

## Micropropagação de *Crossandra infundibuliformis* Nees cultivar ‘Mona Wallhead’<sup>(1)</sup>

JACQUELINE LEITE ALMEIDA<sup>(2)</sup>; JOSEFA DIVA NOGUEIRA DINIZ<sup>(2)</sup> e FERNANDO FELIPE FERREYRA HERNANDEZ<sup>(3)</sup>

### RESUMO

A *Crossandra infundibuliformis* é uma planta ornamental, herbácea, normalmente usada para formação de canteiros, cuja difusão é limitada pela baixa produção de mudas. O trabalho objetivou avaliar o efeito de diferentes reguladores do crescimento na indução de brotações e no enraizamento de explantes de crossandra, com a finalidade de desenvolver um protocolo eficiente para micropropagação da espécie. Para a indução de gemas, segmentos nodais de plântulas de crossandra germinadas *in vitro*, foram cultivados em meio MS com 0,5 mg L<sup>-1</sup> das citocininas: cinetina (CIN), 6-benzilaminopurina (BAP) e 2-isopenteniladenina (2iP) isoladas e combinadas entre si, num total de oito tratamentos: T<sub>1</sub> - testemunha; T<sub>2</sub> - CIN; T<sub>3</sub> - BAP; T<sub>4</sub> - 2iP; T<sub>5</sub> - CIN + BAP; T<sub>6</sub> - CIN + 2iP; T<sub>7</sub> - BAP + 2iP e T<sub>8</sub> - BAP + CIN + 2iP em delineamento inteiramente casualizado com 16 explantes/tratamento. Para o enraizamento, os explantes foram cultivados no meio MS (50%), acrescido de ácido indolbutírico (AIB) nas concentrações de 0,0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 mg L<sup>-1</sup>. O número de explantes com gemas e o número médio de gemas por explantes aumentaram nos diferentes tratamentos em função do tempo de cultivo. Aos 60 dias, todos os tratamentos que continham BAP apresentaram maior número médio de gemas por explante, sendo o tratamento com somente BAP o que apresentou maior taxa de proliferação de brotos (12,19 gemas/explante), seguindo-se do tratamento BAP + CIN (11,44 gemas/explante) com gemas de melhor qualidade. A maior porcentagem de explantes enraizados (60%) foi observada no tratamento com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB e o número médio de raízes por explante foi proporcional ao aumento da concentração. Os resultados permitem concluir que o BAP na concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> é mais eficiente para a indução de múltiplas gemas em explantes de crossandra do que as outras citocininas isoladas ou em combinação. A melhor concentração de AIB para o enraizamento dos explantes é 0,5 mg L<sup>-1</sup>.

Palavras-chave: **Crossandra, cultura de tecidos, enraizamento.**

### ABSTRACT

#### Micropropagation of *Crossandra infundibuliformis* Nees cultivar ‘Mona Wallhead’

*Crossandra infundibuliformis* is a major herbaceous ornamental, normally used to form flower beds. However, *Crossandra* diffusion is limited by the difficult propagation. This study aimed to evaluate the effects of different plant hormones on bud induction and root formation of *Crossandra* explants, in order to develop a reliable protocol toward the propagation of the specie. For bud induction nodal segments of *Crossandra* germinated *in vitro* were cultivated in medium containing 0.5 mg L<sup>-1</sup> of three cytokinins: kytetin (KIN), 6-benzylaminopurine (BAP), and 2-isopentenyladenine (2iP) essayed either alone or combined, totaling eight treatments as follows: T<sub>1</sub> - control; T<sub>2</sub> - KIN; T<sub>3</sub> - BAP; T<sub>4</sub> - 2iP; T<sub>5</sub> - KIN + BAP; T<sub>6</sub> - KIN + 2iP; T<sub>7</sub> - BAP + 2iP and T<sub>8</sub> - KIN + BAP + 2iP. 16 replications (plants) per treatment were used in a complete randomized design. For root formation, explants were cultivated in MS medium (50%) added indolbutiric acid (IBA) in the concentrations as follows: 0.0, 0.25; 0.50; 0.75 and 1.00 mg L<sup>-1</sup>. The number of treated explants presenting buds and bud average per treated explants increased with time. Upon the 60th day of cultivation, all treatments containing BAP averaged a higher number of buds per explant principally the one in which BAP was applied alone. That treatment presented the highest bud proliferation rate (12.9 buds/1 explant) followed by the treatment BAP + KIN, which presented the second best rate (11.4 buds/ 1 explant) and showed buds with higher quality. The greatest percentage of rooting explants (60%) was achieved with IBA 0.5 mg L<sup>-1</sup>. It was also observed that the increase in root average per explant was proportional to the increase in concentration of IBA. The results led to the conclusion that BAP 0.5 mg L<sup>-1</sup> is more efficient to induction of multiple buds on explants than the others tested cytokinins, applied either alone or combined. The best IBA concentration regarding rooting promotion was 0.5 mg L<sup>-1</sup>.

**Key words:** *Crossandra*, *in vitro* propagation, rooting

<sup>(1)</sup> Recebido para publicação em 06/06/2006 e aceito em 05/08/2008.

<sup>(2)</sup> Departamento de Fitotecnica, CCA/UFC, Caixa Postal 12.168, 60356-001 Fortaleza (CE). e-mail: dndiniz@ufc.br

<sup>(3)</sup> Departamento de Ciências do Solo, CCA/UFC.

## 1. INTRODUÇÃO

A crossandra tem importância como planta ornamental, em virtude do amarelo ou salmão das suas flores. Sua difusão no mercado especializado é limitada pela pequena produção de mudas e porque poucos sabem de sua existência, incluindo alguns paisagistas. A cultivar 'Mona Wallhead' em tom salmão, tem um porte mais baixo (até 70 cm), não tolera o frio, pode ser propagada por sementes, porém a técnica mais utilizada é a estaquia (SOUZA, 2002). A micropropagação visando ao desenvolvimento e à otimização de protocolos regenerativos tem sido utilizada, tendo como principal vantagem a fixação de características genéticas nas populações clonais e a obtenção de um grande número de plantas de alta qualidade em reduzido espaço físico e de tempo, independentemente dos fatores climáticos (GUERRA et al., 1999). Para MURASHIGE e SKOOG (1962), a maximização da proliferação de brotos, objetivo básico da micropropagação, pode ser conseguida por meio da adequada manipulação de reguladores de crescimento no meio de cultura.

Das citocininas comercialmente disponíveis, a 6-benzilaminopurina (BAP) é a que, em geral, apresenta melhores resultados para a multiplicação *in vitro*, sendo uma das mais amplamente usadas em pesquisas (GEORGE, 1993). HU e WANG (1983), estudando a frequência de utilização de cada citocinina em meio de isolamento para cerca de 100 espécies, verificaram que o BAP é utilizado em 68% dos meios, a cinetina em 23% e o 2iP e a zeatina em 9%. Esses mesmos autores citam que existem diferenças entre as citocininas e que, geralmente, o BAP induz a formação de grande número de brotos e alta taxa de multiplicação, enquanto a cinetina e o 2iP permitem apenas o crescimento normal sem brotações múltiplas. JOUNG et al. (2002) relatam a ocorrência de interação entre a fonte de citocinina e a duração da cultura *in vitro* na regeneração de gemas de *Campanula glomerata*, em que os explantes regeneraram mais rápido com concentração ótima de 2iP com ANA quando comparados com a concentração ótima de BA e ANA. Fato que pode ser atribuído às diferenças na estabilidade de BA e 2iP durante a cultura, pois, segundo BRZOBOHATY et al. (1994), o BA tem uma degradação muito lenta quando comparado com o 2iP. GIRIJA et al. (1999) obtiveram número máximo de gemas por explante (4-5) em gemas axilares de crossandra com BAP a 1,0 mg L<sup>-1</sup>, demonstrando ser mais efetivo que a CIN na mesma concentração.

A fase de enraizamento é influenciada pelas modificações na constituição do meio, a fim de estimular o estabelecimento e a iniciação de raízes nas microestacas (DEBERGH, 1991). De acordo com GRATTAPAGLIA e MACHADO (1990), mesmo na presença de auxinas, altas concentrações de sais do meio podem inibir as fases de enraizamento, mais particularmente a de crescimento das raízes. LU et al. (1990) obtiveram o melhor meio para enraizamento em segmentos nodais de crisântemo, com 50% dos sais MS.

Os tipos e concentrações de auxina são as variáveis que, em geral, mais influenciam o enraizamento. Diversas espécies, principalmente as herbáceas, enraízam na

presença de níveis muito reduzidos de auxina ou em meio básico sem este regulador (ANDERSON, 1984), pois presumivelmente possuem suficientes níveis endógenos de auxina (GEORGE, 1996). CALDAS et al. (1998) afirmam que as diferenças em metabolismo e estabilidade das auxinas podem contribuir para as diferenças observadas nas respostas *in vitro*, podendo diversas auxinas, isoladamente ou em combinação serem usadas no enraizamento da maioria das espécies, em que as mais utilizadas são o ácido naftalenoacético (ANA), o ácido indolacético (AIA) e o ácido indolbutírico (AIB), freqüentemente a melhor auxina para indução de raízes *in vitro*. Fato confirmado por MNENEY e MANTELL (2002) em microgemas de cajueiro submetidas ao AIB, AIA e ANA; o AIB mais efetivo na promoção de raízes adventícias com 69% de enraizamento e com o maior número de raízes por explante (3,57).

A concentração de auxinas pode afetar a qualidade das raízes. Todavia, espécies ou mesmo cultivares diversas reagem diferentemente a concentrações distintas de auxinas. A concentração ótima para certa planta pode ser insuficiente ou muito elevada para outra (ASSIS e TEIXEIRA, 1990). De acordo com GRATTAPAGLIA e MACHADO (1990), as concentrações mais freqüentes das auxinas empregadas no enraizamento estão na faixa de 0,1 a 1,0 mg L<sup>-1</sup>. É importante que no enraizamento ocorra a formação de um sistema radicular consistente e funcional *in vitro*, pois é um dos pontos fundamentais para a sobrevivência das plantas na fase seguinte, que é a aclimatização (LEITE et al., 2000).

Algumas pesquisas preliminares com crossandra foram feitas, mas com sucesso limitado e, de acordo com GIRIJA et al. (1999), nenhum dos estudos sobre otimização das condições foi efetivo para a propagação *in vitro* da cultura. Para a micropropagação comercial, é necessário um método eficiente de multiplicação. Dessa forma, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de diferentes citocininas isoladas e combinadas entre si na indução de gemas e de concentrações de AIB no enraizamento de explantes de crossandra cultivados *in vitro*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos em condições de laboratório. O primeiro para avaliar a indução de gemas por citocininas e o segundo, para verificar o efeito de diferentes concentrações de AIB no enraizamento de explantes de crossandra. Nos dois experimentos foram usados explantes obtidos de plântulas de *Crossandra infundibuliformis* Nees cultivar 'Mona Wallhead', germinadas e multiplicadas *in vitro* em meio MS e em meio MS com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP respectivamente.

Para a indução de gemas, utilizaram-se segmentos de caule de crossandra com 1-2 gemas laterais, medindo em torno de 0,5 cm, retirados de plantas cultivadas *in vitro* e inoculados em meio MS contendo 0,5 mg L<sup>-1</sup> das citocininas: CIN, BAP e 2iP de forma individual ou combinada, num total de oito tratamentos, conforme descritos a seguir: T<sub>1</sub> - testemunha, T<sub>2</sub> - CIN, T<sub>3</sub> - BAP, T<sub>4</sub> - 2iP, T<sub>5</sub> - CIN + BAP, T<sub>6</sub> - CIN + 2iP, T<sub>7</sub> - BAP + 2iP e T<sub>8</sub> - CIN + BAP + 2iP. Após a inoculação, mantiveram-

se os explantes em sala de crescimento com temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e luminosidade em torno de 2000 lux. Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado com oito tratamentos, quatro repetições e quatro explantes por repetição num total de 16 explantes por tratamento. Em todas as unidades experimentais avaliou-se o número médio de gemas emitidas por explante e a porcentagem de explantes que emitiram gemas e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

Para avaliação do enraizamento, foram usados segmentos de caule contendo a gema apical de plantas de *crossandra* estabelecidas *in vitro*, com 2-3 nós, medindo em torno de 1,0 cm de comprimento, utilizando-se cinco tratamentos correspondentes às concentrações: 0,00, 0,25, 0,50, 0,75 e 1,00 mg L<sup>-1</sup> de AIB, em meio MS com 50% da concentração dos sais macronutrientes. Nos tratamentos, em delineamento inteiramente casualizado, utilizaram-se 10 repetições e cinco explantes por repetição, sendo os explantes inoculados em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de cultivo e um explante por tubo.

Realizaram-se avaliações quanto à porcentagem de explantes com raízes, número médio de raízes por explante e o comprimento médio da maior raiz, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Indução de gemas

Os tipos e as combinações das três citocininas testadas tiveram influência no número de explantes que emitiram novas gemas e no número de gemas formadas por explante.

O número de gemas produzidas por explantes de *crossandra* aumentou com a adição de citocininas e com o tempo de cultivo. Nos primeiros 30 dias, embora se tenha verificado maior número de gemas para algumas das citocininas estudadas (figura 1), não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos. Dos 30 aos 60 dias de cultivo, não houve aumento no número médio de gemas emitidas pelos explantes no tratamento sem citocinina (testemunha). Porém nos tratamentos com citocininas as gemas aumentaram entre 40 e 100%, apresentando diferenças estatísticas entre eles. O maior número médio de gemas emitidas aos 60 dias foi observado no tratamento com adição de somente BAP (12,17 gemas/explante) seguindo-se dos tratamentos que continham BAP combinado com outras citocininas (T<sub>5</sub> - CIN + BAP; T<sub>7</sub> - BAP + 2iP; T<sub>8</sub> - CIN + BAP + 2iP) (figura 1). SAINI e JAIWAL (2002), utilizando as citocininas 2iP, zeatina, cinetina e BAP em segmentos nodais de plantas de *Vigna mungo*, notaram que o BAP nas concentrações de 0,1 a 1,0 mg L<sup>-1</sup> foi mais efetivo na indução de múltiplas gemas do que as outras citocininas.

Das citocininas testadas, o 2iP foi a menos efetiva, tanto adicionada de forma individual como combinada com CIN ou com BAP, observando-se nesses tratamentos as menores médias de gemas emitidas (3,50, 3,94 e 8,19 gemas por explantes para T<sub>4</sub> - 2iP, T<sub>6</sub> - CIN + 2iP e T<sub>7</sub> - BAP + 2iP respectivamente), depois da testemunha. Em explantes de eucalipto, RESENDE e GRAÇA (1993) constataram que dentre as três citocininas utilizadas para

indução de brotações o 2iP apresentou a menor taxa de multiplicação e o BAP, as maiores taxas. Esse fato, em parte, pode ser atribuído às diferenças na estabilidade das citocininas durante o cultivo, pois, segundo BRZOBOHATY et al. (1994), o BAP tem uma degradação muito lenta quando comparada com o 2iP. Além disso, de acordo com HU e WANG (1983), existem diferenças no modo de ação das citocininas, uma vez que o BAP induz a formação de grande número de brotos e alta taxa de multiplicação, enquanto a cinetina e o 2iP geralmente permitem apenas o crescimento normal sem brotações múltiplas.

A taxa de multiplicação de gemas no tratamento com BAP, alcançada neste trabalho (12,19 gemas/explante), foi superior à reportada por GIRIJA et al. (1999) em *crossandra* (4-5 gemas/explante), utilizando 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP. A eficiência na indução de gemas em cultivos *in vitro* também tem sido relatada por AUT (2002), em *Hymenoxys acaulis* var. *Glabra*, conseguindo 10,3 gemas/explante usando 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP, considerando esta citocinina efetiva para estimular a proliferação em Asteraceae. As diferenças de resultados nas taxas de multiplicação de *crossandra* podem ser explicadas pela forma complexa com que os reguladores de crescimento e as células interagem, de maneira que, se o tecido não está em um estágio responsivo não irá responder adequadamente aos reguladores de crescimento exógenos, não importando em quais concentrações e combinações esses reguladores sejam utilizados (BONGA e VON ADERKAS, 1992). Além disso, algumas das diferenças na multiplicação de gemas podem ser explicadas na base de diferenças entre as cultivares de *crossandra* e nas condições de crescimento usadas. De acordo com SANDOVAL et al. (1991), existem contrastes significativos na capacidade de proliferação *in vitro*, incluindo clones de uma mesma cultivar.

O tratamento testemunha, sem citocinina, mostrou o menor número médio de gemas por explante (1,81), o que evidencia a necessidade de uso de citocinina exógena no processo de organogênese de *crossandra*, para aumentar o número de gemas desenvolvidas a partir do explante inicial. Segundo GEORGE (1996), aumentar a taxa de multiplicação é fator determinante no custo efetivo de um protocolo de propagação.

A maior eficiência de regeneração foi verificada nos tratamentos T<sub>5</sub> (CIN + BAP) e T<sub>6</sub> (CIN + 2iP) com a emissão de gemas em 100% dos explantes (figura 2). A adição de CIN, como uma segunda citocinina ao meio de cultivo, aumentou o percentual de resposta dos explantes, além de melhorar a qualidade das gemas formadas, mostrando haver um sinergismo principalmente com o BAP. ALMEIDA et al. (1996) utilizando diferentes citocininas em segmentos de folhas de urucum verificaram que o BAP e a CIN foram as citocininas mais efetivas para a produção de gemas e que suas respostas foram mais pronunciadas quando foram adicionadas em combinação. HERATH et al. (2004), no entanto, observaram que a adição de CIN ao meio com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, apresentou efeito significativo somente em uma das quatro cultivares de *Hibiscus cannabinus* testadas. CHALUPA (1987) relata que muitas espécies de plantas respondem positivamente

à adição de uma segunda citocinina ao meio de cultivo, porém em baixa concentração.

A menor porcentagem de explantes com novas gemas foi observada nos tratamentos T<sub>1</sub> (testemunha) e T<sub>4</sub> (2iP), que apresentaram 56,0 e 62,5% de explantes com novas gemas respectivamente.

### 3.2 Indução de raízes

A emissão de raízes em explantes de *crossandra* aumentou com o tempo de cultivo *in vitro* independentemente da adição de AIB (figura 3). Nos primeiros 21 dias, a velocidade de enraizamento foi maior para os tratamentos que receberam AIB do que para a testemunha (sem AIB) e, a partir dessa data, houve redução da velocidade, mostrando uma tendência a estabilizar-se aos 35 dias. A presença de AIB, também resultou no aumento da porcentagem de explantes com raízes. O AIB na concentração de 0,50 mg L<sup>-1</sup> foi o tratamento que apresentou o maior número de explantes com raízes (60%), enquanto nos tratamentos com concentrações inferiores ou superiores a 0,50 mg L<sup>-1</sup> o enraizamento foi menor (28, 32, 36 e 48% de enraizamento para 0,0, 0,25, 0,75 e 1,00 mg L<sup>-1</sup> de AIB respectivamente). Esses resultados diferem dos encontrados por GIRIJA et al. (1999) que verificaram 100% de enraizamento em gemas de *crossandra* em meio MS com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB. HEWAWASAM et al. (2001), também com *crossandra*, obtiveram a maior quantidade de explantes enraizados em meio MS sem regulador de crescimento. De acordo com GRATTAPAGLIA e MACHADO (1990) e PIO et al. (2002), a adição de uma auxina ao meio de cultivo beneficia o processo de indução de raízes. Para FACHINELLO et al. (1994), o aumento da concentração de auxinas provoca um efeito estimulador de raízes até certo valor, a partir do qual, possui efeito inibidor, e a concentração adequada depende da espécie. GRATTAPAGLIA e MACHADO (1990) salientam que quantidades excessivas de auxina estimulam a produção de calo e ZIMMERMAN (1984) afirma que a melhor concentração é a mínima necessária para proporcionar uma iniciação radicular satisfatória, desde que esta possibilite o maior crescimento e desenvolvimento das raízes sem a formação de calo. Segundo WERNER e BOE (1980), as respostas diferenciadas podem se dar em função não só dos genótipos utilizados, que podem apresentar diferenças quanto à sensibilidade à auxina, como também das condições fisiológicas das plantas na época de coleta dos explantes e das condições de cultivo.

Na figura 4, verifica-se que o número médio de raízes por explante teve crescimento linear com o aumento da concentração de AIB. A sobreposição das linhas que representam a tendência do número médio de raízes emitidas por explante, em função da concentração de AIB aos 21 e 35 dias de cultivo, sugere que o aumento ocorre durante os primeiros 21 dias, independentemente da adição e da concentração do AIB utilizada. Após esse tempo, o número de raízes permanece praticamente constante. A adição de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIB ao meio de cultivo aumentou em 200% o número de raízes por explante (6,36) em relação à testemunha (2,15). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por FERRI et al. (1998), em porta-enxerto de macieira 'MM 111', sendo o número de raízes

influenciado pelas concentrações de AIB, e o número máximo de raízes (seis por explante), obtido com a maior concentração de AIB. Dados semelhantes foram observados por PRETTO e SANTARÉM (2000) em gemas de *Hypericum perforatum*, com o maior número médio de raízes por explante (3,9) na maior concentração de AIB com 50% dos sais do meio MS.

Quanto ao tamanho médio das raízes, verificou-se que houve um aumento em função do tempo, mas não foi influenciado pelas diferentes concentrações de AIB (Figura 5). Dados similares foram observados por ZANOL et al. (1998), utilizando doses crescentes de AIB em brotações de porta-enxerto de macieira cv. 'Marubakaido'. Ação diferente das auxinas foi observada por NAVES et al. (2005) no enraizamento *in vitro* de bromélia imperial, quando citaram que as auxinas induzem a iniciação radicular, entretanto inibem a elongação das raízes. O tamanho médio das raízes foi em torno de 3-4 cm nos diferentes tratamentos, o que pode ser desejável, pois, segundo GRATTAPAGLIA e MACHADO (1990), as raízes mais curtas são as mais adequadas para o sucesso no transplantio, uma vez que se apresentam em fase de crescimento ativo, facilitando a aclimatização.

## 4. CONCLUSÕES

Nas condições em que o experimento foi realizado, concluiu-se:

1. O suprimento exógeno de citocininas é essencial para indução de brotações múltiplas em gemas de *crossandra*.
2. A citocinina BAP é mais eficiente do que a CIN e o 2iP para indução de gemas nos explantes de *crossandra*, quando é utilizada na concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> destes reguladores.
3. Com BAP há a emissão de maior número médio de gemas por explante, porém quando combinado com CIN as gemas são mais desenvolvidas e de melhor qualidade.
4. A concentração de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB é a mais eficiente para induzir maior porcentual de explantes com raízes.
5. O número médio de raízes emitidas por explante de *crossandra* é proporcional ao aumento da concentração de AIB.

## AGRADECIMENTO

Ao Banco do Nordeste do Brasil pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J.L. et al. Indução de brotações em explantes de segmentos de folhas de plântulas de urucueiro em diferentes citocininas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.26, n.1, p.45-49, 1996.
- ANDERSON, W.C. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Iowa, v.109, p.343-347, 1984.
- AUT, J.R. Micropropagation of the rare Lakeside Daisy (*Hymenoxys acaulis* var. *glabra*). **HortScience**,

- Alexandria, v.37, n.1, p.200-201, 2002.
- ASSIS, F.T. de; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPq. 1990. p.261-296.
- BONGA, J.M.; Von ADERKAS, P. **In vitro culture of trees**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1992, 236p.
- BRZOBOHATY, B.; MOORE, I.; PALME, K. Cytokinin metabolism: implications for regulation of plant growth and development. **Plant Molecular Biology**, v.26, p.1483-1497, 1994.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998, v.1, p.87-132.
- CHALUPA, V. Effect of benzylaminopurine and thidiazuron on in vitro shoot proliferation of *Tilia cordata* Mill., *Sorbus aucuparia* L. and *Robinia pseudoacacia* L. **Biologia Plantarum**, v.29, n.6, p.425-429, 1987.
- DEBERGH, P.C. Acclimatization techniques of plants from in vitro. **Acta Horticulturae**, Leiden, n.289, p.291-300, 1991.
- FACHINELLO, J.C.; HOFFMAN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G.R. de L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas: UFPel. 1994, 179p.
- FERRI, V.C.; CENTELLAS, A.Q.; HELBIG, V.E.; FORTES, G.R. DE L. Uso de agar, amido e ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* do porta enxerto de macieira MM111. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.4, p.561-565, 1998.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 1: the technology. 2. Ed. Edington: Exegetics, 1993. 574p.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Part II – In practice England: 2nd. ed. Edington. Exegetics limited, 1996. p.337-343.
- GIRIJA, S.; GANAPATHI, A.; VEGADESAN, G. Micropropagation of *Crossandra infundibuliformis* (L.) Nees. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.82, p.331-337, 1999.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, 1990. p.99-169.
- GUERRA, M.P.; DAL VESCO, L.L.; PESCADOR, R. et al. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.9, p.1557-1563, set. 1999.
- HERATH, S.P.; SUZUKI, T.; HATTORI, K. Multiple shoot regeneration from young shoots of kenaf (*Hibiscus cannabinus*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, the Netherlands, v.77, p.49-53, 2004.
- HEWAWASAM, W.D.C.J.; BANDARA, D.C.; ABEYARATHNE, W.M. In vitro propagation of *Crossandra infundibuliformis* var. Danica through shoot tip and callus culture. **Tropical Agricultural Research**, Washington, v.13, p.328-340, 2001.
- HU, C.Y.; WANG, J.P. Meristem, shoot tip and bud cultures. In: EVANS, D.A. et al. **Handbook of plant cell culture, techniques for propagation and breedings**. New York: Macmillan Pub. Co., 1983. v.1, p.177-227.
- JOUNG, Y.H.; LIAO M.S.; ROH M.S.I.; KAMO K.; SONG J.S. In vitro propagation of *Campanula glomerata*, 'Acaulis' from leaf blade explants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.92, p.137-146, 2002.
- LEITE, G.B.; FINARDI, N.; FORTES, G.R.L. Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento "in vitro" do porta-enxerto de pereira OH X F97. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.2, p.353-357, abr./jun., 2000.
- LU, C.Y.; NUGENT, G.; WARDLEY, T. Efficient direct plant regeneration from stem segments of chrysanthemum (*Crysanthemum morifolium* Ramat. Cv. Royal Purple). **Plant Cell Reports**, Berlin, v.8, p.733-736, 1990.
- MNENEY, E.E.; MANTELL, S.H. Clonal propagation of cashew (*Anacardium occidentale* L.) by tissue culture. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, Kent, England, v.77, n.6, p.649-657, 2002.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- NAVES, V.C.; PAIVA, P.D.O.; PAIVA, R.; PASQUAL, M.; DUTRA, L.F.; PAIVA, L.V. Enraizamento e aclimatização de brotos regenerados *in vitro* de bromélia imperial. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v.11, n.1, p.62-66, 2005.
- PIO, R. et al. Enraizamento *in vitro* de brotações do porta-enxerto de citros Tangerina Sunki x Trifoliata English 63-256 com o uso de sacarose e ácido indolbutírico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.1, p.66-70, 2002.
- PRETTO, F.R.; SANTARÉM, E.R. Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum* leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, the Netherlands, v.62, p.107-113, 2000.
- RESENDE, R.M.S.; GRAÇA, M.E.C. Efeito de citocininas na multiplicação e no enraizamento de brotações de clones de *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden cultivados *in vitro*.

In: CONGRESSO FLORESTAL PANAMERICANO, 1, CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 7, **Anais...** Curitiba, p.116-119, 1993.

SAINI, R.; JAIWAL, P.K. Age, position in mother seedling, orientation, and polarity of the epicotyl segments of blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper) determines its morphogenic response. **Plant Science**, v.163, p.101-109, 2002.

SANDOVAL, J.A.; BRENES, G.; PÉREZ-SÁNCHEZ, L. Micropropagación de plátano y banano (Musa AAB, AAA) en el CATIE. Turrialba: **CATIE**, 1991. 24p. (Informe Técnico, 186).

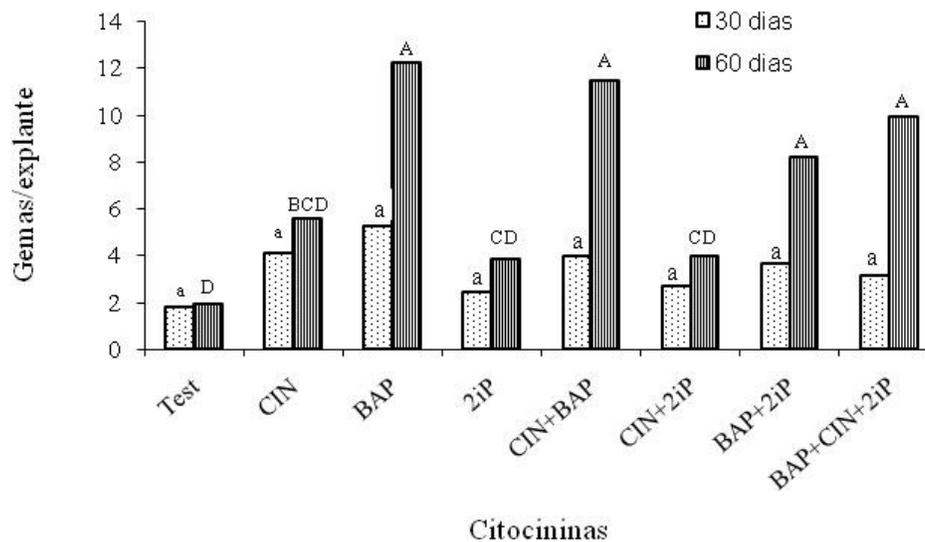
SOUZA, M. de. Flores Tropicais: A crossandra-amarela é uma ótima opção para acrescentar cores onde o verde

predomina. **Revista Natureza**, São Paulo, Ano 15, n.3, p.58-61, abril de 2002.

WERNER, E.M.; BOE, A.A. In vitro propagation of malling-7 apple rootstock. **HortScience**, Alexandria, v.15, p.509-510, 1980.

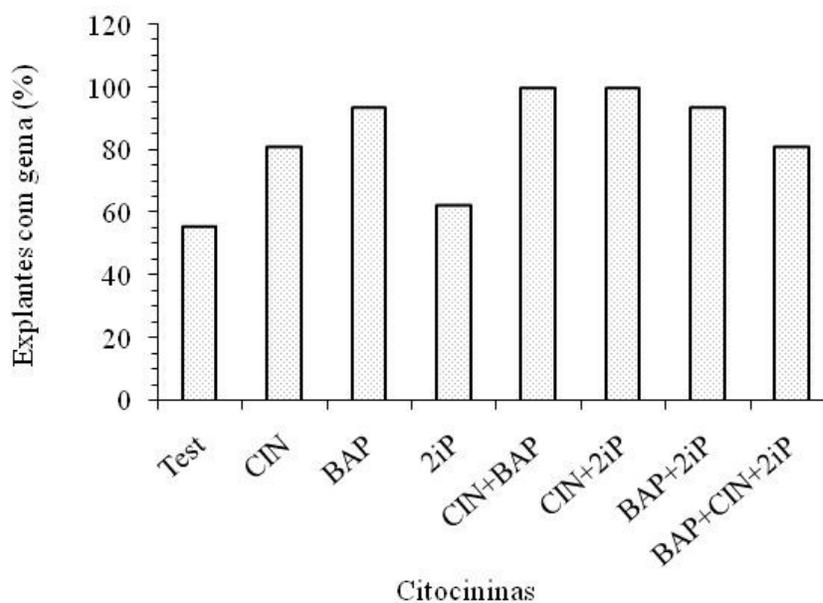
ZANOL, G.C. et al. Uso do ácido indolbutírico e do escuro no enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.3, p.387-391, 1998.

ZIMMERMAN, R.H. Rooting apple cultivars in vitro: Interactions among light, temperature, phloroglucinol and auxin. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, The Netherlands, v.3, p.301-311, 1984.



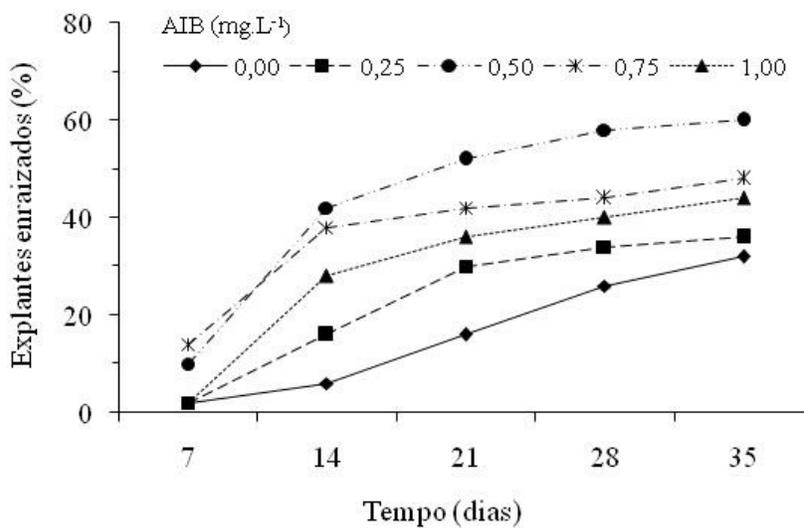
**Figura 1.** Número médio de gemas emitidas por explantes de crossandra aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  das citocininas 6-benzilaminopurina (BAP), 2-isopenteniladenina (2iP) e cinetina (CIN). Médias seguidas de letras minúsculas e maiúsculas distintas para 30 e 60 dias de cultivo, respectivamente, diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Tukey.

**Figure 1.** Average number of buds emitted by explants of crossandra after 30 and 60 days of *in vitro* cultivation in MS medium with  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  of cytokinines 6-benzylaminopurine (BAP), 2-isopentenyladenine (2iP) e kinetin (KIN). Averages with lower cases and different capital letters for the 30 and 60 days of cultivation, respectively, differ statistically among themselves by the Tukey test at 5%.



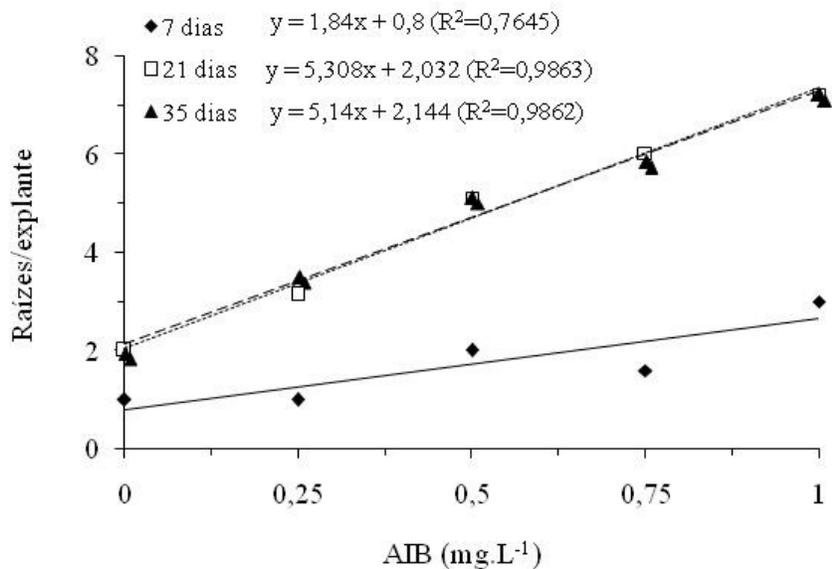
**Figura 2.** Porcentagem de explantes de crossandra que emitiram gemas aos 60 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  das citocininas 6-benzilaminopurina (BAP), 2-isopenteniladenina (2iP) e cinetina (CIN).

**Figure 2.** Percentage of crossandra explants that emit buds after 60 days of *in vitro* cultivation in MS medium with  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  of cytokinines 6-benzylaminopurine (BAP), 2-isopentenyladenine (2iP) e kinetin (CIN).



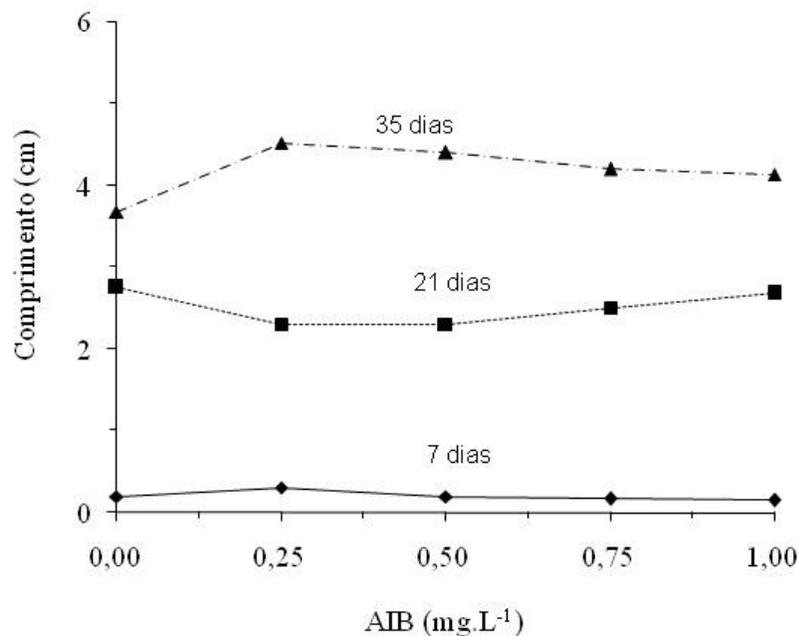
**Figura 3.** Porcentagem de explantes de crossandra com raízes em função do tempo de cultivo *in vitro* em meio com 50% dos sais MS e com diferentes concentrações de AIB.

**Figure 3.** Percentage of crossandra explants with roots in function of culture time of *in vitro* cultivation in MS medium with 50% of MS salts and with different concentrations of AIB.



**Figura 4.** Número médio de raízes por explantes de crossandra em função da concentração de AIB em diferentes tempos de cultivo *in vitro* em meio com 50% dos sais MS.

**Figure 4.** Average number of roots per explants of crossandra in function of AIB concentration in different *in vitro* culture time in medium with 50% of MS salts.



**Figura 5.** Tamanho médio das raízes em explantes de crossandra em função da concentração de AIB em diferentes tempos de cultivo *in vitro* em meio com 50% dos sais MS.

**Figure 5.** Average size of roots in crossandra explants in function of AIB concentration in different *in vitro* culture time in medium with 50% of MS salts.