

# Micropropagação de singônio

ALDECINEI BASTOS SIQUEIRA SCHWERTNER<sup>1</sup> e GILMAR ROBERTO ZAFFARI<sup>2</sup>

## RESUMO

A propagação vegetativa de *Syngonium podophyllum* Schott (Araceae) em campo torna-se difícil para os produtores que buscam obter mudas de qualidade e em larga escala, em vista de problemas fitossanitários. Utilizaram-se gemas laterais da axila foliar de *S. podophyllum* para micropropagar essa espécie ornamental e, na fase de estabelecimento, submetem-se os explantes a dois procedimentos de desinfestação: o primeiro consistiu em uma pré-asepsia em bancada de laboratório, com imersão das gemas em hipoclorito de sódio a 1%, durante 15 minutos, e de uma asepsia em câmara de fluxo laminar, com imersão em etanol 70% e em hipoclorito de sódio a 1%, por 3 e 30 minutos respectivamente; o segundo procedimento consistiu na asepsia apenas em câmara de fluxo laminar. Os explantes foram inoculados em meio MS e MS adicionado de ácido 3-indolacético (AIA) e 6-benzilaminopurina (BAP), ambos a 1,0 mg.L<sup>-1</sup>. Na fase de proliferação, submetem-se os explantes a concentrações de 1,0; 2,5 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, adicionadas ao meio MS, transferindo-se os brotos obtidos para frascos com meio MS para o crescimento e desenvolvimento de plântulas. A exposição das gemas laterais axilares a uma pré-asepsia em bancada e posterior asepsia em câmara de fluxo laminar foi mais eficiente na desinfestação dos explantes, com 100 % de sobrevivência. A adição dos reguladores de crescimento, AIA e BAP, ambos a 1,0 mg.L<sup>-1</sup>, no meio MS, promoveu maior desenvolvimento das plântulas durante o estabelecimento *in vitro* da cultura. Concentrações elevadas de BAP no meio de proliferação não induziram um aumento significativo no número médio de brotos por explante; entretanto, resultaram numa redução significativa do número médio de folhas e raízes. Os explantes provenientes dos subcultivos de proliferação do tratamento com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, quando cultivados em meio MS, isento de reguladores de crescimento, apresentaram maior desenvolvimento de plântulas.

**Palavras-chave:** *Syngonium podophyllum* Schott (Araceae), desinfestação, micropropagação, reguladores de crescimento.

## ABSTRACT

### Micropropagation of *Syngonium podophyllum*

Farmers who search for large scale and quality seedlings, have difficulty in propagating *Syngonium podophyllum* Schott (Araceae) at field due to plant health problems. Therefore, lateral buds of *S. podophyllum* leaf axils were used to micropropagate this ornamental species. At establishment stage, they were submitted to two disinfection procedures and further by inoculated in MS medium with and/or without the addition of 3-indolacetic acid (IAA) and 6-benzilaminopurine (BAP) growth regulators. At development stage, the explants were submitted to different BAP concentrations added to MS medium. The buds obtained were transferred to flasks containing MS for plant development. The exposition of lateral axillary buds to a primary asepsis in laboratory followed by a secondary asepsis in laminar flow bench, proved to be more efficient in disinfecting the explants, with 100% survival rate. The addition of growth regulators, IAA and BAP both at 1.0 mg.L<sup>-1</sup>, in MS medium, has promoted greater seedling growth during *in vitro* plant development. The use of high BAP concentrations in the proliferation mean did not induce a significant increase in average bud number per explant; however, it resulted in significant decrease in the average number of leaves and roots. When explants originated from the proliferation treatment with 1.0 mg.L<sup>-1</sup> of BAP were cultivated in MS with no growth regulator, greater seedling development was observed.

**Key words:** *Syngonium podophyllum* Schott. (Araceae), disinfection, growth regulators, micropropagation.

<sup>1</sup> Universidade do Vale do Itajaí, CTTMar, Caixa Postal 360, 88301-970 Itajaí (SC), aldi@cttmar.univai.br

<sup>2</sup> UNIVALI/Epagri - Estação Experimental de Itajaí, Caixa Postal 277, 88301-970 Itajaí (SC).

## 1. INTRODUÇÃO

*Syngonium* é um gênero pertencente à família Araceae, originário das Américas Central e do Sul, onde cresce nas selvas tropicais trepando sobre árvores e rochas. Existem mais de 20 espécies desse gênero, sendo a mais popular *Syngonium podophyllum* Schott, também conhecida como singônio (LORENZI & SOUZA, 2001).

Pelo menos 10 variedades de *S. podophyllum* foram desenvolvidas em viveiros comerciais para uso em jardins ornamentais ou como plantas de interior. As folhas variam consideravelmente dependendo da variedade, sendo, em geral, acuminadas e brilhantes. Entre suas muitas variedades, as mais cultivadas são: Emerald Gem, Green Gold, Albolineatum, Trileaf Wonder e White Butterfly (CSURHES & EDWARDS, 1998).

A produção de mudas de *Syngonium podophyllum* em Santa Catarina, mediante a propagação vegetativa, por meio de estacas, é realizada em canteiros geralmente protegidos por telados. Nessa fase, ocorrem as maiores perdas de mudas, devidas a problemas fitossanitários causados por microrganismos saprofíticos e patogênicos.

Estudos que propiciem um avanço na atividade de produção de plantas ornamentais são de grande importância para os produtores, diminuindo o tempo de permanência sob os telados e os custos com tratamentos culturais, garantindo a qualidade da espécie cultivada.

A técnica de micropropagação para a multiplicação de plantas ornamentais permite produzir um grande número de mudas em pequeno espaço e em tempo reduzido. Adicionalmente, as plantas obtidas apresentam maior vigor, já que estão isentas de bactérias, fungos e vírus (LANGHANS et al., 1977).

A clonagem de orquídeas a partir de um pequeno fragmento isolado de *Cymbidium*, descoberto por MOREL (1960), juntamente com o desenvolvimento e uso de meio com altas concentrações de sais minerais, formulado por MURASHIGE & SKOOG (1962), foi o maior estímulo para o desenvolvimento das técnicas de cultura de tecidos e propagação de espécies ornamentais. Hoje, muitos tipos dessas plantas são propagados *in vitro* visando escala comercial, a saber: orquídeas, agaves, íris, gladiolos, antúrios, bromélias, narcisos, crisântemos, begônias, gerânios, cactos e violetas (HUGHES, 1981). A regeneração de plântulas de samambaias tem sido amplamente utilizada, a partir

de meristemas apicais do rizoma, desprovidos de primórdios foliares (WETMORE & MOREL, 1949), e a partir de meristemas apicais radiculares (BURR, 1975) em meio contendo sais minerais e vitaminas e enriquecido com fitorreguladores.

A diferenciação de órgãos em plantas é regulada pela interação de dois tipos de hormônios: as auxinas e as citocininas. Uma relação elevada em favor da citocinina promove, em geral, formação de brotos, enquanto uma relação elevada da auxina favorece a diferenciação de raízes. A adição de hormônios exógenos depende, fundamentalmente, dos níveis de hormônios endógenos. Simultaneamente, quando um regulador exógeno é adicionado, a planta responde, compensando com o incremento da concentração de hormônios endógenos (GEORGE, 1993).

Este estudo objetivou avaliar o estabelecimento inicial de gemas laterais axilares de *S. podophyllum*, bem como a taxa de multiplicação, o crescimento e o período de permanência dos explantes em cada fase do cultivo *in vitro*, uma vez que essa espécie é uma planta ornamental de importância econômica e há pouca literatura sobre a propagação vegetativa *in vitro*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Epagri – Estação Experimental de Itajaí, de abril a outubro de 2002. Colocaram-se gemas laterais axilares de *S. podophyllum*, imediatamente depois de extraídas, em frascos contendo água destilada esterilizada, por dois procedimentos de desinfestação: 32 gemas foram submetidas à pré-asepsia em bancada de laboratório e à posterior asepsia em câmara de fluxo laminar (CFL), e outras 32, somente à asepsia em CFL.

A pré-asepsia consistiu na imersão das gemas em hipoclorito de sódio a 1% adicionado de duas gotas de detergente neutro, durante 15 min. A asepsia em CFL consistiu na imersão das gemas em etanol a 70%, por 3 min e, posteriormente, na imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% adicionado de duas gotas de detergente neutro, por 30 min. Entre as exposições aos agentes desinfestantes as gemas foram enxaguadas três vezes em água destilada esterilizada.

Os meios de cultura tiveram como base o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) adicionado de sacarose a 3% e ágar a 0,7%. As gemas foram inoculadas em dois meios de cultura: MS e MS adicionado dos seguintes reguladores de crescimento, com o intuito de avaliar o crescimento na fase inicial: ácido 3-

indolacético (AIA) e 6-benzilaminopurina (BAP), ambos a 1,0 mg.L<sup>-1</sup>. O pH dos meios foi ajustado para 5,7, sendo os meios esterilizados a 120 °C, 1 atm, durante 20 min.

Tanto os explantes submetidos à pré-asepsia seguida da assepsia como os tratados apenas com o processo de assepsia, foram cultivados em ambos os meios.

A efetividade dos dois processos de desinfestação foi avaliada por meio da taxa de contaminação dos explantes, após 35 dias de incubação.

Todas as plântulas regeneradas na fase inicial foram transferidas, após 35 dias, para frascos contendo meios de proliferação. O meio-base foi o MS complementado de diferentes concentrações de BAP: 1,0; 2,5 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>. Após 50 dias, os brotos obtidos na fase de proliferação foram transferidos para frascos contendo meio MS, para induzir o crescimento e o desenvolvimento das plântulas. Os explantes receberam a identificação 1,0; 2,5 e 4,0 conforme a procedência do subcultivo de proliferação.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento em temperatura de 27 ± 2°C, com fotoperíodo de 16 horas, com intensidade luminosa de 40 μmol cm<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

O delineamento experimental dos ensaios foi inteiramente casualizado, sendo, na fase inicial, constituído por quatro tratamentos com dezesseis repetições e, nas fases de proliferação e de crescimento, por três tratamentos com oito repetições cada um. A unidade experimental constou de um explante por frasco.

Os parâmetros avaliados na fase de estabelecimento *in vitro* foram a taxa de contaminação por bactérias e

fungos, a taxa de sobrevivência e a cor dos explantes. Nas fases inicial, de proliferação e de crescimento, avaliaram-se o tamanho e o número dos brotos, das folhas e das raízes. Os resultados obtidos foram submetidos à análise da variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A aplicação de um tratamento de pré-asepsia no laboratório seguido de assepsia na câmara de fluxo laminar (CFL) foi mais eficaz na eliminação de microrganismos da superfície dos explantes (Tabela 1). O processo de desinfestação com pré-asepsia resultou em menor percentagem de contaminação dos explantes (28,1 %), enquanto, sem ela, houve um aumento de 15% na taxa de contaminação. No entanto, mesmo entre tratamentos idênticos quanto à desinfestação, houve uma variação no percentual de contaminação dos explantes tanto para fungos quanto para bactérias. Isso pode ser devido à maior contaminação dos explantes já proveniente das plantas matrizes ou adquirida durante o processo de excisão das gemas. Apesar de os explantes terem sido submetidos aos mesmos tratamentos de desinfestação, a eficiência do etanol e do hipoclorito de sódio na eliminação dos agentes contaminantes depende da capacidade de penetração do produto na superfície do tecido e das células.

As gemas encontram-se sob o efeito da dominância apical e apresentam tamanho e morfologia diferentes. Portanto, os tratamentos de desinfestação receberam números iguais de gemas de tamanhos diferentes, mas com diferentes morfologias. Gemas coletadas em ramos mais velhos, de tamanho maior, apresentavam maior

Tabela 1. Efeito de dois processos de desinfestação na taxa de contaminação de gemas laterais axilares de *Syngonium podophyllum*, incubadas em dois meios de cultivo, por 35 dias

Assepsia feita com etanol 70% e hipoclorito de sódio 1%		Meio de cultivo MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962)		Contaminação		Total de contaminação
Com pré-asepsia (Hipoclorito sódio 1%)	Sem pré-asepsia	Sem fitorregulador	Com fitorregulador (1 mg.L <sup>-1</sup> AIA e 1mg.L <sup>-1</sup> BAP)	Fungos	Bactérias	
				%		
+		+		12,50	6,25	18,75
+			+	25,00	12,50	37,50
				x = 18,75	x = 9,38	x = 28,12
	+	+		31,25	12,50	43,75
	+		+	25,00	18,75	43,75
				x = 28,12	x = 15,62	x = 43,75

superfície externa exposta, maior quantidade de ceras e maior lignificação dos tecidos. Tais características podem ter comprometido a eficiência dos processos de desinfestação. Segundo KANE (2000), o tamanho do explante inicial de singônio tem uma influência grande na sua taxa de contaminação e sobrevivência, podendo, inclusive, apresentar forte oxidação dos tecidos isolados, pela presença de compostos fenólicos.

Os efeitos dos tratamentos no estabelecimento e no desenvolvimento das gemas laterais axilares são mostrados nas Figuras 1 e 2. O crescimento dos brotos foi maior nas gemas inoculadas em meio MS com fitorreguladores, se comparado às gemas inoculadas em meio MS em ambos os casos, tanto com como sem pré-asepsia. Por outro lado, o cultivo dos explantes em meio MS com ou sem fitorreguladores não apresentou diferença significativa no número médio de brotos por explante, independentemente da realização ou não da pré-asepsia. O ajustamento das condições fisiológicas dos explantes à nova condição *in vitro* é o que determina sua sobrevivência e seu desenvolvimento na fase de estabelecimento (KANE, 2000).

Conforme os resultados obtidos, somente as gemas inoculadas em meio MS emitiram raízes após o desenvolvimento de plântulas. O enraizamento pode ter sido promovido por um balanço endógeno em favor da auxina ou pela presença de cálcio, boro e zinco no meio de cultura MS, já que esses nutrientes são conhecidos como rizogênicos (DE FOSSARD et al., 1977; ANDERSEN, 1986). Diversas espécies, principalmente as herbáceas, enraizam na presença de níveis muito reduzidos de auxina ou em meio básico sem reguladores de crescimento. Neste caso, o fornecimento de auxina é realizado pela parte aérea em rápido crescimento, a qual é translocada para a base, estimulando a rizogênese (HASEGAWA, 1980; ANDERSON, 1984). Todavia, tanto o meio MS quanto o MS adicionado de AIA e BAP estimularam a formação da parte aérea, principalmente de folhas. Houve, também, formação de calo na base em 40% dos explantes inoculados em meio MS com reguladores. A presença de fitorreguladores no meio de cultura pode induzir a formação de calo na base dos explantes de singônio, principalmente após várias subculturas em meio com citocinina (KANE, 2000) ou quando da adição de ANA (RAJEEVAN et al., 2002).

A presença de reguladores de crescimento no meio MS influenciou, possivelmente, o nível endógeno de auxina/citocinina, levando à formação de calo em alguns explantes. Adicionalmente, promoveu maior desenvolvimento dos explantes, pelo aumento no

tamanho dos brotos e pela indução na formação de folhas. No entanto, esse aumento no metabolismo de crescimento não foi favorável à indução de primórdios radiculares, já que o balanço hormonal auxina/citocinina é fundamental no controle da morfogênese e na formação de órgãos em cultura de tecidos (MURASHIGE & SKOOG, 1962). Para que ocorra a formação de parte aérea e de raízes, deve-se investigar o melhor balanço entre ambos os hormônios, que é

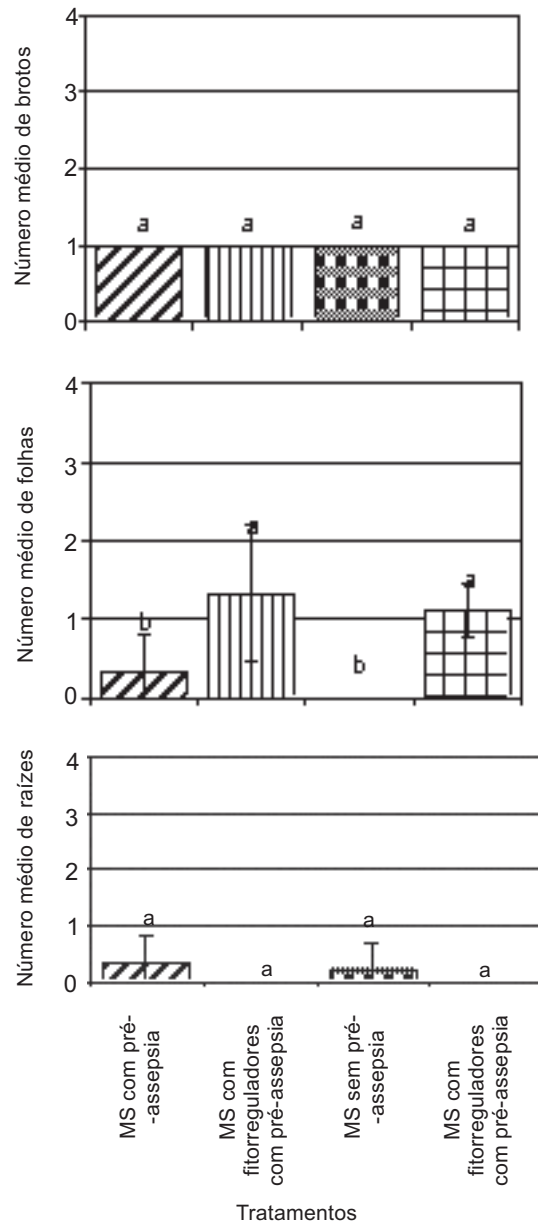


Figura 1. Efeito do meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com e sem fitorreguladores, precedido ou não de pré-asepsia, no desenvolvimento de plântulas de *Syngonium podophyllum*, após 35 dias de incubação.



espécie-específico. Além dos fitorreguladores, as condições de incubação da cultura *in vitro* podem aumentar a sobrevivência e o desenvolvimento dos explantes. Plântulas de *S. podophyllum* submetidas a 3.000 lux de intensidade luminosa apresentaram maior crescimento e número de raízes em relação às crescidas a 1.000 lux, conforme DAHAB et al. (2000). Além disso, esses autores verificaram que a maior intensidade luminosa da fase *in vitro* resultou em maior porcentagem de sobrevivência das plântulas durante a aclimatização.

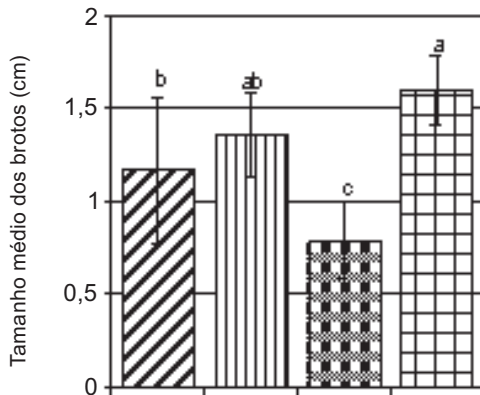


Figura 2. Efeito do meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com e sem fitorreguladores, precedido ou não de pré-asepsia, no crescimento de plântulas de *Syngonium podophyllum*, após 35 dias de incubação.

A adição de elevadas concentrações de BAP (2,5 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>) ao meio MS na fase de proliferação não promoveu um aumento significativo no número médio de brotos/explante, quando comparadas a 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (Figura 3). Da mesma forma, o tamanho dos brotos não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos com diferentes concentrações de BAP, cuja aplicação exógena parece não ter influenciado fortemente a relação auxina/citocinina, promovendo uma pequena redução e/ou quebra da dominância apical dos explantes de *S. podophyllum in vitro*. Contrariamente, o crescimento dos brotos foi afetado pela ação do BAP, que estimula maior produção de parte aérea, porém, se aplicado em excesso, tem efeito tóxico (LANE, 1979; LESHEN et al., 1988). O pequeno tamanho dos brotos pode ser, também, devido à competição pelos nutrientes do meio. Resultados semelhantes foram obtidos por RAJEEVAN et al. (2002), utilizando segmentos nodais de singônio como explantes e cultivados em meio MS, adicionado de 2,0 mg.L<sup>-1</sup>.

O efeito da alta concentração do BAP no meio pode ter comprometido a multiplicação dos brotos, pois causou-lhes demasiada emissão com reduzido crescimento (entufamento) da cultura e redução do tamanho das folhas. Possivelmente, o desenvolvimento dos brotos foi inibido pela divisão celular acelerada, em vista da alta concentração de BAP, comprometendo a organogênese, o que também levou à formação de calo nos explantes oriundos dos meios com 2,5 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>. Tal efeito não ocorreu em explantes submetidos a concentrações de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, que promoveu um aumento no número médio de folhas e de raízes.

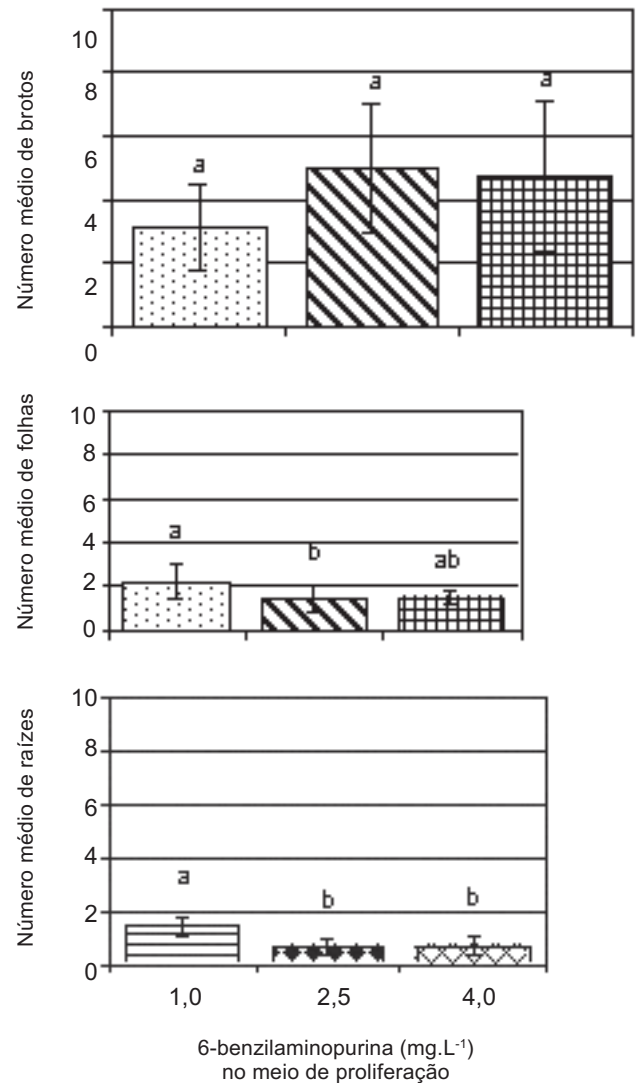


Figura 3. Efeito de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (1,0 mg.L<sup>-1</sup>; 2,5 mg.L<sup>-1</sup> e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>), adicionadas ao meio MS, no desenvolvimento e proliferação de plântulas de *Syngonium podophyllum*, durante os 50 dias de incubação inicial (fase de proliferação).

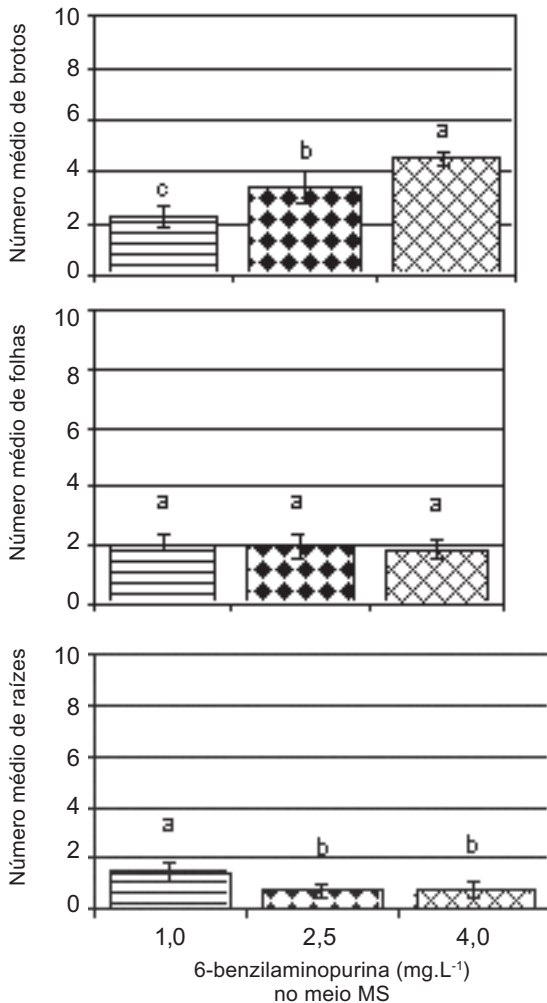


Figura 4. Efeito do meio MS sem reguladores de crescimento, durante 40 dias de incubação, sobre o desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Syngonium podophyllum*, provenientes de três tratamentos da fase de proliferação (incubação em MS acrescido de 1,0 mg.L<sup>-1</sup>; 2,5 mg.L<sup>-1</sup> ou 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP).

Assim, nos explantes inoculados em meio com maiores concentrações desse regulador, foi menor a emissão de raízes, sinalizando a presença do efeito tóxico do BAP, embora não tenha havido o encurtamento dos entrenós nem a vitrificação e o engrossamento do caule dos brotos de *Syngonium podophyllum*.

Os explantes provenientes da fase de proliferação com incubação em MS acrescido de BAP (1,0; 2,5 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>) e submetidos ao meio MS isento de reguladores de crescimento, apresentaram diferenças significativas quanto ao tamanho e ao número médio dos brotos e das raízes (Figuras 4 e 5). De maneira contrária, na fase de proliferação, o tamanho dos brotos

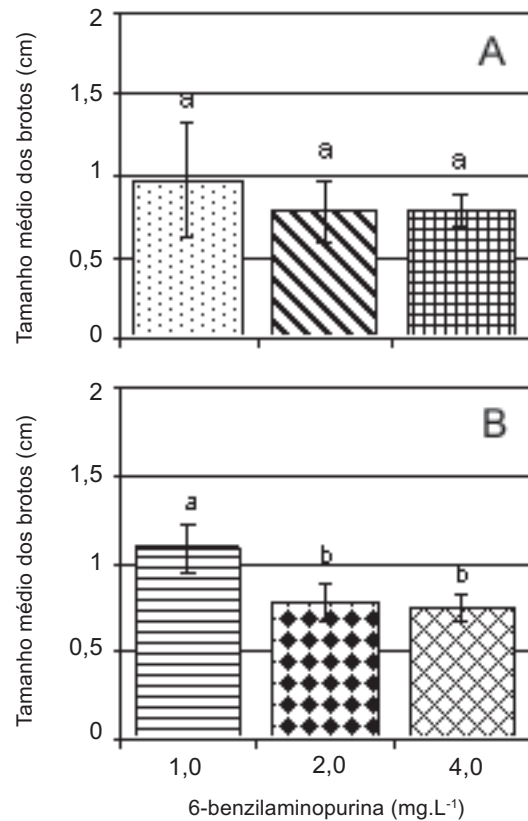


Figura 5. Efeito de diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (1,0 mg.L<sup>-1</sup>; 2,5 mg.L<sup>-1</sup> e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>), adicionadas ao meio MS na fase de proliferação (A), após 50 dias de incubação, e do meio MS sem reguladores de crescimento, na fase de crescimento (B), após 40 dias de incubação, no desenvolvimento de plântulas de *Syngonium podophyllum*.

não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos com diferentes concentrações de BAP (Figura 5). A resposta dos explantes foi muito diferente em função do tratamento recebido no subcultivo de proliferação, promovendo um desenvolvimento diferenciado. Apesar da ausência do BAP no meio MS, os explantes, possivelmente sob efeito residual do regulador, apresentaram elevada multiplicação de brotos, comprometendo o desenvolvimento. Conforme GRATTAPAGLIA & MACHADO (1998), o efeito das citocininas não se restringe a uma subcultura e, por diversas vezes, constata-se um efeito residual de uma subcultura para outra.

Os explantes provenientes do meio de proliferação MS acrescido de 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, quando cultivados em meio de crescimento MS, apresentaram o tamanho médio dos brotos e o número médio de raízes significativamente maiores, em relação aos que foram

submetidos às outras concentrações de BAP. Os explantes oriundos dos meios com altas concentrações de BAP (2,5 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>) apresentaram maior número médio de brotos e menor número médio de raízes. Em relação ao número médio de folhas, não se verificou diferença significativa entre os explantes resultantes dos tratamentos. Apesar da ausência de fitorreguladores, principalmente auxinas, no meio de cultura na fase de proliferação, as plântulas enraizaram rapidamente no meio MS, corroborando com os resultados de RAJEEVAN et al. (2002), que verificaram que diminui o tempo de indução de raízes em segmentos nodais de singônio quando cultivados em meio MS com 100% da concentração salina.

Esses resultados parecem estar relacionados com a quebra da dominância apical promovida pela adição de BAP na fase anterior de proliferação. Embora os explantes tenham sido cultivados em meio MS, pode ter havido um efeito residual da citocinina influenciando o nível endógeno de hormônios, o que pode ter induzido elevada multiplicação de brotos, emissão de folhas e menor emissão de raízes nos explantes oriundos dos meios com 2,5 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP.

#### 4. CONCLUSÕES

1. A execução de pré-asepsia em bancada e posterior asepsia em câmara de fluxo laminar resultou em melhor desinfestação das gemas laterais axilares de *Syngonium podophyllum*.

2. No estabelecimento inicial das gemas laterais axilares de *S. podophyllum in vitro*, o uso do meio de cultura MS adicionado de reguladores de crescimento promoveu maior desenvolvimento dos explantes.

3. Na fase de proliferação dos explantes de *S. podophyllum*, a adição da citocinina BAP ao meio de cultura não propiciou um aumento significativo do número médio de brotos.

4. Melhor desenvolvimento *in vitro* das plântulas de *S. podophyllum* ocorreu quando os explantes cultivados em meio MS isento de reguladores de crescimento eram provenientes de subcultivos de proliferação em MS com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, A.S. Environmental influences on adventitious rooting cuttings of non-woody species. In: JACHSON, M.B. (Ed.) **New root formation in plants and cutting**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1986. p.223-253.

ANDERSON, W.C. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 109, p. 343-347, 1984.

BURR, R.W. Mass propagation of Boston fern through tissue culture. **Com. Proc. Int. Plant Prop. Soc.**, v.25, p.122-124, 1975.

CSURHES, S. & EDWARDS, R. Potential environmental weeds in Australia: Candidate species for preventative control. **Queensland Department of Natural Resources**, 1998. p. 198.

DAHAB, A. M.A.; IBRAHIM, I.A.; ARAFA, A.M.S. & NOWER, A. A. Effect of in vitro and ex vitro light intensity and in vitro aeration on growth of some plants of araceae family during in vitro rooting and adaptation stages. **Egyptian Journal of Agricultural Research**, v.78, n.5, p.2011-2027. 2000.

DE FOSSARD, R.A.; BAKER, P.K. & BOURNE, R.A. The organ culture of nodes of four species of *Eucalyptus*. **Acta Horticulturae**, v.78. p.157-165, 1977.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture: Part 1. The technology**. Wilts: Exegetes, 1993. 574 p.

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/CNPQ, 1998. v.1, p.183-242,

HASEGAWA, P.M. Factors affecting shoot and root initiation from culture rose shoot tips. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 105, p. 216-220, 1980.

HUGHES, K.W. Ornamental species. In: CONGER, B.V. (Ed.) **Cloning agricultural plants via in vitro techniques**. Florida: Boca Raton, 1981. cap. 2, p.5-50.

KANE, M. E. Micropropagation of *Syngonium* by shoot culture. 2.ed. In: TRIGIANO, R.N. & GRAY, D.J.(Eds.). **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. Washington, D.C.: CRC Press, 2000. p.87-95. il.

LANE, W. D. Regeneration of pear plants from shoot meristem-tips. **Plant Science Letters**, v. 16, p. 337-342, 1979.

LANGHANS, R. W.; HORST, R. K. & EARLE, E. D. Disease-free plants via tissue culture propagation. **HortScience**, v. 12, n. 3, p. 25, 1977.

- LESHEN, B.; WERKER, E. & SHALEV, D. P. The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, v. 62, p. 271-276, 1988.
- LORENZI, H. & SOUZA, H.M.de. **Plantas ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3. ed. Nova Odessa, SP : Instituto Plantarum, 2001.
- MOREL, G. Producing virus-free cymbidium. **American Orchid Society Bulletin**, v.29, p.495-497, 1960.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, n. 15, p. 473-497, 1962.
- WETMORE, R.H. & MOREL, G. The growth and development of *Adiantum pedatum* L. on nutrient agar. **American Journal of Botany**, v.36, p.805-806, 1949.
- RAJEEVAN, P.K.; SHEEJA, K.; RANGAN, V.V.; MURALI, T.P. & MISRA, R.L. (Eds.); SANYAT-MISRA. Direct organogenesis in *Syngonium podophyllum*. In: NATIONAL SYMPOSIUM ON INDIAN FLORICULTURE IN THE NEW MILLENNIUM, Lal-Bagh, Bangalore, 2002. **Proceedings...** New Delhi, India, Indian Society of Ornamental Horticulture, 2002. p.353-354.