

Concentrações de sacarose no desenvolvimento *in vitro* e na aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley

Sucrose concentrations in *in vitro* development and acclimatization of *Cattleya loddigesii* Lindley

Renato Fernandes Galdiano Júnior^{1*}; Cibele Mantovani²;
Ricardo Tadeu de Faria³; Eliana Gertrudes de Macedo Lemos⁴

Resumo

Este trabalho foi realizado com objetivo de estudar a influência da concentração de sacarose no meio de cultura para o crescimento *in vitro* e aclimatização da orquídea epífita *Cattleya loddigesii*. Cinco tratamentos (ausência, 10, 20, 30 e 40g L⁻¹ de sacarose) foram utilizados, em delineamento inteiramente casualizado. A sementeira procedeu-se em meio de cultura ½ MS e, após 90 dias as plântulas de 1,0 +/- 0,2 cm foram distribuídas entre os tratamentos, em que permaneceram por mais 90 dias. Após 90 dias da transferência dos explantes para o meio contendo os tratamentos foi avaliado o número de raízes, comprimento da maior raiz, comprimento da parte aérea, comprimento da maior folha, número de folhas, massa de matéria seca total e pigmentos fotossintéticos. A porcentagem de sobrevivência foi aferida 75 dias após a aclimatização das plantas em casa de vegetação. Os dados das variáveis biométricas foram submetidos à análise de variância e regressão polinomial (p<0,05) e para os demais as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (p<0,05). A concentração de 20g L⁻¹ de sacarose favoreceu o crescimento *in vitro*, em todos os parâmetros avaliados, apresentou maior produção de clorofila *a*, clorofilas totais e carotenóides, além de maior sobrevivência em condições *ex vitro*. A concentração de 20g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura foi a de maior eficiência dentre as concentrações estudadas, tanto para o crescimento *in vitro* quanto estabelecimento *ex vitro* de *Cattleya loddigesii*.

Palavras-chave: Micropropagação, carboidrato, orquídea brasileira

Abstract

This work aimed to study the influence of sucrose in the culture medium for *in vitro* growth and acclimatization of the epiphytic orchid *Cattleya loddigesii*. Five sucrose treatments (absence, 10, 20, 30 and 40g L⁻¹) were used in a randomic experimental design. Mature seeds were sowed in ½ MS culture medium and after 90 days the plantlets (1.0 +/- 0.2 cm) were inoculated between the treatments, whereby they were remained more 90 days. After 180 days of the beginning of the experiment the plantlets were removed from the flasks and evaluated the number of roots, shoot length, number of leafs, total dry weight and photosynthetic pigments. Survival percentage was evaluated after 75 days of acclimatization. The data of biometric variables were analyzed by Anova and polynomial regression (p<0.05). Theothers data were submitted to the Anova and the means compared by the Tukey test (p<0.05). The sucrose concentration of 20g L⁻¹ favored the *in vitro* growth in all evaluated parameters, showed higher production of chlorophyll *a*, total chlorophyll and carotenoids, in addition to increased

¹ Biólogo, M. Sc. em Agronomia, Universidade. Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Jaboticabal, SP. E-mail: renatofgaldianojr@yahoo.com.br

² Discente em Agronomia, UNESP, Jaboticabal, SP. E-mail: orquidariomantovani@ig.com.br

³ Prof. Dr. em Genética, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR. E-mail: faria@uel.br

⁴ Prof^a. Dr^a. em Bioquímica, UNESP, Jaboticabal, SP. E-mail: egerle@fcav.unesp.br

* Autor para correspondência

survival under *ex vitro* condition. The sucrose concentration of 20g L⁻¹ in the culture medium was the most efficient among the tested concentrations both for *in vitro* growth and *ex vitro* establishment of *Cattleya loddigesii*

Key words: Micropropagation, carbohydrate, Brazilian orchid

Introdução

Orchidaceae representa uma das famílias de plantas com flores mais diversificadas, com cerca de 800 gêneros, 25 mil espécies descritas e valorizadas por suas belas e duradouras flores que exibem ampla diversidade em tamanho, fragrância e coloração (ROBERTS; DIXON, 2008). A multiplicação em larga escala de espécies raras e híbridos, utilizando técnicas da micropropagação de plantas tem auxiliado na posição em que as orquídeas ocupam entre as dez principais flores de corte no mundo inteiro (CHUGH; GUHA; RAO, 2009).

O cultivo e comércio dessas plantas no mundo e no Brasil, tem sido baseados no extrativismo predatório que, aliado à contínua urbanização e ao aumento das fronteiras agrícolas, contribuíram para que diversas espécies entrassem em um iminente perigo de extinção. Ainda, todas as espécies orquidáceas estão incluídas na Convenção Internacional sobre o Comércio de Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção – CITES (ROBERTS; DIXON, 2008), sendo que no Brasil o comércio dessas plantas para o exterior é regulamentado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. *Cattleya loddigesii*, em particular, é uma orquídea muito apreciada por colecionadores e nativa da região centro-sul brasileira, especialmente dos Estados de São Paulo e Minas Gerais (WATTANABE, 2002).

As sementes de orquídeas, em razão do tamanho diminuto e ausência de endosperma, necessitam para sua germinação ser infestadas por fungos micorrízicos ou então, ser semeadas em condições assépticas em um meio de cultura contendo sais minerais e uma fonte de açúcar (FARIA; ASSIS; CARVALHO, 2010), que geralmente é a sacarose (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998;

COSTA et al., 2009). A sacarose atua como uma fonte de energia e fornece carbonos precursores para a biossíntese de componentes estruturais e funcionais, como oligossacarídeos, aminoácidos e outras moléculas necessárias para o crescimento (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998).

O suprimento exógeno de açúcar pode ampliar as reservas de amido e sacarose nas plantas micropropagadas e favorecer a aclimatização, bem como acelerar as adaptações fisiológicas (HAZARIKA, 2003). O processo de aclimatização consiste na conversão da condição heterotrófica para a autotrófica, em paulatino retorno às características naturais da planta. Durante o cultivo *in vitro* é constatada alta umidade relativa e baixa irradiância luminosa, enquanto na fase *ex vitro* o ambiente apresenta *características* opostas tais como menor umidade, maior temperatura e luminosidade (DEB; IMCHEN, 2010). Como consequência, é verificada baixa taxa de sobrevivência em casa de vegetação para algumas espécies (BARBOZA et al., 2006). A adição de açúcar ao meio de cultura entretanto, pode também estar relacionada à redução no crescimento, baixa atividade fotossintética, mau funcionamento de estômatos e menor desenvolvimento de cutícula (JO et al., 2009).

A perda de plantas na fase de aclimatização pode ser muito alta, tornando-se um fator limitante no processo da micropropagação, em especial para plântulas de orquídeas que majoritariamente são germinadas *in vitro* de maneira assimbiótica. Alguns trabalhos têm mencionado que a sacarose pode aumentar o crescimento de orquídeas durante a propagação *in vitro* (FRÁGUAS et al., 2003; FARIA et al., 2004; SORACE et al., 2008; DIGNART et al., 2009; BESSON et al., 2010; PIVETTA et al., 2010), porém, raramente é avaliada a influência desse

carboidrato na sobrevivência das plantas durante a aclimatização em casa de vegetação.

Face ao exposto e em razão de que informações referentes ao desempenho de plantas de orquídeas brasileiras em relação ao suprimento *in vitro* de sacarose e seu efeito na aclimatização são ainda pouco exploradas, o propósito da investigação foi determinar o efeito de concentração de sacarose adicionados ao meio de cultura no crescimento *in vitro* e a subsequente sobrevivência de plântulas de *Cattleya loddigesii* durante a aclimatização.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado no período de março a dezembro de 2010, no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP), Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, campus Jaboticabal/SP.

Cápsulas fechadas de oito meses contendo sementes maduras e obtidas por autopolinização artificial de *Cattleya loddigesii* foram superficialmente desinfestadas em etanol 70% por cinco minutos, seguido de hipoclorito de sódio com 1% de cloro ativo durante 30 minutos e enxaguadas três vezes em água destilada e autoclavada em câmara de fluxo laminar. Cerca de 100 mg de sementes foram inoculadas em frasco plástico transparente de 220 mL, contendo 40 mL de meio nutritivo MS, cuja concentração de sais foi reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ MS, proposto por REGO-OLIVEIRA; FARIA, 2005) previamente autoclavados a 121 °C e 1,1 atm durante 15 min (CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998).

O meio nutritivo utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) reduzido, suplementado com vitaminas, inositol e glicina (conforme protocolo proposto por 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 *in vitro* sob condições controladas (com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e iluminação incidente nos frascos de, aproximadamente, $75 \mu\text{mol.m}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h).

Decorridos 90 dias, explantes contendo dois folíolos foram transferidos para frascos plásticos de 220 mL contendo o meio nutritivo MS, com quatro concentrações de sacarose (10, 20, 30 e 40 g L⁻¹), além do controle, que consistiu da ausência da sacarose. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Para cada tratamento utilizaram-se oito repetições contendo 12 plantas cada, totalizando 480 plantas.

Após 90 dias da transferência dos explantes para o meio nutritivo com os diferentes tratamentos foi avaliado o crescimento *in vitro* a partir de medidas biométricas do número de raízes, comprimento da maior raiz (cm), número de folhas, comprimento da maior folha (cm), comprimento da parte aérea (cm) e massa da matéria seca total (parte aérea e radicular, em mg). Para a análise desta etapa, foram mensuradas todas as plântulas dos tratamentos, porém para a análise dos pigmentos fotossintéticos 20 plântulas de cada tratamento foram selecionadas aleatoriamente para obter 500 mg de tecido foliar fresco proveniente de cada concentração de sacarose.

A massa de matéria seca foi estimada a partir de 24 plantas escolhidas aleatoriamente de cada tratamento. Cada planta foi colocada individualmente em sacos de papel Kraft e submetido à estufa de circulação forçada com renovação de ar (a 60°C até a aquisição de massa constante) e em seguida pesadas em balança de precisão analítica.

Foram quantificados os pigmentos fotossintéticos a partir da extração conforme proposto por Arnon (1949), por meio da maceração de 500 mg de tecido foliar fresco em acetona a 80%. Quantidades de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofilas totais e carotenóides foram estimadas em espectrofotômetro (Beckman®, mod. DU640B) simultaneamente para as absorbâncias (A) em 662, 645, 470 e 710 nm e

assim calculado conforme descrito por Hendry e Price (1993): clorofila $a = (11,24(A662 - A710) - 2,04(A645 - A710))$, clorofila $b = 20,13(A645 - A710) - 4,19(A662 - A710)$, carotenóides = $(1000(A470 - A710) - 1,9Ca - 64,13Cb)/214$. O aparelho foi calibrado utilizando-se como controle negativo acetona a 80%. As concentrações de pigmentos obtidas foram expressos em μg de pigmento g^{-1} de massa de matéria fresca.

Das demais 260 plantas (que não foram utilizadas para maceração e quantificação de pigmentos ou para inferir a massa de matéria seca), 250 foram transplantadas para vasos plásticos pretos com dimensões de 10 x 8cm (diâmetro da boca e altura), 270 mL de capacidade e cinco furos da parte inferior. Os vasos foram mantidos em bancada, continham musgo *Sphagnum* sp. como substrato e as plantas foram aclimatizadas em casa de vegetação. Esta fase foi conduzida durante os meses de primavera-verão, entre setembro a dezembro.

A partir da divisão das plântulas em cinco repetições com 10 unidades, o experimento foi desenvolvido sob tela de nylon para a retenção de 60% da intensidade luminosa e a umidade relativa mantida constante em 70%, sendo realizadas regas diárias (50 mL por vaso, aplicado no período da manhã dentre 8:00 às 9:30), durante 75 dias, quando foi avaliada a sobrevivência de cada tratamento e os resultados expressos em porcentagem.

Os dados biométricos e de pigmentos do cultivo *in vitro* foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e regressão polinomial. Os valores dos pigmentos fotossintéticos foram transformados em $(x+1)^{1/2}$, ANOVA e submetidos ao teste de Tukey a 5% de probabilidade por meio do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2008).

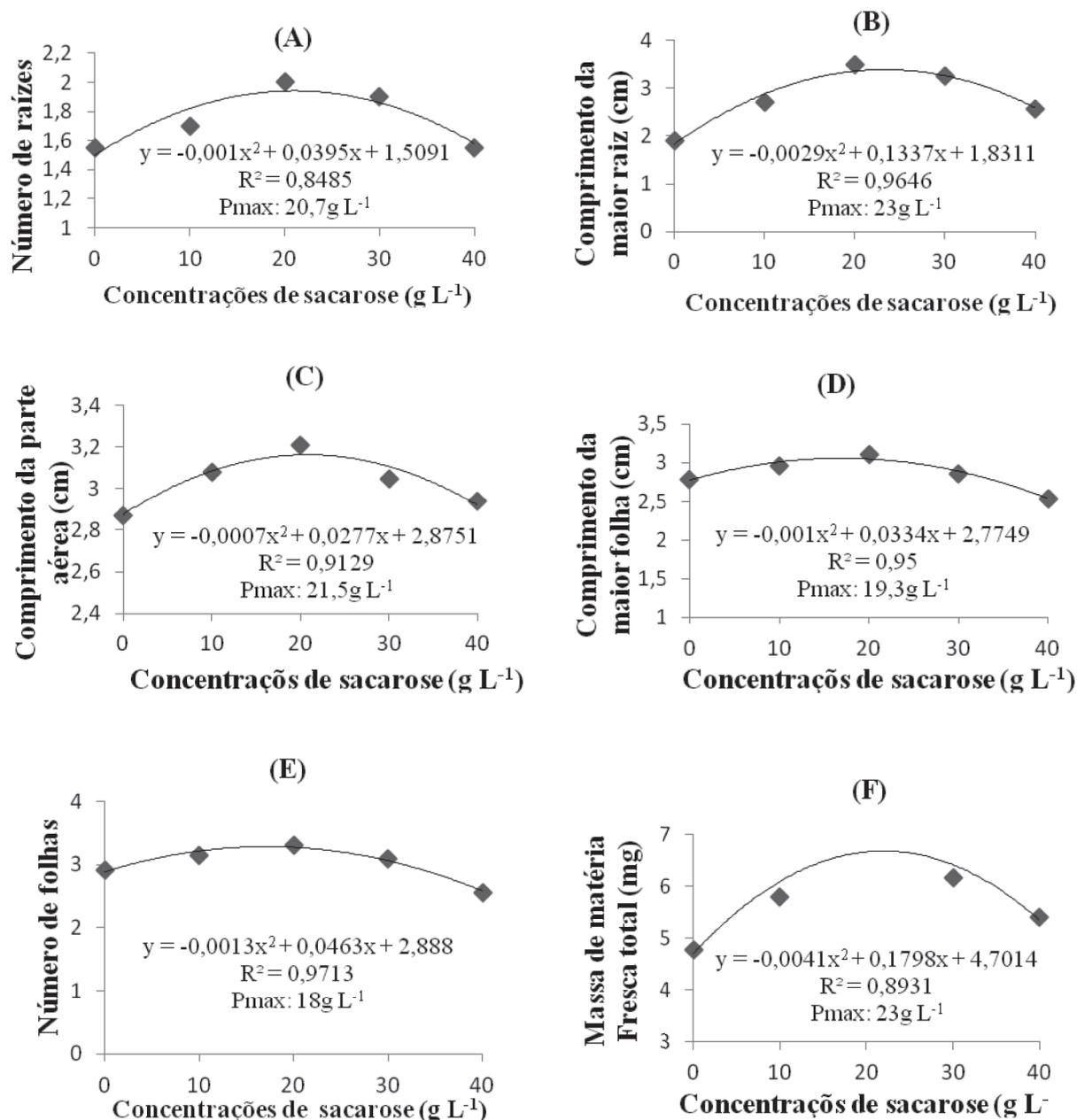
Resultados e Discussão

O meio de cultura acrescido de 20g L⁻¹ de sacarose apresentou a maior eficiência para o crescimento de *Cattleya loddigesii in vitro*, com resposta quadrática em todos os parâmetros avaliados (Figura 1).

O número de raízes, bem como o comprimento da maior raiz foi influenciado pelo aumento da concentração de sacarose no meio de cultura, embora sendo averiguada redução para o crescimento nas concentrações de 30 e 40g L⁻¹ (Figuras 1A e 1B). As plântulas apresentaram maior média constatada para a concentração de 20,7g L⁻¹ de sacarose quanto ao número de raízes, enquanto proporcionaram comprimento da maior raiz na concentração 23,0g L⁻¹ do mesmo carboidrato. Com o aumento da concentração de açúcares há diminuição da absorção de sais minerais e água e, isto pode interferir no crescimento da planta (FRÁGUAS et al., 2003; BESSON et al., 2010).

Estes resultados contrastam com os de Rego-Oliveira et al. (2003), com *Oncidium varicosum* e Sorace et al. (2008), com *Oncidium baueri*, nos quais a concentração de 40g L⁻¹ de sacarose favoreceu maior crescimento e número de raízes, enquanto Dignart et al. (2009), com *Cattleya walkeriana* e Besson et al. (2010), com *Miltonia flavescens* obtiveram resultados semelhantes a 30g L⁻¹. Não obstante, os dados do presente trabalho corroboram os resultados de Fráguas et al. (2003) e Pivetta et al. (2010), com *Cattleya labiata* x *Laelia itambana* e *Caularthron bicornutum*, respectivamente, e representam uma indicação que as exigências de sacarose *in vitro* para o crescimento radicular são heterogêneas entre espécies ou híbrido de orquídeas brasileiras.

Figura 1. Valores médios do número de raízes (A), comprimento da maior raiz – cm (B), comprimento parte aérea – cm (C), comprimento da maior folha – cm (D), número de folhas (E) e massa de matéria seca total – mg (F) em função do aumento de concentrações de sacarose no meio de cultura para o cultivo *in vitro* de *Cattleya loddigesii*. Jaboticabal – SP, 2010.



Fonte: Elaboração dos autores.

O comprimento da parte aérea (Figura 1C) e comprimento da maior folha (Figura 1D) foram reduzidos na ausência e na maior concentração de sacarose. Para a primeira (comprimento da parte aérea) foi verificada maior média para a concentração de 21,5g L⁻¹ e para a segunda, maior rendimento para o crescimento na concentração de 19,3g L⁻¹ de sacarose, concomitantemente. Entretanto, Besson et al. (2010) registraram maiores valores médios nas concentrações de 30 a 45g L⁻¹ de sacarose para o comprimento da parte aérea em *Miltonia flavescens*, enquanto Faria et al. (2004) relataram maior crescimento em altura para *Dendrobium nobile* a 60g L⁻¹ do mesmo açúcar.

A maior média para o número de folhas foi estimado a 18g L⁻¹ (Figura 1E), outro indicativo que a ausência ou concentração de 40g L⁻¹ de sacarose é desfavorável para a parte aérea de *Cattleya loddigesii*. Esses resultados estão em consonância com os de Jo et al. (2009), os quais verificaram baixo crescimento foliar de *Alocasia amazonica* micropropagadas em concentrações elevadas de sacarose (60 e 90g L⁻¹), bem como Braun et al. (2010), que detectaram menor massa *in vitro* de *Beta vulgaris* com 45 ou 60g L⁻¹ de sacarose. Plantas crescendo em cultura *in vitro* são semi-autotróficas (HAZARIKA, 2003),

e as folhas formadas sob tais condições podem não adquirir competência fotossintética (VAN HUYLENBROECK; DEBERGH, 1996).

Em relação à massa de matéria seca total (soma da parte aérea e radicular), as plântulas apresentaram a maior produção próxima de 23g L⁻¹ de sacarose (Figura 1F), o que confirma o resultado de Pivetta et al. (2010), os quais relataram que concentrações mais elevadas desse açúcar são desaconselhadas para o crescimento *in vitro* da espécie de orquídea amazônica *Caularthron bicornutum*.

As quantidades de pigmentos fotossintéticos apresentaram variações entre os tratamentos utilizados (Tabela 1). Houve diferenças significativas para a concentração 20g L⁻¹, que proporcionou a maior produção de clorofila *a* e carotenóides, enquanto a ausência de sacarose ou as demais concentrações estudadas produziram menores teores dos referidos pigmentos fotossintéticos. Concordando com os dados do presente trabalho, Dignart et al. (2009) encontraram menores quantidades de clorofilas em *Cattleya walkeriana* em meio de cultura MS com ausência de sacarose. Ressalta-se, também, que as quantidades de clorofila *b* e relação clorofila *a* sobre clorofila *b* não apresentaram diferenças significativas no presente experimento (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios da quantificação dos pigmentos fotossintéticos clorofila *a* (Cla), clorofila *b* (Clb), relação entre clorofila *a* e clorofila *b* (Cla/Clb), clorofilas totais (Cl T) e carotenóides (Carot). Jaboticabal – SP, 2010.

Tratamentos (g L ⁻¹ de sacarose)	Cla	Clb	Cla/Clb	Cl T	Carot
	-----($\mu\text{g g}^{-1}$ da massa de matéria fresca)-----				
0	10,19b	5,94a	2,05a	16,13c	6,14c
10	10,81ab	7,59a	1,84a	18,4bc	6,79bc
20	13,47a	7,81a	2,05a	21,28a	7,82a
30	10,98b	7,6a	1,89a	20,05a	6,84b
40	11,92b	7,47a	1,95a	19,39ab	7,48ab
CV (%)	5,26	13,93	6,33	7,07	6,14

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

Fonte: Elaboração dos autores.

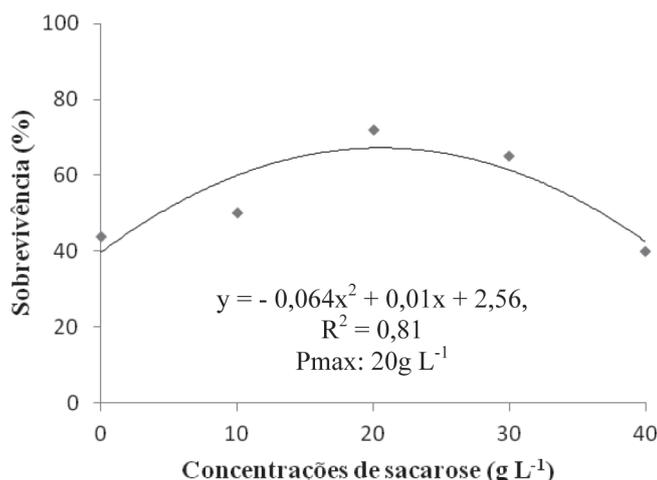
A produção de clorofila *a* foi maior na adição de 20g L⁻¹, enquanto as menores médias foram verificadas na ausência ou a 40g L⁻¹ de sacarose. Esse pigmento atua com maior efetividade na atividade fotossintética, uma vez que diferentemente da clorofila *b* e carotenóides (denominados pigmentos acessórios), desempenha o processamento da luz (TAIZ; ZEIGER, 2006) e pode apresentar, portanto, maior eficiência fotossintética.

A produção de carotenóides foi reprimida no tratamento controle, que não diferiu significativamente da concentração 10g L⁻¹. Esses pigmentos desempenham função essencial como fotoprotetores (TAIZ; ZEIGER, 2006), e podem ser associados a uma importante estratégia para

maior superação da fase de aclimatização, etapa caracterizada por maior disponibilidade de luz em relação à fase *in vitro*.

Os resultados do presente trabalho apontam que não somente a formação de biomassa, mas a fotossíntese por meio da formação de maior quantidade de pigmentos foi influenciada positivamente pela sacarose exógena abaixo da concentração 40g L⁻¹. Quando plantas de *Cattleya loddigesii* cultivadas *in vitro* foram transferidas para condições *ex vitro*, maior sobrevivência e melhor aspecto geral foram observados naquelas em que o meio de cultura foi suplementado com sacarose e nas concentrações 10, 20 e 30g L⁻¹ (Figura 2).

Figura 2. Sobrevivência de plantas de *Cattleya loddigesii* provenientes dos tratamentos de concentrações de sacarose aos 75 dias após aclimatização em casa de vegetação. Jaboticabal – SP, 2010.



Fonte: Elaboração dos autores.

Verifica-se que a adição desse carboidrato no meio ofereceu considerável relevância para o estabelecimento das plantas em casa de vegetação, tendo em vista que o tratamento controle não favoreceu a sobrevivência das plantas. Esses resultados concordam, parcialmente, com os de Vij, Vishal e Sharma (1996), os quais obtiveram maior sobrevivência durante aclimatização de

Vanda cristata Lindl. após propagação *in vitro* em meio de cultura com a presença de sacarose em baixas concentrações (entre 0,5 a 2,0g L⁻¹). A presença de sacarose *in vitro* foi vantajosa para a aclimatização de *Cattleya loddigesii*, no entanto a menor concentração (10g L⁻¹) não foi a mais eficiente para seu crescimento.

A suplementação de sacarose no meio de cultura auxilia a manutenção do potencial osmótico e conservação das células. A conservação de água é essencialmente importante para estabelecimento *ex vitro* de plantas, pois em condições *in vitro* não possuem uma cutícula bem desenvolvida e cera epicuticular (HAZARIKA, 2003), o que pode ter favorecido a aclimatização dessa espécie brasileira.

A sacarose foi efetiva também para a fase de aclimatização nas plantas de *Cattleya loddigesii*, porém ineficiente na concentração de 40g L⁻¹. Uma razão para essa resposta pode ser o excessivo estresse osmótico provocado pela alta concentração de açúcar, a qual reduz a atividade metabólica *in vitro* (JO et al., 2009) e repercutiu, conseqüentemente, no estabelecimento *ex vitro*. Os resultados do presente trabalhos apontam também que teores maiores de pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenóides) podem influenciar de forma positiva a aclimatização.

Conclusão

A concentração de 20g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura apresentou maior eficiência no crescimento *in vitro* e na fase de aclimatização de plantas de *Cattleya loddigesii*.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa doutorado do primeiro autor (Proc. N° 153121/2010-6) e bolsa produtividade em pesquisa dos dois últimos autores.

Referências

ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, Washington, v. 24, n. 1, p. 1-15, 1949.

BARBOZA, S. B. S. C.; GRACIANO-RIBEIRO, D.; TEIXEIRA, J. B.; PORTES, T. A.; SOUZA, L. A. C.

Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 41, n. 2, p. 185-194, 2006.

BESSON, J. C. F.; OLIVEIRA, L. K.; BONETT, L. P.; STEFANELLO, S. Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 8, n. 1, p. 9-13, 2010.

BRAUN, H.; LOPES, J. C.; SOUZA, L. T.; SCHMILDT, E. R.; CAVATTE, R. P. Q.; CAVATTE, P. C. Germinação *in vitro* de sementes de beterraba tratadas com ácido giberélico em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 31, n. 3, p. 539-546, 2010.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, 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 CENARGEN, 1998. v. 1, p. 87-132.

CHUGH, S.; GUHA, S.; RAO, U. Micropropagation of orchid: a review on the potential of different explants. *Scientia Horticulture*, Amsterdam, v. 122, n. 4, p. 507-520, 2009.

COSTA, M. A. P. C.; PEREIRA, M. J.; ROCHA, M. A.; HANSEN, D. S.; ALVES, R. M. O.; SOUZA, E. H.; GARCIA, F. R. Micropropagação de orquídeas. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. *Aspectos práticos da micropropagação de plantas*. Cruz das Almas: EMBRAPA MFT, 2009. v. 1, p. 351-370.

DEB, C. R.; IMCHEN, T. An efficient *in vitro* hardening technique of tissue culture raised plants. *Biotechnology*, Frankfurt, v. 9, n. 1, p. 79-83, 2010.

DIGNART, S. L.; CASTRO, E. M.; PASQUAL, M.; FERRONATO, F.; BRAGA, F. T.; PAIVA, R. Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 33, n. 3, p. 780-787, 2009.

FARIA, R. T. Micropropagação de *Dendrobium nobile in vitro*. In: TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. *Micropropagação de plantas ornamentais*. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. p. 63-67.

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; CARVALHO, J. F. R. P. *Cultivo de orquídeas*. Londrina: Mecenas, 2010. 208 p.

FARIA, R. T.; RODRIGUES, F. N.; OLIVEIRA, L. V. R.; MÜLLER, C. *In vitro Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 22, n. 4, p. 780-783, 2004.

- FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium*, v. 6, n. 1, p. 36-41, 2008. Disponível em: <http://www.fadminas.org.br/symposium/12_edicoes/artigo_5.pdf>. Acesso em: 5 out. 2010.
- FRÁGUAS, C. B.; VILLA, F.; SOUZA, A. V.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídeas oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. *Ceres*, Viçosa, v. 50, n. 292, p. 719-726, 2003.
- HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science*, Bangalore, v. 85, n. 12, p. 1704-1712, 2003.
- HENDRY, G. A. F.; PRICE, A. H. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: HENDRY, G. A. F.; GRIME, J. P. *Methods in comparative plant ecology*. London: Chapman & Hall, 1993. p. 150-152.
- JO, E. A.; TEWARI, R. K.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. *In vitro* sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 96, n. 3, p. 307-315, 2009.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- PIVETTA, K. F. L.; MARTINS, T. A.; GALDIANO JUNIOR, R. F.; GIMENES, R.; FARIA, R. T. F.; TAKANE, R. J. Crescimento *in vitro* de plântulas de *Caularthron bicornutum* em diferentes concentrações de sacarose. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 40, n. 9, p. 1897-1902, 2010.
- REGO-OLIVEIRA, L. V.; FARIA, R. T. *In vitro* propagation of Brazilian orchids using traditional culture media and commercial fertilizers formulations. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 27, n. 1, p. 1-5, 2005.
- REGO-OLIVEIRA, L. V. R.; FARIA, R. T.; FONSECA, I. C. B.; SACONATO, C. H. Influência da fonte e concentração de carboidrato no crescimento vegetativo e enraizamento *in vitro* de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae). *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 24, n. 2, p. 265-272, 2003.
- ROBERTS, D. L.; DIXON, K. W. Orchids. *Current Biology*, London, v. 18, n. 8, p. 325-329, 2008.
- SORACE, M.; FARIA, R. T.; DAMASCENO JÚNIOR, C. V.; GOMES, G. P.; BARBOSA, C. M.; VIEIRA, F. G. N.; SILVA, G. L.; TAKAHASHI, L. S. A.; SCHNITZER, J. A. Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 29, n. 4, p. 775-782, 2008.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 819 p.
- VAN HUYLENBROECK, J. M.; DEBERGH, P. C. Impact of sugar concentration *in vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during ex vitro acclimatization of *Spathiphyllum* plantlets. *Physiologie Plantarum* v. 96, n. 2, p. 298-304, 1996.
- VII, S. P.; VISHAL, S.; SHARMA, V. Regenerative competence of *Vanda cristata* perianth segments: a study *in vitro*. *Journal of the Orchid Society of India*, v. 10, n. 1, p. 25-29, 1996.
- WATTANABE, D. *Orquídeas- manual de cultivo*. São Paulo: AOSP, 2002. 300 p.

