

**Desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* sp.:
adição de reguladores de crescimento e sacarose¹**

***Growth regulators and sucrose on the in vitro development of
Cattleya loddigesii* sp.**

**Juliana Costa de Rezende², Ester Alice Ferreira³, Moacir Pasqual⁴,
Fabíola Villa⁵, Flávia Carvalho Santos⁶**

¹ Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG.

² Doutora, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG/CTSM), Lavras, MG. E-mail: julianacosta@epamig.br.

³ Doutora, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG/CTTP), Cx.P. 351. CEP 38001-970, Uberaba, MG.

⁴ Professor Adjunto, Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG. Cx.P. 3037. CEP 37200-000.

⁵ Pós-doutorado, Bolsista FAPEMIG, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG/FEMF), Maria da Fé, MG.

⁶ Aluna de doutorado, Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG. Cx.P. 3037. CEP 37200-000.

Recebido: 28/01/2009 Aceito: 04/05/2009

Resumo. Estudou-se a influência de diferentes concentrações de sacarose, GA3 e ANA no desenvolvimento de protocormos oriundos da germinação de sementes de orquídea *Cattleya loddigesii* sp. Foram realizados 2 experimentos em delineamento experimental inteiramente ao acaso, com 5 repetições e esquema fatorial 4 x 5, constituído de quatro concentrações de GA3 e cinco concentrações de sacarose (experimento 1) e de quatro concentrações de GA3 e cinco concentrações de ANA (experimento 2) acrescentadas ao meio MS. Os frascos permaneceram por 90 dias em sala de crescimento com irradiância de 32 mM m⁻² s⁻¹, temperatura de 25 ± 1°C e fotoperíodo de 16 horas diárias de luz. Avaliou-se o número de folhas, de raízes, o comprimento da maior raiz e da parte aérea e o peso da matéria fresca das plântulas. As plântulas de *Cattleya loddigesii* sp apresentaram melhor enraizamento e crescimento da raiz na ausência de GA3 e na presença de 60 g L⁻¹ de sacarose. Os maiores valores de comprimento da parte aérea e peso da matéria fresca foram obtidos na ausência de ANA, utilizando-se 4,2 mg L⁻¹ de GA3 e de 16 a 30 g L⁻¹ de sacarose. Maior número de folhas foi obtido 0,67 mg L⁻¹ de ANA.

Palavras-chave: Orchidaceae, GA3, ANA, micropropagação

Abstract. It was studied the influence of sucrose, GA3 and NAA concentrations on *in vitro* plantlets development originating from germination of orchid seeds *Cattleya loddigesii* sp. Two experiments were carried out, in randomized block, with five replications, and factorial 4 x 5, constituted of four concentrations of GA3 and five sucrose concentrations (experiment 1) and of four concentrations of GA3 and five concentrations of NAA (experiment 2) added in culture media MS. The experiment was maintained for 90 days in a growth room under light intensity of $32 \mu\text{Mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 25 ± 1 °C photoperiods of 16 hours. It was evaluated the number of leaves, roots, length of the largest root and the aerial part and the plantlets fresh mass. The absence of GA3 and with 60 g L⁻¹ of sucrose it was the better number and growth of roots plantlets of *Cattleya loddigesii* sp. Higher length of the aerial part and the plantlets fresh mass was obtained in NAA plus 4,2 mg L⁻¹ of GA3 and 16 to 30 g L⁻¹ of sucrose. Larger number of leaves was obtained 0,67 mg L⁻¹ of NAA

Key-words: Orchidaceae, GA3, NAA, micropropagation

Introdução

As orquídeas podem ser propagadas tanto vegetativamente quanto por meio de sementes. Essas, embora produzidas em grande quantidade, não possuem endosperma funcional, sendo incapazes de germinar na natureza. Dessa forma, o cultivo *in vitro* de células e tecidos tem sido excelente alternativa a ser empregada para a propagação das orquídeas, por apresentar vantagens únicas sobre os métodos convencionais de propagação, como multiplicação rápida e obtenção de populações homogêneas de genótipos oriundos de programas de melhoramento genético (CAMPOS, 2004).

As giberelinas exercem efeitos positivos no alongamento de caules e folhas em plantas intactas mediante o estímulo tanto da divisão quanto do alongamento celular. Em geral, induzem o alongamento dos internódios e o crescimento de meristemas ou gemas cultivadas *in vitro* (PIRES, 1998; JACQUES, 1985). As auxinas estão associadas ao crescimento uma vez que agem diretamente no alongamento celular. Seus efeitos são comprovados na formação de brotos e raízes, no desenvolvimento de gemas florais e na indução de diferenciação vascular. Entretanto, em altas concentrações podem prejudicar o crescimento da plântula (TAIZ & ZEIGER, 2004).

A sacarose é o carboidrato mais utilizado nos meios nutritivos, proporcionando as mais altas taxas de crescimento da maioria das espécies (CALDAS *et al.*, 1990). Knudson (1922) já relatava a importância de açúcares no meio de cultura para a germinação das sementes de orquídeas e posterior crescimento das plântulas. Para muitas espécies, a sacarose é empregada nos meios de cultura em uma concentração entre 2 e 4% (NAGAO *et al.*, 1994). Abaixo desta faixa pode ocorrer clorose generalizada da cultura e acima dela podem ocorrer problemas de excessivo potencial osmótico do meio, o que leva a deterioração

das culturas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

A produção comercial de mudas de orquídeas é importante por duas razões: primeiro, do ponto de vista econômico, pelo interesse comercial que representa a sua venda; segundo, por sua importância ecológica ao preservar genótipos existentes, uma vez que as espécies, em estado silvestre, estão ameaçadas de desaparecer, sobretudo em função da destruição de seus 'habitats'. A preocupação com a conservação dos genótipos das orquídeas nativas, ameaçadas de extinção em decorrência da devastação acelerada dos ambientes naturais, levou à realização do presente trabalho, que objetiva estudar os efeitos de diferentes concentrações de GA₃, ANA e sacarose no desenvolvimento inicial de plântulas *Cattleya loddigesii* sp.

Material e Métodos

Plantas adultas de *Cattleya loddigesii* sp, foram coletadas previamente ao enchimento do lago da Usina Hidroelétrica do Funil, situado no Rio Grande, entre os municípios de Lavras e Perdões, em 2002. Essas plantas foram acondicionadas em vasos e permaneceram em casa de vegetação até o florescimento, em maio de 2003. Neste estágio, foi feita a autofecundação das flores, as quais desenvolveram cápsulas que, cerca de nove meses depois, foram coletadas e levadas ao laboratório.

A assepsia do material vegetal constou de lavagem das cápsulas em água corrente por cinco minutos, imersão em solução de álcool 70% por um minuto e desinfestação com hipoclorito de sódio, na concentração de 1%, durante 20 minutos. Em seguida, as cápsulas foram lavadas com água destilada e autoclavada por três vezes. Essa operação foi realizada em câmara de fluxo laminar desinfestada com álcool 70%.

Utilizando-se estilete esterilizado foi feita uma incisão na cápsula, liberando as sementes, que foram inoculadas em frascos contendo meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido de 2 g L⁻¹ de carvão ativado e 100 g L⁻¹ de polpa de banana nanica madura. Os frascos permaneceram por 90 dias em sala de crescimento com irradiância em torno de 32 mM m² s⁻¹, temperatura de 25 ± 1°C e fotoperíodo de 16 horas diárias de luz, até o desenvolvimento dos protocormos, estruturas usadas nos experimentos.

Experimento 1 - constituído de quatro concentrações de GA₃ (0; 15; 30 e 60 mg L⁻¹) e cinco concentrações de sacarose (0; 15; 30; 45 e 60 mg L⁻¹) em todas as combinações possíveis.

Experimento 2 - constituído de quatro concentrações de GA₃ (0; 2,5; 5 e 10 mg L⁻¹) e cinco concentrações de ANA (0; 0,25; 0,5; 1 e 2 mg L⁻¹) em todas as combinações possíveis, suplementado com 20 g L⁻¹ de sacarose.

No preparo dos meios de cultura MS para os experimentos foram utilizadas soluções-estoque armazenadas em frascos de vidro escuro, à temperatura

de 5°C. Foi acrescentado ao meio MS a concentração de 2 g L⁻¹ de carvão ativado. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições (um frasco por repetição) e esquema fatorial 4 x 5.

Os meios foram solidificados com 5 g L⁻¹ de ágar e o pH foi ajustado para 5,8 ± 0,1. Foram vertidos 50 mL de meio de cultivo em frascos de vidro com capacidade para 250 mL. Os frascos foram vedados com tampas plásticas translúcidas antes do processo de autoclavagem a 121°C e 1 atm, por 20 minutos. Após o resfriamento, os meios foram levados à câmara de fluxo laminar, onde foi feita a inoculação dos protocormos, sob condições assépticas. Em seguida, os frascos foram vedados com parafilme e mantidos em sala de crescimento com as mesmas especificações relatadas anteriormente.

A avaliação dos experimentos foi efetivada três meses após a instalação, por meio de contagem do número de folhas e de raízes, do comprimento da parte aérea e da maior raiz e do peso da matéria fresca das plântulas. As análises de variância foram realizadas com a utilização do procedimento GLM do software estatístico SAS® (SAS, 1990), por meio do método dos quadrados mínimos ponderados pelo inverso das variâncias de cada tratamento, dada a heterogeneidade das variâncias. Devido à perda de unidades experimentais, algumas combinações dos fatores não puderam ser estudadas.

Resultados e Discussão

Experimento 1

Houve efeito significativo das concentrações de sacarose para número de raízes, comprimento da maior raiz, peso da matéria fresca das plântulas e comprimento da parte aérea. A concentração de GA₃ influenciou significativamente número de raízes e comprimento da maior raiz. A interação entre os fatores também se mostrou significativa em relação a estas duas últimas características.

Diversos autores são contrários à idéia de redução da sacarose para a micropropagação. Segundo eles os mecanismos pelos quais a concentração de carboidrato influencia na aclimatização não são muito claros, portanto, manter os níveis de sacarose em torno de 3% na fase que antecede a aclimatização é recomendável, pois desse modo, a planta acumularia reservas de energia para sobreviver melhor ao ambiente (CAPELLADES *et al.*, 1990).

Em diferentes concentrações de sacarose obtiveram-se resultados similares para o peso da matéria fresca das plântulas (Figura 1) nas concentrações de 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose. O mesmo resultado foi observado para o comprimento da parte aérea (Figura 2).

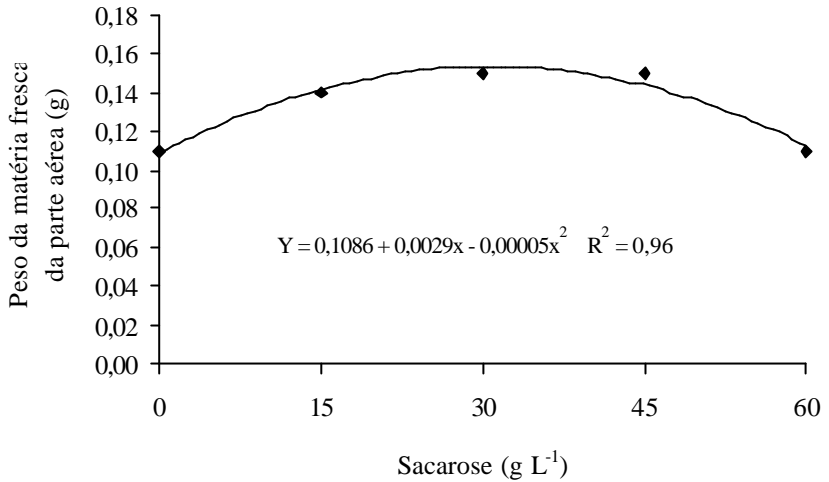


Figura 1. Peso da matéria fresca das plântulas de *Cattleya loddigesii* sp. em função das concentrações de sacarose no meio MS.

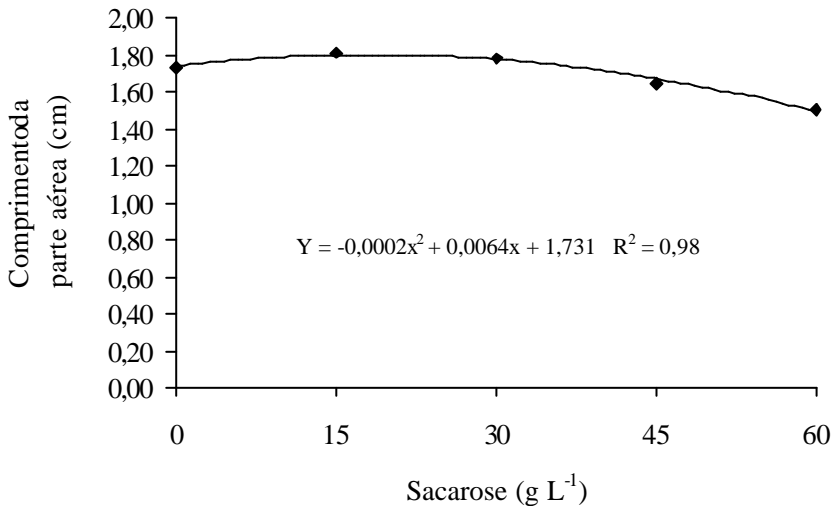


Figura 2. Comprimento da parte aérea das plântulas de *Cattleya loddigesii* sp. em função das concentrações estudadas de sacarose no meio MS.

Com base nestes resultados, é possível afirmar que, no cultivo *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* sp. podem ser utilizadas tanto a concentração convencional de sacarose (30 g L⁻¹), como metade desta, corroborando assim Dignart (2006) que verificou o mesmo efeito em *Cattleya walkeriana* (orchidaceae). Esses resultados concordam com Villa *et al.* (2006), que obteve melhores resultados para a micropropagação do porta-enxerto de videira VR043-43 com o uso do meio MS suplementado com 15-30 g L⁻¹ de sacarose.

Os valores do número de raízes por plântula de *Cattleya loddigesii* sp. em função das combinações dos fatores estudados, podem ser conferidos na Tabela 1.

Tabela 1. Número médio de raízes em plântulas de *Cattleya loddigesii* sp. em função de concentrações de sacarose e GA₃ no meio MS.

Sacarose (g L ⁻¹)	GA ₃ (mg L ⁻¹)			
	0	15	30	60
0	1,90	1,50	1,80	1,49
15	2,35	1,17	1,56	2,06
30	2,57	1,35	2,14	1,86
45	2,00	3,04	2,04	2,33
60	2,09	2,08	1,31	2,44

O desdobramento da interação GA₃ x sacarose sobre o número de raízes mostrou-se significativo apenas na concentração de 15 g L⁻¹ de sacarose (Figura 3) e na concentração de 60 mg L⁻¹ de GA₃ (Figura 4).

Observando-se a Figura 3, pode-se perceber na concentração de 15 g L⁻¹ de sacarose, diminuição do número de raízes com o aumento da concentração de GA₃, até 33 mg L⁻¹ de GA₃ (ponto de mínimo), com novo incremento a partir deste ponto. Observou-se na ausência de GA₃ o maior número de raízes (2,2 raízes). A maioria dos autores mostra que os efeitos de GA₃ podem ser contraditórios, às vezes inibindo e outras estimulando a organogênese do sistema radicular (TAIZ & ZEIGER, 2004; PAIVA *et al.*, 1997). Silva (2001), trabalhando com glóxinia até a concentração de 10 mg L⁻¹ de GA₃, também verificou que o aumento das concentrações desse regulador de crescimento causou queda no fator estudado.

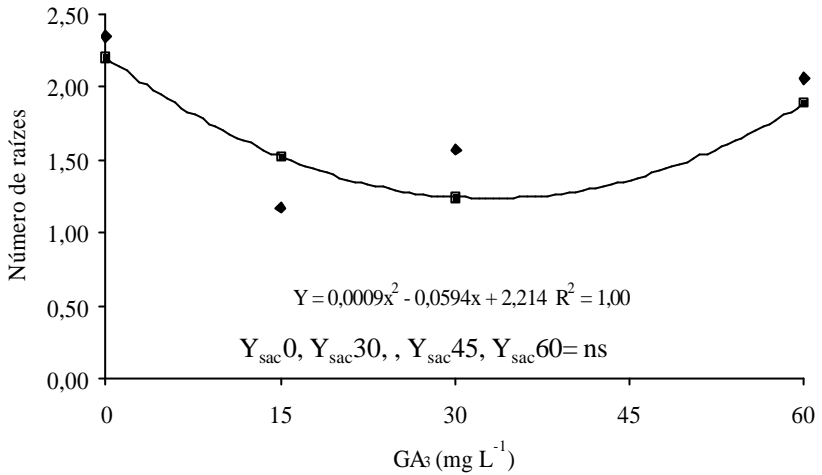


Figura 3. Número médio de raízes em plântulas de *Cattleya loddigesii* sp. em função de concentrações de GA₃ em meio MS suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose.

Observou-se o incremento do número de raízes com o aumento da concentração de sacarose, na presença de 60 mg L⁻¹ de GA₃ (Figura 4). Leite *et al.* (2000) encontraram uma porcentagem de enraizamento para plântulas de pereira com comportamento quadrático significativo relacionado ao aumento das concentrações de sacarose. Em geral, a concentração de sacarose no meio de enraizamento é mantida nos mesmos níveis em que se usa nos meios de multiplicação, entre 2 e 3%. Para Grattapaglia & Machado (1990), uma boa disponibilidade de energia é indispensável para a rizogênese.

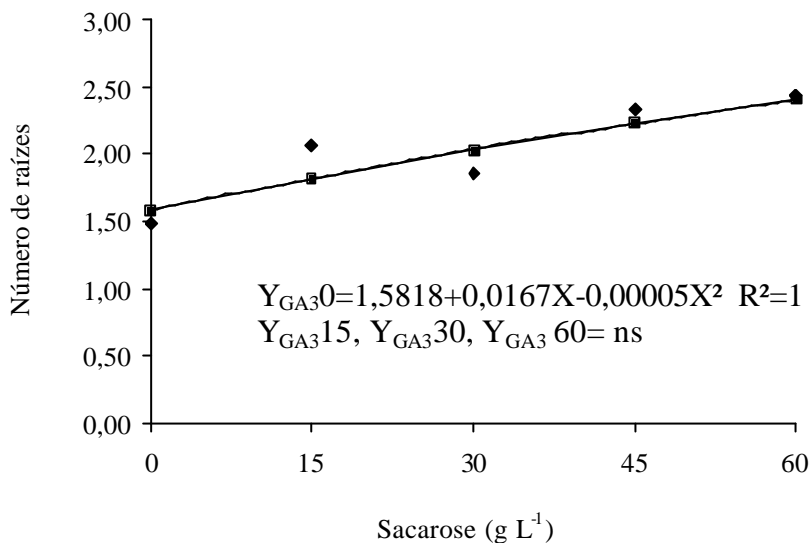


Figura 4. Número de raízes em plântulas de *Cattleya loddigesii* sp. em função de concentrações de sacarose em meio MS suplementado com 60 mg L⁻¹ de GA₃.

Os valores médios do comprimento da maior raiz em função das concentrações de GA₃ e sacarose podem ser conferidos na Tabela 2. Neste caso, apenas na ausência de GA₃ (Figura 5) e na concentração de 30 mg L⁻¹ deste regulador (Figura 6) houve efeito significativo das doses de sacarose.

Tabela 2. Comprimento médio da maior raiz de plântulas de *Cattleya loddigesii* sp. em função das concentrações de sacarose e GA₃ no meio MS.

Sacarose (g L ⁻¹)	GA ₃ (mg L ⁻¹)			
	0	15	30	60
0	2,27	1,24	0,98	1,33
15	2,22	3,04	1,42	1,68
30	1,76	2,20	1,82	1,33
45	1,16	1,99	1,85	0,93
60	1,21	2,23	0,86	1,44

Foi observada a presença de raízes com 2,37 cm de comprimento na ausência de sacarose e de GA₃ (Figura 5). Houve decréscimo no comprimento da maior raiz à medida que se aumentou a concentração de sacarose sendo o conteúdo do endógeno do explante suficiente para promover o enraizamento. O aumento do número de raízes proporcionado pelas maiores concentrações de sacarose (Figura 4) pode ter sido determinante nesta redução do comprimento da maior raiz.

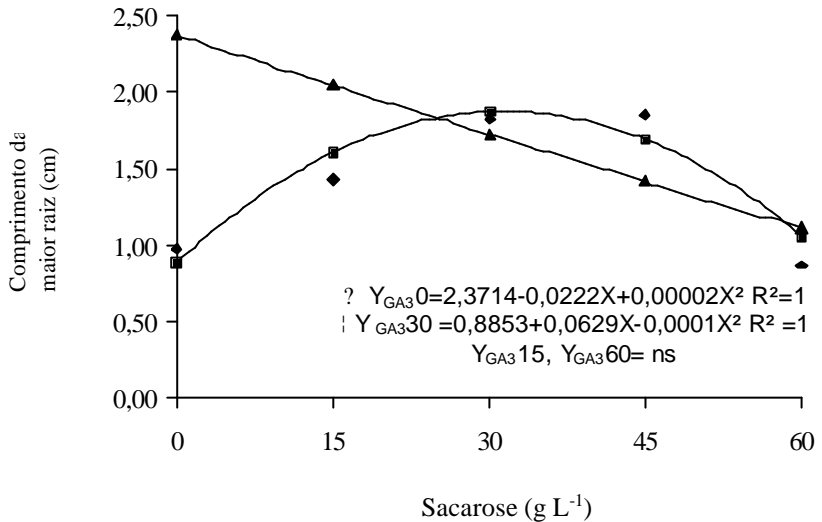


Figura 5. Comprimento da maior raiz de plântulas de *Cattleya loddigesii* sp. em função de concentrações de sacarose na ausência e presença de 30 mg L⁻¹ de GA₃ no meio MS.

Experimento 2

Houve efeito significativo das concentrações de GA₃ sobre o número de folhas, número de raízes, comprimento de raízes e peso da matéria fresca das plântulas. A presença de ANA influenciou significativamente o comprimento da parte aérea e o peso da matéria fresca das plântulas. A interação entre os fatores mostrou-se significativa em relação a número de folhas e número de raízes.

Valores superiores de comprimento da parte aérea (1,74 cm) (Figura 6) e de peso da matéria fresca das plântulas (0,125 g) (Figura 7) foram observados na ausência de ANA, demonstrando o efeito inibidor desse fitorregulador para estas variáveis. Estudos com crisântemo e figueira, realizados respectivamente por Oliveira (1994) e Brum *et al.* (2002), evidenciaram que o aumento da concentração de ANA reduz o comprimento das brotações.

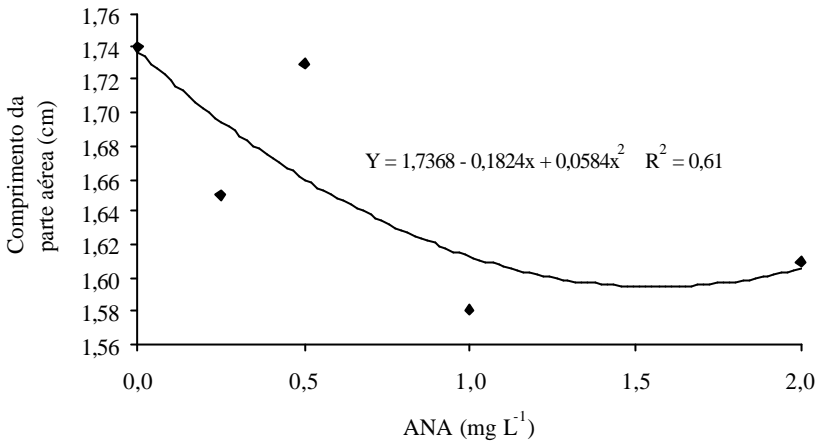


Figura 6. Comprimento da parte aérea de plântulas de *Cattleya loddigesii* sp. em função de concentrações de ANA.

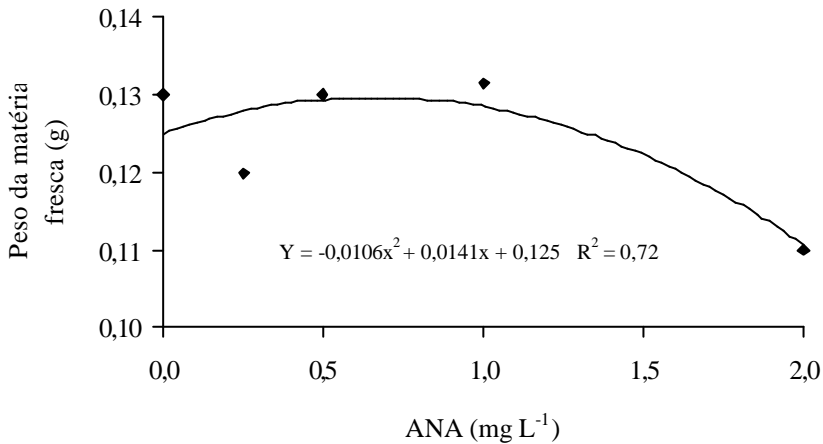


Figura 7. Peso da matéria fresca de plântulas de *Cattleya loddigesii* sp. em função de concentrações de ANA no meio MS.

Quando se desdobra o GA₃, pode-se indicar a dose de 4,2 mg L⁻¹ de GA₃ como ponto de máximo peso da matéria fresca das plântulas (Figura 8). Este resultado discorda do obtido por Silva (2001) e Oliveira (1994), que, trabalhando com gloxínia e crisântemo, respectivamente, observaram que o aumento das concentrações de GA₃ provocou queda no peso da matéria fresca das plântulas.

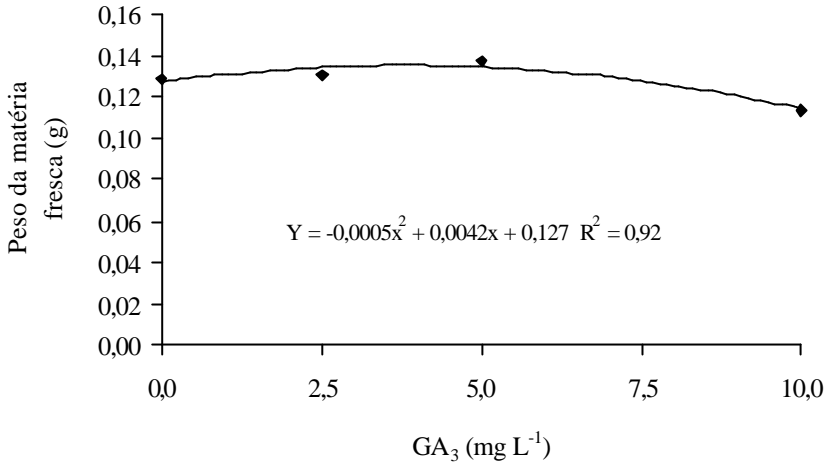


Figura 8. Peso da matéria fresca de plântulas de *Cattleya loddigesii* sp. em função das concentrações de GA₃ no meio MS.

O desdobramento da interação GA₃ x ANA sobre o número de folhas apresentou significância das concentrações de ANA apenas na presença de 10 mg L⁻¹ de GA₃. Apesar do maior valor observado ter ocorrido na concentração de 0,25 mg L⁻¹ de ANA (Tabela 3), houve, com o modelo ajustado, aumento do número de folhas, até a concentração de 0,67 mg L⁻¹ de ANA, ocorrendo, a partir deste ponto, decréscimo dos valores (Figura 9).

Tabela 3. Número de folhas de plântulas de *Cattleya loddigesii* sp. nas combinações dos fatores estudados.

ANA (mg L ⁻¹)	GA ₃ (mg L ⁻¹)			
	0	2,5	5	10
0	4,83	6,70	5,25	4,25
0,25	5,16	2,80	4,20	7,25
0,5	4,82	4,95	4,58	5,10
1	4,75	5,10	4,33	4,40
2	4,81	5,06	4,90	3,35

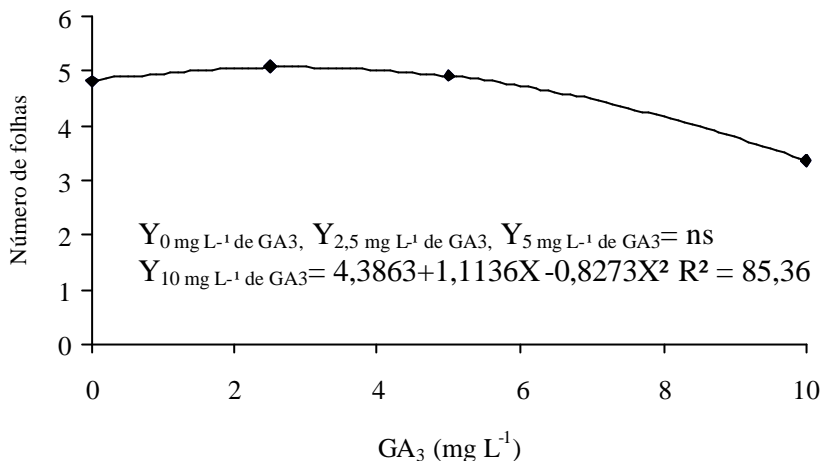


Figura 9. Número de folhas em função de concentrações de ANA no meio MS suplementado com 10 mg L⁻¹ de GA₃.

Os valores médios do número de raízes podem ser conferidos na Tabela 4. Verificou-se que o aumento das concentrações de GA₃ induziu o decréscimo no número de raízes formadas até a concentração de 5,8 mg L⁻¹ de GA₃ (Figura 10). Maior número de raízes foi observado na ausência de GA₃ (3,39).

Tabela 4. Número de raízes em plântulas de *Cattleya loddigesii* sp. nas combinações dos fatores estudados.

ANA (mg L ⁻¹)	GA ₃ (mg L ⁻¹)			
	0	2,5	5	10
0	3,245	2,7	1,5	2,735
0,25	5,16	1,8	1,7	1,333
0,5	4,816	1,95	1,85	2,00
1	4,75	1,808	1,3	1,716
2	4,811	2	1,853	2,149

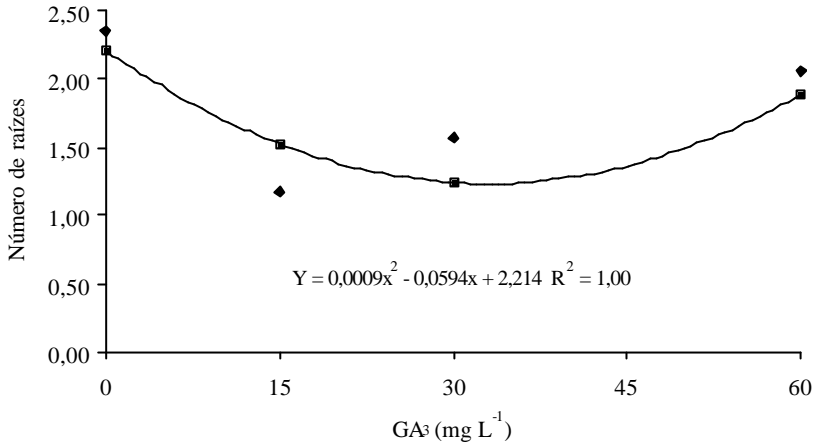


Figura 10. Número de raízes de plântulas de *Cattleya loddigesii* sp. nas concentrações estudadas de GA₃, na ausência de ANA.

Possivelmente, as concentrações utilizadas foram elevadas para *Cattleya loddigesii*, o que prejudicou seu enraizamento, sendo o conteúdo endógeno do explante suficiente para promover o enraizamento, concordando com os resultados do Experimento 1. De modo semelhante Fráguas *et al.* (2004), trabalhando com *Ficus carica*, observaram alto percentual de enraizamento e maior número de raízes na ausência do regulador de crescimento.

A concentração de sacarose também é um fator determinante na promoção de crescimento e é dependente do tipo de explante (CALDAS *et al.*, 1998). Estudos comprovaram que 75 a 85 % do aumento da biomassa se deve à incorporação de carbono pela adição de sacarose (DE RIEK *et al.*, 1997). A concentração mais utilizada no preparo do meio de cultura MS é de 30 g L⁻¹, entretanto modificações nesse valor podem beneficiar o cultivo *in vitro*.

Por outro lado, o excesso de sacarose pode ser prejudicial, pois inibe a síntese de clorofila e, portanto, reduz a capacidade fotossintética das culturas, mesmo sendo essencial ao crescimento (YAMADA & SATO, 1978). Foi observada aumento na taxa de fotossíntese, em subculturas sucessivas, quando a concentração de sacarose foi reduzida de 20 ou 40 g L⁻¹ para 10 g L⁻¹ (PASQUAL, 2001). Embora o açúcar não seja o componente de maior custo no preparo do meio de cultura, a redução da sua concentração pode ser economicamente favorável, especialmente para produção comercial de mudas (HOFFMANN, 1999).

Conclusões

Maior comprimento da parte aérea e peso da matéria fresca são obtidos na ausência de ANA utilizando-se 4,2 mg L⁻¹ de GA₃ associado a 16 - 30 g L⁻¹ de sacarose. Maior número de folhas foi obtido com 0,67 mg L⁻¹ de ANA.

Plântulas de *Cattleya loddigesii* possuem melhor enraizamento e crescimento da raiz na ausência de GA₃ associada à presença de 60 g L⁻¹ de sacarose.

Referências

- AMAKI, W.; HIGUCHI, H. Micropropagation of Boston Ferns. In: BAJAN, Y.P.S. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, Gainesville, v.20, n.104, p.485-494, Oct. 1992.
- BRUM, G.R.; SILVA, A.B. PASQUAL, M. Efeito de diferentes concentrações de BAP e ANA na propagação *in vitro* da figueira (*Ficus carica* L.). **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, Ed. Especial, p.1403-1409, dez. 2002.
- CALDAS, L.S.; HARIDASSAN, P.; FERREIRA, M.E. **Meios nutritivos**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCPT/ EMBRAPA- CNPH, 1990. p.37-63.
- 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 transformações genéticas de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPH, 1998. p.87-132.
- CAMPOS, D.M. Cultura *in vitro* simplificada. **O mundo das orquídeas**, São Paulo, n.36, p.52-53, 2004.
- CAPELLADES, M.; FOUNTARNAU, R.; CARULLA, C.; DEBERGH, P. Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells of tissue-cultured *Rosa multiflora*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.115, n.1, p.141-145, Jan. 1990.
- CORDEIRO, J.A.D. **Crescimento, diferenciação e produção em plantas de sorgo granífero *Sorghum bicolor* (L.) Moench, tratadas com os ácidos giberélico-3 e α -naftalenoacético**. 1979. 50p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Ceará, Ceará.
- DE RIEK, J.; PIQUERAS, A.; DEBERGH, P.C. Sucrose uptake and metabolism in a double layer system for micropropagation of *Rosa multiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.47, n.3, p.269-278, 1997.
- DIGNART, S.L. **Luz e sacarose na micropropagação de *Cattleya walkeriana*: alterações anatômicas e fisiológicas**. 2006. 130p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- EARLE, E.D.; LANGHANS, R.W. Propagation of *Crysanthemum in vitro* II. Production, growth and flowering of plantlets from tissue culture. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.99, n.4, p. 352-358, July 1974.

- FRÁGUAS, C.B. PASQUAL, M. PEREIRA, A.R. Multiplicação *in vitro* de *Ficus carica* L.: efeito de cinetina e do ácido giberélico. **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.1, p.49-55, jan./fev. 2004.
- GOVIL, S.; GUPTA, S.C. Commercialization of plant tissue culture in India. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.51, n.1, p.65-73, 1997.
- 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- CNPH, 1990. p.99-160.
- HOFFMANN, A. **Enraizamento e aclimatização de mudas micropropagadas dos porta-enxertos de macieira ‘Marubakaido’ e ‘M-26’**. 1999. 240p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip and culture. In: EVANS, D.A.; SAHRP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. (Ed.). **Handbook of plant cell culture: techniques of propagation of propagation and breedings**. New York: Macmillan, 1983. v.1, p. 1777-227.
- JACQUES, R.M. Giberelinas. In: FERRI, G.M. **Fisiologia vegetal**. São Paulo: EPU, 1985. v.2, cap.5, p.129-162.
- KNUDSON, L. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. **Botanical Gazette**, Chicago, v.73, n.1, p.1-25, 1922.
- LEITE, G.B.; FINARD, N. FORTES, G.R. 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.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, n.4, p.473-497, 1962.
- NAGAO, E.O.; PASQUAL, M.; RAMOS, J.D. Efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação *in vitro* de brotações de porta-enxerto de citros. **Bragantia**, Campinas, v.53, n.1, p.25-31, 1994.
- OLIVEIRA, P.D. **Propagação *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema grandiflora Tzvelev*) cv Orange Reagen**. 1994. 116p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- PAIVA, P.D.O.; SOLANGE, J.C.B.R.; PASQUAL, M.; PAIVA, R. Efeito do ácido naftaleno acético e GA₃ na micropropagação de violeta. **Revista Ceres**, Viçosa, v.44, n.254, p.392-398, jul./ago. 1997.
- PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações**. Meios de cultura. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 74p.
- PIRES, E.P.J. Emprego de reguladores de crescimento em viticultura tropical. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.19, n.194, p.40-43, jul. 1998.
- SAS Institute SAS/ STAT. SAS/GLM. **Software: usage and reference**, Version 6, Cary, 1990, 501p.

SERRET, M.D.; TRILLAS, M.I. Effects of light and sucrose levels on the anatomy, ultra structure, and photosynthesis of *Gardenia jasminoides* ellis leaflets cultured *in vitro*. **International Journal of Plants Sciences**, Chicago, v.161, n.2, p.281-289, Mar.2000.

SILVA, A.B. **Multiplicação *in vitro* e aclimatização de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lodd. Hiern.)**. 2001. 59p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TAKANE, R.J. **Influência da sacarose e do cloreto de cálcio na aclimatização e no crescimento inicial de plântulas de *Oncidium varicosum* Lindl. & Paxton (Orquidaceae) germinadas *in vitro***. 2002. 79p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP.

VILLA, F.; ARAUJO, A.G.; PIO, L.A.S.; PASQUAL, M. Micropropagação *in vitro* da amoreira-preta em diferentes meios. **Revista Ceres**, Viçosa, v.51, n.296, p.485-493, 2004.

VILLA, F.; PASQUAL, M.; PIO, L.A.; ASSIS, F.A. Multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de videira em variações do meio MS. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v.28, n.3, p.345-349, July/Sept. 2006.

YAMADA, Y.; SATO, F. The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. **Plant Cell Physiology**, v.19, p.691-699, 1978.

WAINWRIGHT, H.; SCRACE, J. Influence of *in vitro* preconditioning with carbohydrates during the rooting of micro cuttings on *in vitro* establishment. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.38, n. 3/4, p. 261-267, Mar. 1989.