

Crescimento *in vitro* e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) com carvão ativado sob dois espectros luminosos

In vitro growth and acclimatization of *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) with activated charcoal in two light spectra

Renato Fernandes Galdiano Júnior^I Cibele Mantovani^{II} Kathia Fernandes Lopes Pivetta^{III}
Eliana Gertrudes de Macedo Lemos^{IV}

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a adição de concentrações de carvão ativado em meio de cultura ½ MS (com metade da concentração dos macronutrientes) sob dois espectros luminosos para a obtenção de plântulas *in vitro* de *Cattleya loddigesii*. Plântulas com aproximadamente 90 dias foram subcultivadas em oito tratamentos, nos quais foi testada a adição ao meio de cultura ½ MS com carvão ativado (0; 0,5; 1,0 e 2,0g L⁻¹) e combinados sob espectro de luz branca e luz vermelha. Após 180 dias da germinação, foram mensurados dados biométricos (raiz e parte aérea), massa fresca e teores de pigmentos fotossintéticos. Em plântulas aclimatizadas em casa de vegetação, foram avaliadas a taxa de sobrevivência após 120 dias. As concentrações de clorofila total, clorofila a e carotenóides foram maiores nos tratamentos sob luz branca, enquanto a luz vermelha influenciou significativamente maior clorofila b, plântulas com menos raízes e de menor comprimento e elevada mortalidade *ex vitro*. A adição de 2,0g L⁻¹ de carvão ativado ao meio de cultura e o uso de luz branca proporcionaram maior eficiência de desenvolvimento tanto para as culturas *in vitro* quanto para a sobrevivência *ex vitro* das plantas.

Palavras-chave: germinação *in vitro*, luminosidade, tipo de luz, orquídea, plântulas e sobrevivência *ex vitro*.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of different concentrations of activated charcoal in ½ MS (half concentration of macronutrients) culture medium under two light spectra on the *in vitro* growth of *Cattleya loddigesii*

seedlings. Plantlets with approximately 90 days were subcultured under eight treatments, consisting of different active charcoal concentrations (0; 0.5; 1.0 and 2.0g L⁻¹) in ½ MS medium combined with white and red light spectra. After 180 days of germination, biometric data, fresh weight, and the level of photosynthetic pigments were evaluated. Plantlets acclimatized in a greenhouse were evaluated for survival after 120 days. Total chlorophyll, chlorophyll a, and carotenoid concentrations were higher in treatments under white light, while red light promoted greater chlorophyll b, plantlets with fewer and shorter roots, and high *ex vitro* mortality. The addition of 2.0g L⁻¹ of active charcoal to the culture medium and the use of white light provided greater development efficiency both on *in vitro* culture and *ex vitro* plant survival.

Key words: *In vitro* germination, luminosity, kinds of light, orchid, plantlets and *ex vitro* survival.

INTRODUÇÃO

Em razão da elevada beleza e exuberância de suas flores, as orquídeas destacam-se como importante planta ornamental e medicinal, de grande interesse econômico, ecológico e para manutenção dos ecossistemas naturais. Atualmente, seu cultivo é um comércio internacional que representa cerca de 8% do mercado mundial de plantas ornamentais e tem o potencial de alterar a paisagem econômica de um país (CHUGH et al., 2009).

^IPrograma de Pós-graduação em Agronomia, Departamento de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil. E-mail: renatofgaldianojr@yahoo.com.br. Autor para correspondência.

^{II}Curso de Agronomia, FCAV, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

^{III}Departamento de Produção Vegetal, FCAV, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

^{IV}Departamento de Tecnologia, FCAV, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

Cattleya é o gênero de *Orchidaceae* exclusivamente neotropical mais cultivada devido à extraordinária beleza de suas flores que a tornou popular e utilizada como matriz para híbridos (HETHERINGTON, 2002). *Cattleya loddigesii* apresenta bom número e tamanho das flores, sendo elas de coloração muito atrativas e duráveis (CARDOSO & ISRAEL, 2005).

Devido à contínua destruição de seu hábitat natural, somado ao comércio e coleta ilegal, muitas espécies de orquídeas estão desaparecendo na natureza a um nível alarmante. Em decorrência, *Cattleya loddigesii*, espécie brasileira nativa das regiões sul e sudeste do Brasil (WATANABE & MORIMOTO, 2007), figura na lista de espécies ameaçadas de extinção da flora do Estado de Minas Gerais (MENDONÇA & LINS, 2000) e em risco de extinção no Estado do Rio Grande do Sul (BAPTISTA & LONGHI-WAGNER, 1998).

O cultivo *in vitro* de células e tecidos constitui excelente alternativa a ser empregada para um grande número de plantas (COSTA et al., 2009). A partir da multiplicação *in vitro*, espécies em perigo ou consideradas em extinção podem se tornar disponíveis em quantidades de proporções comerciais e assim será possível reduzir a extração não controlada em seu habitat.

Carvão ativado é um pó finamente moído obtido a partir da combustão da madeira e, no meio nutritivo, representa uma rede muito fina de poros, com grande área de superfície e volume, o que lhe confere uma capacidade distinta de adsorção (ARDITTI & ERNEST, 1993; THOMAS, 2008). A adição de carvão ativado ao meio nutritivo tem sido explorada para a ampliação do crescimento e desenvolvimento de células *in vitro*.

Assim como a composição do meio nutritivo, as condições de cultivo podem aperfeiçoar a propagação *in vitro* de plantas de orquídeas. Nesse aspecto, diferentes espectros de luz podem alterar o crescimento e desenvolvimento dos tecidos de plantas cultivadas *in vitro* (KURILCIK et al., 2008; BRAGA et al., 2009). TANAKA et al. (1998) reportaram aumento no crescimento de plântulas da orquídea terrestre *Cymbidium* sob luzes LED (light-emitting diodes) nas cores azul e vermelho, assim como a luz vermelha emitida por lâmpadas fluorescentes provocaram maior comprimento de broto para híbrido de *Cattleya* (CYBULARZ-URBAN et al., 2007) e efetividade na propagação de *Odontoglossum gloriosum* (PEDROZA-MANRIQUE & MICÁN-GUTIÉRREZ, 2006). Como alternativa de baixo custo, frascos incubados em luz fluorescente branca e envolvidos por folhas de celofane vermelha foram investigados por ARAÚJO et al. (2009), tendo resultado no alongamento de plântulas de *Cattleya loddigesii*.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a propagação *in vitro* e aclimatização de plântulas germinadas de *Cattleya loddigesii*, orquídea brasileira de grande relevância ecológica e econômica, em meio nutritivo suplementado com concentrações de carvão ativado sob a luminosidade branca e vermelha.

MATERIAL E MÉTODOS

Cápsulas fechadas com sementes maduras obtidas por autopolinização artificial da espécie *Cattleya loddigesii*, com oito meses após a fecundação, foram superficialmente desinfestadas em etanol 70% por cinco minutos, seguido de hipoclorito de sódio com 1% de cloro ativo durante 30 minutos e enxaguadas três vezes com água destilada e autoclavada em câmara de fluxo (FARIA, 1998). Cerca de 100mg de sementes foram inoculadas em frascos plásticos de 220mL, contendo 40mL de meio de cultura ½ MS, composto pela formulação salina proposta por MURASHIGE & SKOOG (1962), com a metade da concentração de macronutrientes e concentração total de micronutrientes, adicionado de vitaminas de MS, inositol e glicina (COSTA et al., 2009), 2% de sacarose e geleificado com 0,7% de ágar (A4675, Sigma®). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,7 antes de ser autoclavado a 121°C e 1,1atm durante 15 minutos (CALDAS et al., 1998).

A germinação e crescimento inicial ocorreram em sala de incubação sob condições controladas, com temperatura de 25±2°C e iluminação incidente nos frascos de, aproximadamente, 75µmol m⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas luz.

Plântulas com cerca de 0,5cm de altura, com a presença de dois folíolos, obtidas após 90 dias da inoculação, foram transferidas para oito diferentes tratamentos, compostos de quatro concentrações de carvão ativado Sinth® (0; 0,5; 1,0 e 2,0g L⁻¹) sob duas condições de luminosidade (luz branca fornecida por lâmpadas fluorescentes e vermelha, obtida por meio de uma folha de papel celofane vermelho envolvendo todo o frasco sob luz branca). O delineamento experimental foi num esquema fatorial 4x2, com parcelas distribuídas em forma inteiramente casualizadas e, em cada parcela, foram utilizadas 12 plântulas com cinco repetições, totalizando 480 plântulas, conforme preconizado por SOARES et al. (2008) para o maior crescimento *in vitro* dessa espécie. A iluminação dentro dos potes foi aferida por meio de um luxímetro (mod. MLM1010, Manipa®). A intensidade da radiação luminosa oferecida em cada condição foi mensurada a partir de um aparelho LI 1400 dataLogger (Li-Cor, EUA), sendo constatada a radiação de 6,18Wm⁻²s⁻¹ e 4,86Wm⁻²s⁻¹ para a luz branca e

celofane vermelho, respectivamente (médias de três repetições). A variação do comprimento de onda foi inferida envolvendo uma folha de celofane em cubeta e analisado em espectrofotômetro (UV-visível U-2000, Hitachi®, Japão), entre 240-900nm, velocidade de 200nm min⁻¹ e resposta rápida a intervalos de 20nm, sendo obtida absorvância na faixa de 540nm.

Dados biométricos do número de raízes, comprimento da maior raiz, número de folhas, comprimento da maior folha, comprimento da plântula e massa fresca da plântula (parte aérea e radicular) foram coletados após 90 dias de cultivo. A quantificação dos pigmentos fotossintéticos foi a partir da extração conforme proposto por ARNON (1949) por meio da maceração de tecido foliar fresco em acetona 80%. Os materiais utilizados foram até 10 plantas escolhidas aleatoriamente para cada tratamento.

Quantidades de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofilas totais e carotenoides foram dosadas em espectrofotômetro (Beckman®, mod. DU640B) simultaneamente para as absorvâncias (A) em 662, 645, 470 e 710nm e assim calculado conforme descrito por HENDRY & PRICE, (1993): clorofila *a*=(11,24(A662-A710)-2,04(A645-A710)), clorofila *b*=20,13(A645-A710)-4,19(A662-A710), carotenoides = (1000(A470-A710)-1,9Ca-64,13Cb)/214. O aparelho foi calibrado utilizando como branco acetona 80%. As concentrações de pigmentos obtidas foram expressas em µg de pigmento g⁻¹ de massa fresca.

As plântulas foram transplantadas em vasos plásticos com pó de fibra de coco e aclimatizadas em casa de vegetação com tela de nylon para retenção de 70% da intensidade luminosa e a umidade relativa mantida constante em 70%. Dados de porcentagem de sobrevivência foram coletados de 50 plantas de cada tratamento após 120 dias da transferência para a aclimatização. Os dados biométricos e de pigmentos do cultivo *in vitro* foram transformados em (x+1)^{1/2}, submetidos à análise de variância e as médias separadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade por meio do programa Sisvar 4.3 (FERREIRA, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maior eficiência de desenvolvimento *in vitro* das plântulas de *Cattleya loddigesii*, em todas as variáveis analisadas, foi observado com o uso do meio de cultura ½ MS suplementado com 2,0g L⁻¹ de carvão ativado e sob luz branca (Tabela 1). Esta composição de meio de cultura também é recomendada para a obtenção de plântulas *in vitro* das espécies *Cattleya walkeriana* (FARIA et al., 2002), *Laelia tenebrosa* (ARAÚJO et al., 2006) e *Sophronis coccinea* (SANTOS et al., 2006). Os efeitos promotores do carvão ativado podem ser principalmente atribuídos a sua função de retenção de substâncias tóxicas presentes no meio de cultura, como, por exemplo, o 5-hidroxi metil-furfural, o qual é produzido a partir da

Tabela 1 - Médias biométricas de plântulas de *Cattleya loddigesii* cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de carvão ativado combinados com dois espectros luminosos, após 180 dias de cultivo.

Espectro de luz	-----Carvão ativado (g L ⁻¹)-----				CV (%)
	0	0,5	1,0	2,0	
	Número de raízes				9,01
Branca	1,46Ab	1,66Aab	1,73Aab	1,77Aa	
Vermelha	1,57Bb	1,62Bb	1,53Bb	1,53Bb	
	Comprimento da maior raiz (cm)				12,08
Branca	3,17Ab	3,71Aab	4,13Aa	4,28Aa	
Vermelha	3,11Bb	3,12Bb	3,15Bb	3,41Bb	
	Número de folhas				21,88
Branca	2,00Aa	2,15Aa	2,17Aa	2,21Aa	
Vermelha	2,71Aa	2,19 Aa	2,12Aa	2,12Aa	
	Comprimento da maior folha (cm)				5,86
Branca	3,01Ac	4,22Ab	4,11Ab	4,77Aa	
Vermelha	3,48Ac	4,48Ab	4,50Ab	3,64Ac	
	Massa fresca da plântula (g)				13,58
Branca	5,26Bc	8,51Ab	9,98Aab	10,84Aa	
Vermelha	6,6Bc	7,9Bc	8,11Bc	8,2Bc	

Letras maiúsculas correspondem ao espectro de luz e minúsculas a concentrações de carvão ativado. Médias não seguidas pela mesma letra diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

desidratação da sacarose durante a autoclavagem, ou substâncias inibitórias presentes no ágar ou também para reduzir a ação de metabólitos tóxicos, tais como substâncias fenólicas, etileno e ácido abscísico que são eliminados pelo explante (PAN & STADEN, 1998; THOMAS, 2008).

Concentrações elevadas (1,0 e 2,0g L⁻¹) de carvão ativado sob luz branca favoreceram o enraizamento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* (Tabela 1). Resultado similar também foi verificado por LÉDO et al. (2007) para o crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa*), em que a adição de carvão ativado ao meio induziu maior crescimento da raiz principal. Este efeito pode ser atribuído à promoção de maior aeração do meio nutritivo e evitação da luz para as raízes (ARDITTI & ERNEST, 1993), propiciando assim condições mais adequadas no local do crescimento radicular. No presente trabalho, observou-se que a utilização da luz vermelha proporcionou uma redução do crescimento da maior raiz, quando comparado com o uso da luz branca (Tabela 1). Resposta semelhante também foi observado por ARAÚJO et al. (2009) para esta mesma espécie de orquídea. Outro fator relevante, observado no presente estudo, foi que a luz vermelha obtida pela folha de celofane apresenta intensidade luminosa menor (600lux) dentro dos potes, quando comparado com a luz das lâmpadas brancas (1000lux). Característica que provavelmente reduziu a função do carvão ativado no

meio nutritivo, uma vez que o menor fornecimento de energia luminosa pode implicar redução do crescimento da plântula.

A massa fresca das plantas de *Cattleya loddigesii* foi superior em luz branca com 2,0g L⁻¹ de carvão ativado. Para a aquisição de biomassa, a luz vermelha foi ineficiente, mesmo com a adição de carvão ativado, o que reforça o fato de que a limitação do espectro oferecida pela luz vermelha trouxe atraso tanto para o crescimento radicular quanto para a aquisição de biomassa *in vitro*.

As quantidades de pigmentos fotossintéticos apresentaram variações entre os tratamentos utilizados (Tabela 2). Houve diferenças significativas entre os tipos de luminosidade, em que a luz branca proporcionou a maior produção de clorofila *a*, clorofila total, carotenoides e relação clorofila *a/b*. De maneira distinta, na luz vermelha, foi registrada a maior produção de clorofila *b*.

A maior produção de clorofila *b* pode estar associada à resposta das plântulas *in vitro* diante das condições luminosas mais limitantes. MARTINS et al. (2010) verificaram maior biossíntese de clorofila *b* em plantas de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum*), cultivadas em casa de vegetação sob malha preta com retenção de 50% da luminosidade. Esse resultado corrobora a menor intensidade luminosa oferecida sob luz vermelha mensurada pelo luxímetro.

Tabela 2 - Teores médios de pigmentos fotossintéticos de plântulas de *Cattleya loddigesii* cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de carvão ativado combinados com dois espectros de luminosidade, após 180 dias de cultivo.

Espectro de luz	-----Carvão ativado (g L ⁻¹) -----				CV (%)
	0	0,5	1,0	2,0	
		Clorofila <i>a</i> (mg g ⁻¹ de massa fresca)			5,00
Branca	16,99Aa	16,17Aab	16,95Aa	15,18Ab	
Vermelha	7,23Bb	7,28Bb	7,28Bb	7,40Bb	
		Clorofila <i>b</i> (mg g ⁻¹ de massa fresca)			5,43
Branca	9,85Bb	10,15Bb	10,58Bb	9,98Bb	
Vermelha	15,96Aa	14,26Ab	15,36Aab	15,76Aab	
		Clorofila total (mg g ⁻¹ de massa fresca)			4,65
Branca	26,84Aa	26,32Aa	27,53Aa	25,16Aa	
Vermelha	23,19Bab	21,54Bb	22,64Bb	22,16Bb	
		relação clorofila <i>a/b</i> (mg g ⁻¹ de massa fresca)			18,63
Branca	1,73Aa	1,6Ab	1,6Ab	1,52Ab	
Vermelha	0,45Bb	0,51Bb	0,47Bb	0,47Bb	
		Carotenoides (mg g ⁻¹ de massa fresca)			7,82
Branca	11,35Aa	10,65Aa	11,63Aa	10,62Aa	
Vermelha	4,11Ba	4,12Ba	4,38Ba	4,08Ba	

Letras maiúsculas correspondem ao espectro de luz e minúsculas a concentrações de carvão ativado. Médias não seguidas pela mesma letra diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

A relação clorofila *a/b* apresentada nos tratamentos sob luz vermelha foram talvez menores que as verificadas em plantas sob luz branca, devido à discrepância observada entre os elevados teores de clorofila *b* e o inverso em relação à clorofila *a* para estes tratamentos. A função da clorofila *b* é referente à absorção de energia luminosa em comprimentos de ondas distintos da clorofila *a* que amplia, consequentemente, a quantidade de fótons para o centro de reação da atividade fotossintética (TAIZ & ZEIGER, 2006).

Outra variação observada foram os teores de carotenoides, significativamente maiores na luz branca. Esses pigmentos desempenham função essencial como fotoprotetores (TAIZ & ZEIGER, 2006). Dessa maneira, a menor produção de carotenoides representa um ajustamento fisiológico de plântulas de *Cattleya loddigesii* ao espectro vermelho.

Para a aclimatização e sobrevivência *ex vitro*, esta condição de incubação foi desfavorável (Figura 1). A maior quantidade de raízes é essencial e deve ser estimulada para maior sobrevivência durante a aclimatização de orquídeas (SORACE et al., 2007; COSTA et al., 2009).

Plântulas que foram cultivadas *in vitro* sob luz vermelha apresentaram maior índice de mortalidade durante a aclimatização (Figura 1). Este evento pode

estar relacionado à menor quantidade de raízes, menor teor e um desbalanço do tipo de clorofilas produzido pelas plântulas, quanto cultivadas no espectro de luminosidade de cor vermelha.

CONCLUSÃO

Plântulas cultivadas sob luz vermelha, mesmo nas concentrações mais elevadas de carvão ativado, resultaram em menor produção de massa de matéria fresca, menor mudança da quantidade de pigmentos fotossintéticos das plântulas *in vitro* e menor sobrevivência em casa de vegetação. Enquanto que a adição de 2,0g L⁻¹ de carvão ativado no meio nutritivo sob luz branca favoreceu maior crescimento *in vitro* e maior porcentagem de sobrevivência *ex vitro* de plantas de *Cattleya loddigesii* e é, portanto, a combinação de tratamentos recomendável para a propagação dessa espécie nativa.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, à CAPES e à FAPESP pelo suporte financeiro. À Profa. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves, do Departamento de Tecnologia da FCAV-UNESP, pelo auxílio na interpretação do espectro de absorbância luminosa.

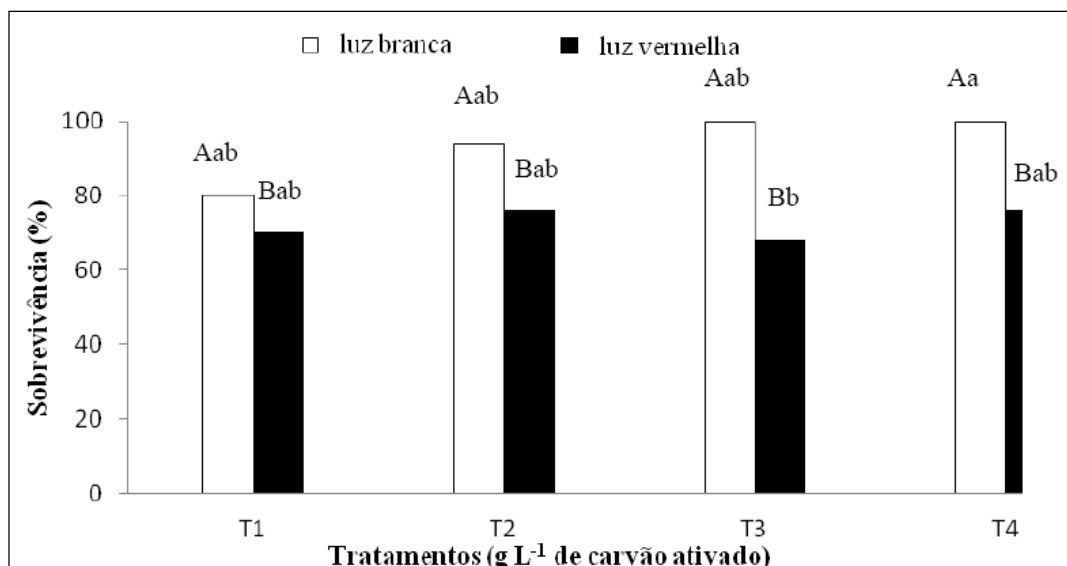


Figura 1 - Porcentagem de sobrevivência de plantas de *Cattleya loddigesii* na aclimatização *ex vitro* em casa de vegetação, a partir de plântulas cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de carvão ativado combinados com dois espectros de luminosidade, após 120 dias da transferência. Tratamentos: T1 - 0g L⁻¹ de carvão ativado; T2 - 0,5g L⁻¹ de carvão ativado; T3 - 1,0g L⁻¹ de carvão ativado; T4 - 2,0g L⁻¹ de carvão ativado. Letras maiúsculas correspondem ao espectro de luz e minúsculas a concentrações de carvão ativado. Barras não seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%).

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, A.G. et al. Crescimento *in vitro* de *Laelia tenebrosa* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de sais de Knudson-C e carvão ativado. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, v.2, n.2, p.61-67, 2006. Disponível em: <<http://www.abctp.ufla.br/v2n2.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2011.
- ARAÚJO, A.G. et al. Crescimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindl. em diferentes espectros luminosos associados com ácido giberélico. **Ceres**, v.56, n.5, p.542-546, 2009. Disponível em: <<http://www.ceres.ufv.br/ceres/revistas/V56N005P07807.pdf>>. Acesso em: 12 nov. 2010.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. New York: J. Wiley, 1993. 682p.
- ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v.24, n.1, p.1-15, 1949. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/content/24/1/1.full.pdf+html>>. Acesso em: 23 jan 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.24.1.1>
- BAPTISTA, L.R.M.; LONGHI-WAGNER, H.M. (Coord.). **Lista preliminar de espécies ameaçadas da flora do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre. Sociedade de Botânica do Brasil, 1998. 72p.
- BRAGA, F.T. et al. Qualidade de luz no cultivo *in vitro* de *Dendranthema grandiflorum* cv. Rage: características morfofisiológicas. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, n.2, p.502-508, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cagro/v33n2/v33n2a22.pdf>. Acesso em: 17 out. 2010. doi: 10.1590/S1413-70542009000200022.
- CALDAS, L.S. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa CENARGEN, 1998. V.1, p.87-132.
- CARDOSO, J.C.; ISRAEL, M. Levantamento de espécies da família *Orchidaceae* em Águas de Sta. Bárbara (SP) e seu cultivo. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.2, p.169-173, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/hb/v23n2/25046.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2010. doi: 10.1590/S0102-05362005000200001.
- CYBULARZ-URBAN, T. et al. Effect of light wavelength on *in vitro* organogenesis of a *Cattleya* hybrid. **Acta Biologica Cracoviensis**, v.49, n.1, p.113-118, 2007. Disponível em: <http://www.ib.uj.edu.pl/abc/pdf/49_1/14cybula.pdf>. Acesso em: 22 out. 2011.
- CHUGH, S. et al. Micropropagation of orchid: a review on the potential of different explants. **Scientia Horticulture**, v.122, n.4, p.507-520, 2009. Disponível em: <http://pdn.sciencedirect.com/science?_ob=MiamiImageURL&_cid=271177&_user=2139813&_pii=S0304423809003641&_check=y&_origin=browse&_zone=rslt_list_item&_coverDate=2009-11-03&wchp=dGLbVBA-zSkWz&md5=9503e220ffc97e5be0ff21c32a355ede/1-s2.0-S0304423809003641-main.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2012. doi:10.1016/j.scienta.2009.07.016.
- COSTA, M.A.P.C. et al. Micropropagação de orquídeas. In: JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A.S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: EMBRAPA MFT, 2009. V.1, p.351-370.
- 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.
- FARIA, R.T. et al. Preservation of the Brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using *in vitro* propagation. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.2, n.3, p.489-492, 2002.
- FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v.6, n.1, p.36-41, 2008. Disponível em: <http://www.fadminas.org.br/symposium/12_edicoes/artigo_5.pdf>. Acesso em: 5 out. 2010.
- HENDRY, G.A.F.; PRICE, A.H. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: HENDRY, G.A.F.; GRIME, J.P. **Methods in comparative plant ecology**. London: Chapman & Hall, 1993. p.150-152.
- HETHERINGTON, E. Influência de *Cattleya labiata* na hibridação. In: MENEZES, L.C. **Cattleya labiata autumnalis**. Brasília: IBAMA, 2002. p.235-247.
- KURILCIK, A. et al. *In vitro* culture of *Chrysanthemum* plantlets using light-emitting diodes. **Central European Journal of Biology**, v.3, n.2, p.161-167, 2008. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/218513h2541j6541/fulltext.pdf>>. Acesso em: 22 out. 2011. doi: 10.2478/s11535-008-0006-9.
- LÉDO, A.S. et al. Crescimento inicial de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) em diferentes meios de germinação *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.4, p.989-993, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v31n4/07.pdf>>. Acesso em: 17 out. 2010. doi: 10.1590/S1413-70542007000400007.
- MARTINS, J.R. et al. Teores de pigmentos fotossintéticos e estrutura de cloroplastos de Alfavaca-cravo cultivadas sob malhas coloridas. **Ciência Rural**, v.40, n.1, p.64-69, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v40n1/a412cr1385.pdf>>. Acesso em: 25 maio, 2011. doi: 10.1590/S0103-84782010000100011.
- MENDONÇA, M.P.; LINS, L.V. **Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2000. 157p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497, 1962.
- PAN, M.J.; STADEN, J.V. The use of charcoal in *in vitro* culture – a review. **Plant Growth Regulation**, v.26, p.155-163, 1998.
- PEDROZA-MANRIQUE, J.; MICÁN-GUTIÉRREZ, Y. Asymbiotic germination of *Odontoglossum gloriosum* Rchb.F. (*Orchidaceae*) under *in vitro* conditions. **In Vitro Cell and Developmental Biology-Plant**, v.42, p.543-547, 2006. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/b02636144078544v/fulltext.pdf>>. Acesso em: 23 out. 2011. doi: 10.1079/IVP2006793.
- SANTOS, A.F. et al. Otimização da propagação de *Sophranitis coccinea* (*Orchidaceae*) considerando meios de cultivo com adição de carvão ativado. **Horta**, v.46, p.8-12, 2006.

SOARES, J.D.R. et al. Crescimento *in vitro* de orquídeas: quantidade de meio e número de explantes. **Ceres**, v.55, n.1, p.49-53, 2008. Disponível em: <<http://www.ceres.ufv.br/ceres/revistas/V55N001P00808.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2010.

SORACE, M. et al. Influência de auxina na aclimatização de *Oncidium baueri* (Orchidaceae). **Semina**, v.28, n.2, p.195-200, 2007. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/3427/2786>>. Acesso em: 8 jun. 2011.

TANAKA, M. et al. *In vitro* growth of *Cymbidium* plantlets cultured under super bright red and blue light-emitting diodes. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.73, p.39-44, 1998.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 819p.

THOMAS, T.D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, v.26, p.618-631, 2008. Disponível em: <http://pdn.sciencedirect.com/science?_ob=MiamiImageURL&_cid=271336&_user=2139813&_pii=S0734975008000864&_check=y&_origin=article&_zone=toolbar&_coverDate=31-Dec-2008&view=c&originContentFamily=serial&wchp=dGLzVlk-zSkWA&md5=6611a3edaf2d08be39121c7e38aa4d01/1-s2.0-S0734975008000864-main.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2012. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.08.003.

WATANABE, D.; MORIMOTO, M.S. **Orquídeas: manual de cultivo**. São Paulo: AOSP, 2007. 347p.