

Propagação *in vitro* de coral-da-serra (*Siphocampylus betulifolius*) a partir de segmentos nodais

Claudimar Sidnei Fior¹, Adriana Maria Brentano²,
Janaina Alves Trindade Sampaio² & Lia Rosane Rodrigues²

¹Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Jardim Botânico de Porto Alegre. Rua Dr. Salvador França, 1427, Porto Alegre, RS, Brasil. csfior@ufrgs.br
²Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (FEPAGRO). Rua Gonçalves Dias, 570, Porto Alegre, RS, Brasil. lia-rodrigues@fepagro.rs.gov.br

Recebido em 21.II.2011. Aceito em 17.X.2011

RESUMO - *Siphocampylus betulifolius* (Cham.) G. Don apresenta potencial para ornamentação de interiores, principalmente pelo florescimento contínuo em áreas parcialmente sombreadas. Uma seqüência de experimentos foi conduzida com o objetivo de identificar as condições para a sua propagação *in vitro*. A micropropagação foi viabilizada em meio MS com 70% da composição de sais e vitaminas, com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 7,5 g.L⁻¹ de ágar, e pH corrigido para 5,8, com diferentes concentrações de ácido naftalenoacético (ANA) e benzilaminopurina (BAP) a cada etapa. A indução de segmentos nodais em 0,1 mg de ANA e 0,5 a 1,5 mg.L⁻¹ de BAP foi satisfatória. A multiplicação foi viabilizada por meio de subcultivos em 0,5 mg.L⁻¹ de BAP. O enraizamento foi significativamente superior em 1mg. L⁻¹ de ANA e 48% das plantas sobreviveram à aclimatização sob nebulização intermitente. Concluiu-se que a propagação de *Siphocampylus betulifolius* pode ser realizada através de segmentos nodais cultivados *in vitro*.

Palavras-chave: *Campanulaceae*, micropropagação, clonagem, organogênese

ABSTRACT - *In vitro* propagation of coral-da-serra (*Siphocampylus betulifolius*) from nodal segments. *Siphocampylus betulifolius* (Cham.) G. Don has the potential for indoor decoration, especially for presenting continuous flowering in partially shaded places. A sequence of experiments was carried out in order to identify the conditions to its *in vitro* propagation. Micropropagation was executed in MS medium with 70% of the composition of salts and vitamins, and with 30 g.L⁻¹ of sucrose, 7.5 g.L⁻¹ of agar and pH adjusted to 5.8 with different concentrations of naphthaleneacetic acid (ANA) and benzyladenine (BAP) in each step. The induction of nodal segments in 0.1 mg ANA and 0.5 to 1.5 mg.L⁻¹ of BAP was satisfactory. Multiplication was made with 0.5 mg.L⁻¹ of BAP. Rooting was significantly higher with 1 mg.L⁻¹ of ANA and 48% of the plants survived to acclimatization under intermittent nebulization. We concluded that the propagation of *Siphocampylus betulifolius* can be accomplished through nodal segments cultured *in vitro*.

Key words: *Campanulaceae*, micropropagation, cloning, organogenesis

INTRODUÇÃO

O coral-da-serra, *Siphocampylus betulifolius* (*Campanulaceae*), é uma espécie perene e herbácea, endêmica no Brasil, que ocorre em regiões de

altitude desde o estado do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul. É considerada espécie de luz difusa ou heliófita, encontrada no interior ou na orla de pequenas matas e capoeiras nos aparados da Serra Geral e outras regiões de altitude (500 a 1400m) em

Santa Catarina. Apresenta flores axilares, solitárias, com pedicelo de até quatro centímetros e corola vermelha com limbo amarelo (Trinta & Santos, 1989).

Exemplares de coral-da-serra cultivados por dois anos sob diferentes níveis de sombreamento em área de sub-bosque do parque do Jardim Botânico da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (JB-FZB-RS, latitude 30°03'S e longitude 51°10'W) vegetaram normalmente e floresceram continuamente a partir de 15 a 30 dias após o plantio (Fior *et al.*, 2004). Plantas também são mantidas permanentemente em casa de vegetação sem prejuízo aos aspectos ornamentais. Tal potencial para ornamentação de áreas parcialmente sombreadas e ambientes interiores é uma característica muito procurada na atualidade.

Como uma etapa inicial para a preservação da diversidade genética e para o emprego ornamental da espécie, estão sendo estudados a propagação por sementes e o encurtamento de entrenós (Fior *et al.*, 2004; Fior, 2006). Contudo, também se faz necessário o estabelecimento de procedimentos que possibilitem a propagação vegetativa, a fim de preservar genótipos com potencial diferenciado. Assim, uma seqüência de experimentos foi conduzida com o objetivo de identificar as condições para a propagação *in vitro* de coral-da-serra.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas obtidas pela germinação de sementes no trabalho de Fior *et al.* (2004) foram podadas e mantidas em vasos em casa de vegetação por 60 dias, adubadas com solução nutritiva (Kristalon® a 0,67 g.L⁻¹ e nitrato de cálcio a 0,33 g.L⁻¹) e pulverizadas semanalmente com soluções aquosas de produtos fitossanitários alternados: mancozeb (2g.L⁻¹ de Manzate®), dicarboximida (2 g.L⁻¹ de Captan®), tiofanato metílico (0,75 g.L⁻¹ de Cercobin®), oxitetraciclina com sulfato de cobre (0,43 g.L⁻¹ de Agrimaicin 500®), metamidofós (1mL.L⁻¹ de Tamaron®) e clorfenapir (1 mL.L⁻¹ de Pirate®), visando à eliminação de vetores e de microorganismos endógenos ao sistema vascular das brotações.

Brotações recém emitidas foram removidas, friccionadas com escova e detergente sob água corrente e submetidas à desinfestação por meio de imersão em etanol 70% por 1min e em NaOCl 1% i. a. por 10min, seguida de triplo enxágue com água deionizada esterilizada, sob fluxo laminar estéril. Sob microscópio estereoscópico foram excisados os ápices

caulinares, cada um constituído por um meristema e 2 a 4 primórdios foliares (≤ 1 mm), caracterizando um explante.

Todos os cultivos foram feitos em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), 70% da concentração de sais e vitaminas, com 30 g de sacarose e 7,5 g.L⁻¹ de ágar e pH corrigido para 5,8 previamente à autoclavagem, escolhido a partir de testes prévios.

Com o objetivo de identificar combinações de fitorreguladores para indução à morfogênese, 200 segmentos nodais foram estabelecidos em tubos de ensaio (25 x 150mm) contendo 10 mL dos meios de cultivo: controle sem fitorreguladores; 0,1 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA); 0,1 mg.L⁻¹ de ANA e 0,5 mg.L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP); 0,1 mg.L⁻¹ de ANA e 1 mg.L⁻¹ de BAP; 0,1 mg.L⁻¹ de ANA e 1,5 mg.L⁻¹ de BAP. O delineamento foi completamente casualizado com dez tubos por parcela e quatro repetições por tratamento.

Os explantes foram mantidos em sala climatizada (fotoperíodo de 16h a 22 μ mol.m⁻². s⁻¹, temperatura 26 \pm 1°C) e avaliados após 28 dias quanto à sobrevivência, presença de calos e número de brotações por segmento (Fig. 1A). As brotações foram subcultivadas no meio em que houve melhor resposta morfológica para geração de material suficiente à continuidade dos experimentos.

Posteriormente, o meio de cultivo em que houve melhor resposta morfológica foi utilizado para estabelecimento de 37 ápices caulinares também obtidos de brotações, com procedimento idêntico ao citado anteriormente.

Com o objetivo de testar a multiplicação de *S. betulifolius* em concentrações de fitorreguladores inferiores às empregadas no meio de indução, plantas subcultivadas em meio com 0,1 mg.L⁻¹ de ANA e 1,5 mg.L⁻¹ de BAP foram fracionadas em câmara de fluxo estéril e padronizadas quanto ao tamanho para a geração de explantes com três folhas de tamanho médio ou quatro folhas de tamanho pequeno. Cinco explantes foram estabelecidos por frasco (altura e diâmetro de 80mm (capacidade 200 mL), com 35 mL de meio de cultivo). Foram testadas seis variações de BAP e de ANA no meio: controle sem fitorreguladores; 0,1 mg.L⁻¹ de ANA; 0,25 mg.L⁻¹ de BAP; 0,5 mg.L⁻¹ de BAP; 1 mg.L⁻¹ de BAP; e controle com 1,5 mg.L⁻¹ de BAP mais 0,1 mg.L⁻¹ de ANA. O delineamento foi em blocos casualizados, com quatro frascos (parcelas) por combinação de tratamentos, totalizando 72 frascos e 360 explantes. Cada bloco foi constituído de explantes com idades diferentes, porque permaneceram 56, 35 e 28 dias no meio anterior.

O material foi cultivado em sala climatizada e avaliado quanto à sobrevivência, presença de raízes, altura e número de folhas após 68 dias. A massa de explantes amostrados aleatoriamente foi verificada em balança de precisão, para determinação do teor de água (massa fresca e massa seca) com quatro repetições por bloco ao início do experimento e com doze repetições por bloco aos 68 dias *in vitro*. A desidratação do material para determinação do teor de água foi realizada em estufa elétrica a 65°C até peso constante (48h).

Com o objetivo de otimizar o enraizamento *in vitro*, plantas subcultivadas em meio de multiplicação contendo 0,5 mg.L⁻¹ de ANA foram selecionadas e transferidas para meios com variações de auxinas. Os tratamentos foram: controle, sem fitorreguladores; 0,1 e 1 mg.L⁻¹ de ANA e 0,1 e 1 mg.L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB). Em delineamento em dois blocos casualizados, 24 plantas sem raízes foram estabelecidas em doze frascos de cada tratamento, totalizando 120 explantes.

Após 42 dias em sala climatizada, foram avaliados o número de folhas verdes e cloróticas, presença de calos, número e tamanho da maior e da menor raiz.

Com o objetivo de testar a resposta à aclimatação, 80 plantas tomadas aleatoriamente dentre as que estavam enraizadas em meio com 0,1 mg.L⁻¹ de ANA foram retiradas dos frascos, lavadas com água corrente para remoção de resíduos do meio de cultivo, e estabelecidas sobre casca de arroz carbonizada, em dois canteiros multicelulares de poliestireno expandido, com células de 120 cm³.

Os canteiros foram mantidos em câmara de nebulização com ciclos de irrigação de 15 seg a cada 1h30 min, sendo que um deles foi removido para bancada sem nebulização aos 14 dias. Aos sete e aos 14 dias foi pulverizada oxitetraciclina com sulfato de cobre (0,43 g.L⁻¹ de Agrimaicin 500®) na metade das plantas de cada canteiro. Ao 20º e ao 40º dia, as plantas foram avaliadas quanto à sobrevivência, à turgidez foliar e ao tamanho. Durante o teste, as temperaturas na casa de vegetação variaram de 8,5 a 27,2°C (com média diária de 16,8°C). Após 60 dias, as plantas foram transferidas para vasos contendo a mistura de casca de arroz carbonizada e pó-de-coco (1:1, v/v) e mantidas em casa de vegetação.

Os dados de todos os experimentos foram submetidos aos testes de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e de igualdade das variâncias (Levene), seguidos da análise da variância (ANOVA). Variáveis que apresentaram significância pela ANOVA foram analisadas pelo teste de Tukey ou Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os gêneros da família *Campanulaceae*, os cultivos *in vitro* de *Campanula* foram os mais explorados em trabalhos direcionados à propagação, produção de metabólitos secundários e transformação genética (Brandt, 1992; Ishimaru *et al.*, 2001; Brandt & Ishimaru, 1998; Frello *et al.*, 2002; Joung *et al.*, 2002). No entanto, não foram encontrados trabalhos com o cultivo *in vitro* de espécies do gênero *Siphocampylus*. Além disso, apenas duas espécies do gênero são citadas como ornamentais no Brasil, *S. corymbiferus* Pohl e *S. verticillatus* G. Don., ambas popularmente denominadas de coral (Lorenzi & Souza, 1999). Dessa forma, o presente trabalho contribui para a valorização de *S. betulifolius* como importante recurso genético, fazendo o primeiro registro da morfogênese *in vitro*.

No teste de indução à morfogênese a partir de segmentos nodais, a presença simultânea de ANA e BAP foi essencial à resposta *in vitro*, pois 97,5% dos explantes não apresentaram morfogênese na ausência de fitorreguladores (Tabela 1).

A citocinina BAP foi essencial à brotação *in vitro*, com a desvantagem de viabilizar a calogênese tanto na base de segmentos nodais quanto de explantes em multiplicação (Fig. 1B). Devido à menor percentagem de calos basais e de explantes mortos em meio com 0,1 mg de ANA e 1,5 mg.L⁻¹ de BAP, os subcultivos também foram realizados neste meio. A combinação de 0,1 mg.L⁻¹ de ANA com 4 mg.L⁻¹ de BAP foi usada por Joung *et al.* (2002) para regeneração *in vitro* a partir de tecido foliar de *Campanula glomerata*. Também 0,5 mg.L⁻¹ de ANA e 0,75 mg.L⁻¹ de BAP foram usados com 0,25 mg.L⁻¹ de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) para organogênese indireta a partir de cotilédones de *Campanula carpatica* (Frello *et al.* 2002).

A resposta morfogênica a partir de segmentos nodais de *S. betulifolius* confirma o resultado de Brandt (1992) com *Campanula isophylla*. Contudo, após três a quatro subcultivos, observou-se proliferação de colônias no meio de cultivo junto à base de explantes que não apresentavam contaminação no meio inicial, indicando a presença de microorganismos endofíticos em parte dos tecidos iniciais. O conteúdo de frascos contendo tais proliferações foi descartado ao longo dos subcultivos.

Dos 37 ápices caulinares cultivados em 0,1 mg.L⁻¹ de ANA e 1,5 mg.L⁻¹ de BAP, oito (22%) permaneceram vivos e apenas três (8%) apresentaram organogênese de tecido foliar (Fig. 1C) após 40 dias. Nesse caso, a baixa proporção de regene-

Tabela 1. Percentagens médias e análise da variância da morfogênese de segmentos nodais de coral-da-serra (*Siphocampylus betulifolius*) em meios de indução por 28 dias *in vitro*.

| Fitorreguladores (mg L ⁻¹) | | Calogênese | Sem organogênese | | | Com organogênese | | | Total |
|---|-----|------------|------------------|-------|---------|------------------|-------|-------|---------|
| ANA | BAP | | Morto | Vivo | Total | Nº de brotações | | | |
| | | | | | | 1 | 2 | ≥3 | |
| 0 | 0 | 00,00 c | 87,50 | 10,00 | 97,50 a | 2,50 | 0,00 | 0,00 | 2,50 b |
| 0,1 | 0 | 00,00 c | 7,78 | 71,67 | 79,44 a | 20,60 | 0,00 | 0,00 | 20,60 b |
| 0,1 | 0,5 | 91,25 a | 0,00 | 8,75 | 8,75 b | 68,13 | 5,63 | 17,50 | 91,25 a |
| 0,1 | 1,0 | 81,39 ab | 2,50 | 10,56 | 13,06 b | 61,23 | 10,71 | 15,00 | 86,94 a |
| 0,1 | 1,5 | 76,39 b | 0,00 | 12,22 | 12,22 b | 76,94 | 2,50 | 8,33 | 87,78 a |
| Média | | 49,81 | 19,56 | 22,64 | 42,19 | 45,87 | 3,77 | 8,17 | 57,81 |
| Valor P | | <0,001 | - | - | <0,001 | - | - | - | <0,001 |
| CV% | | 28,33 | | | 22,4 | | | | 22,6 |

Médias seguidas de letras distintas nas colunas diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

ração foi compensada pela ausência de microrganismos endofíticos.

No teste visando à multiplicação *in vitro*, não houve diferença estatística significativa entre blocos quanto à matéria fresca (média 32 mg, $P = 0,544$) e à matéria seca (média 9%, $P = 0,406$) dos explantes iniciais. Entretanto, ao final do experimento, houve diferença significativa quanto à percentagem de matéria seca entre blocos e entre tratamentos, não associada à maior regeneração de folhas (Tabela 2).

A presença de BAP foi essencial para a multiplicação, principalmente para a formação de novas folhas (Tabela 2). Na ausência de fitorreguladores, 72% dos explantes senesceram. A presença exclusiva de ANA favoreceu a emissão de raízes, indesejada nessa etapa do processo de micropropagação.

Apesar da auxina ANA ter sido essencial na fase de indução, a citocinina BAP foi suficiente para a multiplicação de coral-da-serra, em concentração maior ou igual a 0,5 mg. L⁻¹. Ao longo dos subcultivos em meio com tal constituição, não foram observados eventos indesejáveis como calogênese e hiperidratação. A presença exclusiva de citocininas é freqüente em meios para multiplicação *in vitro* (Caldas *et al.*, 1998).

Contaminantes endógenos regrediram à medida que foram eliminados os frascos nos quais eram observadas colônias no meio de cultivo. Apenas plantas vigorosas, de frascos cujo meio tinha aparência homogênea, sem indícios de colônias de microrganismos, foram subcultivados.

No teste visando ao enraizamento (Fig. 1D), não houve perdas por contaminação ou senescência dos explantes. Não houve diferença entre explantes

dos diferentes tratamentos quanto ao número de folhas verdes. Entretanto, o número de raízes por explante foi significativamente superior no meio contendo 1 mg. L⁻¹ de ANA, no qual também ocorreu o maior percentual de calos basais. Nas outras espécies de *Campanulaceae* micropropagadas, a etapa de enraizamento foi conduzida na ausência de fitorreguladores (Brandt, 1992; Frello *et al.*, 2002), o que também se verificou para *S. betulifolius*, porém, com menor eficiência (Tab. 3).

Em todos os tratamentos, foram registrados explantes com emissão de brotações laterais e espessamento da base, mas sem aparência de calo; emissão de raízes entre as folhas e com crescimento desorientado em relação ao geotropismo; e algumas raízes com muitos pelos radiculares, diferentes da maioria, de aparência lisa. A sobrevivência e o crescimento das plantas não foram afetados por essas características morfológicas atípicas.

No teste da aclimatização, 38 plantas (48% do total) sobreviveram ao final de 40 dias em casa de vegetação, sendo que 25 (66% das sobreviventes) apresentaram folhas hiperidratadas e amolecidas, apesar de não terem essa aparência *in vitro* (Fig. 1D). A identificação de folhas hiperidratadas após alguns dias do cultivo *ex vitro* não foi registrada em outros trabalhos.

A hiperidratação é uma desordem fisiológica comum em tecidos *in vitro*, identificável visualmente pela umidade e flacidez das folhas. Plantas que apresentam tal desordem são facilmente perdidas por dessecação e sobrevivem menos à transferência *ex vitro* (Ziv & Chen, 2008). Contudo, após o 40º dia, tanto plantas de aparência típica quanto plantas hi-

Tabela 2. Médias e análise da variância das características mensuradas em explantes de coral-da-serra (*Siphocampylus betulifolius*) após 68 dias de multiplicação *in vitro*. Explantes mortos e senescentes foram contabilizados como “perdidos”.

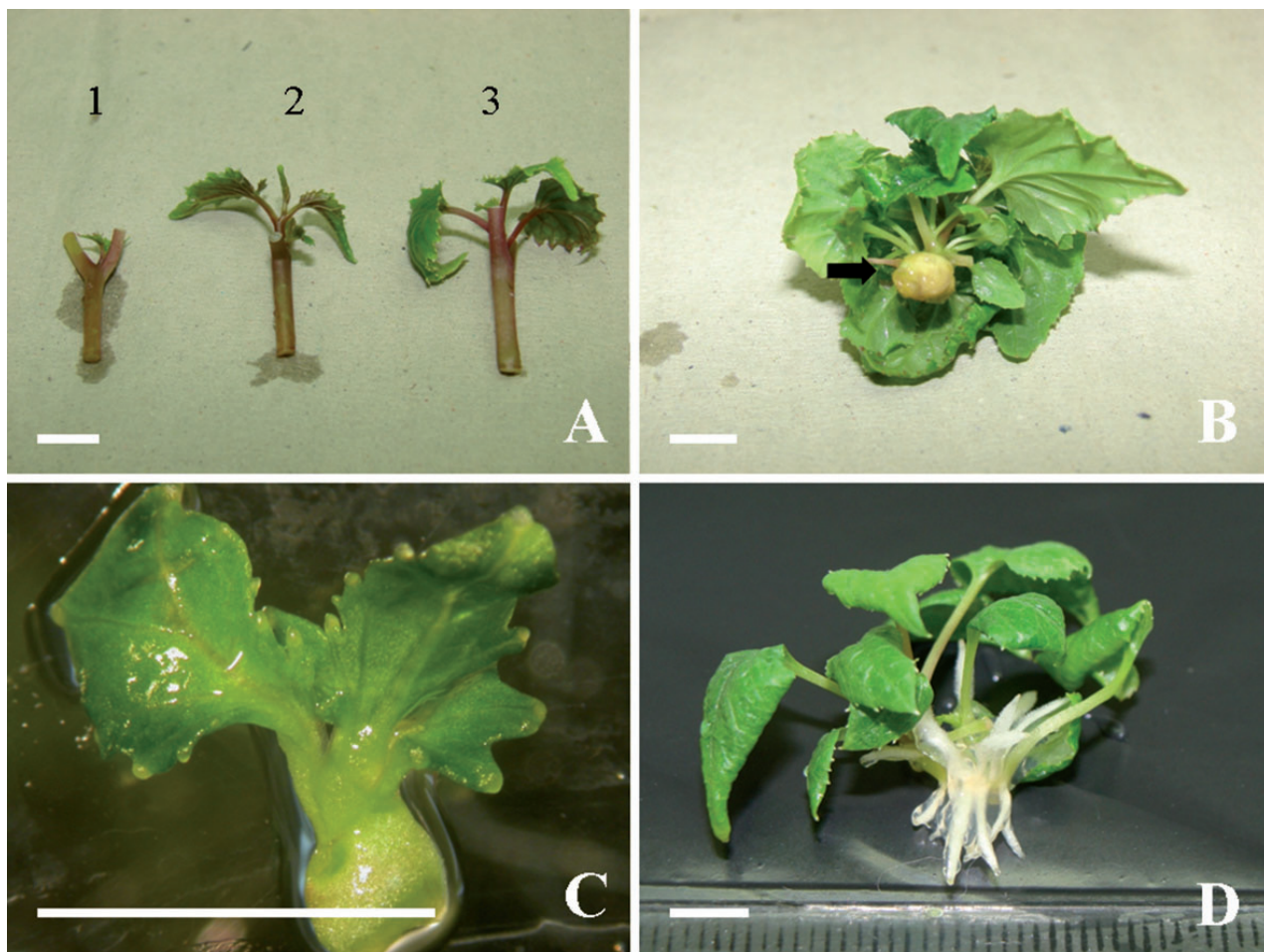
| Tratamentos (mg L ⁻¹) | | Explantes perdidos | Explantes com raiz | Altura de explantes ¹ | Nº de Folhas ¹ | | Matéria Seca ² | | |
|-----------------------------------|-----|--------------------|--------------------|----------------------------------|---------------------------|-----|---------------------------|------|---|
| BAP | ANA | (%) | (%) | (mm) | | | (%) | | |
| 0 | 0 | 72,2 | 26,4 | 17,2 | 9,5 | bc | 9,2 | abc | |
| 0 | 0,1 | 45,8 | 45,8 | 13,0 | 8,6 | c | 11,4 | ab | |
| 0,25 | 0 | 25,0 | 13,9 | 12,5 | 14,0 | abc | 11,8 | a | |
| 0,5 | 0 | 9,7 | 2,8 | 13,9 | 17,7 | a | 8,2 | c | |
| 1,0 | 0 | 13,9 | 4,2 | 15,0 | 17,5 | a | 8,8 | bc | |
| 1,5 | 0,1 | 5,6 | 0,0 | 14,8 | 17,4 | a | 10,2 | abc | |
| Valor P | | | | 0,387 | 0,008 | | 0,007 | | |
| Blocos (dias) | | | | | | | | | |
| | | 56 | 47,9 | 5,6 | 13,9 | b | 15,2 | 11,4 | a |
| | | 35 | 23,6 | 20,1 | 15,4 | a | 15,5 | 9,1 | b |
| | | 28 | 18,8 | 20,8 | 13,2 | b | 15,4 | 9,3 | b |
| Valor P | | | | 0,041 | 0,613 | | 0,005 | | |
| Média Geral | | 30,1 | 15,5 | 14,2 | 15,4 | | 9,8 | | |
| CV% | | | | 29,0 | 31,6 | | 16,9 | | |

Médias seguidas de letras distintas nas colunas diferem pelo teste de Duncan (¹) e Tukey (²) em nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 3. Médias e análise da variância de características morfológicas de plantas de coral-da-serra (*S. betulifolius*) após 42 dias em meios visando ao enraizamento *in vitro*.

| Tratamentos (mg L ⁻¹) | Nº de folhas por explante | | | Explantes com calo | Raízes por explante | | | |
|-----------------------------------|---------------------------|------------|-------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|-----|
| | Verdes | Cloróticas | Total | (%) | Nº | > comprimento (mm) | < comprimento (mm) | |
| 0 | 17 | 3 | 21 | 0 | 3,5 | c | 8,9 | 4,2 |
| 0,1 ANA | 18 | 2 | 20 | 13 | 4,3 | bc | 12,4 | 4,7 |
| 1 ANA | 16 | 3 | 19 | 17 | 15,3 | a | 15,0 | 3,7 |
| 0,1 AIB | 18 | 3 | 21 | 8 | 4,0 | bc | 9,0 | 2,9 |
| 1 AIB | 16 | 2 | 18 | 4 | 6,4 | b | 11,7 | 4,6 |
| Valor P | 0,544 | | | | <0,001 | | | |
| Blocos | | | | | | | | |
| 1 | 16 | | | | 7,4 | a | | |
| 2 | 18 | | | | 6,0 | b | | |
| Valor P | 0,092 | | | | 0,020 | | | |
| Média geral | 17 | 3 | 19 | 8 | 6,6 | | 11,4 | 4,0 |
| CV% | 25,4 | - | - | - | 35,4 | | - | - |

Médias seguidas de letras distintas nas colunas diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.



Figs. 1. A-D. Detalhes da micropropagação de coral-da-serra (*Siphocampylus betulifolius*). **A.** Segmentos nodais com uma, duas e três brotações no experimento de indução à morfogênese; **B.** Calo basal (seta) em planta subcultivada no meio contendo 0,1 mg. L⁻¹ de ANA e 1,5 mg. L⁻¹ de BAP; **C.** Organogênese de folhas a partir de ápice caulinar após 40 dias em meio contendo 0,1 mg. L⁻¹ de ANA e 1,5 mg. L⁻¹ de BAP; **D.** Planta completa na avaliação do experimento de enraizamento. Barras = 5 mm.

peridratadas sobreviveram à posterior transferência para vasos, formando folhas morfologicamente normais, segundo aspectos visuais. Ao longo de meses de desenvolvimento em vasos em casa de vegetação, não foi observado crescimento diferente entre plantas nem alterações fenotípicas indicativas de variações somaclonais e/ou genéticas.

Assim, foi possível identificar as condições para a propagação *in vitro* de *S. betulifolius* e indicar um procedimento para a micropropagação no qual a aclimatização foi a etapa menos eficiente. Foi possível gerar um lote de plantas para estudos da diversidade genética e do manejo para o emprego ornamental. Estratégias para o cultivo de plantas sem sintomas de hiperidratação serão testadas para a otimização do protocolo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a André Luiz Stelmach Vilarinho e Rochele Scopel que auxiliaram nos subcultivos durante seus estágios curriculares.

REFERÊNCIAS

- Brandt, K. 1992. Micropropagation of *Campanula isophylla* Moretti. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 29(1):31-36.
- Brandt, K. & Ishimaru, K. 1998. *Campanula* (bellflower) species: *in vitro* culture, micropropagation and the production of anthocyanins, polyacetylenes, and other secondary metabolites. *In Biotechnology in*

- Agriculture and Forestry. Medicinal and aromatic plants X. (Y.P.S. Bajaj, ed.). Springer-Verlag, Berlin, v. 4, p. 45-46.
- Caldas, L.S., Harisadan, P. & Ferreira, M.E. 1998. Meios nutritivos. *In* Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa (A.C. Torres, L.S. Caldas & J.A. Buso, eds.). SPI, Embrapa CNPH, v. 1, p. 87-132.
- Fior, C.S. 2006. Propagação e manejo de espécies nativas para emprego ornamental. *In* Os avanços da botânica no início do século XXI - Morfologia, Fisiologia, Taxonomia, Ecologia e Genética. (J.E.A. Mariath & R.P. Santos, eds). Sociedade Botânica do Brasil, Porto Alegre, p. 605-611
- Fior, C.S., Calil, A.C. & Leonhardt, C. 2004. *Siphocampylus betulaefolius* (Cham.) G. Don: propagação e potencial ornamental. *Iheringia. Série Botânica*, 59(2):207-210.
- Frello, S., Stummann, B.M. & Serek, M. 2002. Shoot regeneration of *Campanula carpatica* Jacq. (*Campanulaceae*) via callus phase. *Scientia Horticulturae*, 93(1):85-90.
- Ishimaru, K., Ando, M., Takamiya, M., Terahara, N., Yamakawa, T., Shimomura, K. & Tanaka, N. 2001. Transgenic *Campanula* spp. (Bellflower). *In* Biotechnology in Agriculture and Forestry. Transgenic Crops III, (Y.P.S. Bajaj, ed.). Springer-Verlag, Berlin, v. 48, p. 55-69.
- Joung, Y.H., Liao, M.S., Roh, M.S., Kamo, K. & Song, J.S. 2002. *In vitro* propagation of *Campanula glomerata* "Acaulis" from leaf blade explants. *Scientia Horticulturae*, 92:134-147.
- Lorenzi, H. & Souza, H.M. 1999. Plantas ornamentais no Brasil – arbustivas, herbáceas e trepadeiras. Instituto Plantarum, Nova Odessa. 1119 p.
- Murashige, T. & Skoog, F.A. 1962. Revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3):473-497.
- Trinta, E.F. & Santos, E. 1989. Flora ilustrada catarinense – *Campanulaceae*. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí. 80 p.
- Ziv, M. & Chen, J. 2008. The anatomy and morphology of tissue cultured plants. *In* Plant Propagation By Tissue Culture. (E.F. George, M.A. Hall & G.-J. De Klerk, eds.). Springer, Dordrecht, p. 465-468.

