; Soniya & Das, 2002), discos foliares (Mercier et al., 1992; Koroch et al., 2002) e embriões (Gallo-Meagher & Green, 2002). No entanto, vale ressaltar que o sucesso da micropropagação, independentemente do explante utilizado, está sujeito ao efeito do genótipo da planta-matriz na resposta aos estímulos *in vitro* (Stein et al., 2009).

Com relação ao meio nutritivo, Caldas et al. (1998) reportam que os mais usados no cultivo *in vitro* da maioria das espécies são o B5 (Gamborg) e o meio MS (Murashige & Skoog). Entretanto, algumas modificações genótipo-específicas devem ser feitas, no chamado meio básico, com a intenção de otimizar metodologias para o melhor desenvolvimento da espécie estudada (Teixeira & Torres, 1998). Assim, para que se obtenha um desenvolvimento adequado do explante, é necessário que se adicionem ao meio de cultura, além dos macronutrientes, micronutrientes e vitaminas, reguladores de crescimento, cujas concentração e composição são fatores determinantes no crescimento e padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas de cultura de tecidos (Caldas et al., 1998).

Na micropropagação, os reguladores de crescimento, especialmente as auxinas e citocininas, desempenham um papel muito importante. As auxinas são geralmente utilizadas quando o propósito for o alongamento celular, a expansão dos tecidos e divisão celular (formação de calo), a formação de raízes e a embriogênese dos cultivos em suspensão; já as citocininas são frequentemente utilizadas para estimular o crescimento e desenvolvimento de brotações múltiplas (Pierik, 1990; Einsert, 1991; George, 1993).

Neste aspecto, diversos autores relatam a necessidade de suplementação do meio de cultura com combinações de auxinas e citocininas para garantir a eficiência na micropropagação de diferentes plantas medicinais. Como exemplos citam-se os trabalhos conduzidos com bael (*Aegle marmelos* Correa) (Ajithkumar & Seenii, 1998), aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All) (Andrade et al., 2000), calêndula (*Calendula officinalis* L.) (Costa et

**TABELA 1.** Evolução histórica das técnicas de cultura de tecidos em plantas medicinais.

<b>Técnica</b>	<b>Espécie (s)</b>	<b>Referência (s)</b>
Micropopagação	<i>Mentha</i> spp.	Rech & Pires, 1986
	<i>Curcuma</i> sp.	Yasuda et al., 1988
	<i>Withania somnifera</i>	Sen & Sharma, 1991
	<i>Maytenus emarginata</i> (Willd.) Ding Hou	Rathore et al., 1992
	<i>Maytenus aquifolium</i> Mart.	Pereira et al., 1994
	<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart.	Pereira et al., 1995
	<i>Stryphnodendrons barbatiman</i> Mart.	França et al., 1995
	<i>Hemidesmus indicus</i> (L.) R. Br.	Patnaik & Debata, 1996
	<i>Aegle marmelos</i> (L.) Corr.	Ajithkumar & Seenii, 1998
	<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart.	Flores et al., 1998
	<i>Vitex negundo</i> L.	Sahoo & Chand, 1998
	<i>Myracrodruon urundeuva</i> Fr. All.	Andrade et al., 2000
	<i>Tournefortia cf. paniculata</i> Cham.	Bertolucci et al., 2000
	<i>Gymnema sylvestre</i> R. Br.	Komalavalli & Rao, 2000
	<i>Curcuma zedoaria</i> Roscoe	Mello et al., 2000
	<i>Echinodorus cf. scaber</i> Rataj	Pereira et al., 2000
	<i>Cunila galioides</i> Benth.	Fracaro & Echeverrigaray, 2001
	<i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen	Nicoloso et al., 2001
	<i>Celtis</i> sp.	Sato et al., 2001
	<i>Aloe vera</i> (L.) Burm	Araújo et al., 2002
	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Arimura et al., 2002
	<i>Pilocarpus jaborandi</i> Holmes	Sabá et al., 2002
	<i>Piper longum</i> L.	Soniya & Das, 2002
	<i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen	Nicoloso & Erig, 2002
	<i>Cissus sicyoides</i> L.	Abreu et al., 2003
	<i>Phoenix dactylifera</i> L.	Bhargava et al., 2003
	<i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen	Skrebsky et al., 2004
	<i>Lychnophora pinaster</i> Mart.	Souza et al., 2004
	<i>Mikania glomerata</i> Spreng.	Diniz et al., 2006
	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Bandeira et al., 2007
<i>Jatropha elliptica</i> (Pohl) Müll. Arg.	Campos et al., 2007	
<i>Lippia sidoides</i> Cham.	Costa et al., 2007	
<i>Bixa orellana</i> L.	Mantovani, 2007	
<i>Ginkgo biloba</i> L.	Mantovani, 2007	
<i>Melissa officinalis</i> L.	Ribeiro et al., 2007b	
<i>Stryphnodendrons barbatiman</i> Mart.	Nicoli et al., 2008	
<i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Pedersen	Nicoloso et al., 2008	
Cultura de embriões	<i>Coffea arabica</i> L.	Carvalho et al., 1998
	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Burun & Poyrazoglu, 2002
	<i>Musa</i> spp.	Neves et al., 2002
	<i>Coffea arabica</i> L.	Ribeiro et al., 2003
	<i>Lychnophora pinaster</i> Mart.	Souza et al., 2003
	<i>Byrsonima intermedia</i> A. Juss.	Nogueira et al., 2004
	<i>Uncaria tomentosa</i> (Willd. ex Roem. & Schult.) DC.	Pereira et al., 2006
<i>Melissa officinalis</i> L.	Reis et al., 2008	

continua...

TABELA 1. Evolução histórica das técnicas de cultura de tecidos em plantas medicinais.

continuação...

Técnica	Espécie (s)	Referência (s)
Embriogênese somática	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	Chang & Hsiang, 1980
	<i>Panax notoginseng</i> (Burkill) F. H. Chen	Shoyama et al., 1997
	<i>Corydalis yanhusuo</i> W. T. Wang.	Sagare et al., 2000
	<i>Calendula officinalis</i> L.	Costa et al., 2002
	<i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf ex Holm.	Lameira et al., 2002
	<i>Phoenix dactylifera</i> L.	Nunes et al., 2002
	<i>Holostemma ada-kodien</i> Schult	Martin, 2003
	<i>Pfaffia tuberosa</i> (Spreng.) Hicken.	Flores et al., 2007
Cultura de calos, suspensão de células e produção de metabólitos <i>in vitro</i>	<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	Nabeta et al., 1976
	<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	Suzuki et al., 1976
	<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	Lee & Kang, 1982
	<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	Miyagawa et al., 1984
	<i>Tabernaemontana divaricata</i> (L.) R. Br. ex Roem. & Sc.	Van Der Heijden et al., 1988
	<i>Tabernaemontana pandacaqui</i> Poir.	Sierra et al., 1991
	<i>Aspidosperma quebracho blanco</i> Schlecht.	Aimi et al., 1991; 1994
	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	Zypman et al., 1997
	<i>Cordia verbenacea</i> L.	Lameira et al., 1997b
	<i>Centella asiatica</i> (Linn.) Urban.	Patra et al., 1998
	<i>Catharanthus roseus</i> L.	Lee & Shuler, 2000
	<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	Bondarev et al., 2001
	<i>Taxus chinensis</i>	Dong & Zhong, 2001
	<i>Panax notoginseng</i> (Burkill) F. H. Chen	Hu et al., 2001
	<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart.	Buffa Filho et al., 2002
	<i>Aspidosperma ramiflorum</i> Muell. Arg.	Oliveira et al., 2002
	<i>Camptotheca acuminata</i>	Silvestrini et al., 2002
	<i>Taxus chinensis</i>	Wang & Zhong, 2002
	<i>Salvia fruticosa</i>	Karam et al., 2003
	<i>Hypericum perforatum</i> L.	Zobayed & Saxena, 2004
<i>Linum album</i>	Furden et al., 2005	
<i>Rhodiola rosea</i>	Gyorgy et al., 2005	
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf.	Quiala et al., 2006	
<i>Melissa officinalis</i> L.	Silva et al., 2006	
<i>Aloe vera</i> (L.) Burm.	Mógor et al., 2007	
<i>Byrsonima intermedia</i> A. Juss.	Nogueira et al., 2007	
<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	Patrão et al., 2007	
<i>Uncaria guianensis</i> J. F. Gmel.	Pereira et al., 2007	
<i>Valeriana glechomifolia</i> Meyer	Russowski, 2007	
<i>Melissa officinalis</i> L.	Reis et al., 2009	
Cultura de protoplastos	<i>Solarium dulcamara</i> L.	Chand et al., 1988
	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	Arya et al., 1991
	<i>Ginkgo biloba</i> L.	Laurain et al., 1993
	<i>Passiflora</i> spp.	Matos, 2006

al., 2002), jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf) (Sabá et al., 2002) e camomila (*Matricaria recutita* L.) (Cattelan et al., 2007). A combinação de 0,25 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftaleno-acético) com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina) proporciona aumento no número de brotos e raízes, e incremento no peso das matérias frescas e secas de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) (Arimura et al., 2002), enquanto maiores taxas de multiplicação de chapéu-de-couro (*Echinodorus cf. scaber* Rataj) e poejo do campo (*Cunila galioides* Benth.) são observadas apenas com a adição de BAP (Pereira et al., 2000; Fracaro & Echeverrigaray, 2001).

Recentemente, estudos referentes à propagação clonal *in vitro* de *Thymus vulgaris* L., conduzidos por Rubin et al. (2007) e Bandeira et al. (2007), demonstraram que baixas concentrações no meio de cultivo de ANA e ausência de BAP são favoráveis para a multiplicação *in vitro* de plantas de tomilho (*Thymus vulgaris* L.), proporcionando características morfológicas e fisiológicas desejáveis para a sua comercialização, e que o sistema de micropropagação mais adequado para o desenvolvimento desta espécie, tanto da parte aérea quanto do sistema radicular, é em frascos vedados com algodão contendo meio MS acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose.

A fonte e dose de açúcares no meio de cultura também podem interferir no desenvolvimento *in vitro* de algumas espécies medicinais. No caso do marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.), o enraizamento *in vitro* pode ser favorecido pela concentração de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio de cultura (Erig et al., 2004), enquanto que em manjerição (*Ocimum basilicum* L.), o número de folhas é estimulado pela adição de qualquer fonte de carboidratos (sacarose, glicose ou maltose) na concentração de 20 g L<sup>-1</sup> (Ribeiro et al., 2007a). Já para o cultivo de *Melissa officinalis* L., melhores resultados são obtidos em meios de cultura contendo 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Ribeiro et al., 2007b).

Com relação à micropropagação de ginseng brasileiro [*Pffafia glomerata* (Spreng.) Pedersen.], Nicoloso et al. (2001) desenvolveram um protocolo para a multiplicação desta espécie onde, a partir de um único segmento nodal, foi possível obter 15.000 plantas dentro de um período de seis meses. Esses mesmos autores observaram que em *P. glomerata* a concentração padrão dos macronutrientes do meio MS e a ausência de carvão ativado favoreceram o crescimento das plantas. Ainda considerando esta técnica e esta mesma planta, Nicoloso & Erig (2002) conduziram um trabalho para avaliar o efeito do tipo de segmento nodal e do tamanho do recipiente de cultivo em seu crescimento *in vitro*. Segundo esses autores, o tipo de segmento nodal, definido pela posição que ocupa na maior brotação, influencia marcadamente o crescimento das plantas de *P.*

*glomerata* cultivadas *in vitro*, e os segmentos basais proporcionam a maior taxa de multiplicação e plantas maiores em biomassa, altura, número de raízes e brotações. Neste mesmo estudo, os autores verificaram ainda que tubos de cultivo de tamanhos médio e pequeno proporcionam o melhor e o pior crescimento das plantas em biomassa, respectivamente. Além da constituição do meio de cultura, tipo de explante e recipiente, o pH pode influenciar no crescimento desta espécie, sendo que valores próximos a 6,0, ajustados antes da autoclavagem, são considerados ideais (Nicoloso et al., 2008).

Após a multiplicação da espécie medicinal de interesse, pode-se proceder à etapa de enraizamento *in vitro* para posterior aclimatização e comercialização das mudas produzidas. Objetivando a formação de raízes adventícias em erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.), Lameira et al. (1997a) sugerem que o ácido clorogênico atua como co-fator deste processo. Trabalhando com outra planta medicinal, mas também visando ao enraizamento, Souza et al. (2004) verificaram melhores resultados quando plantas de arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.) permaneceram durante 15 dias na presença de 2 mg L<sup>-1</sup> de ANA, alcançando total sobrevivência na aclimatização. Estes resultados corroboram com os encontrados por Diniz et al. (2006), que obtiveram 100% de enraizamento de guaco (*Mikania glomerata* Spreng.) na presença da auxina AIA (ácido indol-acético). Entretanto, para o enraizamento de marmelinho (*Tournefortia cf. paniculata* Cham.), o uso de reguladores de crescimento não se faz necessário (Bertolucci et al., 2000).

Já com relação ao processo de aclimatização *ex vitro*, Skrebsky et al. (2004) observaram um maior crescimento de plantas de ginseng brasileiro (*Pffafia glomerata*) obtido pelo aumento da disponibilidade de sacarose *in vitro* (concentrações entre 45 e 60 g L<sup>-1</sup>) e que, independentemente do período de retirada das plantas da cultura de tecidos (25 e 32 dias após a inoculação), as mudas obtiveram adequada aclimatização.

Após a micropropagação das plantas medicinais, é de extrema importância a avaliação anatômica das espécies cultivadas *in vitro* e *ex vitro*, como demonstrado pelo trabalho realizado por Costa (2006). Estes estudos permitem a identificação dos caracteres que contribuem para a sobrevivência das plantas no campo (etapa pós-aclimatização), assim como suas possíveis adaptações ao meio.

### Cultura de embriões

Do ponto de vista prático, esta técnica permite estudar detalhadamente as necessidades nutricionais e físicas para o pleno desenvolvimento dos embriões cultivados *in vitro*, superar dormência

e testar a viabilidade de sementes (Carvalho et al., 1998), além de poder ser usada para fins de micropropagação. Por causa de sua natureza juvenil com alto potencial regenerativo, embriões são excelentes explantes para propagação clonal *in vitro* (Hu & Ferreira, 1998), sendo a germinação de sementes uma ótima opção para se conseguir plantas assépticas e, a partir delas, iniciar a cultura de explantes, como folhas, segmentos nodais, entre outras (Mercier & Nievola, 2003).

A eficiência da cultura de embriões é afetada pelo grau de maturidade fisiológica da semente, intensidade do tratamento de desinfestação, habilidade manual na extração dos embriões, composição do meio de cultura, condições ambientais de cultivo, dentre outros fatores (Neves et al., 2002). Provavelmente, o mais importante aspecto da cultura de embriões é a determinação do meio de cultura que sustenta seu crescimento e desenvolvimento, pois os nutrientes requeridos variam dependendo da idade do embrião (Burun & Poyrazoglu, 2002). Segundo Hu & Ferreira (1998), embriões excisados no estágio maduro ou próximo a este são quase autotróficos e, em geral, dependendo da espécie, não há necessidade de suplementação de fonte de energia, podendo germinar e crescer num meio inorgânico, sendo dispensável o uso de reguladores de crescimento (Carvalho et al., 1998). Assim, têm-se buscado meios nutritivos que se aproximem da composição do endosperma e possibilitem o desenvolvimento dos embriões, independente da fase em que se encontram (Ribeiro et al., 2003).

De maneira geral, meios de cultura menos concentrados (MS/4) permitem melhor germinação de embriões e crescimento de plantas de arnica, unha-de-gato [*Uncaria tomentosa* (Willd. ex Roem. & Schult.) DC.] e erva cidreira *in vitro* (Souza et al., 2003; Pereira et al., 2006; Reis et al., 2008), enquanto os meios MS e WPM/2, sem sacarose e sem adição de BAP, apresentam, respectivamente, 60% e 100% de germinação *in vitro* de embriões de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) (Nogueira et al., 2004).

### Embriogênese somática

A embriogênese somática constitui-se em ferramenta de alta eficiência para o processo de micropropagação porque oferece importantes vantagens. A regeneração de plantas por esta técnica é altamente desejável por ser processo que permite altas taxas de multiplicação e resulta em embriões individualizados que se desenvolvem diretamente em plantas (Nunes et al., 2002). Além disto, é técnica de grande aplicabilidade para os estudos básicos relacionados com a fisiologia, genética e bioquímica do desenvolvimento embrionário. Entretanto, na maior parte dos protocolos de regeneração são utilizados

altos níveis de auxinas (especialmente 2,4-D, ácido 2,4 diclorofenoxiacético), o que pode levar à indução de variação somaclonal, que será verificada na população regenerada (Bhargava et al., 2003).

Sagare et al. (2000) relatam a indução de grande número de embriões somáticos em meio MS suplementado com BAP, cinetina e zeatina, após a transferência de calos iniciados a partir de rizomas de *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang. (Fumariaceae). Resultados semelhantes foram encontrados por Lameira et al. (2002) e Martin (2003), que obtiveram, respectivamente, embriões somáticos de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm.) a partir de segmentos nodais na presença de cinetina e AIA e embriões somáticos e plantas viáveis a partir de calos de *Holostemma ada-kodien* Schult utilizando folhas, internódios e raízes.

Em algumas espécies medicinais, explantes radiculares vêm sendo utilizados com sucesso na formação de embriões, principalmente quando submetidos a concentrações de 2,4-D (Chang & Hsiang, 1980; Wu et al., 2004; Flores et al., 2007).

Para verificar a possível ocorrência de variação somaclonal em plantas regeneradas a partir de embriões somáticos, podem ser empregadas técnicas de marcadores moleculares. Shoyama et al. (1997) utilizaram análise de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) e verificaram homogeneidade genética em plantas de *Panax notoginseng* (Burkill) F. H. Chen, sugerindo que a embriogênese somática pode ser utilizada para multiplicação clonal desta espécie.

### Cultura de calos, suspensão de células e biorreatores

Outra técnica de multiplicação *in vitro* é a organogênese indireta, passando pela fase de calo. Para ocorrer a indução de calo, qualquer tecido vegetal pode ser utilizado como explante. Entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a totipotência (Grattapaglia & Machado, 1998). Explantes oriundos de tecidos jovens, não lignificados, são mais apropriados para a cultura de calo (Pierik, 1990).

O crescimento de calos é desejável para induzir variação somaclonal e realizar estudos fisiológicos, principalmente quando se deseja relacionar a presença de produtos secundários com o crescimento celular (Pierik, 1990). Assim, objetivando obter calos friáveis para aplicação em suspensões celulares, possibilitando estudos futuros na área de embriogênese somática e/ou metabólitos secundários, experimentos já foram conduzidos em explantes foliares e nodais de centela (*Centella asiática* L.) (Patra et al., 1998) e em segmentos de folhas de unha-de-gato (Pereira et al., 2007) e de

estévia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni] (Patrão et al., 2007).

De acordo com Ozias-Akins & Vasil (1985), muitas vezes é necessário o suprimento exógeno de reguladores de crescimento para a indução de calo, sendo que muitos tecidos desenvolvem-se *in vitro* apenas com suprimento de auxinas. Porém, Vietez & San-José (1996) mencionam que o balanço hormonal obtido entre níveis de citocininas e auxinas, exógenas e endógenas à planta, pode estimular a proliferação celular.

Dentre os reguladores de crescimento mais utilizados na indução de calo em plantas medicinais destacam-se o thidiazuron (TDZ) (Lameira et al., 1997b) e o 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) (Nogueira et al., 2007).

A cultura de tecidos também tem sido apontada como valioso instrumento para o estudo dos metabólitos primário e secundário, constituindo um sistema apropriado para a produção de compostos farmacológicos importantes. Pesquisas têm demonstrado sucesso na produção de metabólitos secundários em diferentes órgãos e culturas não organizadas como calos e suspensão de células (Schripsema & Verpoorte, 1994; Karam et al., 2003; Furden et al., 2005; Gyorgy et al., 2005). No entanto, alguns fatores *in vitro* podem coordenar ou alterar a taxa de produção de metabólitos secundários em plantas medicinais, como a luminosidade, o tipo de frasco (Buffa Filho et al., 2002) e o meio de cultura (Mógor et al., 2007; Reis et al., 2009).

Zypman et al. (1997) realizaram experimentos empregando métodos de cultura de tecidos para a produção de bioinseticida em nim indiano (*Azadirachata indica* A. Juss). Bioensaios executados para avaliar a eficácia de extratos de folhas, calos e suspensão de células *in vitro*, demonstraram que todos os extratos foram eficazes no controle de *Schistocerca gregaria* (gafanhoto-do-deserto), indicando que o emprego de tal técnica para a produção de extratos de nim é possível.

Porém, a produção de glicosídeos diterpenóides (GDS) em culturas de *Stevia rebaudiana in vitro* é pouco entendida e os resultados obtidos por diversos autores são bastante contraditórios (Bondarev et al., 2001). Por exemplo, Nabeta et al. (1976), Suzuki et al. (1976) e Miyagawa et al. (1984) não encontraram evidências da presença de GDS em cultura de calos e de células em suspensão de *S. rebaudiana*, entretanto Lee & Kang (1982) detectaram esteviosídeos em tecidos de calos desta planta medicinal.

Diversos princípios ativos já foram obtidos via técnicas de cultura de tecidos. Como exemplos pode-se citar os alcalóides aparicina (Van Der Heijden et al., 1988; Sierra et al., 1991), aspidochibina (Aimi et al., 1991; 1994) e ramiflorina (Oliveira et al., 2002).

Visando otimizar a produção *in vitro* de compostos de interesse farmacológico, biorreatores têm sido empregados devido aos menores custos e capacidade de produzir tecidos diferenciados contendo significativas quantidades de metabólitos secundários (Gerth et al., 2002; Wilken et al., 2005). Neste contexto, foi relatada a primeira produção *in vitro* de biomassa de capim-limão [*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.] (Quiala et al., 2006). Entretanto, uma vez que os biorreatores podem proporcionar condições de cultura totalmente diferentes das obtidas em frascos, os resultados de rendimentos não podem ser diretamente relacionados (Kim et al., 2002). Assim, mais estudos sobre a produção de metabólitos secundários em biorreatores se fazem necessários para cada espécie vegetal em particular.

Objetivando comparar metodologias para produção dos principais componentes medicinais da erva de São João (*Hypericum perforatum* L.), Zobayed & Saxena (2004) encontraram que os níveis de hipericina e pseudohipericina foram significativamente maiores nas plantas cultivadas em sistema de biorreatores de ambiente fechado e controlado em detrimento aos rendimentos obtidos *in vitro* e em casa-de-vegetação. Esses resultados sugerem que a adaptação deste sistema de cultivo pode otimizar a produção de biomassa e fitoquímicos desta e de outras espécies medicinais.

As principais desvantagens da utilização de biorreatores são a necessidade de mão-de-obra especializada e a manutenção das condições de produção que exigem controle rígido de temperatura, trocas gasosas, sais minerais, pH, reguladores de crescimento e densidade celular (Heyerdahl et al., 1995; Pletsch, 1998).

De maneira geral, a produtividade da cultura de células em biorreatores é contínua (Russowski, 2007), atendendo instantaneamente a demanda do mercado consumidor pelos princípios ativos das plantas medicinais. No entanto, sua aplicação em escala industrial só é economicamente viável se os metabólitos forem de alto valor ou sua síntese favorecida *in vitro*. Neste sentido, citam-se Zhong et al. (1995) e Silva et al. (2006), respectivamente.

Muitas estratégias são utilizadas para se aumentar a produtividade de metabólitos secundários vegetais *in vitro*, como a adição de compostos precursores ao meio de cultivo (Silvestrini et al., 2002), a elicitação (Wang & Zhong, 2002; Dong & Zhong, 2001; Hu et al., 2001; Lee & Shuler, 2000) e a transformação genética usando o sistema de vetor natural mediado por *Agrobacterium rhizogenes* ou *A. tumefaciens* (Giri & Narasu, 2000; Saito et al., 1992).

### Cultura de protoplastos

O interesse em tecnologia de protoplastos tem tido um foco particular na geração de novos

híbridos somáticos e de híbridos citoplasmáticos que não podem ser produzidos via hibridação convencional (Davey et al., 2005). No entanto, esta técnica é pouco empregada em plantas medicinais, sendo escassos os relatos na literatura de sua utilização (Chand et al., 1988; Arya et al., 1991; Laurain et al., 1993; Matos, 2006). Arya et al. (1991) demonstraram que é possível regenerar plantas a partir de culturas de protoplastos de *Panax ginseng* C. A. Mey, já que obtiveram alta frequência de organogênese em protoplastos isolados de embriões desta espécie medicinal, o que pode ser valioso nos programas de melhoramento de novas variedades de ginseng.

## CONCLUSÃO

As técnicas de cultura de tecidos são bastante aplicadas em pesquisas envolvendo plantas medicinais, com ênfase na micropropagação, cujos protocolos permitem estabelecer padrões para a multiplicação massal de várias espécies. Além disso, essa ferramenta biotecnológica permite a produção de metabólitos secundários *in vitro*, assegurando, assim, formas alternativas para a exploração sustentável de algumas espécies, principalmente em ecossistemas ameaçados.

A aplicação das técnicas de cultura de tecidos em plantas medicinais tem como perspectivas a obtenção de germoplasma competitivo e adaptado a diversos métodos de cultivo, escolha de novas espécies que servirão como fonte de compostos biologicamente ativos e aprimoramento da produção de fitofármacos.

Nesse sentido, a cultura de tecidos dispõe alternativas para uma maior produção de biomassa e para garantir a perpetuação de espécies de interesse econômico, apesar das informações científicas sobre plantas medicinais crescerem num ritmo pouco intenso no que se refere aos métodos de propagação, de manipulação *in vitro* e de produção de metabólitos de interesse.

## REFERÊNCIA

- ABREU, I.N. et al. Propagação *in vivo* e *in vitro* de *Cissampelos sicyoides*, uma planta medicinal. **Acta Amazônica**, v.33, n.1, p.1-7, 2003.
- AIMI, N. et al. Novel indole alkaloids from cell suspension cultures of *Aspidosperma quebracho blanco* Schlecht. **Tetrahedron Letters**, v.32, n.7, p.4949-52, 1991.
- AIMI, N. et al. Isolation of two nitrogenous metabolites from the cultured cells of *Aspidosperma quebracho blanco*. **Heterocycles**, v.38, p.2411-4, 1994.
- AJITHKUMAR, D.; SEENI, S. Rapid clonal multiplication through *in vitro* axillary shoot proliferation of *Aegle marmelos* (L.) Corr., a medicinal tree. **Plant Cell Reports**, v.17, n.5, p.422-6, 1998.
- ANDRADE, M.W. et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, n.1, p.174-80, 2000.
- ARAÚJO, P.S. et al. Micropropagação de babosa (*Aloe vera* - Liliaceae). **Biociência, Ciência & Desenvolvimento**, n.25, p.54-7, 2002. Disponível em: <<http://www.biociencia.com.br/revista/bio25/micro.pdf>>. Acesso em: dez. 2009.
- ARIMURA, C.T. et al. Interação ANA x BAP no desenvolvimento *in vitro* de gengibre. **Acta Horticulturae** (ISHS), n.569, p.289-91, 2002. Disponível em: <[http://www.actahort.org/books/569/569\\_47.htm](http://www.actahort.org/books/569/569_47.htm)>. Acesso em: dez. 2009.
- ARNALDOS, T.L. et al. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria ananassa*, c.v. Chandler) callus culture. **Physiologia Plantarum**, v.113, n.3, p.315-22, 2001.
- ARYA, S. et al. Plant regeneration from protoplasts of *Panax ginseng* (C. A. Meyer) through somatic embryogenesis. **Plant Cell Reports**, v.10, n.6, p.277-81, 1991.
- BANDEIRA, J.M. et al. Diferentes tipos de vedações dos frascos e concentrações de sacarose na micropropagação de *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.472-4, 2007.
- BERTOLUCCI, S.K.V. et al. Micropropagação de *Tournefortia* cf. *paniculata* Cham. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.3, n.1, p.43-9, 2000.
- BHARGAVA, S.C. et al. *In vitro* multiplication of *Phoenix dactylifera* L. **Journal Plant Biochemistry & Biotechnology**, v.12, p.43-7, 2003.
- BONDAREV, N. et al. Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Plant Science**, v.161, p.155-63, 2001.
- BUFFA FILHO, W. et al. Indução de metabólitos bioativos em culturas de células de *Maytenus ilicifolia*. **Eclética Química**, v.27, n.esp., p.403-16, 2002.
- BURUN, B.; POYRAZOGLU, E.Ç. Embryo culture in Barley (*Hordeum vulgare* L.). **Turkish Journal of Biology**, v.26, n.3, p.175-80, 2002.
- CALDAS, L.S. et al. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p.87-132.
- CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n.1-2, p.131-4, 2005.
- CAMPOS, R.A.S. et al. Micropropagação de *Jatropha elliptica* (Pohl) Müll. Arg. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.9, n.3, p.30-6, 2007.
- CARVALHO, G.R. et al. Efeito do ácido giberélico e benzilaminopurina no crescimento *in vitro* de embriões do cafeeiro cv. acaia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, n.6, p.847-51, 1998.
- CATTELAN, L.V. et al. Estabelecimento *in vitro* de *Matricaria recutita* utilizando diferentes condições de cultivo. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.201-3, 2007.
- CHAND, P.K. et al. Electroporation stimulates plant regeneration from protoplasts of the woody medicinal species *Solarium dulcamara* L. **Journal of Experimental**



- Botany**, v.39, n.9, p.1267-75, 1988.
- CHANG, W.C.; HSIANG, Y.I. Plant regeneration through somatic embryogenesis in root derived callus of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). **Theoretical and Applied Genetic**, v.57, n.3, p.133-5, 1980.
- COSTA, C.M. et al. Organogênese indireta em explantes de folhas cotiledonares de calêndula. **Revista Ceres**, v.49, n.285, p.563-8, 2002.
- COSTA, N.M.S. **Cultivo in vitro e estudo anatômico da tamareira (*Phoenix dactylifera* L.)**. 2006. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.
- COSTA, A.S. et al. Estabelecimento de alecrim-pimenta *in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v.25, n.1, p.68-72, 2007.
- DAVEY, M.R. et al. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. **Biotechnology Advances**, v.23, p.131-71, 2005.
- DESCHAMPS, C. **Propagação vegetativa in vitro de Sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG.), espécie florestal de mata ciliar**. 1993. 128p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.
- DINIZ, J.D.N. et al. Multiplicação e enraizamento *in vitro* do guaco. **Revista Ciência Agrônômica**, v.37, n.1, p.59-64, 2006.
- DONG, H.D.; ZHONG, J.J. Significant improvement of taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* by combining elicitation with sucrose feed. **Biochemical Engineering Journal**, v.8, n.2, p.145-50, 2001.
- EINSERT, J.W. Woody plant micropropagation with cytokinins. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry: high-tech and micropropagation I**. Berlin: Springer, 1991. v.17, p.190-201.
- ERIG, A.C. et al. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de marmeleiro cvs. Mc e Adams, utilizadas como porta-enxerto para a pereira. **Scientia Agraria**, v.5, n.1-2, p.61-8, 2004.
- FLORES, R. et al. Regeneração *in vitro* de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.4, n.3, p.201-5, 1998.
- FLORES, R. et al. Embriogênese somática e organogênese indireta em *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.993-5, 2007.
- FRACARO, F.; ECHEVERRIGARAY, S. Micropropagation of *Cunila galioides*, a popular medicinal plant of south Brazil. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.64, n.1, p.1-4, 2001.
- FRANÇA, S.C. et al. Micropropagation of *Stryphnodendrons polyphythum* (Barbatimão). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.42, p.291-3, 1995.
- FURDEN, B.V. et al. Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin accumulation in *Linum album* cell suspension cultures. **Plant Cell Reports**, v.24, p.312-7, 2005.
- GALLO-MEAGHER, M.; GREEN, J. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of saw palmetto, an important landscape and medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.68, n.3, p.253-6, 2002.
- GEORGE, F. **Plant propagation by tissue culture: the technology**. Dordrecht: Springer, 1993. 574p.
- GERTH, A. et al. Production of active substances applying innovative plant biotechnology. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT TISSUE CULTURE, 10., 2002, Orlando. **Proceedings...** Orlando: IAPTC, 2002. p.1152.
- GIRI, A.; NARASU, M.L. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. **Biotechnology Advances**, v.18, p.1-22, 2000.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p.183-260.
- GYORGY, Z. et al. Enhanced biotransformation capacity of *Rhodiola rosea* callus cultures for glycosid production. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.83, p.129-35, 2005.
- HEYERDAHL, P.H. et al. Engineering aspects of plant propagation in bioreactors. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; SMITH, M.A.L. (Eds.). **Automation and environment control in plant tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p.87-123.
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G. Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v.1, 371-94.
- HU, W.W. et al. Improvement of *Panax notoginseng* cell cultures for production of ginseng saponin and polysaccharide by high-density cultivation of pneumatically agitated bioreactors. **Biotechnology Progress**, v.17, n.5, p.838-46, 2001.
- KARAM, N.S. et al. Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.73, p.117-21, 2003.
- KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas *in vitro*. **Revista de Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.28, p.1-3, 2003.
- KIM, Y. et al. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v.38, n.1, p.1-10, 2002.
- KOMALAVALLI, N.; RAO, M.V. *In vitro* micropropagation of *Gymnema sylvestre* - A multipurpose medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.61, n.2, p.97-105, 2000.
- KOROCH, A. et al. *In vitro* regeneration of *Echinacea purpurea* from leaf explants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.69, n.1, p.79-83, 2002.
- LAMEIRA, O.A. et al. Efeito de compostos fenólicos, carvão ativado e do meio físico no desenvolvimento de segmento nodal de *Cordia verbenacea* L. **Ciência Rural**, v.27, n.2, p.189-92, 1997a.
- LAMEIRA, O.A. et al. Efeito de Thidiazuron na indução e manutenção de calos de erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.). **Ciência Rural**, v.27, n.1, p.47-9, 1997b.
- LAMEIRA, O.A. et al. Embriogênese somática de *Pilocarpus microphyllus* (Jaborandi). **Acta Horticulturae** (ISHS), n.569, p.271-4, 2002. Disponível em: <[http://www.actahort.org/books/569/569\\_44.htm](http://www.actahort.org/books/569/569_44.htm)>. Acesso em: dez. 2009.
- LAURAIN, D. et al. Direct embryogenesis from female haploid protoplasts of *Ginkgo biloba* L., a medicinal

- woody species. **Plant Cell Reports**, v.12, n.11, p.656-60, 1993.
- LEE, J.I.; KANG, K.K. Studies on the callus culture of stevia as a new sweetening source and formation of stevioside. **Hanguk Chuksan Hakhoe Chi**, v.14, p.179-83, 1982.
- LEE, C.W.T.; SHULER, M.L. The effect of inoculum density and conditioned medium on the production of ajmalicine and catharanthine from immobilized *Catharanthus roseus* cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v.67, n.1, p.61-71, 2000.
- LIMA, C.S.M. et al. Influência de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de partes aérea de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.669-71, 2007.
- MANTOVANI, N.C. **Propagação vegetativa e cultivo *in vitro* de *Bixa orellana* L. e *Ginkgo biloba* L.** 2007. 135p. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- MARTIN, K.P. Plant regeneration through somatic embryogenesis on *Holostemma ada-kodien*, a rare medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.72, p.79-82, 2003.
- MATOS, G.V.C. **Hibridação somática em *Passiflora* spp.** 2006. 52p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico, Campinas.
- MELLO, M.O. et al. Quantificação da micropropagação de *Curcuma zedoaria* Roscoe. **Scientia Agricola**, v.57, n.4, p.703-7, 2000.
- MERCIER, H. et al. Tissue culture and plant propagation of *Gomphrena officinalis* - a Brazilian medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.28, n.3, p.249-54, 1992.
- MERCIER, H.; NIEVOLA, G.B. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry: high tech and micropropagation**. Berlin: Springer, 2003. p.43-57.
- MIYAGAWA, H. et al. Studies on the tissue culture of *Stevia rebaudiana* and its components. **Shoyakugaku Zasshi**, v.38, p.12-8, 1984.
- MÓGOR, G. et al. Efeito de poliaminas exógenas no crescimento inicial *in vitro* e nos teores de fenóis, poliaminas e atividade da peroxidase em *Aloe vera* (L.) Burm. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.3, p.37-47, 2007.
- MURCH, S.J. et al. Thidiazuron-induced plant regeneration from hypocotyl cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum*. cv 'Anthos'). **Plant Cell Reports**, v.19, n.6, p.576-81, 2000.
- NABETA, K. et al. Phytosterol from the callus of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.40, p.2103-4, 1976.
- NEVES, T.S. et al. Desenvolvimento *in vitro* de plântulas de diplóides de bananeira obtidas a partir de cultura de embriões. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.1, p.6-9, 2002.
- NICIOLI, P.M. et al. Ajuste do processo de micropropagação de barbatimão. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.685-9, 2008.
- NICOLOSO, F.T. et al. Micropropagação do ginseng brasileiro. [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.3, n.2, p.11-8, 2001.
- 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**, v.26, n.esp., p.1499-506, 2002.
- NICOLOSO, F.T. et al. pH do meio de cultivo e crescimento de plântulas de ginseng brasileiro cultivadas *in vitro*. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p.2059-62, 2008.
- NOGUEIRA, R.C. et al. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.5, p.1053-9, 2004.
- NOGUEIRA, R.C. et al. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.2, p.366-70, 2007.
- NUNES, R.F.M. et al. Embriogênese somática em tamareira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém. **Proceedings...** Belém: SBF, 2002. Belém. 1 CD-ROM.
- OLIVEIRA, A.J.B. et al. Callus culture of *Aspidosperma ramiflorum* Muell. Arg.: growth and alkaloid production. **Acta Scientiarum**, v.23, p.609-12, 2002.
- OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I.K. Nutrition of plant tissue cultures. In: VASIL, I.K. (Ed.) **Cell culture and somatic cell genetics of plants: cell growth, nutrition, cytodifferentiation and cryopreservation**. Florida: Academic, 1985. v.2, p.128-47.
- PATNAIK, J.; DEBATA, B.K. Micropropagation of *Hemidesmus indicus* (L.) R. Br. through axillary bud culture. **Plant Cell Reports**, v.15, n.6, p.427-30, 1996.
- PATRA, A. et al. Successful plant regeneration from callus cultures of *Centella asiatica* (Linn.) Urban. **Plant Growth Regulation**, v.24, n.1, p.13-6, 1998.
- PATRÃO, A.P. et al. Comparação de diferentes metodologias para obtenção de cultura de calos de *Stevia rebaudiana* (Bertoni). **Acta Scientiarum**, v.29, n.2, p.121-4, 2007.
- PEREIRA, A.M.S. et al. Micropropagation of *Maytenus aquifolium*. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal plants**, v.2, n.3, p.11-9, 1994.
- PEREIRA, A.M.S. et al. Effect of phyto regulators and physiological characteristics of the explants on micropropagation of *Maytenus ilicifolia*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.42, n.3, p.295-7, 1995.
- PEREIRA, F.D. et al. Propagação *in vitro* de chapéu-de-couro (*Echinodorus cf. scaber* Rataj), uma planta medicinal. **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, p.74-80, 2000.
- PEREIRA, R.C.A. et al. Germinação, avaliação do ácido giberélico e posição do explante no alongamento *in vitro* de *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin Rubiaceae (unha-de-gato). **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n.4, p.637-42, 2006.
- PEREIRA, R.C.A. et al. Influência de diferentes auxinas na indução e cinética de crescimento de calos de *Uncaria guianensis* J.F. GMEL. (unha de gato). **Plant Cell Culture and Micropropagation**, v.3, n.2, p.69-77, 2007.
- PEREIRA, A.M.S. **Cultura de Tecidos de plantas mediciniais**. Disponível em: <<http://www.ufmt.br/.../Cultura%20de%20tecidos%20de%20plantas%20mediciniais.pdf>>. Acesso em: 14 dez. 2009.
- PIERIK, R.L.M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 326p.
- PLETSCH, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **Biotechnologia: Ciência e Desenvolvimento**, v.4,

- p.12-5, 1998. QUIALA, E. et al. Biomass production of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., a medicinal plant, in temporary immersion systems. **In vitro Cellular and Developmental Biology**, v.42, p.298-300, 2006.
- RATHORE, T.S. et al. Cloning of *Maytenus emarginata* (Willd.) Ding Hou - a tree of the Indian Desert, through tissue culture. **Plant Cell Reports**, v.11, n.9, p.449-51, 1992.
- RECH, E.L.; PIRES, M.J.P. Tissue culture propagation of *Mentha* spp. by the use of axillary buds. **Plant Cell Reports**, v.5, n.1, p.17-8, 1986.
- REIS, E.S. et al. Influência do meio de cultura na germinação de sementes *in vitro* e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Revista Ceres**, v.55, n.3, p.160-7, 2008.
- REIS, E.S. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. *in vitro* sob influência do meio de cultura. **Acta Scientiarum: Agronomy**, v.31, n.2, p.331-5, 2009.
- RIBEIRO, L.S. et al. Desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos de *Coffea arabica*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n. spe, p.1479-83, 2003.
- RIBEIRO, M.F. et al. Influência de diferentes concentrações de sais de MS e açúcares no cultivo *in vitro* de manjerição roxo (*Ocimum basilicum* L.). **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.57-9, 2007a.
- RIBEIRO, M.V. et al. Concentrações de sacarose e tipos de vedação no cultivo *in vitro* de *Melissa officinalis* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.843-5, 2007b.
- RUBIN, S. et al. Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.480-2, 2007.
- RUSSOWSKI, D. **Produção de valepotriatos em culturas líquidas de plantas de *Valeriana glechomifolia* Meyer (Valerianaceae)**. 2007. 157p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SABÁ, R.T. et al. Micropropagação do jaborandi. **Horticultura Brasileira**, v.20, n.1, p.106-9, 2002.
- SAGARE, A.P. et al. Cytokinin-induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Corydalis yanhusuo* (Fumariaceae) - a medicinal plant. **Plant Science**, v.160, n.1, p.139-47, 2000.
- SAHOO, Y.; CHAND, P.K. Micropropagation of *Vitex negundo* L., a woody aromatic medicinal shrub, through high-frequency axillary shoot proliferation. **Plant Cell Reports**, v.18, n.3-4, p.301-7, 1998.
- SAITO, K. et al. Transgenic medicinal plants: *Agrobacterium*-mediated foreign gene transfer and production of secondary metabolites. **Journal of Natural Products**, v.55, n.2, p.149-62, 1992.
- SATO, A.Y. et al. Micropropagação de *Celtis* sp: controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, v.7, n.2, p.117-23, 2001.
- SCHRIPSEMA, J.; VERPOORTE, R. Primary and secondary metabolism of plants and plant cell cultures: III Special Issue. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.38, n.2, p.23-8, 1994.
- SEN, J.; SHARMA, A.K. Micropropagation of *Withania somnifera* from germinating seeds and shoot tips. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.26, n.2, p.71-3, 1991.
- SHOYAMA, Y. et al. Micropropagation of *Panax notoginseng* by somatic embryogenesis and RAPD analysis of regenerated plantlets. **Plant Cell Reports**, v.16, n.7, p.450-3, 1997.
- SIERRA, M.I. et al. Alkaloid production in relation to differentiation in cell and tissue cultures of *Tabernaemontana pandacaqui*. **Planta Medica**, v.57, n.6, p.543-7, 1991.
- SILVA, S. et al. *In vitro* propagation of *Melissa officinalis* L. and production of essential oil. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, v.2, n.2, p.53-60, 2006.
- SILVESTRINI, A. et al. Effect of alkaloid precursor feeding on a *Campotheca acuminata* cell line. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.40, n.9, p.749-53, 2002.
- 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**, v.34, n.5, p.1471-7, 2004.
- SONIYA, E.V.; DAS, M.R. *In vitro* micropropagation of *Piper longum* - an important medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.70, n.3, p.325-7, 2002.
- SOUZA, A.V. et al. Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *Lychnophora pinaster* Mart. **Ciência e Agrotecnologia**, p.1532-8, 2003.
- SOUZA, A.V. et al. Enraizamento *in vitro* de plântulas de arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.), uma planta medicinal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, n.1, p.86-91, 2004.
- STEIN, V.C. et al. Efeito do genótipo na propagação *in vitro* de *Plantago* sp. **Revista Verde**, v.4, n.2, p.68-75, 2009.
- SUZUKI, H. et al. Isolation and identification of rutin from cultured cells of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.40, p.819-23, 1976.
- TEIXEIRA, S.L.; TORRES, A.C. Organização do laboratório de cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v.1, 71-86.
- VAN DER HEIJDEN, R. et al. Accumulation of indole alkaloids in a suspension culture of *Tabernaemontana divaricata*. **Planta Medica**, v.54, n.5, p.393-7, 1988.
- VEIGA-JUNIOR, V.F.; MELLO, J.C.P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p.464-71, 2008.
- VIEIRA, M.L.C. **Conservação de germoplasma**. Disponível em: <<http://www.biotechnologia.br>>. Acesso em: 11 ago. 2009.
- VIETEZ, A.M.; SAN-JOSÉ, M.C. Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants *in vitro*. **In vitro Cellular and Developmental Biology**, v.32, n.3, p.140-7, 1996.
- WANG, Z.Y.; ZHONG, J.J. Combination of conditioned medium and elicitation enhances taxoid production in bioreactor cultures of *Taxus chinensis* cells. **Biochemical Engineering Journal**, v.12, n.2, p.93-7, 2002.
- WILKEN, D. et al. Comparison of secondary metabolite production in cell suspension, callus culture and temporary immersion system. In: HVOS-ELF, T.; PREIL, W. (Eds.). **Liquid culture systems for in vitro plants propagation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2005. p.525-38.
- WU, I.F. et al. Effects of auxins and cytokinins on embryo formation from root-derived callus of *Oncidium* 'Gower

Ramsey. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.77, n.1, p.107-9, 2004.

YASUDA, K. et al. Multiplication of *Curcuma* species by tissue culture. **Planta Medica**, v.54, p.75-9, 1988.

ZHONG, J. et al. Recent advances in plant cell cultures in bioreactors. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.11, n.4, p.461-7, 1995.

ZOBAYED, S.; SAXENA, P.K. Production of St. John's wort plants under controlled environment for maximizing biomass and secondary metabolites. **In vitro Cellular and Developmental Biology**, v.40, n.1, p.108-14, 2004.

ZYPMAN, S. et al. Tissue culture methods and cloning of the neem tree (*Azadirachata indica*) for bioinsective production. **Acta Horticulturae**, p.235-6, 1997.