

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE MUSSAENDA (*Mussaenda erythrophylla* cv. Rosea)¹

Jacqueline Leite Almeida², Josefa Diva Nogueira Diniz²,
Alexandre Bosco de Oliveira³, Fernando Felipe Ferreyra Hernandez⁴

ABSTRACT

IN VITRO PROPAGATION OF MUSSAENDA
(*Mussaenda erythrophylla* cv. Rosea)

This research aimed to develop a protocol for the micropropagation of *Mussaenda erythrophylla* cv. Rosea. Calcium hypochlorite or sodium hypochlorite (2.5%) was used for the sterilization of bracts segments, with or without previous immersion in alcohol 70%. For callus induction, bracts segments were inoculated on MS medium with different concentrations of BAP and NAA. For buds induction, callus were inoculated on MS medium with different concentrations of cytokinins BAP, 2iP, and KIN (0.0 mg L⁻¹, 0.5 mg L⁻¹, 1.0 mg L⁻¹, and 2.0 mg L⁻¹). For multiplication, nodal segments from *in vitro* plants were inoculated in MS medium with BAP, KIN, and 2iP, in the concentrations of 0.0 mg L⁻¹, 0.5 mg L⁻¹, 1.0 mg L⁻¹, and 2.0 mg L⁻¹. For rooting, nodal segments from *in vitro* plants were inoculated using two MS medium dilutions: full strength and half strength of MS basal salt mixture (macronutrients salts) and different concentrations of IBA (0.00 mg L⁻¹, 0.25 mg L⁻¹, 0.50 mg L⁻¹, and 1.00 mg L⁻¹). The best sterilization treatment was achieved by using calcium hypochlorite combined with immersion in alcohol. For callus induction, the MS medium with 0.4 mg L⁻¹ of NAA plus 4.0 mg L⁻¹ of BAP was more efficient. Bud multiplication was improved in MS medium with 0.5 mg L⁻¹ of 2iP or 1.0 mg L⁻¹ of KIN. The highest percentage of explants with roots without emission of callus was observed in the medium with 50% and 100% of MS salts without IBA.

KEY-WORDS: Disinfection; growth regulator; callus; rooting.

RESUMO

O trabalho foi realizado visando a desenvolver um protocolo para micropropagação de *Mussaenda erythrophylla* cv. Rosea. Na assepsia de segmentos de brácteas, utilizou-se hipoclorito de cálcio ou hipoclorito de sódio (2,5%), com ou sem imersão prévia em álcool 70%. Para indução de calos, os segmentos de brácteas foram inoculados em meio MS com diferentes concentrações de BAP e ANA. Para indução de gemas, os calos foram inoculados em meio MS com diferentes concentrações das citocininas BAP, 2iP e CIN (0,0 mg L⁻¹; 0,5 mg L⁻¹; 1,0 mg L⁻¹; e 2,0 mg L⁻¹). Na multiplicação, segmentos nodais de plantas *in vitro* foram inoculados em meio MS com BAP, CIN e 2iP, nas concentrações de 0,0 mg L⁻¹; 0,5 mg L⁻¹; 1,0 mg L⁻¹; e 2,0 mg L⁻¹. Para o enraizamento, segmentos nodais de plantas *in vitro* foram inoculados no meio MS e MS/2 da formulação dos sais macronutrientes e diferentes concentrações de AIB (0,00 mg L⁻¹; 0,25 mg L⁻¹; 0,50 mg L⁻¹; e 1,00 mg L⁻¹). O melhor tratamento para a desinfestação foi aquele em que utilizou-se hipoclorito de cálcio associado à imersão em álcool. Para a indução de calos, o meio MS com 0,4 mg L⁻¹ de ANA + 4,0 mg L⁻¹ de BAP mostrou-se o mais efetivo. A multiplicação das gemas foi favorecida em meio MS com 0,5 mg L⁻¹ de 2iP ou com 1,0 mg L⁻¹ de CIN. A maior percentagem de explantes com raízes sem a formação de calos foi observada nos meios com 50% e 100% dos sais MS sem AIB.

PALAVRAS-CHAVE: Desinfecção; regulador de crescimento; calos; enraizamento.

INTRODUÇÃO

O gênero *Mussaenda* pertence à família Rubiaceae e compreende cerca de 200 espécies, as quais são nativas da África Tropical, Ásia e Ilhas do Pacífico. Muitas destas espécies são utilizadas como

arbustos ornamentais, devido ao fato de suas vistosas e coloridas brácteas serem semelhantes a sépalas brancas, margeadas (brancas com margens róseas), rosas ou vermelhas com flores amarelas, além de sua fragrância agradável (Rosário 1984). Segundo Sharma et al. (1990), dentre as espécies de *Mussaenda*, quatro

1. Trabalho recebido em maio/2008 e aceito para publicação em maio/2010 (nº registro: PAT 3956/ DOI: 10.5216/pat.v40i2.3956).

2. Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia, Fortaleza, CE, Brasil.

E-mails: jalac@bol.com.br, dndiniz@ufc.br.

3. Universidade Estadual do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia, Uruçuí, PI, Brasil.

E-mail: aleufc@gmail.com.

4. Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciências do Solo, Fortaleza, CE, Brasil.

E-mail: ferrey@ufc.br.

são mais utilizadas: *M. erythrophylla*, *M. frondosa*, *M. philippica* e *M. luteola*.

Alguns países têm interesse em utilizar a mussaenda como planta ornamental, mas a falta de um método mais adequado de propagação e comercialização tem sido um entrave (Cramer & Bridgen 1998). A propagação *in vitro* é uma alternativa para a produção de mudas de plantas ornamentais em larga escala, facilitando a introdução de novas cultivares, sendo utilizada para a propagação de espécies com grande valor comercial. Tem como principais vantagens 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 de fatores climáticos (Guerra et al. 1999). 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 telados e os custos com tratamentos culturais, viabilizando a qualidade da espécie cultivada (Schwertner & Zaffari 2003).

O sucesso da micropropagação de plantas não depende somente dos fatores inerentes ao tecido vegetal (genéticos e fisiológicos), mas, também, do meio de cultura apropriado (Guimarães et al. 1999), onde a micropropagação pode ser conduzida por meio de uma sequência de eventos, cada um com diferentes objetivos e necessidades, em relação à composição do meio de cultura, concentração e tipos de reguladores de crescimento.

Sistemas específicos de condições de cultivo, com adequação do balanço e tipo de reguladores de crescimento, devem ser estabelecidos para diferentes espécies, sendo os fatores que mais influenciam o sucesso, na fase de multiplicação *in vitro*, os tipos e concentrações das citocininas, que se tornam indispensáveis para a quebra da dominância apical e para a indução de proliferação de gemas axilares (Erig & Schuch 2006).

Estudos têm sido feitos, demonstrando que a produção de mussaenda *in vitro*, a partir de tecidos de folhas, brácteas, pecíolos e gemas, é possível para a propagação de algumas cultivares. Maity et al. (2001) utilizaram gemas axilares para a indução de brotações em *Mussaenda erythrophylla* Schum e Thom cv. Scarlet. A embriogênese somática e o desenvolvimento em plantas inteiras foram verificados por Das et al. (1993), em calos originados de internódios de *Mussaenda erythrophylla* cvs. Queen Sirikit e Rosea.

Dessa forma, o trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo de multiplicação *in vitro* de *Mussaenda erythrophylla* cv. Rosea, a partir de segmentos de brácteas.

MATERIAL E MÉTODOS

Assepsia e preparo dos explantes

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Cultura de Tecidos, do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da UFC, no período de outubro de 2004 a março de 2007. Segmentos de brácteas, com nervura central medindo em torno de 1,0 cm², retirados de planta adulta de *Mussaenda erythrophylla* cv. Rosea, utilizada como planta ornamental em uma residência, foram submetidos à assepsia com hipoclorito de cálcio 2,5% ou com hipoclorito de sódio 2,5%, por 10 minutos, com ou sem imersão prévia em álcool 70%, por 1 minuto. Após a assepsia, os explantes, em número de 30 por tratamento, foram inoculados em meio MS (Murashige & Skoog 1962) com 4,0 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) mais 0,4 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético) e mantidos em sala de crescimento com 16 horas de fotoperíodo, temperatura de 26 ± 2°C e intensidade luminosa em torno de 2.000 lux, sendo estas condições ambientais de cultivo utilizadas para todos os experimentos. Aos 50 dias, foi feita a avaliação da percentagem de desinfestação e da sobrevivência dos explantes.

Neste experimento de assepsia, 50% dos explantes (segmentos de brácteas), em cada tratamento, foram colocados em posição adaxial e os outros 50% em posição abaxial, em contato com o meio, e, após 50 dias, foi avaliada a capacidade responsiva dos mesmos, quanto à indução de calo.

Indução de calos

Segmentos de brácteas de mussaenda, com tamanho médio de 1,0 cm², foram colocados na posição adaxial, no meio MS com BAP, nas concentrações de 0,0 mg L⁻¹; 1,0 mg L⁻¹; 2,0 mg L⁻¹; e 4,0 mg L⁻¹, combinado com ANA (0,0 mg L⁻¹; 0,2 mg L⁻¹; e 0,4 mg L⁻¹), em esquema fatorial 4x3, com 12 tratamentos e 15 explantes por tratamento, em delineamento inteiramente casualizado. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento e a avaliação do percentual de explantes com calos foi feita aos 30 e aos 60 dias.

Indução de gemas nos calos

Calos obtidos de segmentos de brácteas, cultivados em meio MS com 4,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,4 mg L⁻¹ de ANA, foram seccionados, com tamanho de, aproximadamente, 1,0 cm², e inoculados em meio MS com diferentes concentrações (0,0 mg L⁻¹; 0,5 mg L⁻¹; 1,0 mg L⁻¹; e 2,0 mg L⁻¹) das citocininas BAP, 2iP (2-isopenteniladenina) e CIN (cinetina), isoladamente, totalizando 10 tratamentos e 20 explantes por tratamento, em delineamento inteiramente ao acaso. A avaliação foi feita aos 30 dias após a inoculação, observando-se a percentagem de calos com gemas diferenciadas.

Multiplicação das gemas

Segmentos nodais com 2 gemas e tamanho médio de 10 mm, retirados de plantas mantidas *in vitro* em meio MS com 0,5 mg L⁻¹ de BAP, foram distribuídos em meio MS com BAP, CIN e 2iP, nas concentrações de 0,0 mg L⁻¹; 0,5 mg L⁻¹; 1,0 mg L⁻¹; e 2,0 mg L⁻¹, totalizando 10 tratamentos, com 20 explantes por tratamento, em delineamento inteiramente casualizado. Aos 30 dias, foi feita a avaliação quanto ao número médio de gemas emitidas por explante e altura média das plantas.

Enraizamento

Segmentos de caule com 2 a 3 gemas e tamanho médio de 2,0 cm, sem folhas, retirados de plantas mantidas *in vitro*, foram inoculados no meio MS com 50% e 100% da formulação dos sais macronutrientes e diferentes concentrações de AIB (0,00 mg L⁻¹; 0,25 mg L⁻¹; 0,50 mg L⁻¹; e 1,00 mg L⁻¹), totalizando oito tratamentos, distribuídos em fatorial 4x2, com 20 explantes por tratamento, utilizando-se delineamento inteiramente casualizado. Após 45 dias, foi feita a avaliação quanto à percentagem de enraizamento das gemas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Assepsia e preparo dos explantes

Aos 50 dias, 55,82% dos explantes estavam contaminados. Nos tratamentos com hipoclorito de cálcio, com e sem imersão prévia em álcool 70%, por 1 minuto, a percentagem de explantes não con-

taminados foi de 53,33% e 43,33%, respectivamente (Figura 1). A imersão em álcool (70%, por 1 minuto) contribuiu, de forma significativa, para a redução da contaminação, principalmente por fungos.

A contaminação por fungos só foi observada até 10 dias, quando 18% dos explantes estavam contaminados. Com relação à contaminação bacteriana, ocorreu até os 50 dias de cultivo, com média de 38% de explantes contaminados. Sousa et al. (2006), trabalhando com desinfestação de feijoa, *Acca sellowiana* (Berg) Burret, utilizando hipoclorito de sódio, verificaram baixa contaminação fúngica (1,2%) e alta contaminação bacteriana (78%), o que atribuem à presença de bactérias endógenas nas plantas matrizes. Segundo Grattapaglia & Machado (1998), existem diversos microorganismos de natureza endógena que não são expostos aos agentes desinfestantes, ocorrendo altas percentagens de contaminação e representando sério problema no estabelecimento das culturas.

Nos tratamentos com hipoclorito de cálcio, independentemente da imersão ou não em álcool 70%, por 1 minuto, o número de explantes com calos foi significativamente maior (Figura 2). Com hipoclorito de sódio, além da maior contaminação, houve, também, maior toxidez aos explantes,

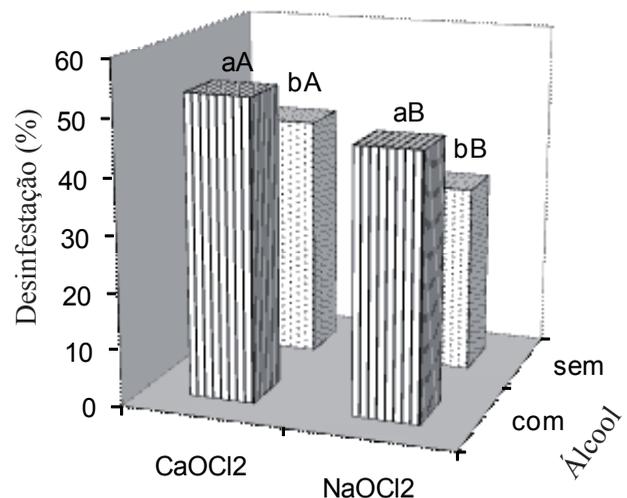


Figura 1. Percentagem de explantes de mussaenda desinfestados com hipoclorito de cálcio (CaOCl₂) ou hipoclorito de sódio (NaOCl₂), a 2,5%, com e sem imersão em álcool 70%, aos 50 dias de cultivo *in vitro*, em meio MS com 4,0 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) e 0,4 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético). Letras minúsculas comparam o uso ou não do álcool em cada desinfestante (CaOCl₂ ou NaOCl₂) e letras maiúsculas comparam os desinfestantes na presença ou ausência de álcool.

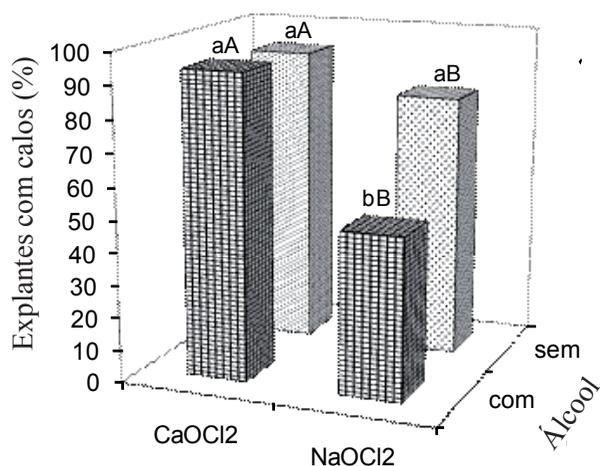


Figura 2. Percentagem de explantes de mussaenda com calos, aos 50 dias de cultivo *in vitro*, após a desinfestação com hipoclorito de cálcio (CaOCl₂) ou hipoclorito de sódio (NaOCl₂), com e sem imersão em álcool 70%, inoculados em meio MS com 4,0 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) e 0,4 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético). Letras minúsculas comparam o uso ou não do álcool em cada desinfestante (CaOCl₂ ou NaOCl₂) e letras maiúsculas comparam os desinfestantes na presença ou ausência de álcool.

que ficaram mais descoloridos e menores que nos tratamentos com hipoclorito de cálcio. De acordo com Grattapaglia & Machado (1998), o hipoclorito de cálcio tem a vantagem de ser menos tóxico aos tecidos que o hipoclorito de sódio. Pierik (1990) também enfatiza que o hipoclorito de cálcio é usado em tecidos mais sensíveis e em concentrações variando de 3,5% a 10%, podendo ser uma alternativa eficiente na desinfestação.

Quanto aos segmentos de brácteas colocados nas posições adaxial e abaxial, verificou-se que, dos explantes não contaminados aos 50 dias, os que estavam na posição adaxial foram mais responsivos, com 90% produzindo calos, enquanto, na posição abaxial, apenas 50% iniciaram a diferenciação em calos. Segundo Welander (1988), este fato ocorre, possivelmente, devido à fonte adaxial apresentar mais resposta aos nutrientes, por esse ser o último tecido da folha a cessar o crescimento e divisão.

Indução de calos

Aos 30 dias, os tratamentos com 4,0 mg L⁻¹ de BAP adicionados de ANA foram os mais efetivos, apresentando percentagem de explantes com calo de 80% e 100%, nas concentrações de

0,2 mg L⁻¹ e 0,4 mg L⁻¹ de ANA, respectivamente (Figura 3). O ANA isolado não foi eficiente na produção de calos, em segmentos de brácteas de mussaenda.

Aos 60 dias, com ou sem ANA, na presença de BAP, 100% dos explantes apresentavam calos em todos os tratamentos (Figura 4). Porém, na presença de ANA, os calos apresentavam melhor aspecto visual e melhor desenvolvimento. Panda et al. (1991), trabalhando com explantes da nervura central e do pecíolo de *M. philippica* cv. Aurorae, em meio com diferentes combinações de ANA, AIA e BAP, verificaram que o BAP foi necessário para indução de calo.

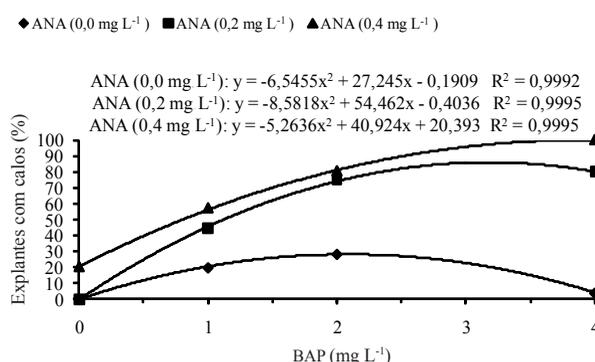


Figura 3. Percentagem de explantes de mussaenda com calos, aos 30 dias de cultivo *in vitro*, em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) e ANA (ácido naftalenoacético).

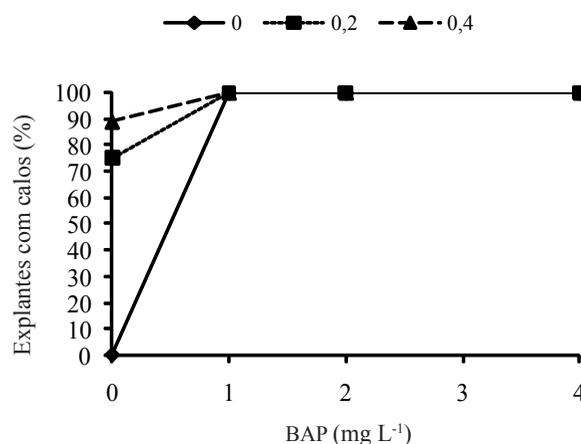


Figura 4. Percentagem de explantes de mussaenda com calos, aos 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) e ANA (ácido naftalenoacético).

Embora todos os tratamentos com BAP + ANA tenham apresentado 100% dos explantes com calos aos 60 dias, o tratamento com 4,0 mg L⁻¹ de BAP + 0,4 mg L⁻¹ de ANA mostrou ser o melhor, com explantes totalmente cobertos com calos. Quanto à coloração, com o tempo de cultivo, os calos que eram verdes, inicialmente, ficaram marrons, nos tratamentos com BAP, independentemente da presença de ANA.

Indução de gemas nos calos

Verificou-se a necessidade de adicionar citocinina ao meio, para induzir maior percentagem de gemas diferenciadas, uma vez que, na ausência da mesma, apenas 5% dos calos apresentavam gemas aos 30 dias.

O 2iP foi a citocinina mais efetiva, com emissão de gemas em 50% dos calos, independentemente das concentrações utilizadas (Figura 5). Com BAP na concentração de 1,4 mg L⁻¹, também houve formação de gemas em 50% dos calos, podendo ser esta a citocinina a ser utilizada na indução de gemas em calos de *Mussaenda*, ao invés de 2iP, que tem maior custo, tornando, assim, mais econômico o protocolo para multiplicação *in vitro* de *Mussaenda*.

Multiplicação das gemas

Aos 30 dias, o maior número médio de gemas emitidas por explante foi observado nos tratamentos com 0,5 mg L⁻¹ de 2iP e 1,0 mg L⁻¹ de CIN, com 1,95 e

1,90 gemas por explante, respectivamente (Figura 6). Gonzáles et al. (2000), trabalhando com a multiplicação de mirtilo (*Ericaceae*), verificaram que o 2iP foi uma das citocininas mais eficazes.

O número médio de gemas por explante foi relativamente baixo, variando de 1,20 a 1,95, havendo redução quando as concentrações de BAP e de 2iP foram aumentadas (Figura 6). Porém, com cinetina, houve um aumento no número médio de gemas por explante, quando a concentração foi aumentada, estimulando-se o número máximo de gemas com 1,4 mg L⁻¹. Para Metiver (1986), a diferença na forma de atuação entre as citocininas sintéticas usadas em pesquisas é que podem, ou não, ter estruturas completamente diferentes das naturais, podendo atuar de modo completamente anormal.

O BAP foi a citocinina menos eficiente, superando a média de gemas por explante da testemunha (1,52) apenas na concentração de 0,5 mg L⁻¹ (1,63). Resultados diferentes foram encontrados por Jasrai et al. (1999), em que a maior proliferação de gemas axilares e a indução de gemas múltiplas de *Mussaenda luteola* foram observadas em meio MS com BAP em altas concentrações. Esta diferença, segundo Torres et al. (1998), deve-se às características únicas determinadas, principalmente, por fatores genéticos de cada cultivar, sendo que as necessidades para o seu cultivo *in vitro* também são únicas e influenciadas por diversas variáveis imponderáveis, que, frequentemente, restringem a repetição dos resultados e dificultam a determinação de um protocolo efetivamente comercial de micropropagação. Para Bonga & Von

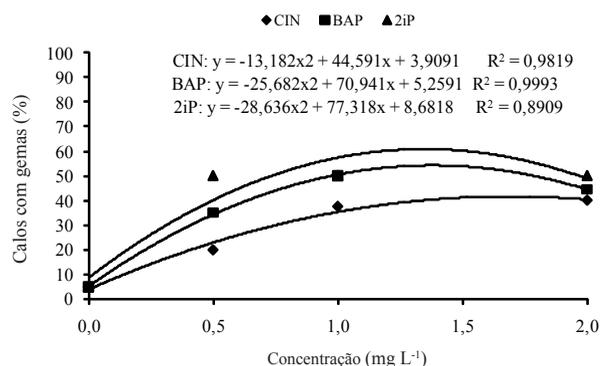


Figura 5. Percentagem de calos com gemas de *Mussaenda*, aos 30 dias de cultivo *in vitro*, em meio MS suplementado com diferentes concentrações de CIN (cinetina), BAP (6-benzilaminopurina) e 2iP (2-isopenteniladenina).

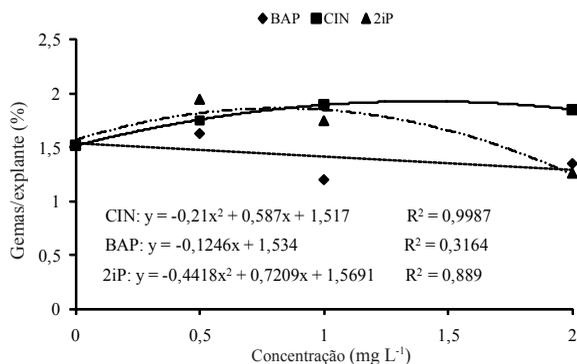


Figura 6. Número médio de gemas de *Mussaenda*, aos 30 dias de cultivo *in vitro*, em meio MS suplementado com diferentes concentrações de BAP (6-benzilaminopurina), CIN (cinetina) e 2iP (2-isopenteniladenina).

Aderkas (1992), as baixas taxas de multiplicação de mussaenda podem ser explicadas pela maneira complexa com que os reguladores de crescimento e as células interagem, de maneira que, se o tecido não está em um estágio responsivo, este não irá responder, adequadamente, aos reguladores de crescimento exógenos, não importando em quais concentrações e combinações esses reguladores sejam utilizados.

A maior altura média das plantas ocorreu no tratamento testemunha (1,65 cm) e com CIN na concentração de 0,5 mg L⁻¹ (Figura 7). Chaves et al. (2005), trabalhando com o estabelecimento de *Prunus*, relataram que, em muitos casos, concentrações crescentes de citocininas tendem a inibir o tamanho das brotações, sendo o maior tamanho observado na ausência deste regulador de crescimento.

Enraizamento

Aos 45 dias, no tratamento com 0,5 mg L⁻¹ de AIB, no meio MS com metade da formulação dos sais macronutrientes, todos os explantes haviam enraizado (Figura 8). Com a mesma concentração de AIB e 100% dos sais, 80% dos explantes emitiram raízes. Segundo Pasqual et al. (2001), o enraizamento *in vitro* pode ser favorecido com o uso de meio de cultura com metade ou 75% da concentração normal de sais, sendo que, em algumas espécies, altas concentrações de sais, principalmente de íons amônio, favorecem o desenvolvimento de raízes, enquanto, em outras espécies, podem ser inibidoras. De acordo com Grattapaglia & Machado (1998), mesmo na presença

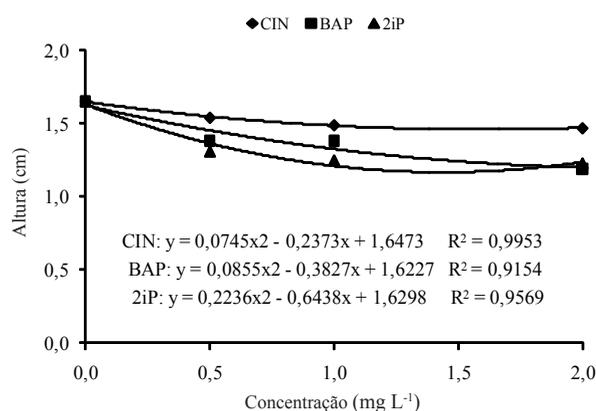


Figura 7. Altura média das plantas de mussaenda, aos 30 dias de cultivo *in vitro*, em meio MS com diferentes concentrações de BAP (6-benzilaminopurina), CIN (cinetina) e 2iP (2-isopenteniladenina).

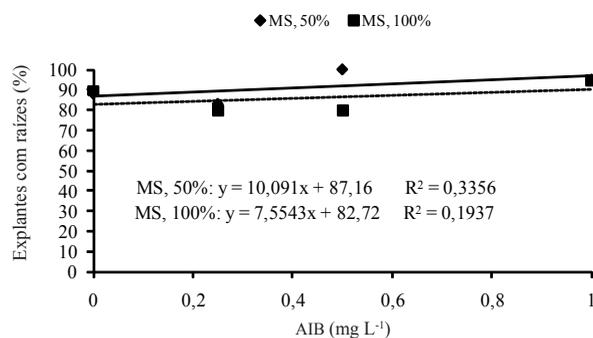


Figura 8. Percentagem de explantes de mussaenda com raízes, aos 45 dias de cultivo *in vitro*, em meio MS com diferentes concentrações da formulação dos sais macronutrientes do meio MS (50% e 100%) e diferentes concentrações de AIB (ácido indolbutírico).

de auxinas, altas concentrações de sais podem inibir as fases de enraizamento, mais particularmente a de crescimento das raízes.

Nos tratamentos sem AIB, ocorreu alto percentual de explantes com raízes, 88,2% e 89,5%, com 50% e 100% dos sais MS, respectivamente, além de serem os únicos tratamentos em que os explantes não desenvolveram calos e as plantas apresentavam-se mais vigorosas. Resultados semelhantes foram obtidos por Villa et al. (2005), trabalhando com brotos de amoreira-preta 'Ebano' *in vitro*, os quais constataram que, para o enraizamento, na ausência de reguladores de crescimento, os explantes apresentaram melhor desenvolvimento das raízes e não houve a formação de calos. De acordo com Grattapaglia & Machado (1998), a formação intermediária de calos dificulta a conexão vascular entre o caule e a raiz. Dessa forma, pode ser utilizado o tratamento com 50% dos sais sem auxina, para o enraizamento de gemas de mussaenda.

CONCLUSÕES

1. O uso do hipoclorito de cálcio (2,5%), com imersão prévia em álcool 70%, por um minuto, promove maior porcentagem de desinfestação em explantes de mussaenda.
2. A combinação de 4,0 mg L⁻¹ de BAP com 0,4 mg L⁻¹ de ANA mostrou-se eficiente para a indução de calos, em explantes de brácteas de mussaenda.
3. O BAP, a 1,0 mg L⁻¹, e o 2iP, em todas as concentrações testadas, mostraram-se eficazes para indução de gemas nos calos de mussaenda. Porém, a utilização do BAP pode reduzir o custo no protocolo de multiplicação.

4. Para a multiplicação de gemas de mussaenda *in vitro*, pode ser utilizado o 2iP ou a CIN, nas concentrações de 0,5 mg L⁻¹ e 1,0 mg L⁻¹, respectivamente.
5. No enraizamento, o meio MS com 50% ou 100% da formulação dos sais, sem regulador de crescimento, permite a emissão de raízes nos explantes, sem que ocorra o desenvolvimento de calos.

AGRADECIMENTOS

Ao Banco do Nordeste do Brasil, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- BONGA, J. M.; VON ADERKAS, P. *In vitro culture of trees*. Dordrecht: Kluwer Academic, 1992.
- CHAVES, A. da C.; SCHUCH, M. W.; FACHINELLO, J. C. Estabelecimento *in vitro* de *Prunus* cultivar MR S1/8. *Revista Científica Rural*, Santa Maria, v. 10, n. 2, p. 30-35, 2005.
- CRAMER, C. S.; BRIDGEN, M. P. Growth regulator effects on plant height of potted *Mussaenda* 'Queen Sirikit'. *HortScience*, Alexandria, v. 33, n. 1, p. 78-81, 1998.
- DAS, P.; ROUT, G. R.; DAS, A. B. Somatic embryogenesis in callus culture of *Mussaenda erythrophylla* cvs. Queen Sirikit and Rosea. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Netherlands, v. 35, n. 2, p. 199-201, nov. 1993.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Fatores que afetam a multiplicação *in vitro* de mirtilo. *Scientia Agraria*, Curitiba, v. 7, n. 1-2, p. 83-88, 2006.
- GONZALES, M. V. et al. Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from field-grown plants. *Annals of Applied Biology*, Oxford, v. 137, n. 1, p. 73-78, 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, DF: Embrapa, 1998. p. 183-260.
- GUERRA, M. P. et al. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para micropropagação do abacaxizeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v. 34, n. 9, p. 1557-1563, 1999.
- GUIMARÃES, P. T. C.; PASQUAL, M.; MIRANDA, A. M. P. Efeito de diferentes concentrações de nitrogênio e de sacarose sobre a micropropagação *in vitro* da samambaia-espada [*Nephrolepis exaltata* (L.) Schoott.]. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 32, n. 2, p. 309-316, 1999.
- JASRAI, Y. T. et al. Micropropagation of an ornamental shrub - *Mussaenda luteola* L. Plant tissue culture and biotechnology: emerging trends. In: PROCEEDINGS OF SYMPOSIUM HELD AT HYDERABAD, 15., Hyderabad. *Annals...* Hyderabad: Universities Press, 1999. p. 223-225.
- MAITY, S. K.; DE, K. K.; KUNDU, A. K. *In vitro* propagation of *Mussaenda erythrophylla* Schum and Tom cv. Scarlet through multiple shoot regeneration. *Indian Journal of Experimental Biology*, New Delhi, v. 39, n. 11, p. 1188-1190, 2001.
- METIVER, J. R. Citocininas. In: FERRI, M. G. *Fisiologia Vegetal 2*. São Paulo: EPU, 1986. p. 93-127.
- MURASHIGE T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- PANDA, N.; DEBATA, B. K.; DAS, P. Regeneration of plants from callus cultures of *Mussaenda philippica* cv. Aurorae. *The Orissa Journal of Horticulture*, Suryanagar, v. 19, n. 1-2, p. 1-5, 1991.
- PASQUAL, M.; CHALFUN, N. M. J.; RAMOS, J. D. *Cultura de tecidos vegetais: aplicações na propagação de plantas*. Lavras: UFLa/Faepe, 2001.
- PIERICK, R. L. M. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Martins: Nijoff, 1990.
- ROSARIO, T. L. *The ornamental mussaendas of the Philippines*. Laguna: Institute of Plant Breeding, 1984.
- SCHWERTNER, A. B. S.; ZAFFARI, G. R. Micropropagação de singônio. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, Campinas, v. 9, n. 2, p. 135-142, 2003.
- SHARMA, S. C. et al. Outline your gardens and parks with mussaendas. *Indian Horticulture*, New Delhi, v. 35, n. 1, p. 33-35, 1990.
- SOUZA, J. A. de et al. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de feijoa [*Acca sellowiana* (Berg) Burret] e pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). *Revista Científica Rural*, Santa Maria, v. 11, n. 2, p. 39-44, 2006.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília, DF: Embrapa, 1998.
- VILLA, F. et al. Multiplicação *in vitro* da amoreira-preta 'Ebano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 29, n. 3, p. 582-589, 2005.
- WELANDER, M. Plant regeneration from leaf and stem segments of shoots raised *in vitro* from mature apple trees. *Journal of Plant Physiology*, Jena, v. 132, n. 6, p. 738-744, 1988.