

# Micropropagação de híbridos de orquídea em meio knudson com adição de vitaminas do meio ms, benzilaminopurina e carvão ativado

## Micropropagation of orchid hybrids in knudson culture medium with addiction of vitamins of ms culture medium, benzilaminopurine and activated charcoal

Fabiola Villa<sup>1\*</sup>; Moacir Pasqual<sup>2</sup>; Enoque Fernandes da Silva<sup>3</sup>

### Resumo

Os gêneros *Cattleya* e *Brassavola*, de ocorrência natural no Brasil, são muito utilizados na hibridação para melhorar a forma do labelo nos híbridos. Esta demanda cria a necessidade de desenvolver técnicas mais eficazes de propagação para atender o mercado e contribuir para evitar a extinção destas plantas. Objetivou-se testar concentrações de BAP, carvão ativado, meio de cultura Knudson e vitaminas do meio MS no subcultivo da orquídea *Brassocattleya* Pastoral x *Laeliocattleya* Amber Glow. Os explantes utilizados foram plântulas oriundas de germinação *in vitro*, com tamanho médio de 1-1,5 cm, submetidos à uniformização em meio Knudson durante três meses. Os experimentos foram realizados usando-se concentrações de meio Knudson (0%, 50%, 100%, 150% e 200%) combinadas com concentrações de vitaminas do meio MS (0%, 50%, 100% e 200%) e concentrações de BAP (0; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>) e de carvão ativado (0; 200; 400 e 600 mg L<sup>-1</sup>). Em cada frasco de 250 mL contendo aproximadamente 50 mL de meio, foram colocadas quatro plântulas, sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar. Pode-se utilizar 129% de Knudson, suplementado com 137,5 mg L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 104% de vitaminas do meio MS e sem adição de BAP, como melhor composição de meio de cultura na propagação *in vitro* do híbrido de orquídea. O meio Knudson não promove aumento no sistema radicial.

**Palavras-chave:** *Brassocattleya* Pastoral, *Laeliocattleya* Amber Glow, reguladores de crescimento, cultura *in vitro*

### Abstract

The genera *Cattleya* and *Brassavola*, naturally occurring in Brazil, are widely used in hybridization to obtain better shape of the lip in the hybrids. This demand creates the need to develop more effective propagation to meet the market and contributing to avoid the extinction of these plants. This study aimed to test BAP concentrations, activated charcoal, culture medium Knudson and culture medium MS's vitamins in subculture of *Brassocattleya* Pastoral x *Laeliocattleya* Amber Glow orchids plants. There were used seedlings from *in vitro* germination, with 1-1.5 cm length, undergoing standardization in the culture medium Knudson for three months. The experiment were performed using concentrations of culture medium Knudson (0%, 50%, 100%, 150% and 200%), combined with concentrations of culture medium MS's vitamins (0%, 50%, 100% and 200%) and BAP concentrations (0; 1.0; 2.0 and

<sup>1</sup> Dr<sup>a</sup> em Fitotecnia, Prof<sup>a</sup> Adjunto B, Centro de Ciências Agrárias, CCA, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Campus Marechal Cândido Rondon, PR. E-mail: fvilla2003@hotmail.com

<sup>2</sup> Prof. Titular, Dept<sup>o</sup> de Agricultura, DAG, Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG. E-mail: mpasqual@ufla.br

<sup>3</sup> M.e em Fitotecnia, Pós-Graduação em Agronomia, Dept<sup>o</sup> de Agricultura, DAG, UFLA, Lavras, MG. E-mail: enorquidario@uol.com.br

\* Autor para correspondência

4.0 mg L<sup>-1</sup>) versus activated charcoal (0, 200, 400 and 600 mg L<sup>-1</sup>), incorporated in a culture medium Knudson. In each flask of 250 mL containing approximately 50 mL of culture medium, four seedlings were placed under aseptic conditions. It was concluded that can use 129% of Knudson, supplemented with 137.5 mg L<sup>-1</sup> activated charcoal, 104% of vitamin MS medium without addition of BAP as the best composition for culture medium of hybrid orchid *in vitro* propagation. The Knudson culture medium does not promote increase in the root system.

**Key words:** *Brassocattleya* Pastoral, *Laeliocattleya* Amber Glow, plant growth, *in vitro* culture

## Introdução

A formação de híbridos é uma das principais características hortícolas das orquídeas, entre espécies, gêneros e mais raramente, subtribos. A hibridação artificial em orquidáceas vem ocorrendo a mais de um século, sendo estimada a existência de mais de cem mil híbridos registrados (RAPOSO, 1993). De acordo com as regras do Código Internacional de Nomenclatura de Plantas Cultivadas, o nome dado a híbridos formados por espécies do gênero *Laelia* e *Cattleya*, é *Laeliocattleya*, e híbridos formados por espécies do gênero *Cattleya* e *Brassavola*, é *Brassocattleya* (CUNHA et al., 2011; LA CROIX, 2008).

O elevado número de espécies e híbridos tropicais possibilita variadas formas, cores e flores, exploradas comercialmente em todo mundo. Os gêneros *Cattleya* e *Brassavola*, de ocorrência natural no Brasil (PAULA; SILVA, 2001), são bastante populares e atingem altos preços no mercado interno e externo, procurados por colecionadores, orquidófilos, decoradores de ambiente e consumidores (SILVA et al., 2005).

Técnicas como a cultura de tecidos têm auxiliado na preservação destas espécies, tendo como uma de suas principais vantagens o manuseio de grande número de indivíduos em espaço reduzido e sob condições assépticas. A micropropagação ou propagação *in vitro* tem sido utilizada no Brasil há pouco mais de 25 anos, para aumentar principalmente a produção de mudas, reduzindo seu custo e contribuindo para salvar muitas espécies de orquídeas da extinção (STANCATO; BEMELMANS; VEGRO, 2001).

Os fatores que mais frequentemente determinam o sucesso da cultura de tecidos vegetais são: origem do explante e meio nutritivo onde são cultivados. Vários meios de cultura têm sido testados e um meio específico é identificado pela composição de sais minerais, enquanto as vitaminas, os reguladores de crescimento e outros suplementos orgânicos variam em concentração (VENTURA et al., 2002).

A escolha do meio de cultivo depende da espécie em questão e do propósito da cultura (meristema, organogênese, embriogênese somática e cultivo ou subcultivo de explantes). No cultivo e subcultivo de plântulas dos gêneros *Oncidium* Sw., *Laelia* Lindl. e *Cattleya* Lindl., Unemoto et al. (2007) sugerem o meio MS, com adição de adubo comercial NPK (6-6-8). Segundo Arditti e Ernst (1993) e Schneiders et al. (2012), o meio de propagação utilizado para *Cattleya*, *Laelia*, *Laeliocattleya* e *Brassocattleya* pode ser o Knudson e ½ MS.

Dentre os reguladores de crescimento comumente usados no cultivo *in vitro* está o BAP (6-benzilaminopurina), utilizado na formação de brotações do híbrido *Blc.* Owen Holmes 'Ponkan' x *Brassavola* digbiana n°2 e multiplicação de híbrido de *Brassocattleya* 'Pastoral' x 'Auto' (GIATTI; LIMA, 2007; CARDOSO; ONO, 2011). O carvão ativado normalmente é adicionado ao meio de cultivo em concentrações de 0,2 a 3% (BEYL, 2000) e sua presença pode promover e/ou inibir o crescimento *in vitro*, dependendo da espécie e do tecido utilizados (PAN; van STADEN, 1998).

Diante do exposto, objetivou-se com o presente trabalho testar diferentes concentrações do meio de cultura Knudson, de vitaminas do meio MS, BAP e carvão ativado, no subcultivo *in vitro* do híbrido de

orquídea *Brassiocattleya* Pastoral x *Laeliocattleya* Amber Glow, a fim obter um melhor protocolo para a multiplicação da espécie.

## Material e Métodos

Utilizou-se o híbrido intergenérico de orquídea *Brassocattleya* Pastoral x *Laeliocattleya* Amber Glow, selecionado pelo valor comercial dos progenitores. Os cruzamentos foram obtidos inoculando-se as mássulas de *Laeliocattleya* Amber Glow no estigma de *Brassocattleya* Pastoral. Os experimentos foram realizados em condições assépticas, no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG. As sementes resultantes do cruzamento foram colocadas no meio de cultivo Knudson (KNUDSON, 1946), acrescido de 40 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana e 100 mL L<sup>-1</sup> de água de coco. Após a germinação, foram subcultivadas para meio idêntico ao do semeio, obtendo-se as plântulas.

As plântulas com tamanho médio de 1-1,5cm foram submetidas à uniformização em frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio Knudson e dividida em três experimentos individuais, contendo concentrações do meio Knudson de 0%, 50%, 100%, 150% e 200% associado a 0%, 50%, 100% e 200% de vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>) associadas ao carvão ativado (0; 200; 400 e 600 mg L<sup>-1</sup>). Foram utilizadas quatro plântulas por frasco com tampa plástica e vedados com parafilme, sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, totalizando 320 frascos.

O meio foi solidificado com 6% de ágar e pH ajustado para 5,8, antes do processo de autoclavagem a 121°C, 1 atm, por 20 minutos. Os experimentos foram conduzidos em sala de crescimento com temperatura de 26±1°C e fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa de 2500 lux. Utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado, fatorial duplo, contendo quatro plântulas/parcela e quatro repetições, totalizando 16 plântulas/tratamento.

As avaliações ocorreram 90 dias após suas instalações, analisando-se número de brotos e folhas, altura das plântulas (cm), número de raízes, comprimento médio do sistema radicial (cm) e biomassa fresca da plântula (g). Realizou-se a análise estatística pelo uso do software SAS Institute (2003). Os dados foram analisados por meio de regressão polinomial.

## Resultados e Discussão

Pode-se observar que houve variação para número de brotos, número de folhas, e comprimento médio do sistema radicial, para concentrações do meio Knudson e concentrações de vitaminas do meio MS, adicionadas ao meio. Não houve interação significativa para o uso destes produtos. Para altura das plântulas apenas as concentrações do meio Knudson promoveram efeito significativo, enquanto que, para número de raízes, apenas o uso de concentrações de vitaminas do meio MS apresentou efeito significativo.

As concentrações de BAP suplementadas ao meio Knudson não influenciaram quaisquer das variáveis estudadas. Para as concentrações de carvão ativado houve efeito significativo no número de brotos, número de folhas e no peso da matéria fresca do híbrido analisado.

### Número de brotos

Observa-se na Figura 1A que o meio de cultura sem nutrientes pouco estimulou o número de brotos quando comparado com a concentração de 50% onde se obteve um máximo de dois brotos/explante cultivado. O pequeno efeito no número de brotos promovido na ausência dos nutrientes do meio Knudson pode estar associado à contaminação do ágar com sais e resíduos de reguladores, induzindo a morfogênese de brotos adventícios (PIERIK, 1987) ou devido às reservas existentes no explante, suficientes para iniciar o processo de formação de brotos, ou sua prévia indução no momento da

inoculação (PASQUAL; HOFFMANN; RAMOS, 1998).

A quantidade de nutrientes do meio Knudson parece influenciar o número de brotos emitidos pelo explante do híbrido *BC Pastoral x LC Amber Glow*, quando se aumenta a concentração até 50%, evidenciando a deficiência em nutrientes nas concentrações próximas a 0%, visto que o meio Knudson possui baixos teores em sais nutritivos, quando comparado com outros meios, como o MS (GEORGE, 2008).

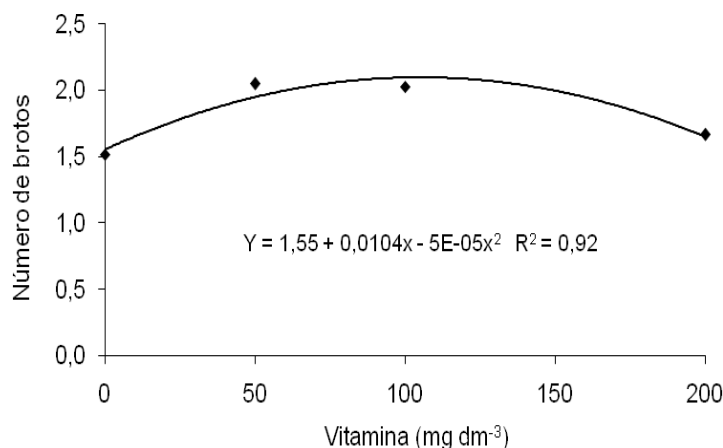
Houve influência positiva na morfogênese das brotações adventícias quando se aumentou a concentração para 50% do meio Knudson (PIERIK, 1987). Concentrações maiores que 50% não promoveram aumento do número de brotos, havendo tendência de estabilização na média de dois brotos, podendo-se supor que o estímulo é dirigido para o crescimento do explante ou para o alongamento do sistema radicial. Na Figura 1B observa-se que a concentração de 50% de vitaminas do meio MS promoveu a melhor resposta para número de brotos, com média máxima de 2,05 brotos por explante.

Vários autores, estudando o crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea, verificaram que a redução em até 50% dos sais do meio de cultivo MS não comprometeu o crescimento, como ocorreu

em *Oncidium varicosum* e *Miltonia flavescens* (MULLER et al., 2007). Porém, híbridos de *BC Pastoral Inocence x Cattleya loddigesii x LC Luminosa* e *BLC Arrow gold x Pot Red crab* tiveram um aumento no número de suas brotações em meio Knudson sem a adição de vitaminas do MS (FIGUEIREDO et al., 2007).

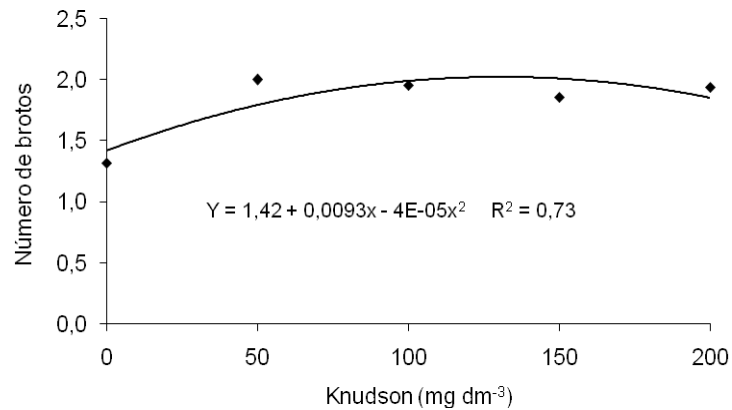
As concentrações de carvão ativado promoveram influência positiva para número de brotos até a concentração de 137,5 mg L<sup>-1</sup> (Figura 1C). Esta influência benéfica pode ser explicada pela provável adsorção de substâncias tóxicas produzidas durante a autoclavagem ou pelos tecidos das plântulas durante o cultivo. Concentrações acima de 137,5 mg L<sup>-1</sup> de carvão ativado passaram a inibir a formação de brotos, provavelmente porque além de adsorver substâncias tóxicas, passaram a adsorver os nutrientes do meio de cultivo, como citado por George (2008) e Guson, Moraes e Ronconi (2012). Resultados antagônicos para adição de carvão ativado ao meio de cultivo foram observados por Villa et al. (2007), na multiplicação de brotações de duas espécies frutíferas de clima temperado. Tal diversidade de resultados *in vitro* está relacionada principalmente ao genótipo da espécie, tecidos, meios de cultivo e/ou reguladores de crescimento empregados nestes estudos.

**Figura 1A.** Número de brotos em plântulas de orquídea *BC Pastoral x LC Amber Glow* cultivadas em variações do meio Knudson.



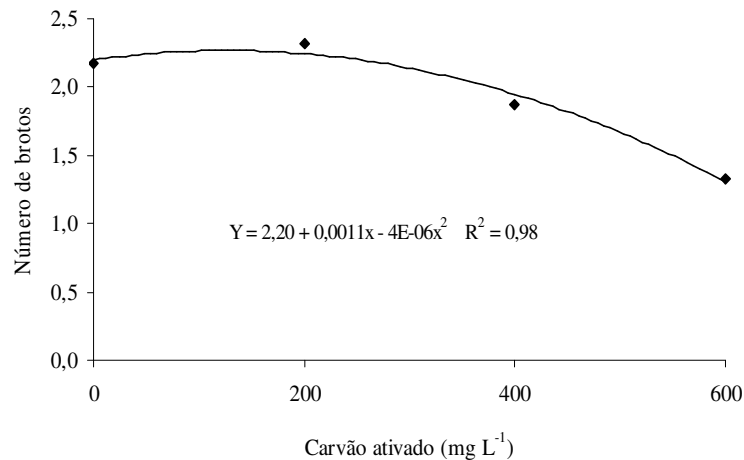
Fonte: Elaboração dos autores.

**Figura 1B.** Número de brotos em plântulas de orquídea *BC Pastoral x LC Amber Glow* cultivadas em variações do meio Knudson suplementado com diferentes concentrações de vitaminas do meio MS.



**Fonte:** Elaboração dos autores.

**Figura 1C.** Número de brotos em plântulas de orquídea *BC Pastoral x LC Amber Glow* cultivadas em meio Knudson suplementado com diferentes concentrações BAP e carvão ativado.



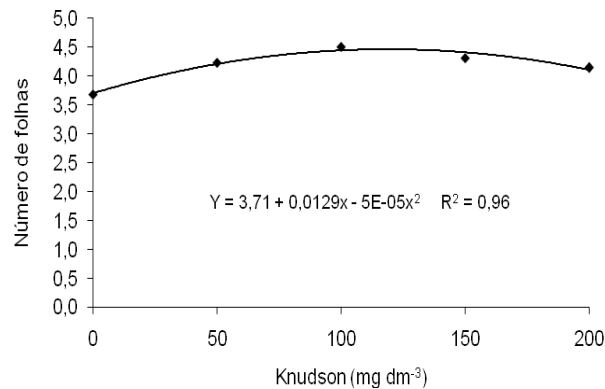
**Fonte:** Elaboração dos autores.

### *Número de folhas*

O número de folhas foi influenciado pelas concentrações do meio Knudson e vitaminas do meio MS de maneira diversa. Na Figura 2A, pode-se observar que a quantidade de folhas aumenta gradativamente até o ponto de máxima da concentração do meio Knudson, provavelmente pelo

aumento da disponibilidade de nutrientes. Como o incremento não foi significativo para número de folhas do híbrido estudado, pode-se utilizar a concentração 100%. A diminuição no número de folhas em concentrações acima da citada pode estar relacionada com o favorecimento do crescimento de folhas pré-existentes no explante em detrimento da morfogênese (GEORGE, 2008).

**Figura 2A.** Número de folhas de plântulas de orquídea *BC Pastoral x LC Amber Glow* cultivadas em variações do meio Knudson.

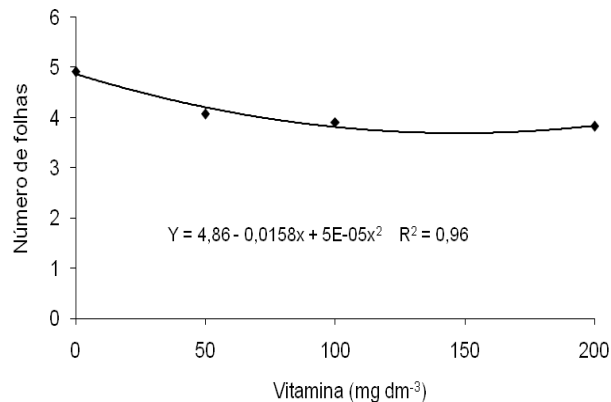


**Fonte:** Elaboração dos autores.

Na Figura 2B observa-se que o aumento gradativo nas concentrações das vitaminas do meio MS reduziu a emissão de novas folhas. As vitaminas do meio MS influenciaram como catalisadores metabólicos no crescimento de órgãos, confirmando

sua função de estimular o crescimento geral das plântulas (GEORGE; SHERRINGTON, 1984). Pode-se inferir que as vitaminas do meio MS não são necessárias seja para promover número de brotos ou para número de folhas.

**Figura 2B.** Número de folhas de plântulas de orquídea *BC Pastoral x LC Amber Glow* cultivadas em variações do meio Knudson suplementado com diferentes concentrações de vitaminas do meio MS.

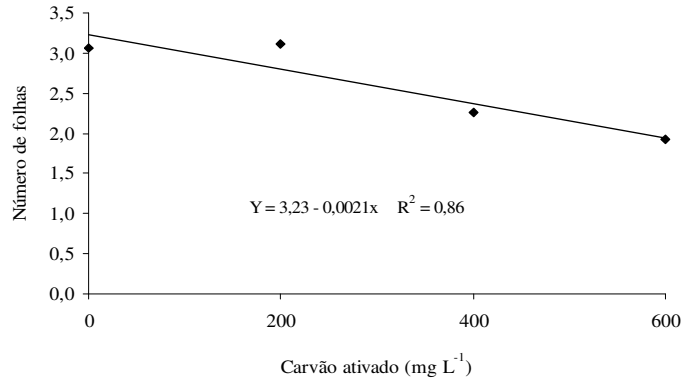


**Fonte:** Elaboração dos autores.

Crescentes concentrações de carvão ativado incorporado ao meio Knudson influenciaram negativamente a morfogênese foliar (Figura 2C). A associação do uso de meio sólido, que inibe a

difusão de fósforo, potássio e zinco, combinada com concentrações mais elevadas de carvão ativado, podem ter inibido a formação de folhas por carência desses elementos que são requeridos na formação de órgãos.

**Figura 2C.** Número de folhas em plântulas de orquídea BC Pastoral x LC Amber Glow cultivadas em meio Knudson suplementado com diferentes concentrações de BAP e carvão ativado.



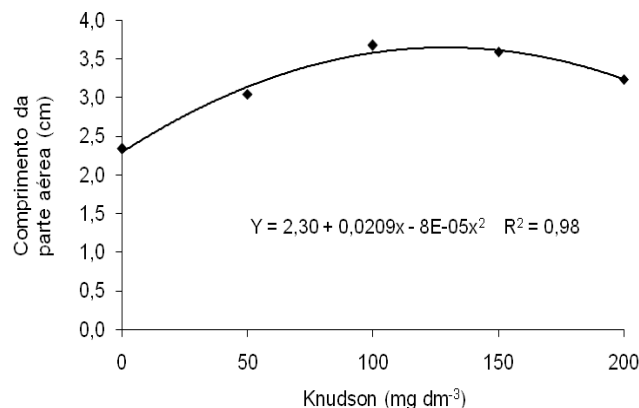
Fonte: Elaboração dos autores.

### Comprimento das plântulas

As proporções do meio Knudson influenciaram positivamente a altura das plântulas até o ponto máximo, sendo uma influência direta do aumento no teor de nutrientes (Figura 3). Rodrigues et al. (2010) e Campos (2002) afirmam que os gêneros *Cattleya* e *Laelia* são exigentes em zinco (Zn). O Zn desempenha importante função no metabolismo de

crescimento das plântulas e, segundo alguns autores, existe necessidade do aumento da disponibilidade desse nutriente em meio de cultura para melhor crescimento de híbridos (FIGUEIREDO et al., 2007). Após atingir o valor máximo, a altura das plântulas decresceu, provavelmente em função da elevação na concentração de nutrientes, causando fitotoxicidade.

**Figura 3.** Comprimento da parte aérea de plântulas de orquídea BC Pastoral x LC Amber Glow cultivadas em variações do meio Knudson.



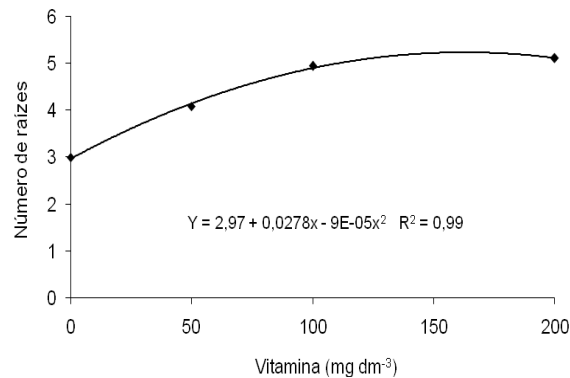
Fonte: Elaboração dos autores.

Uma característica marcante das orquídeas epífitas no estágio juvenil é a emissão de novas raízes, se comparado com o sistema radicular fasciculado das monocotiledôneas terrestres e este fato pode ter agravado a absorção por difusão pela menor área de contato do sistema radicular do híbrido (SILVA et al., 2005).

#### Número e comprimento de raízes

À medida que se aumentaram as concentrações de vitaminas do meio MS, maior quantidade de raízes foi formada (Figura 4), aumentando a área de contato raiz/substrato, refletindo em maior absorção dos nutrientes. Desta forma, as vitaminas do meio MS contribuíram no aumento do número de raízes.

**Figura 4.** Número de raízes de plântulas de orquídea *BC Pastoral x LC Amber Glow* cultivadas em variações do meio Knudson suplementado com concentrações de vitaminas do meio MS.

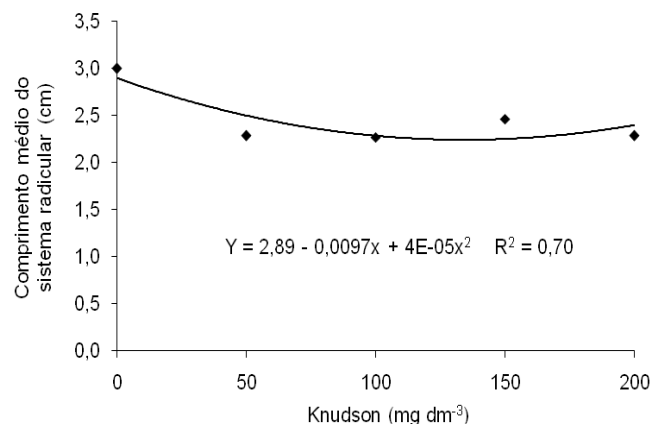


**Fonte:** Elaboração dos autores.

Num substrato com deficiência de nutrientes, aumentar o comprimento das raízes é uma maneira da plântula buscar os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento mesmo que isto implique em

gasto de reservas (SOARES et al., 2011). Na Figura 5A observa-se que a ausência do meio Knudson influenciou o comprimento médio do sistema radicular desta maneira.

**Figura 5A.** Comprimento médio do sistema radicular de plântulas de orquídea *BC Pastoral x LC Amber Glow* cultivadas em variações do meio Knudson.

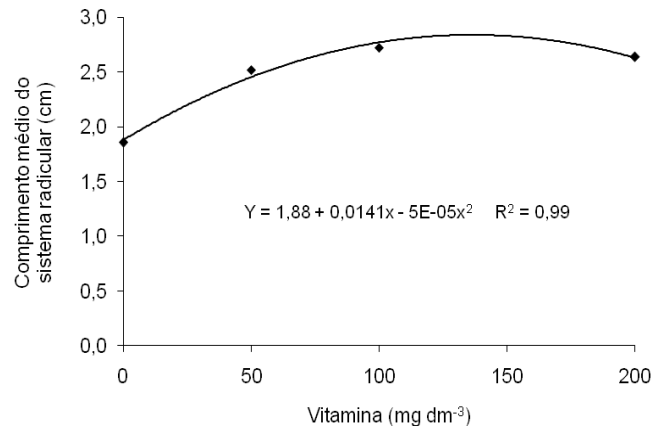


**Fonte:** Elaboração dos autores.



À medida que aumenta a concentração até próximo de 100%, diminui o comprimento médio do sistema radicular. As concentrações de vitaminas do meio MS influenciaram de maneira positiva o crescimento das raízes (Figura 5B), até o ponto de máxima.

**Figura 5B.** Comprimento médio do sistema radicular de plântulas de orquídea *BC Pastoral x LC Amber Glow* cultivadas em variações do meio Knudson suplementado com diferentes concentrações de vitaminas do meio MS.



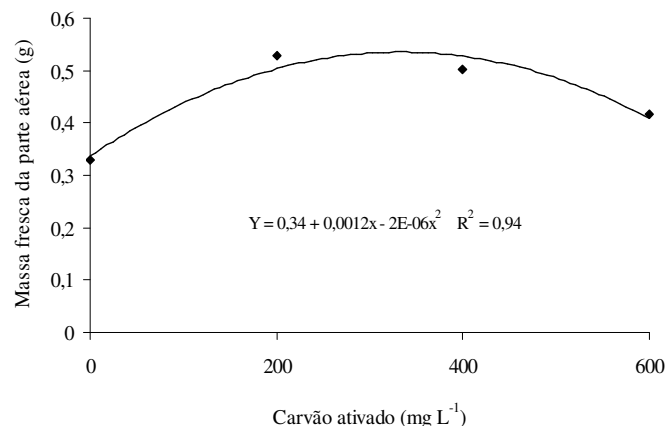
**Fonte:** Elaboração dos autores.

#### *Biomassa fresca de plântulas*

Na concentração de 333,33 mg L<sup>-1</sup> de carvão ativado suplementado ao meio Knudson, obteve-se o máximo de resposta para biomassa fresca das plântulas (Figura 6). Mohamed-Yasseen (2001), trabalhando com sementes de milho, obteve

resultados semelhantes, atribuindo o efeito benéfico do carvão ativado à adsorção do ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), fato que ajuda a explicar porque o carvão pode inibir o efeito negativo de substâncias tóxicas produzidas pela própria plântula ou por resultado da autoclavagem.

**Figura 6.** Biomassa fresca da parte aérea em plântulas de orquídea *BC Pastoral x LC Amber Glow* cultivadas em meio Knudson suplementado com concentrações de BAP e carvão ativado.



**Fonte:** Elaboração dos autores.

Concentrações maiores que 333,33 mg L<sup>-1</sup> de carvão ativado passaram a inibir o ganho de peso. Galdiano Júnior et al. (2012) e George, Puttock e George (1987) também citam o lado negativo da incorporação do carvão no meio de cultura que é a remoção de nutrientes orgânicos, fitormônios e inibição do crescimento e da morfogenia das espécies cultivadas. A influência negativa observada para número de folhas no item anterior pode ter sido compensada com maior estímulo ao crescimento das folhas pré-existentes ou do sistema radicial, verificada pelo ganho da massa fresca da parte aérea das plântulas.

Como a massa fresca da plântula é uma referência de vigor, poder-se-ia estabelecer o valor máximo de resposta 333,33 mg L<sup>-1</sup> como o melhor a ser incorporado ao meio. Entretanto, como número de brotos e peso fresco da plântula são variáveis diretamente afetadas pelas concentrações de carvão ativado, quando se desejar maior número de brotos no estágio de subcultivo, a concentração recomendada é 137,5 mg L<sup>-1</sup>, que também beneficia o número de folhas.

VILLA et al. (2007) afirma que adição *in vitro* de carvão ativado reduziu a biomassa de frutíferas de clima temperado. O efeito não-seletivo desse carvão pode proporcionar resultados negativos na micropropagação de espécies vegetais (PAN; van STADEN, 1998).

As pesquisas envolvendo diferentes vitaminas parecem ser específicas para cada espécie e talvez para diferentes cultivares da mesma espécie, dependendo também do tipo de explante (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998). Além disso, o efeito benéfico da inclusão de determinada vitamina no meio de cultura dependerá, em grande parte, da capacidade de biossíntese de cada um nos tecidos ou órgãos cultivados. Ainda, dos resultados já obtidos em estudos envolvendo o emprego de vitaminas, o que mais se destacou foi o efeito benéfico ou mesmo a dependência absoluta de muitas culturas para a tiamina.

## Conclusões

Pode-se utilizar 129% de Knudson, suplementado com 137,5 mg L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 104% de vitaminas do meio MS e sem adição de BAP, como melhor composição de meio de cultura na propagação *in vitro* do híbrido de orquídea.

O meio Knudson não promove aumento no sistema radicial.

## Referências

- ARDITTI, J.; ERNST, R. *Micropropagation of orchids*. New York: John Wiley, 1993. 682 p.
- BEYL, C. A. Getting started with tissue culture – media preparation, sterile technique, and laboratory equipment. In: TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. (Ed.). *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*. London: CRC Press, 2000. p. 21-38.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. 2. ed. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1998. v. 1, p. 87-132.
- CAMPOS, D. M. *Orquídeas: manual prático de cultura*. 3. ed. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 2002. cap. 5. p. 140-141.
- CARDOSO, J. C.; ONO, E. O. *In vitro* growth of *Brassocattleya* orchid hybrid in different concentrations of KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> and benzylaminopurine. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 29, n. 3, p. 359-363, 2011.
- CUNHA, T.; CORDEIRO, G. M.; MASSARO, R.; DEZAN, L. F.; PEDROSO-DE-MORAES, C. Desenvolvimento *in vitro* de *Laeliocattleya schilleriana* Rolfe em meios de cultivo simplificados. *Scientia Plena*, Aracaju, v. 7, n. 8, p. 1-5, 2011.
- FIGUEIREDO, M. A.; SANTOS, F. M.; SILVA, J. O. C.; COSTA, F. H. S.; PASQUAL, M. Variações no meio de cultura sobre o crescimento *in vitro* em híbridos de orquídea. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, p. 294-296, 2007. Suplemento 2.
- GALDIANO JÚNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; PIVETTA, K. F. L.; LEMOS, E. G. M. Crescimento *in vitro* e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) com carvão ativado sob dois espectros luminosos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 42, n. 5, p. 801-807, 2012.

- GEORGE, E. F. (Ed.). *Plant propagation by tissue culture. The technology*. 2. ed. Edington: Exegetics, 2008. 574 p.
- GEORGE, E. F.; PUTTOCK, D. J. M.; GEORGE, H. J. *Plant culture media: formulations and uses*. England: Exegetics, 1987. v. 1, 567 p.
- GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. Factors affecting growth and morphogenesis. In: GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. (Ed.). *Plant propagation by tissue culture*. London: Exegetics, 1984. cap. 5, p. 125-171.
- GIATTI, L.; LIMA, G. P. P. Ação do BAP na regeneração *in vitro* de *Blc Cowen Holmes Ponkan x Brassavoladigbiana* nº 2. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1279-1285, 2007.
- GUSON, R. R.; MORAES, C. P.; RONCONI, C. C. Influência de diferentes concentrações de carvão ativado no crescimento e enraizamento *in vitro* de *Cattleya pumila* HOOK. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*, Maringá, v. 5, n. 3, p. 551-563, 2012.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin*, West Palm Beach, v. 14, n. 1, p. 214-217, 1946.
- LA CROIX, I. F. *The new encyclopedia of orchids: 1.500 species in cultivation*. 6<sup>th</sup> ed. London: Timberpress Inc., 2008. 524 p.
- MOHAMED-YASSEEN, Y. Influence of agar and activated charcoal on uptake of gibberellin and plant morphogenesis *in vitro*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, London, v. 37, n. 2, p. 204-205, 2001.
- MULLER, T. S.; DEWES, D.; KARSTEN, J.; SCHUELTER, A. R.; STEFANELLO, S. Crescimento *in vitro* e aclimação de plântulas de *Miltonia flavescens* Lindl. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 5, p. 252-254, 2007. Suplemento 2.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Sweden, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- PAN, M. J.; van STADEN, J. The use of charcoal *in vitro* culture – a review. *Plant Growth Regulation*, Dordrescht, v. 26, n. 3, p. 155-163, 1998.
- PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J. D. *Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações*. Introdução – fundamentos básicos. Lavras, MG: UFLA/FAEPE, 1998. 159 p.
- PAULA, C. C.; SILVA, H. M. P. *Cultivo prático de orquídeas*. 2. ed. Viçosa: UFV, 2001. 63 p.
- PIERIK, R. L. M. *In vitro culture of higher plants*. Dordrecht: Martinus Nyjhoff Publishers, 1987. 344 p.
- RAPOSO, J. G. *Questões práticas de nomenclatura de orquídeas*. São Paulo: Editora Ave-Maria, 1983. 80 p.
- RODRIGUES, D. T.; NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H. V.; DIAS, J. M. M.; VILLANI, E. M. A. Response of *Epidendrum Ibaguense* (orchidaceae) to the application of lime rates to the pot. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, MG, v. 34, n. 3, p. 793-800, 2010.
- SAS Institute. SAS/STAT®. User's guide: statistics. Version 8.1. Cary: SAS Institute, 2003.
- SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, D.; ROSETE, B.; RAITZ, M.; SUZUKI, R. M. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). *Revista Ceres*, Viçosa, v. 59, n. 2, p. 185-191, 2012.
- SILVA, E. F.; PASQUAL, M.; PAIVA, P. D. O.; SILVA, A. B.; NOGUEIRA, D. A. Polpa de banana e vitaminas do meio MS no cultivo *in vitro* de orquídea. *Plant Cell Culture & Micropropagation*, Lavras, v. 1, p. 8-12, 2005.
- SOARES, J. D. R.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; VILLA, F.; CARVALHO, J. G.; ARAUJO, A. G. Propagação *in vitro* de orquídea: iodeto de potássio e cloreto de cobalto em meio de cultura Knudson C. *Revista Ceres*, Viçosa, v. 58, n. 3, p. 273-277, 2011.
- STANCATO, C. G.; 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*, Campinas, v. 17, n. 1, p. 25-33, 2001.
- UNEMOTO, L. K.; FARIA, R. T.; VIEIRA, A. O. S.; DALIO, R. J. D. Propagação *in vitro* de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado. *Revista Brasileira de Agrociência*, Jaboticabal, v. 13, n. 2, p. 267-269, 2007.
- VENTURA, G. M.; DIAS, J. M. M.; TEIXEIRA, L. S.; CARVALHO, S. V.; MOTOIKE, Y. S.; NOVAIS, F. R.; CECON, R. P. Organogênese *in vitro* a partir de gemas apicais e auxiliares de plantas adultas de orquídeas do grupo *Cattleya*. *Revista Ceres*, Viçosa, v. 47, n. 286, p. 613-628, 2002.
- VILLA, F.; PASQUAL, M.; PIO, L. A. S.; ASSIS, F. A.; TEODORO, G. S. Influência do carvão ativado e BAP na multiplicação *in vitro* de duas frutíferas de clima temperado. *Revista Ceres*, Viçosa, v. 54, n. 312, p. 118-124, 2007.

