

# Germinação *in vitro* e organogênese direta em explantes hipocotiledonares com polaridade invertida de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes

## *In vitro* germination and direct organogenesis from hypocotyledonary explants with inverted polarity of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes

Maurecilne L. da Silva<sup>1\*</sup>; Aristéa A. Azevedo<sup>2</sup>; Gizelly M. da Silva<sup>3</sup>, Ilio F. de Carvalho<sup>4</sup>, Ana Aparecida B. Rossi<sup>5</sup>, Wagner C. Otoni<sup>6\*</sup>

<sup>1,4</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Genética/Cultura de Tecidos Vegetais – CPEDA, Universidade do Estado de Mato Grosso/UNEMAT, 78300-000, MT 358 Km 07, Jd. Aeroporto, Tangará da Serra, MT, Brasil – \*E-mails: maurecilne@gmail.com, iliocarv@gmail.com.

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Vegetal, Laboratório de Anatomia Vegetal, Av. Peter Henry Rofs s/n, Ed. CCB II, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 36570-000 Viçosa, MG, Brasil – E-mail: aazevedo@ufv.br.

<sup>3</sup>Mestranda em Genética e Melhoramento de Plantas, Laboratório de Genética/Cultura de Tecidos Vegetais - CPEDA, Universidade do Estado de Mato Grosso/UNEMAT, 78300-000, MT 358 Km 07, Jd. Aeroporto Tangará da Serra, MT, Brasil E-mail: gizellymendes@hotmail.com.

<sup>5</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade do Estado de Mato Grosso/UNEMAT, Campus Universitário de Alta Floresta. Residencial Flamboyant, Alta Floresta, MT, 78.580-000, Brasil; E-mail: anabanrossi@gmail.com

<sup>6</sup>Departamento de Biologia Vegetal, Laboratório de Cultura de Tecidos/BIOAGRO, Av. Peter Henry Rofs s/n, UFV, 36570-000 Viçosa, MG, Brasil – E-mail: wcotoni@gmail.com

\*Correspondências: maurecilne@gmail.com e wcotoni@gmail.com

**Palavras-chaves:** Poaia; Alcalóides; Planta medicinal; Cultivo *in vitro*; Histologia; Brotações adventícias.

**Key words:** Poaia; Alkaloids; Medicinal plant; *In vitro* culture; Histology; Adventitious shoots

### Resumo

Este trabalho visou à germinação e à regeneração adventícia *in vitro* de brotos a partir de hipocótilos invertidos de *Psychotria ipecacuanha*. Os resultados demonstraram um percentual de 84,17% de sementes germinadas com desenvolvimento normal das plântulas. A germinação iniciou-se após o segundo dia de cultivo sendo observada até aos 70 dias. Após 40 dias de cultivo foram obtidas plântulas com  $\pm 10$  cm, respondendo satisfatoriamente ao processo de aclimatização, sob condições de laboratório. Nos hipocótilos com polaridade invertida formaram-se brotos adventícios por via direta do tecido do explante, na região de contato com o meio de cultura, em vários estádios de desenvolvimento e na porção do hipocótilo fora de contato com o meio. A utilização de hipocótilos com a polaridade invertida ainda não foi reportada para a espécie. A organogênese ocorreu de forma direta nos explantes de *P. ipecacuanha* e a concentração de 1 mg L<sup>-1</sup> BA favoreceu a indução de maior número de brotações adventícias. A análise anatômica dos brotos adventícios confirmou a origem dessas brotações por organogênese direta. Brotos adventícios alongados foram enraizados na presença de AIB. O maior percentual de enraizamento das brotações ocorreu na presença de 1,5 mg L<sup>-1</sup> do regulador.

## Abstract

This study aimed to seed germination and adventitious shoot regeneration from *Psychotria ipecacuanha* inverted hypocotyls. The results showed a percentage of 84.17% of seeds germinated with normal seedlings development. The germination started after the second day of cultivation and was observed up to 70 days. After 40 days seedlings were obtained with average 10 cm in length, responding satisfactorily to the process of acclimatization under laboratory conditions. In hypocotyls with inverted polarity adventitious shoots were formed directly from the explant tissue in the region of contact with the medium, and on the hypocotyl portion out of contact with the medium. The use of hypocotyls with inverted polarity has not been previously reported for the species. The organogenesis occurred directly in the explants and the BA at 1 mg L<sup>-1</sup> enhanced the induction of greater number of adventitious shoots. Anatomical analysis confirmed the formation of adventitious shoots by direct pathway. Elongated adventitious shoots were rooted in the presence of IBA. The highest percentage of rooting shoots occurred in the presence of 1.5 mg L<sup>-1</sup> of this growth regulator.

## Introdução

*Psychotria ipecacuanha* conhecida popularmente como poaia é reconhecida mundialmente como uma das espécies medicinais mais importantes da indústria farmacêutica devido à presença dos alcaloides bioativos encontrados em suas raízes, sendo os principais a emetina, cefalina e a psicotrina (Assis e Giullietti 1999; Rossi et al., 2009). Os alcaloides possuem ação emética, nas afecções brônquicas como anti-inflamatório, no combate a febres e malária e atuam como inibidores da síntese de proteínas e de DNA (Burhans et al., 1991) e são principalmente utilizados no combate à amebíase. A poaia brasileira é a preferida no mercado mundial, por possuir maior concentração de alcaloides eméticos, o que levou o Brasil a ser um dos principais exportadores desse produto extinção (Vieira, 1991).

As raízes da poaia crescem torcidas, ramificando-se com o tempo; a parte inferior é carnosa e fibrosa, possuindo cheiro fraco, quando frescas, e um sabor amargo e nauseante (Lameira 2002) em consequência da concentração dos alcaloides eméticos. A coleta silvestre das raízes de poaia é a principal fonte de manutenção do mercado mundial. Em consequência desse extrativismo intenso e da destruição do seu habitat pelo desmatamento das áreas de subosques e florestas naturais, a espécie encontra-se em vias de extinção (Rossi et al., 2009; Oliveira et al., 2010).

O cultivo da espécie é dificultado devido ao crescimento lento, baixa porcentagem de germinação de suas sementes e pela perda de viabilidade após estocagem. Em condições naturais e em viveiro, a germinação demora de três a seis meses (Oliveira e Martins, 1998). Outro aspecto relevante é atribuído ao extenso período de 3 a 4 anos, para que

ocorra maior concentração dos alcaloides eméticos nas suas raízes (Yoshimatsu e Shimomura, 1993; Shimomura, 1998). Esses fatores contribuem para que ocorram oscilações no atendimento às demandas da indústria farmacêutica.

A propagação *in vitro* de *P. ipecacuanha* já foi descrita anteriormente (Ikeda et al., 1988; Yoshimatsu e Shimomura 1993; Reis et al., 2004; Gomes, Oliveira e Ribeiro, 2009). No entanto, ainda não foram estabelecidas condições ideais que garantam a viabilidade econômica desta técnica de cultivo. Diferentes tipos de explantes têm sido utilizados na cultura de tecidos de *P. ipecacuanha* como segmento nodal (Ikeda et al., 1988), hipocótilos (Jha, Sahu e Mahato, 1988) e segmento internodal (Reis et al., 2004; Gomes, Oliveira e Ribeiro, 2009). Experimentos com germinação *in vitro* de sementes de *P. ipecacuanha* foram realizados por (Jha, Sahu e Mahato, 1988), que utilizaram plântulas para o cultivo de calo a partir de hipocótilo, visando à produção *in vitro* de alcaloide eméticos e com Rajkhowa (1969) que cultivou sementes *in vivo*, obtendo também baixos índices de germinação.

Ainda não foi descritos relatos na literatura sobre a utilização de hipocótilos com polaridade invertida como fonte de explante para a indução de organogênese para esta espécie. A indução de brotações adventícias em hipocótilos com a polaridade invertida foi relatada com sucesso para espécies de *Bixa orellana* (Paiva Neto, Mota e Otoni, 2003; Parimalan et al., 2007) *Capsicum frutescens* (Kumar et al., 2007), *Genipa americana* (Rocha et al., 2008) como fonte alternativa de explante e estudos fisiológicos quanto a inversão da polaridade do explante.

O presente trabalho teve como objetivo o estabelecimento de um protocolo para a germinação *in vitro*

de sementes de *P. ipecacuanha* e a regeneração de brotações adventícias a partir de hipocótilos invertidos.

## Material e Métodos

Sementes de poaia (Figura 1A) foram coletadas em espécimes adultos que ocorrem naturalmente em fragmentos florestais no município de Barra do Bugres no Estado de Mato Grosso, localizada a 58° W a 57° 45' W e 14° 30' a 14° 45' S e transportadas para o Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais/UFV/Bioagro.

As sementes foram desinfestadas com álcool etílico a 70° (v/v) por 1 minuto, posteriormente em água deionizada esterilizada com Tween 20 (3 gotas de Tween 20 em 100 mL de H<sub>2</sub>O), por 15 minutos. Em seguida as sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% por 30 minutos, e enxaguadas por 4 lavagens consecutivas em água deionizada e esterilizada.

Primeiramente foram realizados testes pré-germinativos para definir as melhores condições de cultivo das sementes. Foram testadas nas seguintes condições, sendo sementes com e sem tegumento externo inoculadas no meio com os sais básicos de MS (Murashige e Skoog, 1962) na metade da concentração (MS ½) e força total, acrescido de sacarose a 3,0% (p/v), 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, complexo vitamínico de White (White, 1951) e 5 g L<sup>-1</sup> de ágar (Sigma Chemical Co., USA). Com suplementação de 0; 0,5 e 1 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>. O pH do meio foi ajustado a 5,7 ± 0,1, antes da autoclavagem. As culturas foram mantidas no escuro em estufa incubadora (Diurnal Growth Chamber, Forma Scientific, USA), à temperatura de 26 ± 2 °C para germinação num período de 30 dias.

Sementes cultivadas na ausência de tegumento e no meio de MS na metade da concentração dos sais básicos resultou na melhor condição de cultivo *in vitro*. Desta forma foi montado o experimento para o estabelecimento do protocolo para a germinação de sementes de *P. ipecacuanha*. Em capela de fluxo laminar, retirou-se mecanicamente o tegumento externo das sementes de poaia, com auxílio de um bisturi,

sob lupa. Logo após, procedeu nova desinfestação com hipoclorito de sódio a 1,5%, durante 15 minutos, seguido por 4 enxágues em água deionizada e esterilizada. As sementes foram cultivadas no meio de MS ½ nas mesmas condições anteriormente descritas.

Dez sementes foram inoculadas por placa de Petri, no total de 24 repetições e 240 sementes inoculadas. O número de sementes germinadas foi avaliado a cada 7 dias, durante 70 dias de cultivo. Foram aclimatizadas 30 plântulas com aproximadamente 10 cm de altura em substrato Plantmax® sob condições de laboratório e, posteriormente em casa de vegetação.

Para a indução de rizogênese, brotos adventícios (±15 mm), originados dos explantes dos hipocótilos cultivados em placas, foram individualizados e inoculados em frascos (250 mL) contendo 30 mL de meio básico de MS nas mesmas condições anteriores e suplementado com 1,5 e 3,0 mg L<sup>-1</sup> de ácido indolil-3-butírico (AIB). As culturas foram mantidas no escuro com temperatura de 26 ± 2 °C por 70 dias.

Objetivando análises anatômicas da morfogênese *in vitro* das brotações adventícias, cultivados por 30 dias e submetidos a cortes a fresco utilizando-se de micrótomo de mesa (Ernst Leitz - Wetzlar) e montadas lâminas temporárias em glicerina após coloração dos cortes com safrablau.

Para todos os experimentos utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC). No experimento de indução de organogênese, foram realizados 04 (quatro) tratamentos com 4 repetições, cada repetição foi constituída de uma placa com 10 explantes. Para a avaliação da rizogênese foram inoculados 5 brotos adventícios por repetição, num total de 5 repetições por tratamento. Os dados obtidos foram analisados, quando apropriado, com ajuda do Aplicativo computacional em genética e estatística GENES (Cruz, 2006).

## Resultados e Discussão

Foi obtido percentual de 84,17% de germinação das sementes cultivadas *in vitro* de *P. ipecacuanha*

com desenvolvimento normal das plântulas. A germinação iniciou-se após o segundo dia de cultivo e foi observada até aos 70 dias (Figura 1B), caracterizando grande desuniformidade na germinação. A presença de tegumento nas sementes favoreceu o aparecimento de contaminantes, principalmente por bactérias, mesmo com a utilização de antibiótico Timentin foi de 99%. No entanto, a retirada dos tegumentos das sementes proporcionou rendimentos de 100% de culturas assépticas.

A dormência das sementes de *P. ipecacuanha* está relacionada com a consistência fibrosa do tegumento que prejudica a embebição e impede a extrusão da radícula (Figura 1A). A retirada do tegumento aumentou a taxa de germinação em sementes de *Pterodon pubescens* (Coelho et al., 2001), *Bixa orellana* L. cv. Bico de Pato (Paiva Neto, Mota e Otoni, 2003) e em *Passiflora* sp. (Carvalho et al., 2012; Soares et al., 2012). Apesar de *C. ipecacuanha* não apresentar camada paliádica do tegumento, observou-se que este é constituído de fibras entrelaçadas e esclerificadas, o que dificulta a sua embebição. Após 40 dias de cultivo foram obtidas plântulas com  $\pm 10$  cm. Ao todo, 20 plântulas  $\pm 15$  cm de *P. ipecacuanha* foram aclimatizadas (Figura 1C) com sucesso sob condições de laboratório e em casa de vegetação, com 99% de sobrevivência.

**Tabela 1** - Médias do número de brotações adventícias em hipocótilos com a polaridade invertida e segmentos de hipocótilos de *P. ipecacuanha* na presença de concentrações de BA, após 30 dias de cultivo *in vitro*.

Explante	Concentração de BA (mg L <sup>-1</sup> )			
	0	1	2	3
Hipocótilo com polaridade invertida	1,38 Bab	2,00 Ba	1,43 Aab	0,90 Bb
Segmento de hipocótilo	2,58 Ab	4,00 Aa	1,73 Ab	1,85 Ab

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas dentro da mesma linha e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas dentro da mesma col una, não diferem estatisticamente entre si a 5% de probabilidade.

Segmentos de hipocótilos cultivados em presença de 1 mg L<sup>-1</sup> de BA produziram maior número de

brotações adventícias (Figura 2) de forma direta (Figura 1D). Cultivando explantes de segmento internodal de *P. ipecacuanha* Yoshimatsu e Shimomura (1993), indicam a importância da utilização de explantes juvenis, principalmente, no estabelecimento da cultura *in vitro*, por ser material ideal para a micropropagação e manipulação genética (Singh et al., 2002; Paiva Neto, Mota e Otoni, 2003). Além de uma ferramenta alternativa para uma rápida multiplicação e conservação de espécies que possuem dificuldades de propagação em método convencional, e de, constituir-se em técnica especialmente vantajosa para a preservação de genótipos produtores de compostos medicinais (Parveen e Shahzad, 2011). Protocolos de micropropagação têm sido desenvolvidos para importantes espécies medicinais *Eclipta alba* (Baskaran e Jayabalan, 2005), *Celastrus paniculatus* (Martin et al., 2006), *Pterocarpus marsupium* (Husain, Anis e Shahzad, 2008), *C. siamea* (Parveen e Shahzad, 2011), *Veronica anagallis-aquatica* (Shahzad Parveen e Fatema, 2010) e *Azadirachta indica* (Rodrigues et al., 2012).

Nos hipocótilos com a polaridade invertida formaram-se brotos adventícios direto do tecido do explante, na região basal em contato com o meio de cultura e na região mediana, em vários estágios de desenvolvimento (Figura 1E), nesta última com a formação de brotos mais alongados e de fácil individualização apresentando a melhor resposta e diferindo estatisticamente dentre os tratamentos e o tipo de explante.

A organogênese ocorreu de forma direta nos explantes de *P. ipecacuanha* com o intumescimento da região do hipocótilo invertido em contato com o meio de cultura desenvolvendo multibrotações (Figura 1F). Apesar da produção dos múltiplos brotos nos hipocótilos com a polaridade invertida, os explantes seccionados apresentaram maior número de brotações adventícias (Figura 2). A organogênese em hipocótilos invertidos foi relatado na regeneração de *Capsicum annuum* (Valera-Montero e Ochoa-Alejo, 1992) e *Bixa orellana* (Paiva Neto, Mota e Otoni, 2003; Parimalan et al., 2007), *Genipa americana* (Rocha et al., 2008), sendo que para estas espécies a utilização desse tipo de explante apresentou melhor produtividade de brotos adventícios.



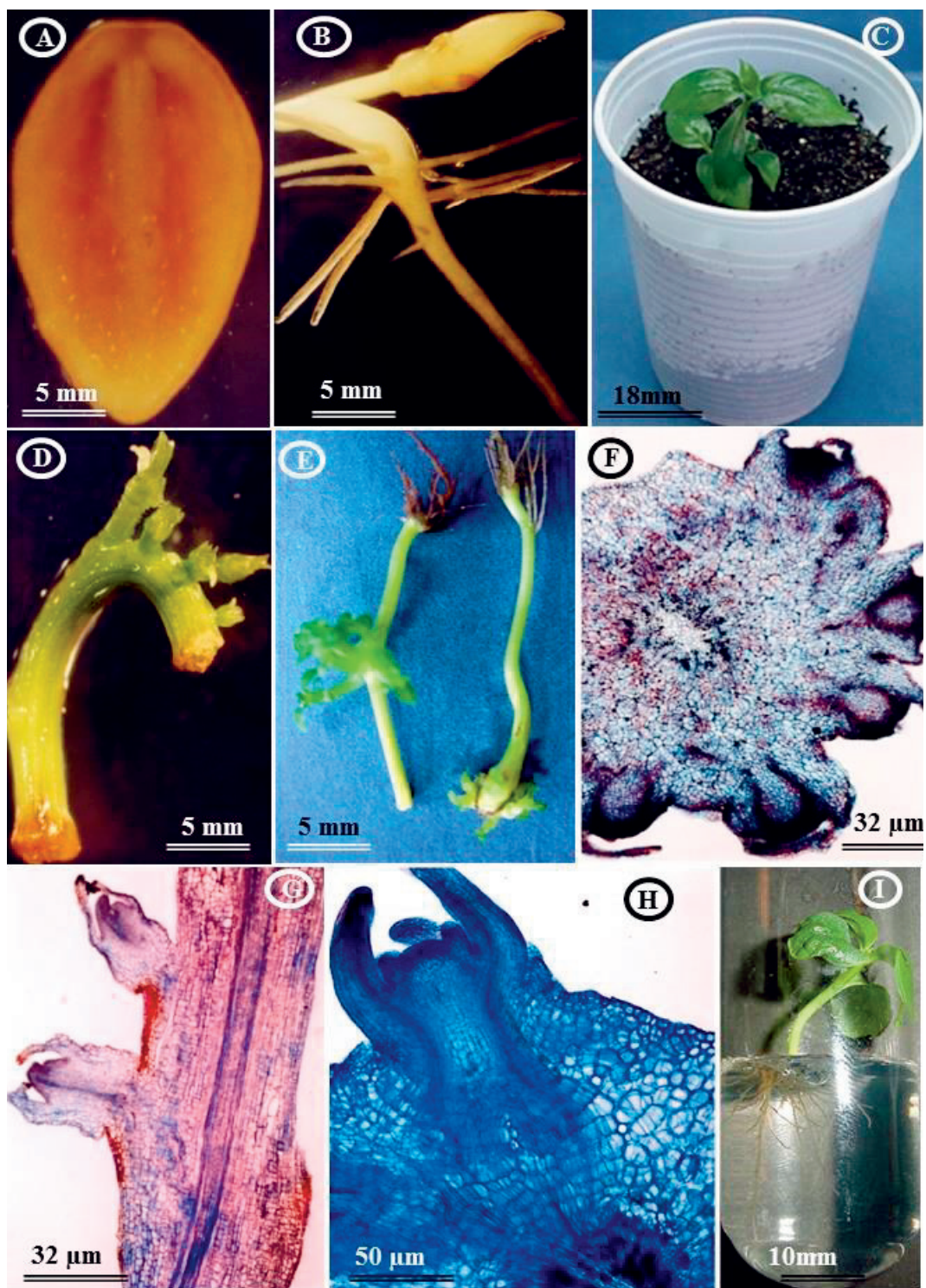


Figura 1- Aspectos da germinação *in vitro*, formações de brotações adventícias em hipocótilos de *P. ipecacuanha* e análise histológica de *P. ipecacuanha*. (A) Semente com tegumento; (B) Germinação da semente sem tegumento e o desenvolvimento dos primórdios radiculares. (C) Plântula aclimatizada sob condições de laboratório; (D) Organogênese direta em segmento de hipocótilo; (E) Formação de brotações adventícias em hipocótilo com polaridade invertida na região basal em contato com o meio de cultura e na mediana; (F) Formação de multibrotações diretas em hipocótilo com a polaridade invertida; (G) Formação de gemas adventícias com a

proliferação e expansão do parênquima cortical; (H) Brotação evidenciando o sistema vascular e os primórdios foliares; (I) Enraizamento *in vitro* de brotação adventícia.

A análise histológica das multibrotações, originadas a partir de segmentos dos hipocótilos revela uma região meristemática que aumenta rapidamente de tamanho devido à intensa atividade celular na formação de estruturas nodulares (Figura 1F) e, posterior diferenciação em regiões circundadas por gemas adventícias visto no parênquima cortical (Figura 1G). Nesta região ocorrem divisões anticlinais e periclinais, sendo predominantes no processo de formação de uma massa de células homogêneas, denominada de meristemoides, caracterizando o desenvolvimento e a conversão em primórdios das brotações adventícias. Com o desenvolvimento dos brotos adventícios observa-se a diferenciação da protoderme, do meristema fundamental e do procâmbio. A partir desse último, elementos vasculares diferenciam-se rapidamente estabelecendo a conexão vascular com o explante de origem (Figura 1H) e, posteriormente são formados os primórdios foliares.

As células do domo apical das brotações adventícias são isodiamétricas, envoltas por uma camada de células - a túnica, que apresenta padrão de divisão predominantemente anticlinal (Figura 1H). No desenvolvimento mais tardio dos brotos adventícios há a formação dos primórdios foliares com estômatos do tipo paracítico. Na extremidade distal dos segmentos de hipocótilo formou-se um calo cicatricial. Nessa região houve intensa proliferação de um parênquima, não regenerativo, constituída por células volumosas e vacuolizadas frouxamente organizadas, com citoplasma e núcleo pouco denso.

A auxina utilizada (AIB) induziu a formação de raízes nas brotações adventícias de *P. ipecacuanha*. O maior percentual de enraizamento das brotações ocorreu na presença de 1,5 mg L<sup>-1</sup> do regulador (Figura 1I). Na região basal das brotações formaram-se calos com células indiferenciadas. A protusão das raízes ocorreu após o 15º dia de cultivo. Gomes, Oliveira e Ribeiro, (2009) utilizando-se do mesmo regulador de crescimento em brotos adventícios provenientes da cultura de segmento internodal em *P. ipecacuanha* obtiveram resultados similares.

O cultivo *in vitro* na resposta morfogênica a partir da organogênese direta e um sistema de regeneração descrito em nossos estudos indicam que a cultura de

hipocótilo invertido e segmentado como uma fonte de explante alternativo na perspectiva de produção em larga escala para plantios comerciais e conservar a diversidade genética a partir do estabelecimento do protocolo responsivo de germinação de sementes de *P. ipecacuanha*. Cabe ainda ressaltar que esta importante espécie medicinal se encontra ameaçada de extinção.

## Referências Bibliográficas

Assis, M.C.; Giullietti, A.M. 1999. Diferenciação morfológica e anatômica em populações de "ipecacuanha" - *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, n. 22, p. 205-216.

Baskaran, P.; Jayabalan, N. 2005. An efficient micropropagation system for *Eclipta alba* valuable medicinal herb. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, n. 41, p. 532-539.

Burhans, W.C.; Vassiley, L.T.; Wu, J.M.; Nallaseth, F.S.; Depamphilis, M.L. 1991. Emetine allows identification of origins of mammalian DNA replication by imbalanced DNA synthesis, not through conservative nucleosome segregation. *EMBO Journal*, n. 10, p. 4351-4360.

Carvalho, M.A.F.; Paiva, R.; Vargas, D.P.; Porto J.M.P.; Herrera, R.C.; Stein, V.C. 2012. Germinação *in vitro* de *Passiflora gibertii* N. E. Brown com escarificação mecânica e ácido giberélico. *Semina: Ciências Agrárias*, n. 3, p. 1027-1032.

Coelho, M.C.F.; Pinto, J.E.B.P.; Morais, A.R.; Cid, L.P.B.; Lameira, O.A. 2001. Germinação de sementes de sucupira branca (*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.) *in vitro* e *ex vitro*. *Revista Ciência e Agrotecnologia*, n. 1, p. 38-48.

Cruz, C.D. 2006. Programa Genes - *Aplicativo computacional em genética e estatística*. Disponível em: [www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm](http://www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm).

Gomes, R.S.D.L.; Oliveira, V.D.C.; Ribeiro, R.L. 2009. Estudo morfoanatômico comparativo entre a poaia (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes - Rubiaceae) obtida da região Amazônica (*habitat* original) e proveniente de processo biotecnológico submetida a diferentes tratamentos de interceptação da radiação solar. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, n. 19, p. 276-283.

- Husain, M.K.; Anis, M.; Shahzad, A. 2008. *In vitro* propagation of a multipurpose tree (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) using nodal explants. *Acta Physiologiae Plantarum*, n. 30, p. 353-359.
- Ikeda, K.; Teshima, D.; Aoyama, T.; Satake, M.; Simomura, K. 1988. Clonal propagation of *Cephaelis ipecacuanha*. *Plant Cell Reports*, n. 7, p. 288-291.
- Jha, S.; Sahu, N.P.; Mahato, S.B. 1988. Production of the alkaloids emetine and cephaeline in callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha* Rich. *Planta Medica*, n. 6, p. 504-506.
- Kumar, V.; Sharma, A.; Prasad, B.C.N.; Gurujaj, H.B.; Ravishankar, G.A. 2007. Direct shoot bud induction and plant regeneration in *Capsicum frutescens* Mill.: influence of polyamines and polarity. *Acta Physiologiae Plantarum*, n. 29, p. 11-18.
- Lameira, O.A. 2002. Cultivo da Ipecacuanha [*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes]. EMBRAPA, Circular técnica, n.28, p. 1-4.
- Martin, G.; Geetha, S.P.; Raja, S.S.; Raghu, A.V.; Balachandran, I.; Ravindran, P.N. 2006. An efficient micropropagation system for *Celastrus paniculatus* Willd.: a vulnerable medicinal plant. *Journal of Forest Research*, n. 11, p. 461-465.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, n. 15, p. 473-497.
- Oliveira, L.O.; Martins, E.R. 1998. O desafio das plantas medicinais brasileiras: I – o caso da poaia (*Cephaelis ipecacuanha*). UENF: FENORTE, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 73 p.
- Oliveira, L.O.; Rossi, A.A.B.; Martins, E.R.; Batista, F.R.C.; Silva, R.S. 2010. Molecular phylogeography of *Carapichea ipecacuanha*, an amphitropical shrub that occurs in the understory of both semideciduous and evergreen forests. *Molecular Ecology*, n. 19, p. 1410-1422.
- Paiva Neto, V.B.; Mota, T.R.; Otoni, W.C. 2003. Direct organogenesis from hypocotyl-derived explants of annatto (*Bixa orellana*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, n. 75, p. 159-167.
- Parimalan, R.; Giridhar, P.; Gururaj, H.B.; Ravishankar, G.A. 2007. Organogenesis from cotyledon and hypocotyl-derived explants of japhara (*Bixa orellana* L.). *Acta Botanica Croatica*, n. 66, p. 153-160.
- Parveen, S.; Shahzad, A. 2011. A micropropagation protocol for *Cassia angustifolia* Vahl. From root explants. *Acta Physiologiae Plantarum*, n. 33, p. 789-796.
- Rajkhowa, S. 1969. The cultivation of ipeca roots in Assam. *Indian Forestier*, p. 245-252.
- Reis, E.S.; Pinto, J.E.B.P.; Corrêa, R.M.; Lameira, O.A. 2004. Tamanhos e posições de explantes e volumes de meio de cultivo na multiplicação de ipeca (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes) *in vitro*. *Ciência e Agrotecnologia*, n. 28, p. 703-709.
- Rocha, M.A.C. da; Costa, M.A.P. de C.; Silva, S.A.; Ledo, C.A. da S.; Moreira, M.J.S.; Bastos, L. P. 2008. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, n. 3, p. 769-774.
- Rodrigues, M.; Thales, H.F.C.; Festucci-Buselli, R. A.; Silva, L.C.; Otoni, W.C. 2012. Effects of flask sealing and growth regulators on *in vitro* propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). *Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant*, n. 48, 67-72.
- Rossi, A.A.B.; Oliveira, L.O.; Venturini, B.A., Silva, R.S. 2009. Genetic diversity and geographic differentiation of disjunct Atlantic and Amazonian populations of *Psychotria ipecacuanha* (Rubiaceae). *Genética*, n. 136, p. 57-67.



Shahzad, A.; Parveen, S.; Fatema, M. 2010. Development of a regeneration system via nodal segment culture in *Veronica anagallis-aquatica* L.: an amphibious medicinal plant. *Journal of Plant Interactions*, n. 6, p. 63-68.

Shimomura, K. 1988. Production of emetic alkaloid by *in vitro* culture of *Cephaelis ipecacuanha* A. Rich. *Plant Cell Reports*, n. 7, p. 278-280.

Singh, S.K.; Meghwal, P.R.; Sharma, H.C.; Singh, S.P. 2002. Direct shoot organogenesis on hypocotyls explants from *In vitro* germinated seedlings of *Psidium guajava* L. Cv. Allahabad Safeda. *Scientia Horticulturae*, n. 95, p. 213-221.

Soares, W.S.; Rêgo, M.M.; Rêgo, E.R.; Barroso, P.A.; Nascimento, K.S.; Ferreira, K.T. 2012. Estabelecimento *in vitro* e micropropagação de maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, n. 4, p.138-142.

Valera-Montero, L.L.; Ochoa-Alejo, N. 1992. A novel approach for chili pepper (*Capsicum annum* L.) plant regeneration: shoot induction in rooted hypocotyls. *Plant Science*, n. 84, p. 215-219.

Vieira, L.S. 1991. *Manual da medicina popular*. Ed. Vozes, p. 247. Belém.

White, P.R. 1951. Nutritional requirements of isolated plant tissues and organs. *Annual Review of Plant Physiology*, n. 2, p. 231-244.

Yoshimatsu, K.; Shimomura, K. 1993. *Cephaelis ipecacuanha* A. Rich. (Brazilian ipeca) *Micropropagation and the production of emetine and cephaeline*. In: Bajaj, Y.P.S (ed.). *Biotechnology in Agriculture Forestry – Medicinal and Aromatic Plants*, 21. Springer-Verlag, p. 87-103.