

## AGRÁRIA

Revista Brasileira de Ciências Agrárias  
ISSN (on line) 1981-0997  
v.7, suplemento, p.756-760, 2012  
Recife, PE, UFRPE. www.agraria.ufrpe.br  
DOI:10.5039/agraria.v7isa1930  
Protocolo 1930 - 11/11/2011 • Aprovado em 09/07/2012

Renato F. Galdiano Júnior<sup>1,2</sup>

Cibele Mantovani<sup>1,3</sup>

Eliana G. de M. Lemos<sup>1,4</sup>

# Seleção de agentes alternativos ao ágar para propagação de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae)

## RESUMO

Objetivou-se avaliar o crescimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* em agentes alternativos ao Agar, a partir de amido e matrizes físicas com posterior aclimatização das plântulas geradas. Protocormos com 90 dias após a semeadura (0,5 cm de comprimento) foram subcultivados em meio de cultura ½ MS entre os tratamentos constituídos de ágar 7 g L<sup>-1</sup> (T<sub>1</sub> que corresponde ao controle), ágar 3,5 g L<sup>-1</sup> associado à fécula de mandioca 30 g L<sup>-1</sup> (T<sub>2</sub>), fécula de mandioca 60 g L<sup>-1</sup> (T<sub>3</sub>), fibra de algodão (T<sub>4</sub>) e espuma de poliuretano picada (T<sub>5</sub>). As plântulas foram repicadas mensalmente nesses tratamentos por mais 150 dias e, ao término do cultivo *in vitro*, as plântulas foram retiradas dos frascos e analisadas as características biométricas, sendo em seguida aclimatizadas em casa de vegetação durante 120 dias e avaliadas a sobrevivência e a taxa de crescimento relativo (TCR). Para o substrato composto por espuma de poliuretano picada (T<sub>5</sub>) constatou-se maior eficiência para o crescimento *in vitro*, além de maiores taxas de sobrevivência e crescimento relativo enquanto o substrato fécula de mandioca 60 g L<sup>-1</sup> (T<sub>3</sub>) proporcionou atraso no crescimento das plântulas. Portanto, a espuma de poliuretano picada é recomendada por ser de baixo custo e reunir características adequadas para a propagação *in vitro* e aclimatização de *Cattleya loddigesii*.

**Palavras-chave:** aclimatização, alternativas de baixo custo, cultivo *in vitro*, orquídea

## Selection of alternative agents to agar for the propagation of *Cattleya loddigesii* (Orchidaceae) plantlet

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* growth of *Cattleya loddigesii* in alternative agents to agar with starch and physical matrix with acclimatization of regenerated plants. Protocorms with 90 days after sowing (0.5 cm of length) were subcultured in ½ MS culture medium among the treatments consisting of: agar 7 g L<sup>-1</sup> (T<sub>1</sub>, which corresponds the control), agar 3,5 g L<sup>-1</sup> with cassava starch 30 g L<sup>-1</sup> (T<sub>2</sub>), cassava starch 60 g L<sup>-1</sup> (T<sub>3</sub>), cotton fiber (T<sub>4</sub>) and chopped polyurethane foam (T<sub>5</sub>). Plantlets were retained in these treatments for over 150 days, and at the end of *in vitro* culture, were analyzed by their biometric data and acclimatized in a greenhouse during 120 days and evaluated the survival and relative growth rate (RGR). The substrate comprising of chopped polyurethane foam (T<sub>5</sub>) showed greater efficiency for growth *in vitro* and also increased survival rate, while substrate cassava starch (T<sub>3</sub>) provided delay for plantlet growth. Therefore, chopped polyurethane foam is recommended because of low cost and suitable characteristics for the propagation of *Cattleya loddigesii*.

**Key words:** acclimatization, low cost alternatives, *in vitro* culture, orchid

1 Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Departamento de Tecnologia, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Zona Rural, CEP 14884-900, Jaboticabal-SP, Brasil.  
Fone: (16) 3209-2675 Ramal 217.  
Fax: (16) 3209-2676. E-mail: renatofgaldianojr@yahoo.com.br; orquidariomantovani@ig.com.br; egerle@fcav.unesp.br

2 Bolsista de Doutorado do CNPq

3 Bolsista de Iniciação Científica do CNPq

4 Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq

## INTRODUÇÃO

Orchidaceae é uma família bastante diversificada, com distribuição cosmopolita e plantas de valor ornamental em virtude da beleza, durabilidade e ampla diversidade morfológica de suas flores (Chai et al., 2007). *Cattleya* é um gênero representado por mais de 48 espécies nativas da América tropical (Pridgeon & Morrison, 2006) sendo a *Cattleya loddigesii* uma epífita brasileira de tamanho médio, com cerca de 30 cm de altura, flores com 7 a 8 cm de diâmetro, cuja época de floração é entre os meses de inverno e primavera (Watanabe & Morimoto, 2007).

A propagação *in vitro* de orquídeas constitui-se numa técnica viável e convencional para a aquisição de plantas sadias em larga escala (Stancato et al., 2001) haja vista que sua utilização é indispensável para a germinação em condições artificiais e o melhoramento genético. Não apenas espécies de interesse comercial são beneficiadas por esta produção massal mas também aquelas que estão em risco de extinção; além disso, por meio da propagação *in vitro* também é possível executar clonagens e assim efetivar a propagação e fixação de genótipos consagrados em curtos períodos de tempo (Faria et al., 2012).

O sucesso dos métodos de cultura *in vitro* se deve a uma compreensão melhor dos requerimentos nutricionais das células e tecidos, tipo de explante, genótipo, condições ambientais e processo de aclimatização (Costa et al., 2009). O meio de cultura amplamente utilizado para cultivo *in vitro* é o MS (Santos-Serejo et al., 2006) mas modificações na concentração dos sais macronutrientes deste meio têm sido utilizadas por pesquisadores no cultivo de algumas orquídeas brasileiras (Rego-Oliveira & Faria, 2005).

Neste processo, o ágar é o gelificante mais utilizado por oferecer características que proporcionam bom suporte para as plântulas, pois é estável, com alta claridade, natureza atóxica e resistência aos metabólitos da cultura (McLachlan, 1985). Porém o ágar é um dos componentes mais dispendiosos para a cultura de tecidos de plantas (Caldas et al., 1998; Junghans et al., 2009) sendo sua substituição por materiais alternativos uma medida conveniente para a redução de despesas com a técnica de cultivo *in vitro* (Faria et al., 2006).

Na escolha de agentes de baixo custo para a substituição do ágar iniciativas que envolvam a utilização de alguns amidos ou gomas vegetais (Nagamori et al., 2001; Dabai & Muhammad, 2005; Costa et al., 2007) e matrizes físicas para a propagação de plantas medicinais são importantes (Moraes-Cerdeira et al., 1995). Para a regeneração e crescimento *in vitro* de *Dendrobium chrysotoxum*, Jain & Babar (2005) reportaram que isugbol (um derivado de sementes de *Plantago ovata*) e goma Katira (um exudato da casca de *Cochlospermum religiosum*) proporcionaram resultados ainda mais favoráveis que o ágar. A espuma de poliuretano foi selecionada como substituto ao ágar no meio de cultura para o crescimento *in vitro* da *Oncidium baueri* (Faria et al., 2006).

Assim, o objetivo neste estudo foi avaliar a eficiência da fécula de mandioca, associada ou não ao ágar, tal como as matrizes físicas fibra de algodão e espuma de poliuretano como substitutas ao ágar para o crescimento *in vitro* e aclimatização de plântulas de *Cattleya loddigesii*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Cápsulas fechadas com sementes maduras da espécie *Cattleya loddigesii* foram superficialmente desinfestadas em etanol 70%, por 5 minutos, seguido de hipoclorito de sódio com 1% de cloro ativo durante 30 minutos e enxaguadas três vezes com água destilada e esterilizada em autoclave, sendo todo o procedimento em câmara de fluxo. As sementes foram inoculadas em frascos de vidro com tampas plásticas que permitiam trocas gasosas (mod. Bio-Sama PP63, Samavidros®) com 250 mL de capacidade e contendo 40 mL do meio nutritivo MS reduzido e esterilizado em autoclave a 121 °C e 1,1 atm durante 15 minutos (Caldas et al., 1998).

O meio MS reduzido consistiu da formulação proposta por Murashige & Skoog (1962) com metade da concentração de sais macronutrientes e concentração total de micronutrientes, suplementado com vitaminas, inositol e glicina (Costa et al., 2009), 2% de sacarose, pH ajustado para 5,7 e geleificado com 0,7% de ágar (tipo E, Sigma®). A germinação e o crescimento ocorreram em sala de incubação em condições controladas (temperatura de 25 ± 2 °C e iluminação incidente nos frascos de aproximadamente 75 μmol m<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas com luz).

Decorridos 90 dias explantes com cerca de 0,5 cm de comprimento e com presença de dois folíolos foram transferidos para os tratamentos ágar 7 g L<sup>-1</sup> (T<sub>1</sub> que corresponde ao controle), ágar 3,5 g L<sup>-1</sup> associado à fécula de mandioca 30 g L<sup>-1</sup> (T<sub>2</sub>), fécula de mandioca 60 g L<sup>-1</sup> (T<sub>3</sub>), fibra de algodão (T<sub>4</sub>) e espuma de poliuretano picada (T<sub>5</sub>) e distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado.

As plântulas foram repicadas novamente em intervalos de 30 dias para o respectivo tratamento até 240 dias após a semeadura sendo que, para cada tratamento, se utilizava cinco repetições contendo 12 plântulas, como preconizado por Soares et al. (2008) para o maior crescimento *in vitro* desta espécie, totalizando 300 plântulas.

Após a fase *in vitro* foram avaliados as medidas biométricas do número de raízes (NR), o comprimento da maior raiz (CMR), o número de folhas (NF), o comprimento da maior folha (CMF) a massa fresca (MF) e seca (MS). A massa seca total foi inferida a partir de 20 exemplares selecionados aleatoriamente entre as repetições de cada tratamento os quais, por sua vez, foram colocados separadamente em pacotes de papel Kraft e submetidos a estufa a 60 °C por no mínimo 72 horas até a obtenção de peso constante; ainda foi mensurado o pH do meio de cultura nos frascos em pHmetro de bancada (mod. Analyser pH 300).

Decorridos 120 dias de aclimatização em casa de vegetação, as plântulas foram avaliadas quanto à sobrevivência (%), massa de matéria seca e analisada a taxa de crescimento relativo de cada tratamento (TCR) por meio da fórmula:  $TCR = \log(MS_f) - \log(MS_i) / (T_f - T_i)$  em que MS<sub>f</sub> = massa seca final, MS<sub>i</sub> = massa fresca inicial, T<sub>f</sub> = tempo final e T<sub>i</sub> = tempo inicial (Benincasa, 2003).

Os dados foram transformados em  $(x + 1)^{1/2}$  e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, por meio do programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2008).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento de plântulas de *Cattleya loddigesii* foi influenciado pelo material utilizado como suporte ao meio de cultura *in vitro*, sendo que a espuma de poliuretano picada (T<sub>5</sub>) proporcionou condições para a maior eficiência no crescimento entre as variáveis analisadas enquanto a utilização de fécula de mandioca (T<sub>3</sub>) foi ineficiente (Tabela 1).

As maiores médias de todas as variáveis foram verificadas entre os tratamentos T<sub>5</sub> (espuma de poliuretano picada) e T<sub>1</sub> (ágar); entretanto, houve diferenças significativas para as variáveis comprimento da maior raiz e massa seca, nas quais a espuma de poliuretano picada (T<sub>5</sub>) foi mais apropriada para o crescimento *in vitro* da *Cattleya* estudada. Assim como os resultados deste trabalho, Faria et al. (2006) verificaram maior comprimento radicular da *Oncidium baueri* em espuma picada em relação ao ágar.

Os resultados neste estudo referentes ao crescimento *in vitro* da *Cattleya loddigesii* nas condições descritas no trabalho, estão de acordo com os obtidos por Deb & Pongener (2010), para o crescimento da espécie *Cymbidium aloifolium*, os quais observaram que a natureza da matriz física proporcionada pela espuma de poliuretano facilitou o crescimento de raízes *in vitro*, fator este que poderia melhorar a absorção de nutrientes do meio de cultura e propiciar maior crescimento com aumento da massa seca. Somada a este benefício há, ainda, a possibilidade de recomposição apenas do meio de cultura líquido nos frascos, ao invés de realizar um novo subcultivo diminuindo a manipulação e, conseqüentemente, os custos do processo (Deb & Pongener, 2010).

A substituição total do ágar pela fécula de mandioca foi danosa para o crescimento de *Cattleya loddigesii in vitro*, pois se constataram as menores médias para todos as variáveis avaliadas. Esses resultados diferiram dos de Costa et al. (2007) que indicaram a utilização dessa fonte de amido nas concentrações de 60 g L<sup>-1</sup> para a propagação de abacaxi cv. Rio Branco.

Como agente de baixo custo, o amido tem fraca habilidade geleificante, baixa claridade e natureza metabolizável, o que contribui para a alteração da consistência do meio de cultura. A combinação em razão exata de amido e Agar, pode ampliar suas características geleificantes (Sharifi et al., 2010) embora essa resposta não tenha sido verificada para a espécie em estudo. O crescimento de plântulas de *Cattleya loddigesii* foi mais eficiente em meio de cultura geleificado com ágar (T<sub>1</sub>) mediante utilização parcial (T<sub>2</sub>) ou total de amido (T<sub>3</sub>).

**Tabela 1.** Valores médios do número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CMR), número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CMF), massa fresca (MF) e seca (MS) de plântulas de *Cattleya loddigesii*, após 240 dias de cultivo *in vitro*

**Table 1.** Mean values of root number (NR), tallest root length (CMR), number of leaves (NF), leaf length (CMF), fresh mass (MF) and dry mass (MS) of *Cattleya loddigesii* plantlets after 240 days *in vitro* cultivation

Tratamentos	NR	CMR (cm)	NF	CMF (cm)	MF (g)	MS (g)
T <sub>1</sub>	1,71a <sup>1</sup>	3,93b	2,29a	4,72a	8,95a	2,24b
T <sub>2</sub>	1,54b	3,44c	2,18bc	4,21b	7,16b	2,05c
T <sub>3</sub>	1,38c	1,98c	2,11c	3,76c	5,55c	1,81d
T <sub>4</sub>	1,69a	3,52bc	2,14c	4,14b	8,16ab	2,08c
T <sub>5</sub>	1,61ab	4,51a	2,23ab	4,73a	9,15a	2,47a
CV (%)	15,87	24,43	7,47	10,3	25,57	12,21

<sup>1</sup> Médias seguidas por letras distintas em cada coluna diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

Ágar 7 g L<sup>-1</sup> (T<sub>1</sub>, que corresponde ao controle), ágar 3,5 g L<sup>-1</sup> associado à fécula de mandioca 30 g L<sup>-1</sup> (T<sub>2</sub>), fécula de mandioca 60 g L<sup>-1</sup> (T<sub>3</sub>), fibra de algodão (T<sub>4</sub>) e espuma de poliuretano picada (T<sub>5</sub>)

Após o último subcultivo *in vitro* o pH variou entre os agentes utilizados cujos menores valores foram observados no tratamento composto de espuma de poliuretano picado (T<sub>5</sub>), o qual foi significativamente diferente dos demais (Tabela 2). A redução do pH é atribuída a diferentes causas que envolvem a atividade metabólica em decorrência do crescimento dos protocormos em contato com o meio de cultura.

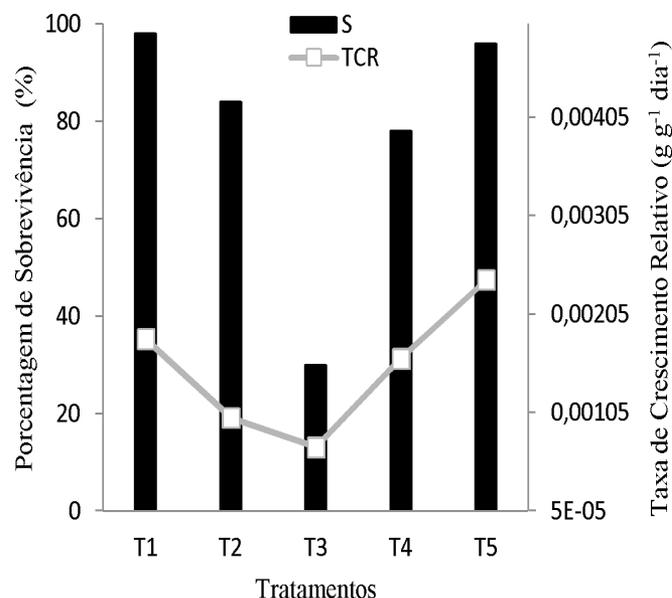
**Tabela 2.** Valores médios de pH do meio de cultura dos tratamentos 30 dias após o último subcultivo *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii*

**Table 2.** Mean values of pH of culture medium of treatments 30 days after the last subculture *in vitro* of *Cattleya loddigesii* plantlets

Tratamentos	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	CV (%)
pH	3,78bc <sup>1</sup>	4,12b	4,31a	4,19a	3,69c	13,51

<sup>1</sup> Médias seguidas por letras distintas em cada coluna diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

Ágar 7 g L<sup>-1</sup> (T<sub>1</sub>, que corresponde ao controle), ágar 3,5 g L<sup>-1</sup> associado à fécula de mandioca 30 g L<sup>-1</sup> (T<sub>2</sub>), fécula de mandioca 60 g L<sup>-1</sup> (T<sub>3</sub>), fibra de algodão (T<sub>4</sub>) e espuma de poliuretano picada (T<sub>5</sub>)



<sup>1</sup> Barras seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

Ágar 7 g L<sup>-1</sup> (T<sub>1</sub>, que corresponde ao controle), ágar 3,5 g L<sup>-1</sup> associado à fécula de mandioca 30 g L<sup>-1</sup> (T<sub>2</sub>), fécula de mandioca 60 g L<sup>-1</sup> (T<sub>3</sub>), fibra de algodão (T<sub>4</sub>) e espuma de poliuretano picada (T<sub>5</sub>)

**Figura 1.** Porcentagem de sobrevivência (S) e taxa de crescimento relativo (TCR) de plântulas de *Cattleya loddigesii* aos 120 dias após aclimatização em casa de vegetação

**Figure 1.** Survival percentage (S) and relative growth rate (TCR) of *Cattleya loddigesii* plantlets 120 days after acclimatization in greenhouse

As reações de troca iônica entre os explantes e o meio nutritivo durante o período de cultivo constituem um dos motivos para redução do pH (Nicoloso et al., 2008). O balanço de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  no meio de cultura e a absorção diferenciada desses íons pelas plantas, participam na variação do pH no meio de cultura. Quando as plantas absorvem íons  $\text{NH}_4^+$  os  $\text{H}^+$  são liberados e contribuem para a redução do pH do meio de cultura (Skirvin et al., 1986).

Assim, o suporte oferecido pela espuma favorece uma condição na qual os protocormos utilizam, com maior eficiência, os nutrientes do meio de cultura fornecido no estado líquido enquanto o meio semissólido com ágar limita a difusão de nutrientes até o explante (Caldas et al., 1998).

Após a aclimatização *ex vitro* foram verificadas diferenças entre a sobrevivência das plântulas dos diversos tratamentos, sendo o  $T_1$  e  $T_5$  (ágar 0,7% e espuma de poliuretano, respectivamente) os tratamentos que proporcionaram maior sobrevivência enquanto o  $T_5$  (60 g  $\text{L}^{-1}$  de fécula de mandioca) a menor (Figura 1). As características do cultivo *in vitro* são de grande importância pois determinam padrões de crescimento que são fundamentais para o bom desempenho das plântulas durante a aclimatização (Chandra et al., 2010). Desta maneira, para as plântulas com maior crescimento *in vitro* (provenientes dos tratamentos  $T_1$  e  $T_5$ ) também se observou maior sobrevivência em casa de vegetação.

Também se observam maiores taxas de crescimento relativo das plântulas entre os tratamentos  $T_1$  (ágar 7 g  $\text{L}^{-1}$  - controle) e  $T_5$  (60 g  $\text{L}^{-1}$  de fécula de mandioca) o que reforça o efeito positivo dos dois tipos de material envolvido. A taxa de crescimento relativo é a velocidade de crescimento a partir das reservas da planta, em gramas por dia (Benincasa, 2003) e seus valores maiores reafirmam os dados inferidos com a análise biométrica e de pH do meio de cultura após o cultivo *in vitro* que foi proporcionado pela matriz física oferecida pela espuma poliuretano picada.

## CONCLUSÃO

A espuma de poliuretano picada é um agente alternativo eficiente ao ágar para o crescimento *in vitro* e aclimatização *ex vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii*.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de pesquisa.

## LITERATURA CITADA

- Benincasa, M. M. P. Análise de crescimento de plantas: noções básicas. Jaboticabal: Funep, 2003. 41p.
- Caldas, L. S.; Haridasan, P.; Ferreira, M. E. Meios Nutritivos. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (Eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. v.1. Brasília: Embrapa CENARGEN, 1998. p.87-132.
- Chai, D.; Lee, S. M.; Ng, J. H.; Yu, H. L-methionine sulfoximine as a novel selection agent for genetic transformation of orchids. *Journal of Biotechnology*, v.131, n.4, p.466-472, 2007. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165607014228>>. 05 Nov. 2011. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.07.951.
- Chandra, S.; Bandopadhyay, R.; Kumar, V.; Chandra, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology Letters*, v.32, n.9, p.1199-1205, 2010. <<http://www.springerlink.com/content/m8011n3405568861>>. 31 Oct. 2011. doi:10.1007/s10529-010-0290-0.
- Costa, F. H. S.; Pereira, M. A. A.; Oliveira, J. P.; 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. <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-705420070001000006&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-705420070001000006&script=sci_arttext)>. 01 Nov. 2011. doi:10.1590/S1413-705420070001000006.
- Costa, M. A. P. C.; Pereira, M. J.; Rocha, M. A.; Hamsen, D. S.; Alves, R. M. O.; Souza, E. H.; Garcia, F. R. Micropropagação de orquídeas. In: Junghans, T. G.; Souza, A. S. (eds.). Aspectos práticos da micropropagação de plantas. Cruz das Almas: Embrapa MFT, v.1, 2009. p.351-370.
- Dabai, Y. U.; Muhammad, S. Cassava starch as an alternative to agar-agar in microbiological media. *African Journal of Biotechnology*, v.4, n.6, p.573-574, 2005. <<http://www.academicjournals.org/AJB/abstracts/abs2005/Jun/Dabai%20and%20Muhammad.htm>>. 22 Oct. 2011.
- Deb, C. R.; Pongener, A. Search of alternative substratum for agar in plant tissue culture. *Current Science*, v.98, n.1, p.99-102, 2010. <[http://www.currentscience.ac.in/php/show\\_article.php?volume=098&issue=01&titleid=id\\_098\\_01\\_0099\\_0102\\_0&page=0099](http://www.currentscience.ac.in/php/show_article.php?volume=098&issue=01&titleid=id_098_01_0099_0102_0&page=0099)>. 02 Nov. 2011.
- Faria, R. T.; Assis, A. M.; Unemoto, L. K.; Carvalho, J. F. R. P. Produção de orquídeas em laboratório. Londrina: Mecenaz, 2012. 116p.
- Faria, R. T.; Dalio, R. J. D.; Unemoto, L. K.; Silva, G. L. Propagação *in vitro* de *Oncidium baueri* Lindl. (Orchidaceae) sem uso de ágar. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v.28, n.1, p.71-74, 2006. <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAgron/article/view/1672/1040>>. 28 Oct. 2011. doi:10.4025/actasciagron.v28i1.1672.
- Ferreira, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium*, v.6, n.1, p.36-41, 2008.
- Jain, R.; Babar, R. B. Guar gum and isubgol as cost-effective alternative gelling alternative agent for *in vitro* multiplication of an orchid, *Dendrobium chrysotoxum*. *Current Science*, v.88, n.2, p.292-295, 2005. <[http://www.currentscience.ac.in/php/show\\_article.php?volume=088&issue=02&titleid=id\\_088\\_02\\_0292\\_0295\\_0&page=0292](http://www.currentscience.ac.in/php/show_article.php?volume=088&issue=02&titleid=id_088_02_0292_0295_0&page=0292)>. 12 Nov. 2011.
- Junghans, T. G.; Souza, A. S.; Santos-Serejo, J. A.; Souza, F. V. D. Redução de custos na micropropagação. In: Junghans, T. G.; Souza, A. S. (eds.) Aspectos práticos da micropropagação de plantas. Cruz das Almas: Embrapa MFT, 2009. p.153-175.

- McLachlan, J. Macroalgae (seaweeds): industrial resources and their utilization. *Plant and Soil*, v.89, n.1-3, p.137-157, 1985. <<http://www.springerlink.com/content/p2735523087j3762>>. doi:10.1007/BF02182240.
- Moraes-Cerdeira, R. M.; Krans, J. V.; Mcchesney, J. D.; Pereira, A. M. S.; França, S. C. Cotton fiber as a substitute for agar support in tissue culture. *HortScience*, v.30, n.5, p.1082-1083, 1995. <<http://hortsci.ashspublications.org/content/30/5/1082.full.pdf+html>>. 21 Oct. 2011.
- 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. <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x/abstract>>. 01 Nov. 2011. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Nagamori, E.; Omote, M.; Honda, H.; Kabayashi, T. Enhanced and prolonged production of plantlets regenerated from carrot callus in a viscous additive-supplemented medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.91, n.3, p.283-287, 2001. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172301801353>>. 12 Nov. 2011. doi:10.1016/S1389-1723(01)80135-3.
- Nicoloso, F. T.; Ferrão, G. E.; Castro, G. Y. pH do meio de cultivo e crescimento de plântulas de ginseng brasileiro cultivadas *in vitro*. *Ciência Rural*, v.38, n.7, p.2059-2062, 2008. <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782008000700043&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782008000700043&script=sci_arttext)>. 10 Oct. 2011. doi:10.1590/S0103-84782008000700043.
- Pridgeon, A.; Morrison, A. The illustrated encyclopedia of orchids: over 1100 species illustrated and identified. Oregon: Timber Press, 2006. p.52.
- Rego-Oliveira, L. V.; Faria, R. T. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v.27, n.1, p.1-5, 2005. <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAgron/article/view/1901/1250>>. 05 Nov. 2011. doi:10.4025/actasciagron.v27i1.1901.
- Santos-Serejo, J. A.; Junghans, T. G.; Soares, T. L.; Silva, K. M. Meios nutritivos para a micropropagação de plantas. In: Souza, A. S.; Junghans, T. G. (eds.) *Introdução à micropropagação de plantas*. Cruz das Almas, BA; Embrapa MFT, 2006. p.79-98.
- Sharifi, A.; Moshtaghi, N.; Bagueri, A. Agar alternatives for micropropagation of African violet (*Saintpaulia ionantha*). *African Journal of Biotechnology*, v.9, n.54, p.9199-9203, 2010. <<http://www.academicjournals.org/AJB/abstracts/abs2010/29Dec%20Special%20Review/Sharifi%20et%20al.htm>>. 10 Oct. 2011.
- Skirvin, R. M.; Chu, M. C.; Mann, M. L.; Young, H.; Sullivan, J.; Fermanian, T. Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. *Plant Cell Reports*, v.5, p.292-294, 1986. <<http://www.springerlink.com/content/q971255531wv702p>>. 22 Sep. 2011. doi:10.1007/BF00269825.
- Soares, J. D. R.; Rodrigues, F. A.; Araújo, A. G. de; Pasqual, M.; Assis, F. A. de. Crescimento *in vitro* de orquídeas: quantidade de meio e número de explantes. *Ceres*, v.55, n.1, p.49-53, 2008. <<http://www.ceres.ufv.br/ceres/revistas/V55N001P00808.pdf>>. 12 Oct. 2011.
- Stancato, G. C.; Bemelmans, P. F.; Vegro, C. L. R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*, v.7, n.1, p.25-33, 2001.
- Watanabe, D.; Morimoto, M. S. *Orquídeas: manual de cultivo*. São Paulo: AOSP, 2007. 347p.