

## Fontes de nitrogênio, polpa de banana e ágar no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de orquídea

Moacir Pasqual<sup>1</sup>; Milene A de Figueiredo<sup>3,6</sup>; Juliana C de Rezende<sup>2</sup>; Aparecida G de Araújo<sup>4,6</sup>; Flávia C Santos<sup>3,7</sup>; Ester A Ferreira<sup>2</sup>; Keize P Junqueira<sup>5,7</sup>

<sup>1</sup>UFLA-DAG, C. Postal 3037; 37200-000 Lavras-MG; <sup>2</sup>Pesquisadora EPAMIG; <sup>3</sup>Doutoranda UFLA; <sup>4</sup>Pós-Doutoranda UFLA; <sup>5</sup>Doutoranda UnB; <sup>6</sup>Bolsista CAPES; <sup>7</sup>Bolsista CNPq; mpasqual@ufla.br

### RESUMO

Foram realizados dois experimentos com o objetivo de estudar os efeitos de fontes de nitrogênio, polpa de banana e ágar no desenvolvimento *in vitro* de orquídea *Cattleya loddigesii*. O primeiro experimento constituiu-se de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (0; 25; 50; 75 e 100% da formulação de 330 mg L<sup>-1</sup>) e KNO<sub>3</sub> (0; 25; 50 e 100% da formulação de 380 mg L<sup>-1</sup>) acrescidas ao meio MS. No segundo experimento, os tratamentos consistiram de concentrações de ágar (0; 2; 4; 6 e 8 g L<sup>-1</sup>), no meio de cultura Knudson C, acrescido de polpa de banana nanica (0; 50; 100; 150 e 200 g L<sup>-1</sup>) em todas as combinações possíveis. Após a inoculação as culturas foram mantidas em sala de crescimento com irradiância em torno de 35 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, temperatura de 25±1°C e fotoperíodo de 16 horas, por 90 dias. Com base no peso da matéria fresca das plântulas, número de raízes, comprimento da parte aérea e comprimento da maior raiz, a adição de 17,5 a 41,16% da formulação original de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> ao meio MS proporcionou melhor desenvolvimento *in vitro* em plântulas de *Cattleya loddigesii*. Maior número de folhas foi obtido com a adição ao meio MS de 100% da formulação original de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e 50% de KNO<sub>3</sub>. A multiplicação *in vitro* de plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii* é viável em meio Knudson C líquido com a utilização de 128,42 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana nanica.

**Palavras-chave:** *Cattleya loddigesii*, Orchidaceae, cultura de tecidos, meios de cultura.

### ABSTRACT

#### Nitrogen sources, banana pulp and agar in the orchid seedlings *in vitro* development

Two experiments were carried out in order to evaluate the effects of nitrogen sources, banana pulp and agar on *Cattleya loddigesii* seedlings development *in vitro*. In the first experiment were tested NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> at 0; 25; 50; 75 and 100% (330 mg L<sup>-1</sup> formulation) and KNO<sub>3</sub> 0; 25; 50 and 100% (380 mg L<sup>-1</sup> formulation) added to MS medium. The second experiment consisted of different agar concentrations (0; 2; 4; 6 and 8 g L<sup>-1</sup>), banana nanica pulp (0; 50; 100; 150 and 200 g L<sup>-1</sup>) in all the possible combinations added to Knudson C medium. After inoculation the plantlets were maintained in growth room with irradiancy around 35 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 25±1°C temperature and 16-hour photoperiod for 90 days. The NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> formulation added to culture medium at 17,5 to 41,16% provides best development of *Cattleya loddigesii* plantlets based on plantlets fresh mass, number of roots, largest root length and aerial part length. Larger number of leaves was obtained at 100% of the original formulation of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> and 50% of KNO<sub>3</sub> in MS medium. The best results for *in vitro* multiplication of *Cattleya loddigesii* orchid seedlings occurred in liquid Knudson C medium with 128,42 g L<sup>-1</sup> banana nanica pulp.

**Keywords:** *Cattleya loddigesii*, Orchidaceae, tissue culture, culture media.

(Recebido para publicação em 18 de janeiro de 2008; aceito em 6 de abril de 2009)

(Received in January 18, 2008; accepted in April 6, 2009)

A cultura de tecidos em orquídeas constitui técnica bastante relevante dos pontos de vista comercial e ecológico. As plantas produzidas desta forma são altamente interessantes para programas de reintrodução de espécies nativas em áreas de preservação ambiental (Araújo, 2007). A cultura assimbiótica resulta em maiores percentuais de germinação em comparação com a germinação em condições naturais, que é dependente da infecção por fungos micorrízicos simbiotes, muitas vezes espécie-específicos (Araújo, 2004). A obtenção de orquídeas a partir da sementeira *in vitro* é, atualmente, um processo rotineiro. No entanto, os conhecimentos sobre a melhor formulação do meio de cultura para cada espécie ainda são limitados. Um grande número de fa-

tores complexos influencia a germinação e o crescimento *in vitro* de orquídeas, sendo altamente dependentes do genótipo (Silva *et al.*, 2002).

Os fatores que mais frequentemente determinam o sucesso da micropropagação são a origem do explante e o meio nutritivo onde são cultivados. Várias mudanças de padrão foram propostas na tentativa de otimizar o crescimento *in vitro*. Essas modificações visam principalmente a redução ou o incremento de alguns componentes que podem promover melhor crescimento em tecidos de orquídeas (Pasqual *et al.*, 2001).

George *et al.* (2008) sugerem que a adição no meio de cultura de compostos orgânicos complexos como polpa de banana pode suplementar o teor de vi-

taminas, aminoácidos e reguladores de crescimento. De acordo com Arditti & Ernst (1993), a polpa de banana madura pode intensificar o crescimento de plântulas obtidas a partir de explantes *in vitro*. No mesmo sentido, Torres *et al.* (2001) citam que essa substância pode promover diferentes efeitos no cultivo *in vitro*, tais como espessamento e/ou crescimento das raízes, dependendo da cultivar e da quantidade de polpa de banana utilizada.

O ágar tem sido muito utilizado na propagação *in vitro*, pela sua grande eficiência como agente geleificante, promovendo condições ideais de suporte para as plântulas no meio de cultura (Faria *et al.*, 2006). Segundo Grattapaglia & Machado (1998), há uma tendência mundial para se buscarem sistemas utilizan-

do meio líquido, em virtude da redução do custo pela eliminação do ágar e maior agilidade na preparação do meio.

Os elementos minerais exigidos em maiores quantidades para o crescimento de plantas são incluídos nos meios nutritivos nas formas de sais inorgânicos, podendo o nitrogênio ser adicionado como componente de suplementos orgânicos (Caldas *et al.*, 1998). O nitrogênio, juntamente com a sacarose, é o principal componente em quantidade no meio de cultura, contribuindo de forma efetiva tanto no metabolismo celular como na regulação do seu potencial osmótico (Nagao *et al.*, 1994).

Por apresentar-se nas formas de cátion (amônio) e ânion (nitrito e nitrato), o nitrogênio difere dos demais macronutrientes (Caldas *et al.*, 1998). Esses íons são de grande importância no controle do pH do meio de cultura, atuam como agente tamponante e favorecem a absorção de outros íons presentes no meio (Nagao *et al.*, 1994).

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 objetivou estudar os efeitos de diferentes concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ , ágar e polpa de banana nanica no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Plantas adultas de *Cattleya loddigesii* 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 e, cerca de nove meses depois, foram coletadas e levadas ao laboratório.

A assepsia constou de lavagem 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 autoclavada por três vezes. Essa operação foi realizada em câmara de fluxo laminar desinfestada com álcool 70%.

Com auxílio de estilete esterilizado foi feita uma incisão na cápsula, liberando as sementes, que foram inoculadas em frascos contendo meio de cultura Knudson C (1946), acrescido de 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 100 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana nanica madura. Os frascos permaneceram em sala de crescimento com irradiância em torno de 35  $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperatura de 25±1°C e fotoperíodo de 16 horas, até que houvesse o desenvolvimento dos protocormos e plântulas, explantes usados para realização dos experimentos.

**Experimento 1:** Protocormos foram inoculados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) constituído de concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (0; 25; 50; 75 e 100% da formulação de 330 mg L<sup>-1</sup>) e de  $\text{KNO}_3$  (0; 25; 50 e 100% da formulação de 380 mg L<sup>-1</sup>) em todas as combinações possíveis, suplementado de sacarose (30 g L<sup>-1</sup>). Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 5, com 5 repetições e 4 protocormos por frasco. Foram analisados o número de folhas e de raízes, comprimento da maior raiz e da parte aérea e peso da matéria fresca da plântula.

**Experimento 2:** Plântulas, com 1 a 1,5 cm de comprimento e contendo raízes pequenas (±0,5 cm), foram inoculadas em meio de cultura Knudson C, acrescido de ágar (0; 2; 4; 6 e 8 g L<sup>-1</sup>) e de polpa de banana nanica madura (0; 50; 100; 150 e 200 g L<sup>-1</sup>) em todas as combinações possíveis, suplementado de sacarose (20 g L<sup>-1</sup>) e carvão ativado (2 g L<sup>-1</sup>). Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 5, com 4 repetições e 4 plântulas por frasco. As variáveis analisadas foram número de brotos, altura da parte aérea, massa seca da parte aérea, comprimento de raízes e massa seca de raízes.

Em ambos os experimentos, os meios tiveram o pH ajustado para 5,8±0,1, sendo 60 mL vertidos em frasco de vidro com capacidade de 250 cm<sup>3</sup>, antes do processo de autoclavagem a 121°C e 1,1 atm por 20 minutos. Após o resfriamento,

os frascos foram levados à câmara de fluxo laminar, onde foi feita a inoculação dos explantes, sob condições assépticas. Após inoculação, os frascos foram mantidos em sala de crescimento com irradiância em torno de 35  $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperatura de 25±1°C e fotoperíodo de 16 horas, por 90 dias.

A análise de variância foi realizada utilizando o 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.

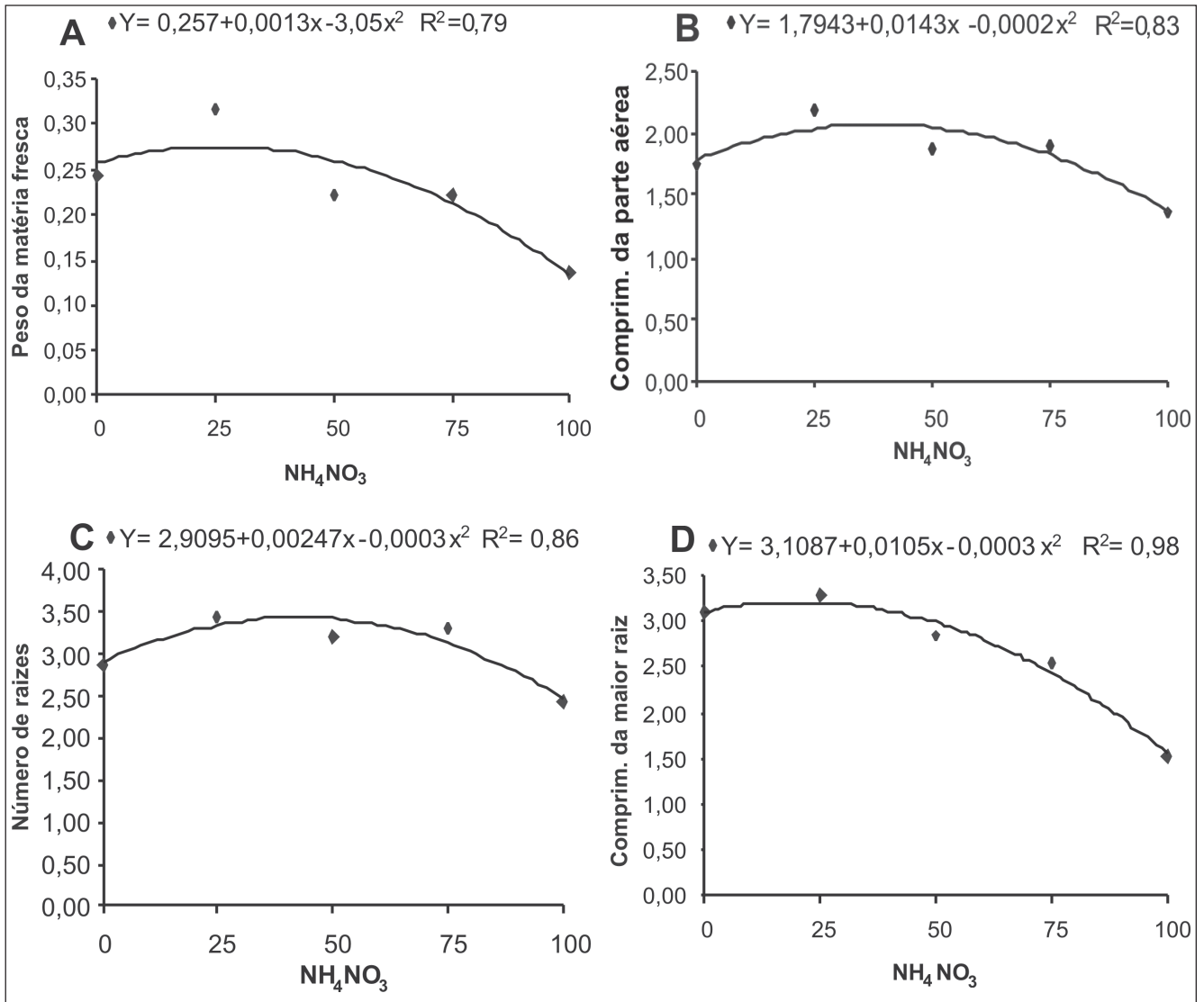
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Experimento 1:** A interação entre os fatores mostrou significância apenas para a variável número de folhas. Somente as concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  influenciaram significativamente as demais variáveis analisadas (Figuras 1 e 2).

A concentração de 21,31% de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  apresenta-se como quantidade ideal para peso da matéria fresca das plântulas (Figura 1A), registrando-se decréscimo a partir desse ponto. Este resultado, de certa forma, difere dos obtidos por Araújo *et al.* (2005), relatando que o incremento das concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$  promoveu aumento no peso da matéria fresca das plântulas de *Cattleya nobilior*, tendo sido o maior peso obtido com adição de 100% de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$  em meio Knudson C.

Para comprimento da parte aérea (Figura 1B) a equação apresentou bom ajuste dos dados ( $R^2=0,83$ ) e uma vez derivada indicou o ponto de máximo na concentração de 35% de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , havendo, a partir daí, decréscimo dos valores. Resultados similares foram obtidos por Araújo *et al.* (2005), que recomendam o incremento de 50% de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$  no meio de cultura para comprimento da parte aérea em plântulas de *Cattleya leopoldii*.

Pode-se inferir o efeito estimulante do número de raízes até a concentração de 41,16% de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , havendo a partir daí decréscimo dos valores (Figura 1C). Houve aumento no comprimento da

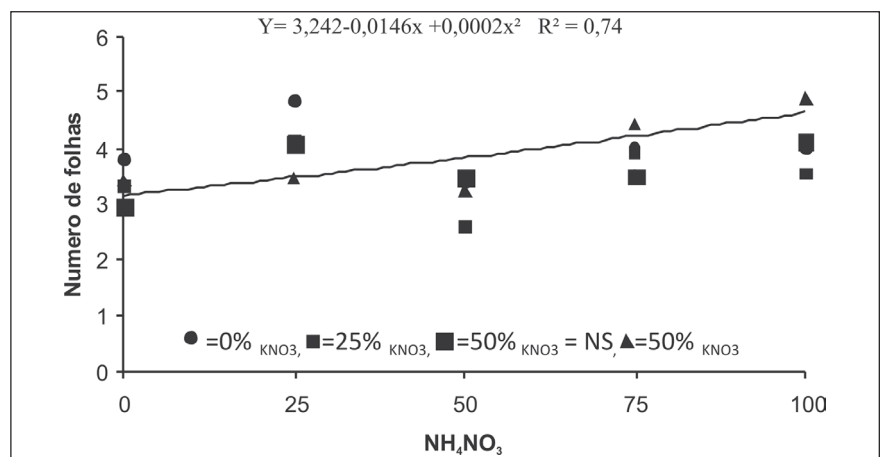


**Figura 1.** Peso da matéria fresca (A), comprimento da parte aérea (B), número de raízes (C) e comprimento da maior raiz em plântulas de *Cattleya loddigesii* em função de concentrações de  $NH_4NO_3$  (D). (weight of the fresh matter (A), length of shoot (B), number of roots (C) and length of the longest root in seedlings of *Cattleya loddigesii* according to concentrations of  $NH_4NO_3$  (D)). Lavras, UFLA, 2007.

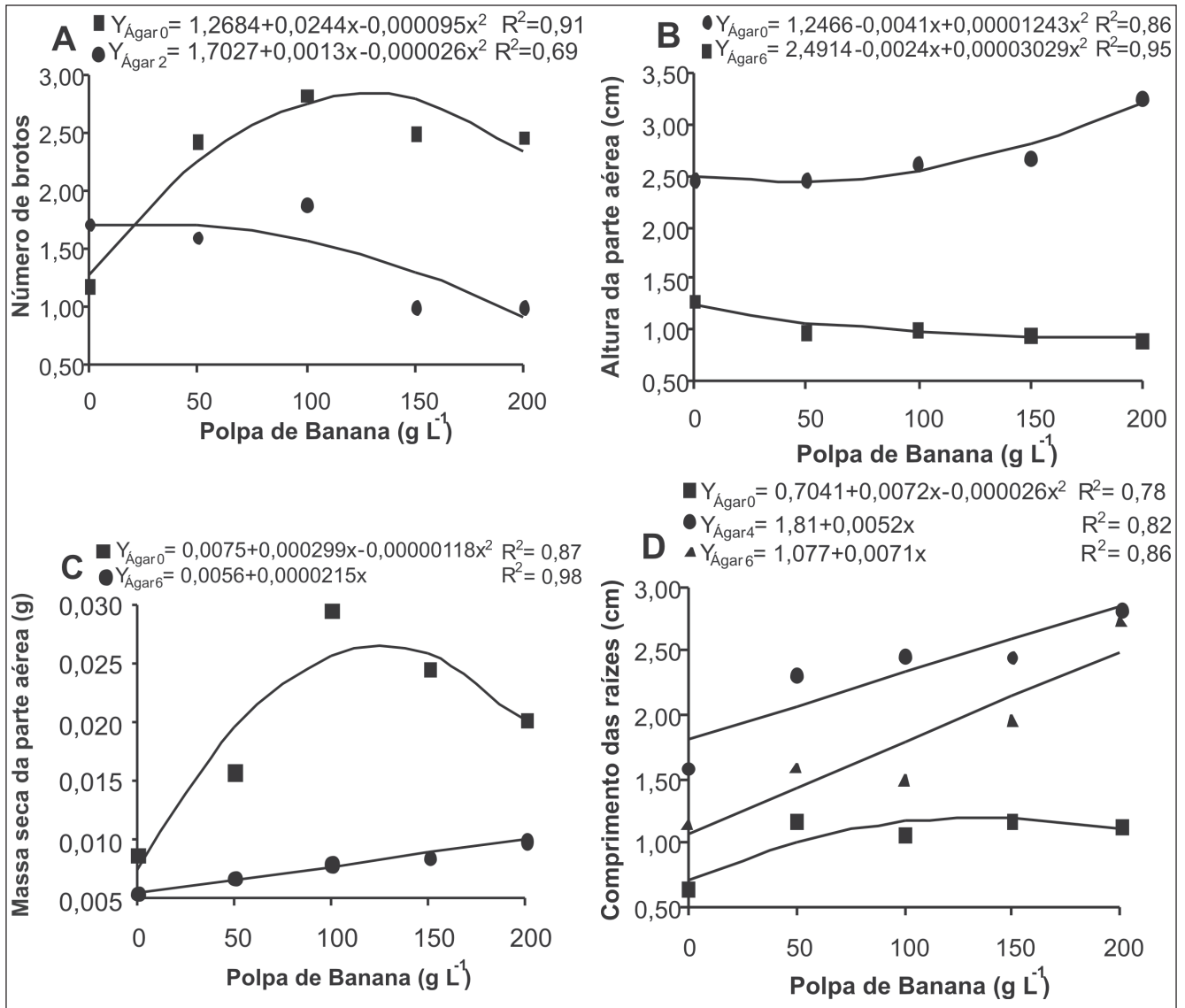
maior raiz até a concentração de 17,5% de  $NH_4NO_3$ , havendo a partir daí redução da variável (Figura 1D). Araújo *et al.* (2005) também obtiveram resultados semelhantes, trabalhando com plântulas de *Cattleya nobilior*.

Todas as variáveis estudadas, exceto número de folhas, seguiram a mesma tendência, o nitrato de amônio estimulou aumento até certo ponto, tornando-se tóxico a partir do mesmo, com o aumento das concentrações, provavelmente causado pelos distúrbios nutricionais pela adição desse sal ao meio de cultura.

Após desdobramento da interação concentração de  $NH_4NO_3$  e de  $KNO_3$  sobre a variável número de folhas, apenas a concentração de 50% de  $KNO_3$  nas



**Figura 2.** Número de folhas em plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii* nas concentrações estudadas de  $NH_4NO_3$  combinadas com a concentração de 50% de  $KNO_3$  (number of leaves on seedlings of *Cattleya loddigesii* orchid with the concentration of  $NH_4NO_3$  combined with the level of 50% of  $KNO_3$ ). Lavras, UFLA, 2007.



**Figura 3.** Número de brotos (A), altura da parte aérea (B), massa seca da parte aérea (C) e comprimento das raízes em plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii* nas diferentes concentrações de ágar e polpa de banana (D) (number of shoots (A), shoot height (B), dry mass of shoot (C) and length of roots in seedlings of *Cattleya loddigesii* orchid in different concentrations of agar and banana pulp (D)). Lavras, UFPA, 2007.

concentrações de nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) apresentou significância (Figura 2), observando-se aumento no número de folhas com o incremento de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , até a máxima concentração utilizada.

Sato *et al.* (2001), estudando a influência da concentração de nitrato de amônio na micropropagação da mandioca (*Manihot esculenta*), verificaram que o número de folhas cresceu com o aumento da concentração de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , e na concentração de  $41,20 \text{ mM L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4^+$ , que equivale ao dobro da concentração de nitrato de amônio utilizada no meio MS, o número de folhas foi maior (7 folhas), na presença de BAP.

Os resultados encontrados são concordantes com os de Sato *et al.* (2001) que afirmam que a maioria das plantas prioriza a absorção de  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$ . Além do favorecimento do pH do meio (aproximadamente 5,8), a assimilação do íon amônio requer uma demanda energética menor em relação à assimilação do íon nitrato (Nagao *et al.*, 1994).

**Experimento 2:** Observa-se na Figura 3A que, na ausência de ágar, o aumento da concentração de polpa de banana até o limite de  $128,4 \text{ g L}^{-1}$  promove incremento na taxa de multiplicação, registrando-se 2,84 brotos por explante. Em concentrações superiores houve tendência de redução do número de bro-

tos. Ao se utilizar  $2 \text{ g L}^{-1}$  de ágar, houve decréscimo no número de brotos na medida em que se aumentaram as concentrações de polpa de banana. Por outro lado, nessa concentração de ágar, verifica-se que na ausência de polpa de banana, o número de brotos é maior do que aquele observado em meio líquido.

Os resultados obtidos estão de acordo com afirmações de Arditti & Ernst (1993), de que a adição de polpa de banana no meio de cultivo aumenta o número de brotos na propagação *in vitro* de plântulas de orquídeas. Concordam em parte com Silva *et al.* (2005), que estudando a micropropagação de orquídea *Brassolaeliocattleya* 'Pastoral' x

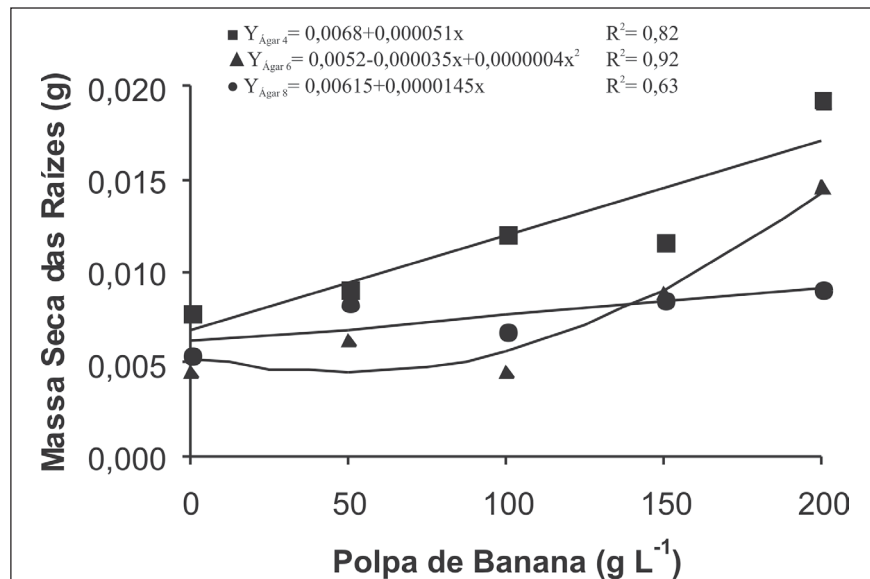


*Laeliocattleya* 'Amber Glow', registraram que 75 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana promoveram a formação de maior número de brotos.

Ocorreu uma tendência de aumento no tamanho de brotos com o aumento das concentrações de polpa de banana (Figura 3B). Maior altura da parte aérea é obtida na concentração de 200 g L<sup>-1</sup> de polpa da banana e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar. Nessa concentração de ágar e na ausência de polpa de banana observa-se maior altura da parte aérea das plântulas do que em meio líquido. De modo semelhante, bom crescimento *in vitro* de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl, em meio de cultura, com adição de 60 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana foi evidenciado por Song *et al.* (1999). A adição de polpa promove desenvolvimento da parte aérea no cultivo *in vitro* de orquídea, bem como emissão de brotos adventícios (Torres & Barbosa, 2001).

Melhor resultado para massa seca da parte aérea (0,0264 g) é observado na ausência de ágar com 126,7 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana (Figura 3C), concordando com os resultados de Pasqual *et al.* (2008) que obtiveram maior massa seca de parte aérea de abacaxi ornamental (*Ananas lucidus* L.) na ausência de ágar e de reguladores de crescimento e está de acordo com Adelberg *et al.* (1997), reportando que o cultivo em meio líquido apresenta crescimento mais vigoroso de plântulas. A polpa de banana pode suplementar o teor de vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento ao meio de cultura, promovendo aumento da massa fresca da plântula (George *et al.*, 2008).

O incremento da concentração de polpa de banana, associado a 4 g L<sup>-1</sup> de ágar, promoveu aumento no comprimento das raízes das plântulas de forma linear (Figura 3D). Maior comprimento das raízes (2,85 cm) foi obtido na concentração de 4 g L<sup>-1</sup> de ágar e 200 g L<sup>-1</sup> de polpa da banana. Na ausência de ágar e polpa de banana pode-se observar o menor comprimento das raízes (0,70 cm). A variável massa seca das raízes também obteve melhor resultado com a utilização de 4 g L<sup>-1</sup> de ágar e 200 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana (Figura 4). Essa resposta pode ser explicada pelo fato de concentrações elevadas de ágar dificultarem o contato



**Figura 4.** Massa seca das raízes em plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii* cultivadas em diferentes concentrações de ágar e polpa de banana (dry mass of roots in seedlings of *Cattleya loddigesii* orchid grown in different concentrations of agar and banana pulp). Lavras, UFLA, 2007.

do explante com o meio, limitando a absorção de sais minerais.

De forma similar ao que ocorreu com orquídea nesse experimento, o enraizamento *in vitro* do abacaxi ornamental foi viável em meio MS líquido (Pasqual *et al.*, 2008). A adição de 100 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana promoveu maior crescimento da parte aérea e da maior raiz e o aumento da massa fresca de raízes de plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii* 'Grande' x *Cattleya loddigesii* 'Alba' (Araújo *et al.*, 2006). Analisando o enraizamento *in vitro* de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl, em diferentes meios de cultura, Song *et al.* (1999) verificaram que a combinação Adubo Peters® (3 g L<sup>-1</sup>, 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 60 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana) proporcionou maior número de raízes. O uso de meios líquidos viabiliza a absorção de nutrientes e minerais presentes no meio de cultura, favorecendo o acúmulo de matéria fresca e seca no explante.

Com base no peso da matéria fresca das plântulas, número de raízes, comprimento da parte aérea e comprimento da maior raiz, a adição de 17,5 a 41,16% da formulação original de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> ao meio MS proporciona o melhor desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii*. Maior número de folhas é obtido com a adição ao meio MS de 100% da formulação original de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e 50% de KNO<sub>3</sub>.

A multiplicação *in vitro* de plântulas de orquídea *Cattleya loddigesii* é viável em meio Knudson C líquido com a utilização de 128,42 g L<sup>-1</sup> de polpa da banana nanica.

## REFERÊNCIAS

- ADELBERG JW; DESAMERO NV; HALE SA; YOUNG RE. 1997. Long term nutrient and water utilization during micropropagation of *Cattleya* on a liquid membrane system. *Plant Cell and Tissue Organ Culture* 48: 1-7.
- ARAUJO AG. 2007. *Micropropagação de Cattleya loddigesii* 'tipo': fontes de nitrogênio, qualidade de luz, sacarose e ácido giberélico. Lavras: UFLA. 74p. (Tese doutorado)
- ARAUJO AG; PASQUAL M; RODRIGUES VA; SILVA AB; SOARES GA. 2005. Concentração de KNO<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea. *Plant Cell Culture and Micropropagation* 1: 31-36.
- ARAUJO AG; PASQUAL M; VILLA F; COSTA FC. 2006. Água de coco e polpa de banana no cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea. *Revista Ceres* 53: 608-613.
- ARAÚJO D. 2004. Cultivo de Orquídeas - *Cattleya*, as mais belas orquídeas brasileiras. *Revista Brasil Orquídeas* 8: 18-26.
- ARDITTI J; ERNST R. 1993. *Micropropagation of orchids*. New York: John Wiley, 682p.
- CALDAS LS; HARIDASAN P; FERREIRA ME. 1998. Meios nutritivos. In: TORRES AC; CALDAS LS; BUSO JA. (eds). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa. p. 87-132.

- FARIA RT; DALIO RJD; UNEMOTO LK; SILVA GL. 2006. Propagação *in vitro* de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de ágar. *Acta Scientiarum Agronomy* 28: 71-74.
- GEORGE EF; HALL MA; DE KLERK GJ. 2008. *Plant propagation by tissue culture*. v.1 The Background, 3rd edition. Springer, Dordrecht, 501 p.
- GRATTAPAGLIA D; MACHADO M. 1998. Micropropagação. In: TORRES AC; CALDAS LS; BUSO JA. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação de plantas*. Brasília:Embrapa, 183-260.
- KNUDSON L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin* 14: 214-217.
- MURASHIGE T; SKOOG FA. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- NAGAO EO; PASQUAL M; RAMOS JD. 1994. Efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação *in vitro* de brotações de porta-enxerto de citros. *Bragantia* 53: 25-31.
- PASQUAL M; CHALFUN NNJ; RAMOS JD. 2001. *Cultura de tecidos: Tecnologia e aplicações: aplicação na propagação de plantas*. Lavras: UFLA/FAEPE, 81 p.
- PASQUAL M; SANTOS FC; FIGUEIREDO MA; JUNQUEIRA KP; REZENDE JC; FERREIRA EA. 2008. Micropropagação de abacaxizeiro ornamental. *Horticultura Brasileira* 26: 45-49.
- SAS INSTITUTE. 1990. *Statistical Analysis System: Procedures guide: version 6*. Cary, NC. 705p.
- SATO AY; MARIA J; SEDIYAMA T; BORÉM A; CECON PR; JUNQUEIRA CS. 2001. Micropropagação da mandioca: influência da concentração de amônio com e sem BAP. *Revista Ceres* 48: 405-413.
- SILVA ALL; FRANCO ETH; GESING JPA; PESSOA CC. 2002. Efeitos de alguns meios de cultura sobre o desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya tigrina* A. Rich. Ex Beer - Orchidaceae. *ABCTP Notícias* 4-7.
- SILVA EF; PASQUAL M; PAIVA PDO; SILVA AB; NOGUEIRA DA. 2005. Polpa de banana e vitaminas do meio MS no cultivo *in vitro* de orquídea. *Plant Cell Culture and Micropropagation* 1: 8-12.
- SONG MKR; SILVA GL; FARIA RT; TAKAHASHI LSA. 1999. Análise do crescimento e enraizamento *in vitro* de híbridos de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) semeados em diferentes meios de cultura. In CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 12., *Anais...* Jaboticabal:UNESP, p. 110.
- TORRES AC; BARBOSA NVR. 2001. Condições de incubação para cultura *in vitro*. *ABCTP Notícias* 1-7.
- TORRES AC; BARBOSA NVR; WILLADINO L; GUERRA MP; FERREIRA CF; PAIVA SAV. 2001. *Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas*. Brasília: Embrapa (Circular Técnica). 20p.