

## Crescimento *in vitro* de plântulas de *Caularthron bicornutum* em diferentes concentrações de sacarose

### *In vitro* growth of *Caularthron bicornutum* plantlets in different sucrose concentrations

Kathia Fernandes Lopes Pivetta<sup>I\*</sup> Taissara Abdala Martins<sup>II</sup> Renato Fernandes Galdiano Junior<sup>III</sup>  
Renata Gimenes<sup>I</sup> Ricardo Tadeu de Faria<sup>IV</sup> Roberto Jun Takane<sup>V</sup>

#### RESUMO

Objetivou-se neste trabalho estudar a influência de diferentes concentrações de sacarose no crescimento *in vitro* de *Caularthron bicornutum* (Hook.) Raf. O experimento foi conduzido no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – Unesp/FCAV, em Jaboticabal, São Paulo (SP), no período de janeiro a outubro de 2009. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Foram seis tratamentos (cinco concentrações de sacarose: 10; 20; 30; 40 e 50g L<sup>-1</sup> e ausência de sacarose no meio de cultura) e cinco repetições, totalizando 30 parcelas e 12 plântulas/parcela. A semeadura foi feita em meio de cultura MS e, após 90 dias, estas foram selecionadas e transferidas para frascos contendo meio de cultura com metade da concentração de macronutrientes (½ MS), com as diferentes concentrações de sacarose. Aos 150 dias após a semeadura, foi realizado o segundo subcultivo, cujos procedimentos foram semelhantes aos do primeiro, sendo as plântulas reinoculadas para renovação do meio. Após 210 dias da semeadura, foi realizada avaliação. Verificou-se que a sacarose não influenciou a porcentagem de enraizamento, porém foi efetiva no número e crescimento de raízes e da parte aérea de plântulas de *Caularthron bicornutum*, em concentrações que variaram de 13 a 29g L<sup>-1</sup> de sacarose.

**Palavras-chave:** micropropagação, orquídea, planta ornamental.

#### ABSTRACT

This research aimed to studied the influence of different sucrose concentrations in the *in vitro* growth of *Caularthron bicornutum* (Hook.) Raf.. The experiment was

conducted at Department of Technology of Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – Unesp/FCAV, Jaboticabal, São Paulo state, in the period of January to October of 2009. Were studied 6 treatments (5 sucrose concentrations: 10; 20; 30; 40 and 50g L<sup>-1</sup> and sucrose absence in the middle of culture) and 5 replications with 12 seedlings per replication had been used in a completely randomized design. The seeds were placed in culture medium MS, and after 90 and 150 days they were selected and transferred for flasks containing culture medium ½MS, with the different sucrose concentrations. After 210 days evaluation was accomplished. It was verified that the sucrose in the concentrations from 13 to 29g L<sup>-1</sup> provided the largest averages for the number of roots, length of roots and length of the aerial part; however it didn't influence in the rooting percentage of the plântlests of *Caularthron bicornutum*.

**Key words:** micropropagation, orchid, ornamental plant.

#### INTRODUÇÃO

O gênero *Caularthron*, pertencente à Família Orchidaceae, é composto por apenas quatro espécies epífitas originárias da América Central e do norte da América do Sul. O nome desse gênero vem do grego *kaulos*, caule, e *arthron*, articulado, em referência à aparência de articulações que existem em seus pseudobulbos (CAULARTHON, 2010). *Caularthron bicornutum* (Hook.) Raf. é uma orquídea epífita que

<sup>I</sup>Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil. E-mail: kathia@fcav.unesp.br. \*Autor para correspondência.

<sup>II</sup>Curso de Agronomia, Departamento de Produção Vegetal, FCAV, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

<sup>III</sup>Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, FCAV, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

<sup>IV</sup>Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil.

<sup>V</sup>Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil.

ocorre naturalmente no Brasil, na região Norte do rio Amazonas e também ao longo da região Norte da América do sul e em Trinidad e Tobago; apresenta flores brancas dispostas em inflorescências; o labelo apresenta pequenas manchas vermelho-escuras e a parte apical amarela (CAULARTHON BICORNUTUM, 2010).

Uma das formas de multiplicação comercial de orquídeas é por meio de sementes; no entanto, é necessário que entrem em contato com um fungo simbiótico ou deve-se proceder à semeadura *in vitro* (FARIA et al., 2010). No cultivo *in vitro*, as plantas perdem parcialmente o autotrofismo e, conseqüentemente, necessitam de uma fonte exógena de carboidratos; a melhor fonte e concentração de carboidrato (carbono reduzido) dependem principalmente da espécie vegetal e da fase do processo de micropropagação (NICOLOSO et al., 2003). Vários autores têm relatado o efeito positivo da sacarose no cultivo *in vitro* de várias espécies (CALVETE et al., 2002; FRÁGUAS et al., 2003; NICOLOSO et al., 2003; FARIA et al., 2004; SKREBSKY et al., 2004; MOREIRA et al., 2007; SORACE et al., 2008; RIBEIRO et al., 2009). No entanto, YAMADA & SATO (1978) comentam que, embora a sacarose seja essencial ao crescimento das culturas *in vitro*, o seu excesso pode ser prejudicial, pois inibe a síntese de clorofila, reduzindo a capacidade fotossintética das culturas. Além disso, altas concentrações de sacarose no meio de cultura pode favorecer o desenvolvimento de fungos e bactérias e, conseqüentemente, aumentar a taxa de contaminação, a qual interferirá negativamente na sobrevivência e no desenvolvimento das plântulas (KOZAI, 1991; SOUZA et al., 2007). Assim, é importante estudar a curva de resposta em função do aumento da concentração de sacarose para as diferentes espécies.

Como *Caularthron bicornutum* ainda é pouco estudada e apresenta potencial comercial, verifica-se a necessidade de aprimoramento da técnica de micropropagação dessa orquídea visando a disponibilizar mudas em grande quantidade e de alta qualidade. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da sacarose no crescimento *in vitro* de plântulas de *Caularthron bicornutum* (Hook.) Raf.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – Unesp/FCAV, em Jaboticabal, São Paulo (SP), no período de janeiro a outubro de 2009.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Foram seis tratamentos (0, 10; 20; 30; 40 e 50g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio de cultura), sendo o tratamento controle o meio isento de sacarose. Inicialmente foram arrançadas em cinco repetições, totalizando 30 parcelas. Cada parcela foi representada por um frasco contendo 12 plântulas.

Cápsulas maduras de *Caularthron bicornutum*, obtidas do acervo do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos de Plantas, do Departamento de Tecnologia da Unesp/FCAV, foram desinfestadas em hipoclorito de sódio 1,0%, durante 30 minutos e enxaguadas por três vezes consecutivas com água destilada e autoclavada, segundo recomendações de FARIA (1998). Em seguida, foram abertas no sentido de sua deiscência, sendo utilizados pinça e bisturi autoclavados, para retirada das sementes, que foram colocadas sobre meio de cultura, contidos em frascos (40mL de meio de cultura em frascos com capacidade de 280mL), em condições de câmara de fluxo. Para semeadura, foi utilizado meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), completo, suplementados com 30g L<sup>-1</sup> de sacarose.

Os frascos contendo as sementes foram colocados em sala de cultivo com intensidade luminosa de, aproximadamente, 75µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40W, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2°C.

Após 90 dias da semeadura (primeiro subcultivo), protocormos com um par de folíolos foram selecionadas visualmente, mantendo um padrão de altura de cerca de dois milímetros e transferidas para frascos contendo meio de cultura MS, com as diferentes concentrações de sacarose, sendo a concentração dos macronutrientes do meio de cultura reduzido (com metade da concentração de macronutrientes do meio MS), conforme proposto por REGO-OLIVEIRA & FARIA (2005), para a repicagem de orquídeas. Foram colocados 40mL de cada meio de cultura em frascos com capacidade de 280mL, que foram esterilizados em autoclave com pressão de 1,21atm, durante 20 minutos. Após 150 dias da semeadura, foi realizado o segundo subcultivo cujos procedimentos foram semelhantes aos do primeiro (90 dias), sendo as plântulas reinoculadas em frascos contendo os respectivos meios de cultura utilizados para cada tratamento.

Aos 150 e 210 dias após a semeadura, foi anotado o número de plântulas mortas e sobreviventes. Após 210 dias de cultivo, foram avaliadas as seguintes características: número de raízes por plântula (>1mm); comprimento médio de raízes por plântula (mm); comprimento da parte aérea (mm);

número de folhas por plântula e massa de matéria seca do sistema radicular e da parte aérea (previamente, o sistema radicular e a parte aérea de cada plântula foram acondicionados em sacos de papel Kraft e secos em estufas dotadas de sistema para circulação forçada e renovação de ar, com temperatura de 60°C, até atingir peso constante, que ocorreu após 72 horas; as medidas foram expressas em miligramas).

Para a característica porcentagem de plântulas mortas e normais, não foi realizada análise estatística, pois houve perdas por contaminação. Para as demais variáveis, os dados foram tabulados e analisados estatisticamente. O nível de significância utilizado para teste F foi de 5%. Os dados de número de folhas e número de raízes foram transformados em  $(x+1)^{1/2}$ . Foi realizada a análise de regressão polinomial a fim de verificar a resposta das variáveis em função do aumento da concentração de sacarose. A significância da regressão foi testada pelo teste F, a 5% de probabilidade.

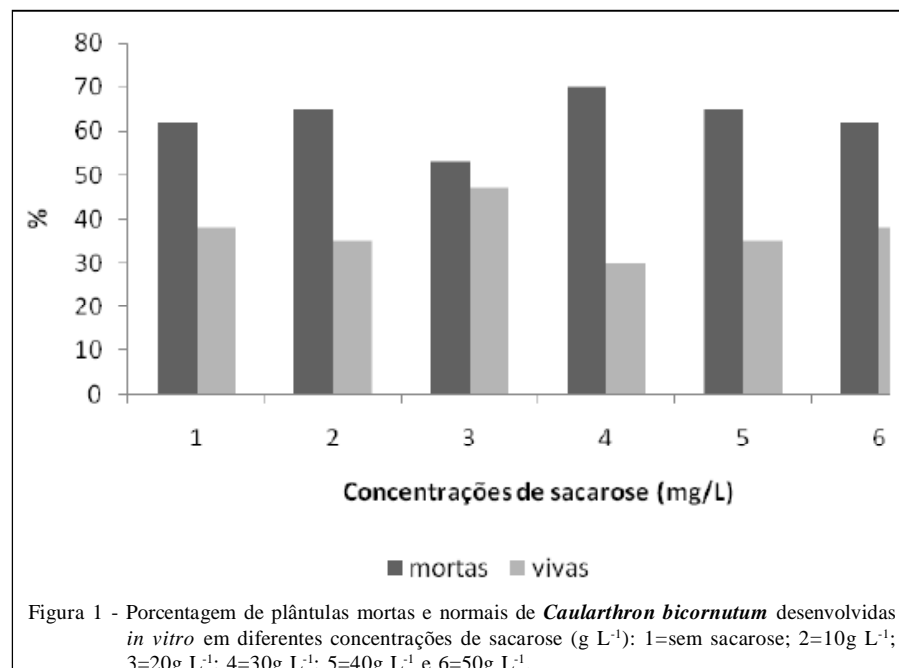
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O meio de cultura contendo 20g L<sup>-1</sup> de sacarose foi o que apresentou maior porcentagem de plântulas de *Caularthron bicornutum* sobreviventes. O experimento foi inicialmente instalado com seis tratamentos e cinco repetições, sendo cada parcela representada por um frasco contendo 12 plântulas. Entretanto, no decorrer do trabalho, houve a perda de alguns frascos (parcelas) por contaminação. Em virtude

desse fato, cada plântula passou a representar uma repetição, não sendo possível realizar a análise estatística para a variável porcentagem de plântulas mortas (Figura 1). MOREIRA et al. (2007) também verificaram que a concentração de 20g L<sup>-1</sup> de sacarose proporcionou maior taxa de sobrevivência de plântulas do híbrido de orquídea *Laelia purpurata* X *Cattleya warneri*.

Com exceção da concentração de 20g L<sup>-1</sup> de sacarose, em que a taxa de sobrevivência foi da ordem de 47%, nos demais meios de cultura, a taxa de sobrevivência foi semelhante, variando de 30 a 38%, inclusive no meio isento de sacarose (Figura 1).

De acordo com YAMADA et al. (1978) e BARZ & HÜSEMANN (1982), em condições *in vitro*, as células das plântulas não têm capacidade de suprir os carboidratos necessários para o desenvolvimento, e são, portanto, dependentes de uma fonte externa de carboidratos; no entanto, essa sobrevivência em meio isento de sacarose pode ser explicada pela diferença na capacidade fotossintética das plantas. GROUT (1988) agrupou as plantas cultivadas em meio asséptico em duas classes: plantas cujas folhas formadas não desenvolvem capacidade fotossintética, se crescerem em meio contendo sacarose (heterotróficas ou mixotróficas), e plantas adaptadas às condições autotróficas *in vitro*, ou seja, apesar das condições artificiais de cultivo, podem apresentar significativa taxa fotossintética. Assim, observa-se que algumas plântulas de *Caularthron bicornutum* desenvolveram capacidade autotrófica, pois, embora baixa (38%),



houve sobrevivência das plântulas; as condições encontradas no frasco de cultivo e na sala de crescimento foram eficientes para promover quantidades suficientes de fotossíntese para essas plântulas que sobreviveram.

Neste experimento, observa-se, de modo geral, alta porcentagem de plântulas mortas, de 53 a 70% (Figura 1). Conforme KOZAI (1991), embora o incremento de sacarose no meio de cultura apresente vantagens, a presença de açúcar no meio pode favorecer o desenvolvimento de fungos e bactérias e a consequente contaminação, diminuindo a taxa de sobrevivência das plântulas. A contaminação do meio nutritivo por bactérias e fungos é um dos principais problemas no cultivo assimbiótico de orquídeas, estabelecendo-se no meio de cultura ou mesmo no próprio explante, competindo pelos nutrientes, produzindo substâncias tóxicas e inibindo o desenvolvimento da plântula, ocasionando, assim, sua perda (SOUZA et al., 2007).

Com relação à porcentagem de enraizamento das plântulas, o valor obtido foi de 100%, inclusive em meio isento de sacarose, sendo mais um indicativo da capacidade autotrófica desta orquídea. Para muitas espécies, a sacarose tem sido importante no processo de enraizamento *in vitro*. COLLINS & DIXON (1992) verificaram para a orquídea *Diuris longifolia* que o aumento das concentrações de sacarose de 20 para 40g L<sup>-1</sup> proporcionou aumento na taxa de enraizamento, dobrando o número de plantas enraizadas e melhorando o desenvolvimento destas. No entanto, DAMIANI & SCHUCH (2009), analisando diferentes concentrações de sacarose (0, 15 e 30g L<sup>-1</sup>) no crescimento *in vitro* de plântulas de mirtilo (*Vaccinium ashei*), constataram que as maiores porcentagens de enraizamento foram obtidas em meio sem a adição de sacarose.

A sacarose influenciou positivamente o número de raízes (Figura 2A), o comprimento de raízes (Figura 2B) e a massa de matéria seca de raízes (Figura 2C) de *C. bicornutum*. De acordo com GEORGE & SHERRINGTON (1984), o aumento da concentração de sacarose, de modo geral, estimula o crescimento e a formação de raízes em algumas espécies.

As plântulas apresentaram resposta quadrática com maior média estimada na concentração de 24,2g L<sup>-1</sup> de sacarose quanto ao número de raízes por plântula (Figura 2A). No entanto, SORACE et al. (2008) verificaram maior número de raízes em plântulas micropropagadas da orquídea *Oncidium baueri* em meio de cultura ½ MS contendo 40g L<sup>-1</sup>.

Com relação ao comprimento de raízes, as plântulas apresentaram resposta cúbica (Figura 2B) e, para a massa de matéria seca de raízes (Figura 2C), resposta quadrática, em que as maiores médias foram

estimadas nas concentrações de 13,0 e 24,0g L<sup>-1</sup>, respectivamente. MOREIRA et al. (2007) também verificaram efeito positivo da sacarose no comprimento das raízes das plântulas de *Laelia purpurata* X *Cattleya warneri*, nas concentrações de 15 e 20g L<sup>-1</sup> de sacarose.

A maior média para comprimento da parte aérea foi estimada na concentração de 23,0g L<sup>-1</sup> (Figura 2D). De forma semelhante, FRÁGUAS et al. (2003), no cruzamento de *Cattleya labiata* X *Laelia itambana*, observaram maior crescimento das plântulas em meio de cultura MS contendo 20g L<sup>-1</sup> de sacarose. Entretanto, FARIA et al. (2004) relataram que o maior comprimento da parte aérea de plântulas de *Dendrobium nobile* foi obtido na concentração de 60g L<sup>-1</sup>. No estudo de doses de sacarose com a orquídea *Oncidium baueri*, SORACE et al. (2008) verificaram que o maior comprimento da parte aérea ocorreu em meio de cultura ½MS contendo 40g L<sup>-1</sup>.

Para a variável número de folhas, o maior valor foi estimado na concentração de 29g L<sup>-1</sup> (Figura 2E). MOREIRA et al., (2007), em experimento com o híbrido de orquídea *Laelia purpurata* X *Cattleya warneri*, concluíram que a concentração de 20g L<sup>-1</sup> de sacarose foi a que proporcionou maior número de folhas. RIBEIRO et al. (2009), avaliando o efeito da sacarose na multiplicação *in vitro* de copo-de-leite (*Zantedeschia aethiopica*), verificaram que a concentração de sacarose foi significativa para a variável número de folhas.

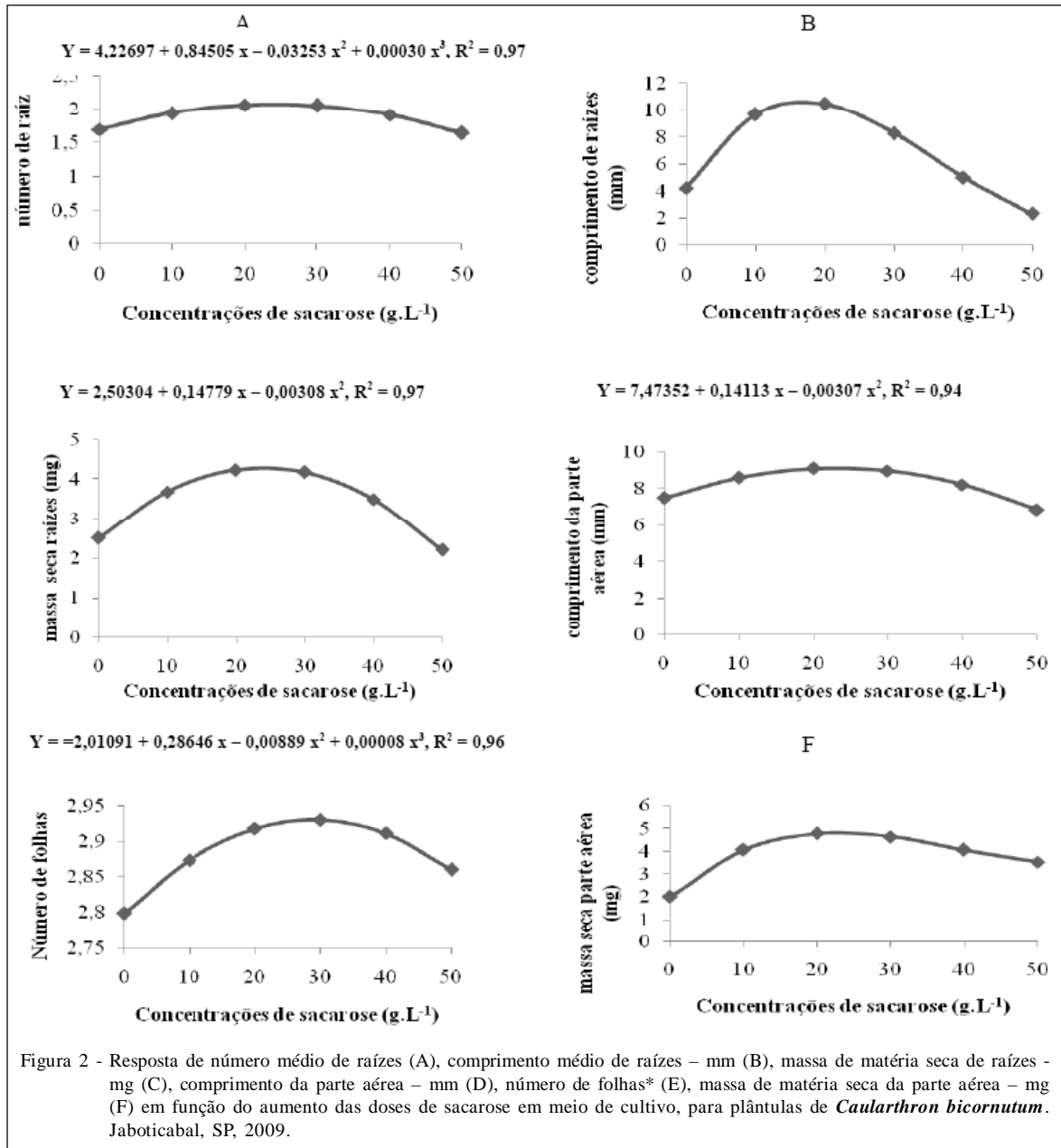
Quanto à variável massa de matéria seca da parte aérea, as plântulas apresentaram resposta cúbica, com maior produção estimada em 16g L<sup>-1</sup> de sacarose (Figura 2F). CALVETE et al. (2002), NICOLOSO et al. (2003) e SKREBSKY et al. (2004) também descreveram o efeito positivo da sacarose na produção de massa de matéria seca em outras culturas.

## CONCLUSÃO

A sacarose nas concentrações estimadas de 13 a 29g L<sup>-1</sup> proporciona as maiores médias para o número de raízes, comprimento de raízes e comprimento da parte aérea, porém não influencia a porcentagem de enraizamento das plântulas de *Caularthron bicornutum*.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de Iniciação Científica da segunda autora, e à Prof. Dra. Eliana G. de Macedo Lemos, pelo fornecimento das cápsulas de sementes, pela infraestrutura e pelo espaço cedido no laboratório do Departamento de Tecnologia.



## REFERÊNCIAS

BARZ, W.; HÜSEMANN, W. Aspects of photoautotrophic cell suspension cultures. In: FUJIWARA, A. **Plant tissue culture**. Tokio: Maruzen, 1982. p.245-248.

CALVETE, E.O. et al. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, v.20, n.2, p.186-191, 2002. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-05362002000200014&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-05362002000200014&script=sci_arttext)>. Acesso em: 20 jan. 2010. doi: 10.1590/S0102-05362002000200014.

CAULARTHON BICORNUTUM. American Orchid Society. Acesso em: 05 jan. 2010. Online. Disponível em: <<http://www.aos.org/AM/Template.cfm?Section=Home&CONTENTID=6146&TEMPLATE=/CM/ContentDisplay.cfm>>.

CAULARTHON. Acesso em: 05 jan. 2010. Online. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Caularthron>>.

COLLINS, M.T.; DIXON, K.W. Micropropagation of an Australian terrestrial orchid *Diuris longifolia* R Br. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.32, p.131-135, 1992.

DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. Enraizamento *in vitro* de mirtilo em condições fotoautotróficas. **Ciência Rural**, v.39, p.186-191, 2009.

DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. Enraizamento *in vitro* de mirtilo em condições fotoautotróficas. **Ciência Rural**, v.39, p.186-191, 2009.

- n.4, p.1012-1017, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782009000400009&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782009000400009&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 20 jan. 2010. doi: 10.1590/S0103-84782009005000031.
- FARIA, R.T. et al. **Cultivo de orquídeas**. Londrina: Mecenas, 2010. 208p.
- FARIA, R.T. et al. *In vitro* **Dendrobium nobile** plant growth and rooting in different sucrose concentrations. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.4, p.780-783, 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-05362004000400023&lng=pt&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362004000400023&lng=pt&nrm=iso&tlng=en)>. Acesso em: 15 jan. 2010. doi: 10.1590/S0102-05362004000400023.
- FARIA, R.T. Micropropagação de **Dendrobium nobile in vitro**. In: TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A.M.M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agronômico, 1998. p.63-67.
- FRÁGUAS, C.B. et al. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídeas oriundas da hibridação entre **Cattleya labiata** e **Laelia itambana**. **Ceres**, v.50, n.292, p.719-726, 2003.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics, 1984. 230p.
- GROUT, B.W.W. Photosynthesis of regenerated plantlets *in vitro* and the stresses of transplanting. **Acta Horticulturae**, n.230, p.129-134, 1988.
- KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v.27, p.47-51, 1991.
- MOREIRA, B.M. et al. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea (**Laelia purpurata** Lindl var venosa X **Cattleya warneri** T. Moore alba) sob diferentes concentrações de sacarose e frutose. **Revista de Saúde e Biologia**, v.2, n.2, p.16-21, 2007.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- NICOLOSO, F.T. et al. Efeitos de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [**Pfaffia glomerata** (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.1, p.84-90, 2003.
- REGO-OLIVEIRA, L.V.; FARIA, R.T. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. **Acta Scientiarum**, v.27, n.1, p.1-5, 2005.
- RIBEIRO, M.N.O. et al. Multiplicação *in vitro* de copo-de-leite: espectros de luz e sacarose. **Ciência Rural**, v.39, n.08, p.2388-2393, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782009000800018&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782009000800018&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 15 jan. 2010. doi: 10.1590/S0103-84782009005000187.
- SKREBSKY, E.C. et al. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (**Pfaffia glomerata** Spreng. Pedersen). **Ciência Rural**, v.34, n.5, p.1471-1477, 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782004000500022&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782004000500022&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 15 jan. 2010. doi: 10.1590/S0103-84782004000500022.
- SORACE, M. et al. Crescimento *in vitro* de **Oncidium baueri** (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. **Semina**, v.29, n.4, p.775-782, 2008.
- SOUZA, G.C. et al. Contaminação microbiana na propagação *in vitro* de **Cattleya walkeriana** e **Schomburgkia crista**. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, p.405-407, 2007.
- YAMADA, Y. et al. Photoautotrophism in green culture cells. In: THORPE, T.A. **Frontiers of plant tissue culture**. Calgary: University of Calgary, 1978. p.453-462.
- YAMADA, Y.; SATO, F. The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. **Plant and Cell Physiology**, v.19, n.4, p.691-699, 1978.