

Casca de arroz e 6-Benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de *Oncidium baueri*

Michele Carla Nadal¹, Bruna Andressa dos Santos Oliveira², Dianini Brum Frölech², Roseane Maidana Moreira², Márcia Wulff Schuch², Ricardo Tadeu de Faria³, Adriane Marinho de Assis²

¹ Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil. E-mail: michecn@gmail.com (ORCID: 0000-0002-8774-8374)

² Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: brunah.andressa@gmail.com (ORCID: 0000-0003-0272-075X); dianinifrolech.enologia@gmail.com (ORCID: 0000-0003-0080-1759); roseane_moreira@hotmail.com (ORCID: 0000-0003-2522-0387); marciaws@ufpel.tche.br (ORCID: 0000-0001-5237-8302); agroadri17@gmail.com (ORCID: 0000-0003-4230-1242)

³ Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, Londrina, PR, Brasil. E-mail: faria@uel.br (ORCID: 0000-0002-7595-1965)

RESUMO: Objetivou-se avaliar o uso de casca de arroz como estruturador físico em substituição ao ágar e de 6-Benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de *Oncidium baueri*. Foram avaliados dois fatores: tipos de substratos (casca de arroz *in natura*; casca de arroz carbonizada e ágar), e concentrações de BAP (0, 1, 2 e 3 mg L⁻¹), com quatro repetições de cinco explantes. Após quatro meses, analisou-se a porcentagem de sobrevivência; o número médio de folhas e brotações; a massa de matéria fresca e seca de parte aérea. Quanto à porcentagem de sobrevivência e o número de folhas, o ágar apresentou as maiores médias. Para o número de brotações, a casca de arroz carbonizada e o ágar não diferiram estatisticamente. A maior massa de matéria fresca foi obtida com o uso de ágar associado a 1 mg L⁻¹ de BAP. Para massa seca, o ágar apresentou a maior média quando foi utilizado juntamente com 1 mg L⁻¹ de BAP; porém, não diferiu das concentrações 0 e 3 mg L⁻¹. Assim, o ágar e a concentração de 1 mg L⁻¹ de BAP são os mais indicados. Porém, como alternativa ao ágar, pode-se utilizar a casca de arroz carbonizada sem o regulador de crescimento, mas deve-se considerar a possibilidade de uma redução de até 35,8% na taxa de sobrevivência e 53,8% no número de na multiplicação *in vitro* de *O. baueri*.

Palavras-chave: ágar; micropropagação; regulador de crescimento; resíduos agrícolas; substratos

In vitro multiplication of *Oncidium baueri* using rice husk and 6-Benzylaminopurine

ABSTRACT: The aim of the work was to evaluate the use of substrates as support agents in substitution of agar in the medium and concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP) in the *in vitro* multiplication of *Oncidium baueri*. Two factors were evaluated: types of substrates (rice husk, carbonized rice husk and agar) and BAP concentrations (0, 1, 2 e 3 mg L⁻¹). After four months, it was evaluated the survival percentage; average leaves number; average sprout number; fresh and dry mass aerial part of the explants. Regarding the percentage of survival and the number of leaves, the agar showed the highest averages. For the number of shoots, the carbonized rice husk and the agar did not differ statistically. The highest fresh mass was obtained using 1 mg L⁻¹ BAP and agar. For the dry mass, agar showed the highest average when associated to 1 mg L⁻¹ of BAP, however, no significant difference was observed at 0 and 3 mg L⁻¹. Thus, the use of agar and 1 mg L⁻¹ of BAP is recommended. However, as an alternative to agar carbonized rice husk without the growth regulator, but a reduction of up to 35.8% in the survival rate and 53.8% in the number of in *in vitro* multiplication of *O. baueri*.

Key words: agar; agricultural waste; growth regulator; micropropagation; substrates

Introdução

A família Orchidaceae apresenta relevante importância ambiental e econômica, com flores muito apreciadas por colecionadores e comerciantes (Stefanello et al., 2009). Nesta família, a *Oncidium baueri* Lindl. faz parte do grupo das orquídeas nativas do Brasil cultivada e comercializada em vaso, embora o uso de suas hastes florais como flor de corte e a utilização da planta em projetos paisagísticos venha ganhando destaque na floricultura (Lorenzi & Souza, 2001; Faria et al., 2006).

A obtenção de mudas de orquídeas pode ser feita por propagação sexuada ou vegetativa. No entanto, além da variabilidade genética e da fase de juvenilidade, as sementes das orquídeas, de maneira geral, são desprovidas de endosperma e apresentam baixa porcentagem de germinação em condições ambientais naturais. Em virtude disso, a utilização da micropropagação para a produção comercial de mudas é uma alternativa promissora, em função da maior quantidade e qualidade das mudas obtidas, além da otimização do uso do espaço produtivo (Faria et al., 2010).

Devido à necessidade da infraestrutura de laboratório, de mão de obra especializada e uso de determinados reagentes artificiais, a micropropagação apresenta um custo de produção elevado (Junghans & Souza, 2006; Costa et al., 2007). Em relação aos reagentes, o ágar promove condições ideais de suporte para as plântulas; porém, com o objetivo de reduzir custos de produção, observa-se uma tendência em substituir este material por outros que solidifiquem o meio de cultura e propiciem desenvolvimento adequado aos explantes.

Alguns estudos com essa finalidade foram realizados com *Pinus* sp. (Golle et al., 2010); *Ananas* sp. (Oliveira et al., 2015a; Oliveira et al., 2015b); *Laelia tenebrosa* (Orchidaceae) (Fialho et al., 2011) e *Oncidium baueri* (Orchidaceae) (Rodrigues et al., 2016). Dentre os materiais testados para substituir o ágar está o amido de milho, a vermiculita, as espumas de poliuretano e a fibra de coco.

Além do material usado no meio de cultura para propiciar o suporte das plantas, para que o processo de multiplicação ocorra de maneira satisfatória é fundamental o controle do balanço hormonal (Pasa et al., 2012), e segundo Schuch & Erig (2015), o uso de reguladores de crescimento, juntamente com as formulações básicas dos meios de cultura, é imprescindível para que se obtenha êxito na propagação de algumas culturas *in vitro*. Como as citocininas estimulam a divisão e o alongamento celular (Castro et al., 2008), a 6-benzilaminopurina (BAP) tem se revelado eficiente em muitas espécies (Grattapaglia & Machado, 1998; Santos et al., 2010; Rodrigues et al., 2016) e tem sido utilizada comercialmente no processo de multiplicação.

Considerando a necessidade de ampliar as informações a respeito do uso de substratos em substituição ao ágar no meio de cultura, bem como verificar a concentração ideal de BAP na multiplicação *in vitro* de orquídeas, este

trabalho teve como objetivo avaliar o uso de casca de arroz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de *O. baueri*.

Material e Métodos

O experimento foi realizado entre julho e novembro de 2015. Plantas micropropagadas de *O. baueri* com 6 meses de cultivo e $2,0 \pm 0,2$ cm de altura foram utilizadas neste experimento.

O delineamento experimental foi em esquema bifatorial, com quatro repetições, sendo utilizados cinco explantes por repetição. O primeiro fator foi representado pelos resíduos agrícolas como agentes solidificantes: ágar (6 g L^{-1}), casca arroz *in natura* (6 g frasco^{-1}) e casca arroz carbonizada (12 g frasco^{-1}); e o segundo de concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP): 0; 1; 2 e 3 mg L^{-1} .

Os substratos casca de arroz *in natura* e casca de arroz carbonizada foram autoclavados a 120°C e 1,5 atm de pressão, por 20 min, antes de serem acrescidos aos frascos.

Os explantes com duas folhas, $2,0 \pm 0,2$ cm de comprimento, sem a presença de raízes foram subcultivados em frascos de vidro de 250 mL em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), com a metade dos macronutrientes; 100 mg L^{-1} mio-inositol e 30 g L^{-1} de sacarose, acrescido dos fatores de tratamento. O pH do meio foi ajustado para 5,8 e, posteriormente, foram acondicionados em cada frasco 30 mL do meio de cultura líquido. Em seguida, realizou-se a autoclavagem a 120°C e 1,5 atm de pressão, por 20 min.

Os frascos foram vedados com papel alumínio e filme plástico transparente na parte superior e mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 h, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e intensidade luminosa de $27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Após quatro meses, as variáveis analisadas foram: porcentagem de sobrevivência; número de folhas; número de brotações; comprimento da parte aérea (cm); massa de matéria fresca e seca de parte aérea (g).

O comprimento de parte aérea foi realizado com o auxílio de uma régua graduada em milímetros. Para a determinação da massa de matéria fresca e seca de parte aérea foi utilizada uma balança de precisão. A massa de matéria seca de parte aérea foi registrada após secagem em estufa a 50°C até peso constante.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, através do software SASM-Agri.

Resultados e Discussão

Para as variáveis porcentagem de sobrevivência, número de brotações e número de folhas, observou-se efeito significativo apenas para os resíduos agrícolas usados como estruturadores físicos na multiplicação *in vitro* de *O. baueri* (Tabela 1).

Com relação à porcentagem de sobrevivência, a utilização de ágar no meio de cultura proporcionou a maior média,

Tabela 1. Médias de porcentagem de sobrevivência, número de brotações e número de folhas, em função dos estruturadores físicos do meio na multiplicação *in vitro* de *Oncidium baueri*. Pelotas-RS, 2015.

Estruturador físico do meio de cultura	Variável analisada		
	Sobrevivência (%)	Número de brotações	Número de folhas
Casca de arroz carbonizada	63 b ^{1/}	1,4 ab	3,8 b
Casca de arroz	55 b	1,0 b	4,7 b
Ágar	98 a	2,6 a	10,0 a
C.V (%)	42,9	87,3	41,5

^{1/} Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \geq 0,05$). C.V.: coeficiente de variação.

diferindo estatisticamente da casca de arroz *in natura* e da casca de arroz carbonizada (Tabela 1).

Em estudo com *O. baueri*, Rodrigues et al. (2016) utilizando os substratos fibra de coco e vermiculita em substituição ao ágar obtiveram a maior taxa de sobrevivência na vermiculita, seguido da fibra de coco. Golle et al. (2010) trabalhando com meio de cultura alternativo, composto por amido de milho (*Zea mays*) e água, não observaram diferenças estatísticas para a germinação *in vitro* de sementes *Pinus taeda* L. Da mesma forma, Oliveira et al. (2015b) não constataram diferenças estatísticas para a sobrevivência *in vitro* de abacaxizeiro (*Ananas comosus*) 'Vitória', mediante o uso de amido de milho como agente geleificante do meio de cultura.

Para o número de brotações, a maior média foi verificada no meio de cultura com ágar, não diferindo estatisticamente do meio em que os explantes foram mantidos com casca de arroz carbonizada (Tabela 1). Apesar da casca de arroz *in natura* ter apresentado a menor média, não diferiu estatisticamente da casca de arroz carbonizada.

Em nosso estudo com *O. baurei*, o meio $1/2$ MS acrescido de BAP, tanto com o ágar, quanto com a casca de arroz carbonizada e a casca de arroz *in natura* como estruturadores, não apresenta efeito significativo para brotações. Resultados semelhantes são descritos por outros autores. Faria et al. (2006) avaliando materiais inertes e esfagno na propagação *in vitro* de *O. baueri*, observaram que não houve diferença entre o ágar e a espuma picada na emissão de brotações, assim como o observado neste trabalho, onde a casca de arroz carbonizada não diferiu do ágar em relação às brotações. Além disso, Araújo et al. (2006) testando o uso de reguladores de crescimento, dentre eles o BAP, encontraram maior número de brotos em meio MS sem reguladores de crescimento em *Brassocattleya* 'Pastoral' x *Laeliocattleya* 'Amber Glow'.

O uso do ágar como estruturador físico do meio promoveu a formação de maior número de folhas, com valores diferentes significativamente dos demais tratamentos (Tabela 1). Tal variável é determinante para a multiplicação e o estabelecimento das plantas *in vitro*, pois está ligada diretamente com o metabolismo de desenvolvimento e crescimento vegetal (Castro et al., 2008).

Outros estudos demonstram que os materiais usados em substituição ágar podem influenciar nas respostas fisiológicas. Pereira et al. (2015) não verificaram diferenças estatísticas entre o uso de amido de milho em substituição ao ágar, quando analisaram o número de folhas na propagação *in vitro* de abacaxizeiro. Gallo et al. (2014) também não encontraram diferenças estatísticas para número de folhas, quando compararam ágar e outros materiais, como espuma de poliuretano e papel filtro na multiplicação *in vitro* da orquídea *Cattleya loddigesii*.

Vários trabalhos demonstram ampla utilização do ágar para a micropropagação de plantas, tendo em vista que apresenta condições de suporte ideal, pH relativamente baixo e pouca variação após a autoclavagem (Faria et al., 2002; Scholten & Pierik, 1998a). Entretanto, podem apresentar alta quantidade de oligoelementos, como cloro e sódio, o que influencia o desenvolvimento de algumas plantas (Scholten & Pierik, 1998a; 1998b). Nesse sentido, a casca de arroz *in natura* ou carbonizada apresenta características interessantes para a micropropagação, além de ser um resíduo que não necessita passar por tratamento químico para ser utilizado. Segundo análises realizadas por Takane et al. (2013) a casca de arroz carbonizada apresenta grande porosidade, pouca variação no pH e acidez, além de estabilidade de estrutura.

A análise da massa fresca e seca de parte aérea apresentou interação entre as concentrações de BAP e os estruturadores físicos testados (Tabela 2). Em relação à massa de matéria fresca de parte aérea, comparando os resíduos agrícolas em relação às concentrações de BAP, verifica-se que no cultivo em ágar, as plantas apresentaram maior massa em comparação com ao cultivo em casca de arroz carbonizada e a casca de arroz *in natura*, independente da concentração de BAP utilizada (Tabela 2).

Tabela 2. Massa de matéria fresca de parte aérea e seca de parte aérea em função dos estruturadores físicos do meio e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de *Oncidium baueri*. Pelotas, 2015.

Estruturadores físicos do meio	Concentrações de BAP (mg L ⁻¹)			
	0	1	2	3
Massa de matéria fresca de parte aérea (g)				
Casca de arroz carbonizada	0,08 b ^{1/} A ^{2/}	0,21 bA	0,24 aA	0,30 abA
Casca de arroz <i>in natura</i>	0,20 abA	0,21 bA	0,18 aA	0,16 bA
Ágar	0,60 aB	2,40 aA	0,33 aB	0,50 aB
C.V	72,8	28,2	59,1	37,8
Massa de matéria seca de parte aérea (g)				
Casca de arroz carbonizada	0,01 bA	0,01 bA	0,01 bA	0,02 bA
Casca de arroz <i>in natura</i>	0,02 bA	0,01 bA	0,01 bA	0,01 bA
Ágar	0,06 aAB	0,12 aA	0,04 aB	0,06 aAB
C.V (%)	51,6	54,0	54,4	34,7

^{1/} Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \geq 0,05$). ^{2/} Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \geq 0,05$). C.V: coeficiente de variação.

Analisando as concentrações de BAP dentro de cada tipo de substrato, na massa de matéria fresca de parte aérea, para casca de arroz carbonizada e casca de arroz *in natura* não houve diferença estatística entre as concentrações de BAP testadas (Tabela 2). No entanto, para o ágar, na concentração de 1 mg L⁻¹ de BAP foi obtida a maior média, diferindo das concentrações 0, 2 e 3 mg L⁻¹.

Quanto à massa de matéria seca de parte aérea, comparando os tipos de substratos em cada concentração de BAP, o ágar apresentou a maior média, diferindo estatisticamente da casca de arroz carbonizada e da casca de arroz *in natura* para todas as concentrações de BAP testadas (Tabela 2).

Quando comparadas as concentrações de BAP dentro de cada tipo de substrato, para casca de arroz carbonizada e casca de arroz *in natura*, não houve diferença estatística entre as concentrações analisadas. Para o ágar, a maior média foi observada na concentração de 1 mg L⁻¹; não diferindo estatisticamente das concentrações 0 e 3 mg L⁻¹, onde ambas apresentaram média de 0,06 g de massa seca de parte aérea (Tabela 2). Resultado similar foi demonstrado por Rodrigues et al. (2016) na micropropagação de *O. baueri*, onde 1,0 mg L⁻¹ de BAP promoveu as maiores taxas de multiplicação. Para outras espécies de orquídeas como *Epidendrum ibaguense*, Santos et al. (2010) verificaram que o uso de 3,6 mg L⁻¹ de BAP induziu maior desenvolvimento da parte aérea; enquanto Pauw et al. (1995) avaliando as citocininas BAP, 2iP e cinetina na micropropagação de *Cypripedium candidum* ex Willd, concluíram que o BAP e o 2iP promoveram o maior crescimento em concentrações inferiores a 1,0 mg L⁻¹.

Com base no exposto, pode-se inferir que a concentração ideal de reguladores de crescimento, como o BAP, na fase de multiplicação *in vitro* é variável, em função da espécie. Em relação ao uso de materiais como estruturadores físicos no meio de cultura, no presente experimento o ágar, em geral, propiciou as maiores médias para todas as variáveis estudadas, mas a casca de arroz carbonizada pode representar uma alternativa para a substituição do ágar na multiplicação *in vitro* de *O. baueri*. Considerando que esse resíduo está disponível em abundância em alguns estados brasileiros, como o Rio Grande do Sul, tal uso também contribuirá para a redução do volume do mesmo no meio ambiente, além desse resíduo apresentar custo inferior ao ágar.

Como houve redução de até 35,8% na taxa de sobrevivência e 53,8% no número de brotações, outros estudos devem ser realizados, visando aperfeiçoar a micropropagação dessa orquídea mediante a utilização de estruturadores físicos para a substituição do ágar, o que poderá representar uma alternativa para a redução nos custos de produção.

Conclusão

O ágar e a concentração de 1 mg L⁻¹ de 6-Benzilaminopurina são os mais indicados para a multiplicação *in vitro* de *O. baueri*.

Como alternativa para a substituição do ágar, a casca de arroz carbonizada pode ser utilizada sem 6-Benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* dessa orquídea.

Literatura Citada

- Araújo, A.G.; Pasqual, M.; Silva, A. B.; Villa, F.; Rocha, H.S.; Costa, F.C. Propagação *in vitro* de plântulas de orquídea em diferentes meios de cultura e concentrações de citocinina. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, v.2, n.2, p.68-73, 2006. <http://www.abctp.ufla.br/v2n2.pdf>. 22 Abr. 2017.
- Castro, P.R.C.; Kluge, R.A.; Sestari, L. Manual de fisiologia de vegetal: fisiologia de cultivos. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres, 2008. 864p.
- Costa F.H.S.; Pereira, M.A.A.; Oliveira, J.P. de; Pereira, J.E.S. Efeito de agentes geleificantes alternativos no meio de cultura no cultivo *in vitro* de abacaxizeiro e bananeira. *Ciência e Agrotecnologia*, v.31, n.1, p.41-46, 2007. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542007000100006>.
- Faria, R.T.; Assis, A.M. de; Fiúza, J.R.P.C. Cultivo de Orquídeas. Londrina: Editora Mecenaz, 2010. 208p.
- Faria, R.T.; Dalio, R.J.D.; Unemoto, L.K.; Silva, G.L. da. Propagação *in vitro* de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de ágar. *Acta Scienciarum. Agronomy*, v.28, n.1, p.71-74, 2006. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v28i1.1672>.
- Faria, R.T.; Santiago, D.C.; Saridakis, D.P.; Albino, U.B.; Araújo R. 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. <https://doi.org/10.12702/1984-7033.v02n03a24>.
- Fialho, S.F.; Dovale, J.C.; Sobreira, F.M.; Schmildt, E.R. Comportamento de plântulas de *Laelia tenebrosa* Rolfe (Orchidaceae), inoculadas *in vitro* sob diferentes substratos. *Idesia (Arica)*, v.29, n.1, p.103-105, 2011. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292011000100014>.
- Gallo, F.G.; Kuhn, B.C.; Milaneze-Gutierrez, M.A. Cultivo *in vitro* de *Cattleya loddigesii* (Orchidaceae) sobre suportes alternativos ao ágar. *SaBios: Revista Saúde e Biologia*, v.9, n.3, p.17-22, 2014. <http://revista.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios2/article/view/1450>. 22 Abr. 2017.
- Golle, D.P.; Reiniger, L.R.S.; Curti, A.R.; Hanauer, J.G.; Waldow, D.A.G. Substratos alternativos e tratamentos pré-germinativos na germinação *in vitro* de sementes de *Pinus taeda* L. *Revista Árvore*, v.34, n.1, p.39-48, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622010000100005>.
- Grattapaglia, D.; Machado, M.A. Micropropagação. In: Torres, A.C.; Caldas, L. S.; Buso, J. A. (Eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2013. v.2, p.183-260.
- Junghans, T.G.; Souza, A.S. Aspectos práticos da micropropagação de plantas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2013. 407p.
- Lorenzi, H.; Souza, H.M. Plantas Ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2001. 1088p.

- Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, n.3, p.473-497, 1962. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Oliveira, R. da S.; Pereira, M.R.; Carvalho, V.S.; Lucas, E. de F.; Gravina, G. de A. Amido e hipoclorito de sódio no enraizamento *in vitro* do abacaxizeiro 'Gold' e seus efeitos na aclimatização. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.37, n.2, p.273-280, 2015a. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-120/14>.
- Oliveira, R. da S.; Pereira, M.R.; Carvalho, V.S.; Silva, J.R. da; Camostrini E. Esterilização química e agentes geleificantes alternativos na propagação vegetativa *in vitro* do abacaxizeiro 'Vitória'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.37, n.4, p.819-826, 2015b. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-121/14>.
- Pasa, M. da S.; Carvalho, G.C.; Schuch, M.W.; Schmitz, J.D.; Torchelsen, M. de M.; Nickel, G.K.; Sommer, L.S.; Lima, T.S.; Camargo, S.S. Qualidade de luz e fitorreguladores na multiplicação e enraizamento *in vitro* da amoreira-preta 'Xavante'. *Ciência Rural*, v.42, n.8, p.1392-1396, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782012000800010>.
- Pauw, M.A.; Remphrey, W.R.; Palmer, C.E. The cytokinin preference for *in vitro* germination and protocorm growth of *Cypripedium candidum*. *Annals of Botany*, v.75 n.3, p.267-275, 1995. <https://doi.org/10.1006/anbo.1995.1020>.
- Pereira, M.R.; Carvalho, V.V.; Lucas, E. de F.; Gravina, G. de A. Amido de milho e hipoclorito de sódio no enraizamento *in vitro* do abacaxizeiro 'Vitória' e seu efeito na aclimatização. *Revista Brasileira Fruticultura*, v.37, n.2, p.528-533, 2015. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-122/14>.
- Rodrigues, D.B.; Nadal, M.C.; Camargo, S.S.; Assis, A.M.; Schuch, M.W.; Peil, R.M.N.; Faria, R.T. Reguladores de crescimento e substratos para a micropropagação de *Oncidium baueri* Lindl. *Semina: Ciências Agrárias*, v.37, n.5, p.2901-2910, 2016. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n5p2901>.
- Santos, M.R.A. dos; Ferreira M. das G.R.; Marques, M.G. BAP e AIB no cultivo *in vitro* de *Epidendrum ibaguense* Kunth. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, v.6, n.2, p.90-98, 2010. <http://177.105.2.193/ojs/index.php/PlantCellCultureMicropropagation/article/view/72>. 21 Ab. 2017.
- Scholten, H.J.; Pierik, R.L.M. Agar as a gelling agent: chemical and physical analysis. *Plant Cell Reports*, v.17, n.3, p.230-235, 1998a. <https://doi.org/10.1007/s002990050384>.
- Scholten, H.J.; Pierik, R.L.M. Agar as a gelling agent: differential biological effects *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, v.77, n.1-2, p.109-116, 1998b. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(98\)00165-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(98)00165-4).
- Schuch, M.W.; Erig, A.C. Micropropagação de plantas frutíferas. In: Fachinello, J.C.; Hoffmann, A.; Nachtigal, J.C. (Eds.). *Propagação de plantas frutíferas*. 1.ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p.155-173.
- Stefanello, S.; Silveira, E.V.; Oliveira, L.K.; Besson, J.C.F.; Dutra, G.M.N. Eficiência de substratos na aclimatização de plantas de *Miltonia flavescens* Lindl. propagadas *in vitro*. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, v.2, n.3, p.467-476, 2009. <http://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/rama/article/view/1180>. 09 Abr. 2017.
- Takane, R.J.; Yanagisawa, S.S.; Góis, E. de A. *Técnicas em substratos para floricultura*. Fortaleza: Expressão Gráfica e Editora, 2013. 132p.