

# Influência da fonte e concentração de carboidrato no crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro* de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae)

## Influence of source and concentration of carbohydrate on shoot growth and rooting of *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae)

Luciana do Valle Rego-Oliveira<sup>1</sup>; Ricardo Tadeu de Faria<sup>2\*</sup>;  
Inês Cristina de Batista Fonseca<sup>2</sup>; Charlen Saconato<sup>3</sup>

### Resumo

*Oncidium varicosum* é uma orquídea nativa do Brasil conhecida popularmente como “chuva de ouro”, devido a sua inflorescência muito ramificada e com inúmeras flores amarelas. O tipo e a concentração dos carboidratos são importantes para promover o desenvolvimento das plântulas das orquídeas *in vitro*. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes fontes e concentrações de carboidratos no crescimento *in vitro* de plântulas de *O. varicosum*. Foi utilizado o meio de cultura Murashige e Skoog, modificado pela redução à metade da concentração dos macronutrientes. Plântulas provenientes de sementes estabelecidas *in vitro* com  $0,8 \pm 0,2$  cm de altura, foram inoculadas nos meios de cultura contendo as seguintes fontes de carboidratos: sacarose, maltose e glicose, nas concentrações de 0, 10, 20, 30, 60 e 90 g.L<sup>-1</sup>. Foram analisadas, após 8 meses, as seguintes variáveis: altura da parte aérea, número de raízes, comprimento da maior raiz, diâmetro do pseudobulbo e peso da matéria fresca. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento. Realizou-se análise de variância e teste Tukey (5%) para a comparação das médias. Concluiu-se que 60 g.L<sup>-1</sup> sacarose foi a melhor fonte e concentração de açúcar para todos os parâmetros avaliados. A glicose (30 g.L<sup>-1</sup>) e a maltose (60 g.L<sup>-1</sup>) também foram adequadas, porém o diâmetro de pseudobulbo e o peso da matéria fresca das plantas foram inferiores aos de 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose.

**Palavras-chave:** Carboidrato, Orchidaceae, *in vitro*, *Oncidium*.

### Abstract

*Oncidium varicosum* is a native Brazilian orchid popularly known as ‘Golden Shower’ because of its very ramified inflorescence and many yellow flowers. The type of carbohydrate and its concentration are important in promoting plantlet development of *in vitro* orchids. The present study was carried out to assess the effect of different carbohydrate sources and concentrations on the *in vitro* growth of *O. varicosum* plantlets. Murashige e Skoog culture medium was used, at half of its macronutrient concentration. The plantlets, derived from seeds that were already established *in vitro* and  $0.8 + 0.2$  cm in height, were inoculated in the culture media containing the following carbohydrate sources: saccharine, maltose and glucose, at concentrations of 0, 10, 20, 30, 60 and 90 g.L<sup>-1</sup>. The following variables were analyzed 8 months later: canopy height, number of roots, greatest root length, pseudobulb diameter and fresh weight. A completely randomized block experimental design was used with five replications per

<sup>1</sup> Aluna de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Agronomia- UEL.

<sup>2</sup> Professor(a) do Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

<sup>3</sup> Estagiário do Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

\* Autor para correspondência: [faria@uel.br](mailto:faria@uel.br)

treatment. Analysis of variance and the Tukey test (5%) were performed to compare the means. It was concluded that 60 g.L<sup>-1</sup> saccharose was the best treatment for all the parameters assessed. The sugars 30 g.L<sup>-1</sup> glucose and 60 g.L<sup>-1</sup> maltose were also suitable, but presented lower pseudobulb diameter and lower fresh weight when compared to 60 g.L<sup>-1</sup> saccharose.

**Key words:** Carbohydrate, Orchidaceae, *in vitro*, *Oncidium*.

## Introdução

A família Orchidaceae é uma das mais numerosas entra as fanerógamas, sendo encontrada em quase todas as regiões do planeta, com exemplares até nas regiões boreais. Atualmente, muitas orquídeas em estado silvestre encontram-se em extinção, tendo-se, portanto, a importância de seu cultivo (MOURA, 1979).

*Oncidium varicosum* Lindl. é uma das mais belas espécies de orquídeas nativas do Brasil, conhecida popularmente como “chuva de ouro”, devido à sua inflorescência muito ramificada e com inúmeras flores amarelas (SENGHAS, 1998).

As plantas propagadas *in vitro* necessitam de uma fonte de energia externa pois, nesta fase são praticamente heterotróficas não encontrando as condições favoráveis para realizar a fotossíntese. Assim, fontes de carboidrato são adicionadas ao meio nutritivo fornecendo energia metabólica e esqueletos carbônicos para a síntese de compostos orgânicos necessários para o crescimento das células (CALDAS; HARIDASAM; FERREIRA, 1998). A sacarose é o carboidrato mais utilizado em meios de cultura visando a propagação de plantas ornamentais, sendo que no meio Murashige e Skoog (1962) sua concentração é de 30g.L<sup>-1</sup>. Na propagação *in vitro* de orquídeas, porém, outras fontes também têm sido utilizadas com menor frequência como a glucose, frutose, maltose, entre outras (TOMBOLATO; COSTA, 1998).

O tipo e a concentração dos açúcares são importantes para promover a germinação e o crescimento das plântulas *in vitro*, assim como a própria manutenção de crescimento de explantes radiculares (ARDITTI, 1967; ERNEST, 1967; KRAUS; KERBAUY, 1992; COLLINS; DIXON, 1992; KERBAUY 1993).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro* de plântulas de *O. varicosum*.

## Material e Métodos

Foram utilizadas plântulas provenientes de sementes de *O. varicosum*, que já se encontravam estabelecidas *in vitro*, com aproximadamente 0,8 ± 0,2 cm de altura. O meio de cultura utilizado foi o de Murashige e Skoog (1962), com a metade da concentração dos macronutrientes.

Foram utilizadas três fontes de carboidrato: sacarose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>), maltose (C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>) e glucose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), nas concentrações de 0, 10, 20, 30, 60 e 90 g.L<sup>-1</sup>. O pH dos meios de cultura foi ajustado para 6,2 utilizando hidróxido de sódio (NaOH) e ácido clorídrico (HCl) a 1 N, antes da adição do ágar. Após o preparo, 50 mL de meio de cultura foram distribuídos nos frascos de vidro de 250 mL e em seguida tampados e submetidos ao processo de esterilização por autoclavagem a 121°C durante 20 minutos. A inoculação foi realizada assepticamente em câmara de fluxo laminar, sendo utilizadas 10 plântulas por repetição. Posteriormente, os frascos foram transferidos para sala de crescimento com temperatura de 26°C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 1.600 lux.

O experimento teve a duração de 8 meses onde foram realizados 4 subcultivos (1 a cada 2 meses). Após este período, foram efetuadas as seguintes avaliações das variáveis: altura da parte aérea, número de raízes, comprimento da maior raiz, diâmetro do pseudobulbo e peso total de matéria fresca.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições por

tratamento. Realizou-se análise de variância e o teste Tukey (5%) para a comparação das médias (SAS INSTITUTE, 1989).

## Resultado e Discussão

Embora não tenha sido constatado o efeito do tipo de carboidrato na altura da parte aérea das plantas, nas concentrações 20 e 30 g.L<sup>-1</sup>, notou-se que até a concentração 30 g.L<sup>-1</sup>, os carboidratos glucose e sacarose proporcionaram maior altura de parte aérea, sendo inclusive, na concentração 10 g.L<sup>-1</sup>, estatisticamente diferente da maltose (Tabela 1).

Nas concentrações de 60 e 90 g.L<sup>-1</sup> os maiores valores para altura da parte aérea foram obtidos na presença de maltose e sacarose.

Quando comparadas às concentrações, foi observado que, para glucose, a concentração que proporcionou maior altura de parte aérea foi 30 g.L<sup>-1</sup> sendo estatisticamente diferente das demais. Para maltose e sacarose, a concentração que proporcionou maior altura de parte aérea foi 60 g.L<sup>-1</sup>, sendo, nos dois casos, estatisticamente diferentes dos demais.

**Tabela 1.** Altura da parte aérea (cm), número de raízes, comprimento da maior raiz (cm), diâmetro do pseudobulbo (cm) e peso fresco (g), de plântulas de *Oncidium varicosum* inoculadas em meio de cultura contendo glucose, maltose ou sacarose após 240 dias do início do experimento.

Altura da parte aérea	Concentrações (g . L <sup>-1</sup> )				
	10	20	30	60	90
Glucose	2,87 Ac*	4,10 Ab	5,67 Aa	2,26 Bc	0,91 Bd
Maltose	1,15 Bd	2,98 Ac	4,85 Ab	6,72 Aa	5,42 Ab
Sacarose	2,49 Ad	4,10 Ac	5,33 Ab	6,99 Aa	4,69 Abc
C.V.	10,87%				
<b>Nº de raízes</b>					
Glucose	3,75 Ac	7,40 Aab	8,42 ABa	6,13 Bb	2,50 Cc
Maltose	1,24 Bd	6,80 Ac	8,55 Abc	9,70 Aab	11,19 Aa
Sacarose	4,0 Ac	6,28 Ab	6,60 Bb	9,10 Aa	7,06 Bb
C.V.	11,91%				
<b>Comprimento da maior raiz</b>					
Glucose	2,27 Ac	3,64 Ab	5,96 Aa	3,47 Cbc	0,45 Bd
Maltose	0,84 Bc	3,30 Ab	6,60 Bb	5,01 Ba	5,44 Aa
Sacarose	2,69 Ad	4,03 Ac	4,80 Abc	6,56 Aa	6,06 Aab
C.V.	14,92%				
<b>Diâmetro do pseudobulbo</b>					
Glucose	0,32 Aab	0,35 Aa	0,40 Aa	0,39 Ba	0,23 Bb
Maltose	0,35 Ab	0,43 Ab	0,38 Ab	0,35 Bb	0,55 Aa
Sacarose	0,31 Ad	0,40 Acd	0,42 Abc	0,55 Aa	0,51 Aab
C.V.	11,14%				
<b>Peso Fresco</b>					
Glucose	0,76 Acd	1,00 Ac	1,71 Ab	2,49 Aa	0,20 Cd
Maltose	0,48 Ac	0,78 Ac	1,51 Ab	1,60 Bb	2,96 Aa
Sacarose	0,57 Ad	0,99 Ad	1,51 Ac	2,99 Aa	2,16 Bb
C.V.	15,26%				

\* Médias seguidas de mesma letra maiúscula na vertical e minúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

Devido às diferenças de altura da parte aérea apresentada, constata-se a importância do tipo de carboidrato a ser usado, assim como a sua dose adequada, para o desenvolvimento *in vitro* dessa orquídea. Ishii et al. (1998), observaram que o crescimento de calos da orquídea *Phalaenopsis* é influenciado pelo tipo e pela quantidade de carboidrato no meio de cultura e que, para a indução de calos, a quantidade ideal de sacarose seria de 40 g.L<sup>-1</sup>. Porém, Tanaka e Sakanishi (1978) reportaram que um meio de cultura contendo 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose foi adequado para a cultura de segmentos de folhas de *Phalaenopsis*.

As curvas das regressões polinomiais da altura da parte aérea estão representadas na Figura 1A e suas fórmulas e coeficiente de determinação R<sup>2</sup>, na Tabela 2. A altura de parte aérea em função das concentrações dos carboidratos maltose e sacarose foi estudada por equações de 2º grau semelhantes, onde o aumento da parte aérea esteve diretamente ligado com o aumento das doses do açúcar, porém, com uma queda a partir da dose de 60 g.L<sup>-1</sup>, considerada a melhor dose para esses carboidratos. Para a glucose, ocorreu o aumento da parte aérea até a dose 30 g.L<sup>-1</sup>, que também foi a mais satisfatória. A partir desta dose, o declínio foi acentuado com um pequeno aumento a 90 g.L<sup>-1</sup>.

**Tabela 2.** Equações das Regressões polinomiais e R<sup>2</sup> para as seguintes variáveis: altura da parte aérea (cm), número de raízes, comprimento da maior raiz (cm), diâmetro do pseudobulbo (cm) e peso fresco (g) de plântulas de *O. varicosum* após 240 dias do início do experimento.

Altura da parte aérea	Equação da Regressão	R <sup>2</sup>
Glucose	$y = -0,836701 + 0,451152x - 0,010301x^2 + 0,000061126x^3$	0,9115
Maltose	$y = -1,165192 + 0,254495x - 0,002020x^2$	0,9507
Sacarose	$y = 0,319521 + 0,230883x - 0,002021 x^2$	0,9266
<b>Nº de raízes</b>		
Glucose	$y = -1,935408 + 0,708931x - 0,014105x^2 + 0,000075294x^3$	0,9522
Maltose	$y = -6,102368 + 0,899701x - 0,016144x^2 + 0,000092043x^3$	0,9583
Sacarose	$y = 1,966790 + 0,230605x - 0,001924x^2$	0,7620
<b>Comprimento da maior raiz</b>		
Glucose	$y = -1,531357 + 0,439157x - 0,008420x^2 + 0,000042017x^3$	0,8963
Maltose	$y = -1,560499 + 0,294778x - 0,004493x^2 + 0,000023143x^3$	0,8442
Sacarose	$y = 1,289979 + 0,153964x - 0,001120x^2$	0,8898
<b>Diâmetro do pseudobulbo</b>		
Glucose	$y = 0,243384 + 0,007542x - 0,000085969x^2$	0,6961
Maltose	$y = 0,265167 + 0,012177x - 0,000345x^2 + 0,000002720x^3$	0,7722
Sacarose	$y = 0,229580 + 0,008925x - 0,000063820x^2$	0,7846
<b>Peso fresco</b>		
Glucose	$y = 0,567987 + 0,000119x + 0,001706x^2 - 0,000019478x^3$	0,9640
Maltose	$y = -0,617930 + 0,127920x - 0,002566x^2 + 0,000017613x^3$	0,9175
Sacarose	$y = 0,410818 + 0,001451x + 0,001676x^2 - 0,000016405x^3$	0,9396

O maior número de raízes foi verificado com maltose 90 g.L<sup>-1</sup> e 60 g.L<sup>-1</sup> (11,19 e 9,70 respectivamente), sacarose 60 g.L<sup>-1</sup> (9,10) e glucose 30 g.L<sup>-1</sup> (8,42) (Tabela 1).

Collins e Dixon (1992), visando propagar a orquídea terrestre *Diuris longifolia* R. Br., testaram concentrações de sacarose (0, 10, 20 e 40 g.L<sup>-1</sup>). Foi observado que o aumento das concentrações de sacarose de 20 para 40 g.L<sup>-1</sup> proporcionou um aumento na frequência de enraizamento, dobrando o número de plantas enraizadas. Os resultados obtidos mostraram que o desenvolvimento radicular desta orquídea terrestre está diretamente ligado à concentração de sacarose no meio de cultura.

Para glucose e maltose, as regressões polinomiais foram apresentadas na forma de equações de 3º grau (Tabela 2) e suas curvas na Figura 1B. Para a glucose, o número de raízes aumentou até a dose 30 g.L<sup>-1</sup>, com um declínio a partir desta dose. Para a maltose, ocorreu um aumento no número de raízes até a dose 30 g.L<sup>-1</sup>, mantendo parcialmente estável até a dose de 60 g.L<sup>-1</sup>, com um considerável aumento do número de raízes na dose de 90 g.L<sup>-1</sup>.

Para a variável comprimento da maior raiz, o melhor resultado foi obtido com glucose na dose de 30 g.L<sup>-1</sup> (5,96 cm), para a maltose, os melhores resultados foram a 60 g.L<sup>-1</sup> e 90 g.L<sup>-1</sup> (5,01 e 5,44 cm, respectivamente) e para a sacarose (6,56 e 6,06 cm, respectivamente) a 60 g.L<sup>-1</sup> e 90 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Diferente das demais, na concentração de 20 g.L<sup>-1</sup> a avaliação da maior raiz não apresentou diferença significativa entre os açúcares. O menor desenvolvimento de raízes ocorreu com a maltose a 10 g.L<sup>-1</sup> (0,84 cm) (Tabela 1).

Após 240 dias estudando protocormos de *O. varicosum*, Kerbauy (1993) concluiu que 40 g.L<sup>-1</sup> de sacarose promoveu uma grande alongação celular nesta orquídea e que as doses 5 e 10 g.L<sup>-1</sup> retardaram o crescimento celular além de resultarem em uma completa desorganização estrutural.

O comprimento de maior raiz em função das concentrações de glucose foi estudado por uma

equação de 3º grau, onde houve um aumento do comprimento até 30 g.L<sup>-1</sup> e um acentuado declínio após esta dose. Na maltose também foi representado por uma equação de 3º grau, com um aumento na dose 30 g.L<sup>-1</sup> e mantendo-se relativamente estável até 90 g.L<sup>-1</sup>. Para a sacarose, ocorreu um acentuado aumento até a dose de 60 g.L<sup>-1</sup> com uma pequena queda a 90 g.L<sup>-1</sup> (Tabela 2, Figura 1C).

Para o parâmetro diâmetro de pseudobulbos, não foi observado o efeito dos carboidratos nas concentrações de 10, 20 e 30 g.L<sup>-1</sup>. Já com 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose as plantas apresentaram um melhor desenvolvimento (0,55 cm), em relação à glucose e à maltose (0,39 e 0,35 cm, respectivamente) e na concentração 90 g.L<sup>-1</sup>, a glucose (0,23 cm) foi inferior aos demais, maltose e sacarose (0,55 e 0,51 cm, respectivamente) (Tabela 1).

Rodrigues (1999), estudando a orquídea *Dendrobium nobile*, observou que a concentração de 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose ocasionou um aumento no crescimento em altura e uma alta taxa de multiplicação de mudas quando comparada com as outras doses estudadas: 0, 5, 10, 20, 30 g.L<sup>-1</sup>.

A regressão polinomial do diâmetro de pseudobulbo, em função das concentrações de maltose foi de 3º grau. Para a glucose e a sacarose, as equações que melhor representaram seus comportamentos foram de 2º grau (Tabela 2). Para esta característica o carboidrato sacarose foi o que apresentou uma melhor curva se destacando então das demais (Figura 1D).

Não foi observado o efeito dos carboidratos no peso de matéria fresca de *O. varicosum* nas concentrações de 10, 20 e 30 g.L<sup>-1</sup> (Tabela 1). Na concentração de 60 g.L<sup>-1</sup>, glucose e sacarose destacaram-se da maltose; porém, esta se destacou na concentração de 90 g.L<sup>-1</sup> o que a fez diferir estatisticamente das demais.

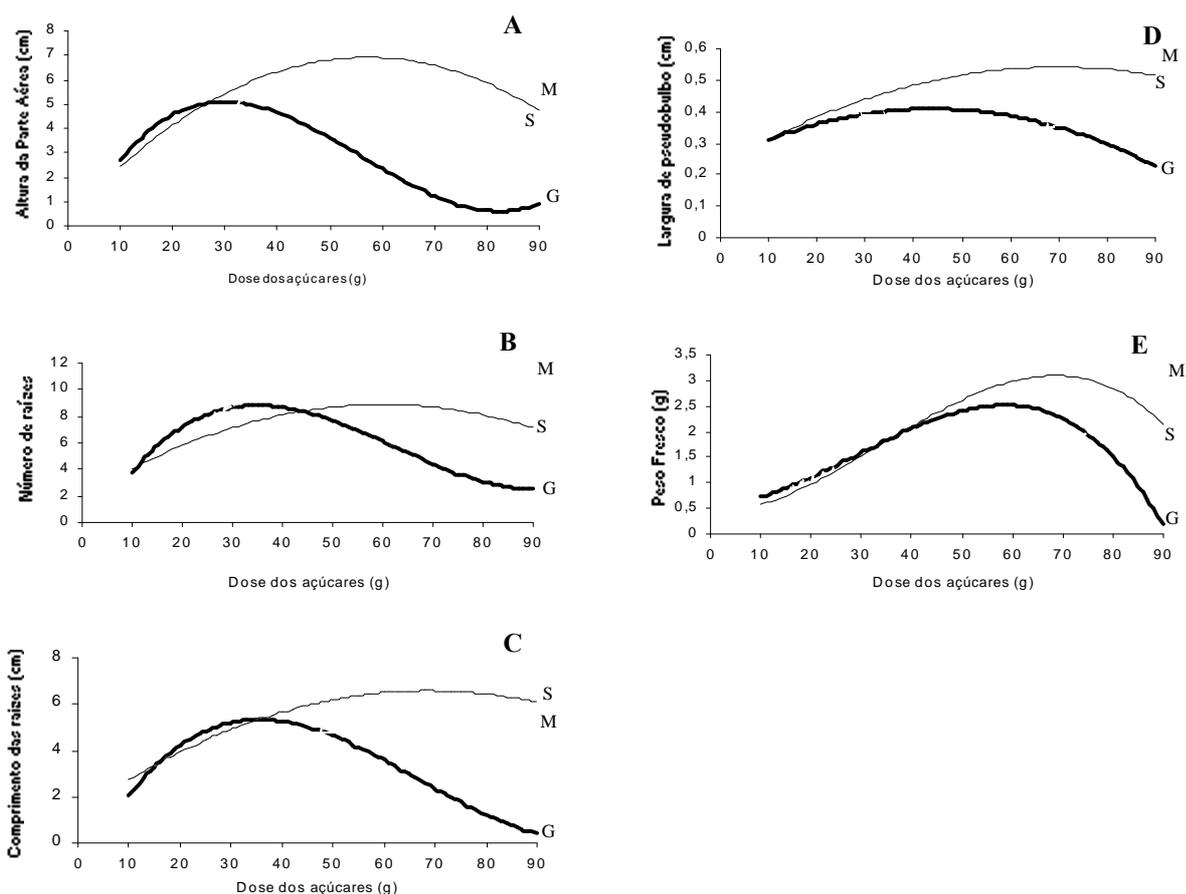
Para a característica peso de matéria fresca, as regressões polinomiais de todos os carboidratos foram de 3º grau (Tabela 2) com suas curvas representadas na Figura 1E. A glucose causou um

aumento do peso de matéria na dose de 60 g.L<sup>-1</sup> com um grande declínio na dose de 90 g.L<sup>-1</sup>. Já a maltose causou o aumento do peso seco até a dose de 30 g.L<sup>-1</sup>, mantendo-se estável até a dose de 60 g.L<sup>-1</sup> e chegando ao máximo a 90 g.L<sup>-1</sup>. Finalmente, um aumento do peso fresco foi atingido a 60 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, com uma pequena queda a 90 g.L<sup>-1</sup>.

Para a maioria das características estudadas, um aumento na dose do açúcar *in vitro* foi significativo para um melhor desenvolvimento de plântulas de *O. varicosum*. Contudo, a presença de açúcar no meio de cultura é um dos fatores que contribui para um aumento significativo nos custos de produção de mudas propagadas, isto porque o carboidrato, no meio

de cultura, favorece o desenvolvimento de fungos e bactérias (KOZAI, 1991). Assim, a ausência do carboidrato pode reduzir os problemas de crescimento de microorganismos no meio de cultura e permitir que a planta cresça autotroficamente *in vitro*, quando a taxa de CO<sub>2</sub> suficiente para o crescimento for providenciada e a intensidade de luz for aumentada (DEBERGH, 1991).

Concluiu-se que o tratamento sacarose a 60 g.L<sup>-1</sup> mostrou-se o mais adequado para o cultivo *in vitro* de *O. varicosum*, para os parâmetros avaliados. Os carboidratos glucose a 30 g.L<sup>-1</sup> e maltose a 60 g.L<sup>-1</sup> também foram adequados, porém apresentaram um menor diâmetro de pseudobulbo e menor peso de matéria fresca em relação à sacarose a 60 g.L<sup>-1</sup>.



**Figura 1.** Regressões polinomiais das variáveis. A. altura da parte aérea. B. número de raízes. C. comprimento da maior raiz. D. diâmetro dos pseudobulbos. E. peso fresco de plântulas de *Oncidium varicosum* após 240 dias de tratamento Glucose (G), Maltose (M) e Sacarose (S).

## Referências

- ARDITTI, J. Factors affecting the germination of orchid seeds. *Botanical Review*, Bronx, v.33, p.1967.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAM, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa/SPI, 1998. v.1, p.87-132.
- COLLINS, M. T.; DIXON, K. W. Micropropagation of an Australian terrestrial orchid *Diuris longifolia* R Br. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, Melbourne, v.32, p.131-135, 1992.
- DEBERGH, P. C. Control of *in vitro*. In: CROCOMO, O. J.; SHARP, W. R.; MELO, M. *Biotecnologia da Produção Vegetal*. Piracicaba: CEBTEC/FEALQ, 1991. p.3-8.
- ERNEST, R. Effects of carbohydrate selection on the growth rate of freshly-germinated *Phalaenopsis* and *Dendrobium* seed. *American Orchid Society Bulletin*, West Palm Beach, v.36, p.1068-1073, 1967.
- ISHII, Y.; TAKAMURA, T.; GOI, M.; TANAKA, M. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis*. *Plant Cell Reports*, Berlin, v.17, p. 446-450, 1998.
- KERBAUY, G. B. The effects of sucrose and agar on the formation of protocorm-like bodies in recalcitrant root tip meristems of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae). *Lindleyana*, West Palm Beach, v.8, p.149-154, 1993.
- KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, Columbia, v.27, p.47-51, 1991.
- KRAUS, J. E.; KERBAUY, G. B. Formation of protocorm-like bodies from root apices of *Catasetum pileatum* (Orchidaceae) cultivated *in vitro* II Some non-hormonal requirements involved in the regeneration. *Boletim de Botânica*, São Paulo, v.13, p.31-40, 1992.
- MOURA, V. *Natureza violentada: flora e fauna agredidas*. Porto Alegre: Leal, 1979.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- RODRIGUES, F. N. *Avaliação do crescimento e enraizamento in vitro de Dendrobium nobile Lindl. (Orchidaceae) cultivado em diferentes concentrações de sacarose*. Dissertação (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- SAS INSTITUTE. *SAS/STAT User's guide*. version 6. 4.ed. Cary, 1989. v.2.
- SENGHAS, K. A subtribo *Oncidiinae*. *Orquidário*, Rio De Janeiro, v.12, n.110-112, 1998.
- TANAKA, M.; SAKANISHI, Y. Factors affecting the growth of *in vitro* cultured lateral buds from *Phalaenopsis* flower stalks. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.8, n.169-178, 1978.
- TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. *Micropropagação de plantas ornamentais*. Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 1998. (Boletim Técnico, n.174).