



Revista Brasileira de Ciências Agrárias

ISSN: 1981-1160

editorgeral@agraria.pro.br

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Brasil

Moreira, Rodrigo A.; Rodrigues, Filipe A.; Monfort, Lucila E. F.; Pires, Marinês F.; Pasqual, Moacir

Diferentes meios de cultura no crescimento in vitro de sorvetão

Revista Brasileira de Ciências Agrárias, vol. 7, núm. 3, julio-septiembre, 2012, pp. 409-413

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Pernambuco, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=119024529006>

- ▶ Como citar este artigo
- ▶ Número completo
- ▶ Mais artigos
- ▶ Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe , Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

AGRÁRIA

Revista Brasileira de Ciências Agrárias

ISSN (on line) 1981-0997

v.7, n.3, p.409-413, jul.-set., 2012

Recife, PE, UFRPE. www.agraria.ufpe.br

DOI:10.5039/agraria.v7i3a1447

Protocolo 1447 - 28/03/2011 • Aprovado em 22/12/2011

Rodrigo A. Moreira^{1,2}

Filipe A. Rodrigues^{1,3}

Lucila E. F. Monfort^{1,2}

Marinês F. Pires^{1,4}

Moacir Pasqual^{1,5}

Diferentes meios de cultura no crescimento *in vitro* de sorvetão

RESUMO

Este trabalho teve, como objetivo, avaliar diferentes meios de cultura no crescimento *in vitro* de sorvetão. Os explantes foram inoculados em frascos de vidro contendo 50 mL de diferentes meios de cultura. Os meios de cultura utilizados foram o MS suplementado com 3% de sacarose, Knudson suplementado com 2% de sacarose, Knudson suplementado com vitamina, aminoácidos, mioinositol e 2% de sacarose, Pierik suplementado com 2% de sacarose, solução de Hoagland suplementado com 3% de sacarose e solução de Hoagland suplementado com vitamina, aminoácidos, mioinositol e 3% de sacarose. O delineamento inteiramente casualizado foi utilizado com cinco repetições e quatro plantas por parcela. Diferenças significativas foram observadas entre os meios de cultura para número de folhas, comprimento de brotações, biomassa seca da parte aérea, número de raízes, comprimento de raízes e biomassa seca do sistema radicular; no entanto, não houve diferença significativa para o número de brotações nos meios de cultura utilizados na micropromoção do sorvetão. No cultivo *in vitro* de sorvetão o meio MS proporcionou maior crescimento dos explantes.

Palavras-chave: cultura de tecidos, nutrição mineral de plantas, *Zingiber spectabile*

Different culture medium *in vitro* growth of beehive ginger

ABSTRACT

This study aimed to evaluate different culture medium *in vitro* growth of beehive ginger. The explants were cultured in glass vials containing 50 mL of different culture media. The culture media used were MS supplemented with 3% sucrose, Knudson supplemented with 2% sucrose, supplemented with vitamin, Knudson supplemented with amino mio-inositol and 2% sucrose, Pierik supplemented with 2% sucrose, Hoagland solution supplemented with 3% sucrose and Hoagland solution supplemented with vitamin, amino mio-inositol and 3% sucrose. A completely randomized design was used with five replications and four plants per plot. Significant differences were observed between the culture media for leaf number, shoot length, dry weights of shoot, root number, root length and dry biomass of root system. However, there was no significant difference in the number of shoots in culture media used in micropropagation of beehive ginger. *In vitro* cultivation of beehive ginger in MS medium provided the higher growth of the explants.

Key words: Tissue culture, plant mineral nutrition, *Zingiber spectabile*

1 Universidade Federal de Lavras,
Departamento de Agricultura, Campus
Universitário, CEP 37200-000, Lavras, MG,
Brasil. Caixa Postal 3037.
Fone: (35) 3829-1329. E-mail:
amatomoreira@yahoo.com.br;
filipealmendagna@yahoo.com.br;
lucilaagro@yahoo.com.br;
marinesfpires@gmail.com;
mpasqual@dag.ufla.br

2 Bolsista de Doutorado da CAPES

3 Bolsista de Doutorado do CNPq

4 Bolsista de Doutorado da FAPEMIG

5 Bolsista de Produtividade em Pesquisa do
CNPq

INTRODUÇÃO

A floricultura brasileira representa um setor altamente competitivo e exigente na utilização de tecnologias avançadas, sobretudo quando se trata de exportação; abrange desde o cultivo de plantas ornamentais, flores de corte, plantas envasadas, floríferas ou não, até a produção de sementes, bulbos e mudas de várias espécies, inclusive arbóreas. A produção e o consumo de flores e plantas ornamentais no Brasil vêm acompanhando a tendência de expansão do mercado mundial, que vem crescendo a cada ano (Landgraf & Paiva, 2009). 70% da produção de plantas ornamentais nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina, são destinados à exportação para outros países, como a Holanda, Canadá, Alemanha e Estados Unidos (Debiasi et al., 2004).

O sorvetão (*Zingiber spectabile* Griff) também conhecido como gengibre ornamental, pertence à família Zingiberaceae; é uma espécie originária da Malásia, com altura de 1,5 a 2,0 m, possui hastes mais ou menos eretas semelhantes às da cana-de-açúcar. As folhas são沿ongadas e aveludadas na face abaxial; possui inflorescências terminais, em espiga com aspecto de cerosidade, que, à medida em que se desenvolve, passa da cor amarela para a vermelha. Protegidas por suas brácteas elas contêm pequenas flores brancas com o centro arroxeados (Lorenzi, 2001).

Um dos grandes problemas da cultura está relacionado à produção de mudas com qualidade genética e fitossanitária. Convencionalmente, os produtores propagam, vegetativamente, por rizomas, produzindo suas próprias mudas. Porém esta prática acarreta vários problemas fitossanitários, dentre eles a disseminação de doenças a cada ciclo da cultura, o que pode levar à destruição total das plantações devido à disseminação rápida, principalmente de fungos, nematóides e bactérias (Debiasi et al., 2004).

Desta forma, a cultura de tecidos tem sido utilizada para a propagação clonal em massa de híbridos e espécies de plantas ornamentais, possibilitando a obtenção de plantas de alta qualidade fitossanitária, em curto período de tempo (Arditti & Ernst, 1993).

A micropopulação ou propagação *in vitro* é utilizada no Brasil há pouco mais de 25 anos, com a finalidade de produção de mudas de alta qualidade genética e, consequentemente, reduzir seu custo. Além disso, tem contribuído para impedir a extinção de muitas espécies vegetais (Stancato et al., 2001). Sua utilização em âmbito comercial já é uma realidade em diversos países do mundo, destacando-se Holanda, França, Espanha, Japão e, mais recentemente, o Brasil.

O meio de cultura mais utilizado em cultura de tecidos para a propagação de várias espécies vegetais, é o MS (Murashige & Skoog, 1962), embora sua concentração de nutrientes tenha sido identificada como elevada, em especial quanto ao fornecimento de nitrogênio e, neste sentido, muitas modificações têm sido sugeridas objetivando-se maior adaptação das culturas e redução de custos.

Um dos fatores importantes para o sucesso do sistema de micropopulação é a conjugação de fatores nutritivos, ambientais e endógenos. No caso específico dos fatores

ambientais, procura-se estudar os componentes do meio de cultura. Neste caso, diversas formulações de meios básicos têm sido utilizadas (Villa et al., 2010). A composição do meio de cultura é relevante para o desenvolvimento da planta, geralmente constituído por macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, sacarose e agente gelificante.

Vários meios de cultura têm sido testados e o fator que mais varia entre eles é a concentração de sais minerais. Com tantas possibilidades a escolha do meio mais adequado para a micropopulação da espécie alvo se faz oportuna para a obtenção de um bom desenvolvimento da cultura em condições de cultivo *in vitro*. Ante o exposto o presente trabalho objetivou avaliar diferentes meios de cultura no crescimento *in vitro* de sorvetão (*Zingiber spectabile* Griff).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras. Foram utilizadas plantas de sorvetão (*Zingiber spectabile*) estabelecidas *in vitro* como doadoras de explantes basais, com visto à condução do ensaio. Os explantes foram inoculados em frascos de vidro contendo 50 mL de diferentes meios de cultura. Os meios de cultura utilizados foram o MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 3% de sacarose, Knudson suplementado com 2% de sacarose, Knudson suplementado com vitamina, aminoácidos, mio-inositol nas mesmas concentrações do MS e 2% de sacarose, Pierik suplementado com 2% de sacarose, solução de Hoagland suplementado com 3% de sacarose e solução de Hoagland suplementado com vitamina, aminoácidos, mio-inositol nas mesmas concentrações do MS e 3% de sacarose. Cada meio de cultivo constituiu um tratamento; utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições e quatro plantas por parcela.

Para ambos os tratamentos o meio de cultura foi solidificado com 0,6% de ágar, o pH foi ajustado para 5,8±0,1 e, em seguida, autoclavado a 120°C e 1 atm, durante 20 minutos; após a inoculação os frascos foram vedados com parafilm e mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas, sob intensidade luminosa de 42 W m⁻².

Aos 60 dias as variáveis agronômicas avaliadas nos experimentos foram o número de brotações, comprimento (cm) (CB) e biomassa seca da parte aérea (mg) (BSPA), número de folhas (NF), número (NR), comprimento (cm) (CR) e biomassa seca de raiz (mg) (BSSR). O comprimento de brotações e o comprimento de raiz foram determinados com o auxílio de uma régua. Para a altura, a medição foi feita da base da brotação até a gema apical; enquanto à determinação da biomassa seca, as brotações e as raízes foram colocadas em sacos de papel kraft e acondicionadas em estufa de circulação forçada de ar, a 60°C, por 5 dias; após este período o material vegetal foi mensurado em balança de precisão.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$) e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) enquanto nas variáveis foram realizadas correlações de Pearson.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observaram-se diferenças significativas entre os meios de cultura para número de folhas, comprimento de brotações, biomassa seca da parte aérea, número de raízes, comprimento de raízes e biomassa seca do sistema radicular; no entanto, não houve diferença significativa para o número de brotações nos meios de cultura utilizados na micropagação do sorvetão.

O meio de cultura MS propiciou o maior número de folhas em comparação com os demais meios de cultura, que não diferenciaram entre si (Tabela 1). Este resultado pode ser explicado pela maior concentração de nitrogênio ($840,90 \text{ mg L}^{-1}$) presente no meio MS; este nutriente, juntamente com a sacarose, é o principal componente em quantidade no meio de cultura, contribuindo de forma efetiva, tanto no metabolismo celular como na regulação do seu potencial osmótico (Nagao et al., 1994). Resultados semelhantes foram encontrados por Pasqual et al. (2009) que, a partir da elevação na concentração de NH_4NO_3 no meio de cultura MS, que obtiveram aumento no número de folhas de plantas de orquídeas.

Tabela 1. Valores médios do número de folhas (NF), comprimento de brotações (CB) (cm) e biomassa seca da parte aérea (BSPA) (mg) de plantas de sorvetão micropagadas em diferentes meios de cultura, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, 2010

Table 1. Mean values of leaf number (NF), shoot length (CB) (cm) and dry biomass of shoot (BSPA) (mg) of beehive ginger plants micropropagated in different culture media at 60 days *in vitro* cultivation. UFLA, Lavras, 2010

Meios de cultura	NF	CB	BSPA
Murashige & Skoog	7a	3,76 a	80,50 a
Knudson + vitam. + a.a.	4 b	2,34 b	24,38 c
Knudson	4 b	2,48 b	30,00 c
Pierik	5 b	2,42 b	30,76 c
Hoagland + sacarose	5 b	2,82 b	46,78 c
Hoagland + sacarose + vitam + a.a.	5 b	3,08 a	59,14 b

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade de erro

Sato et al. (2001) verificaram, estudando a influência da concentração de nitrato de amônio na micropagação da mandioca (*Manihot esculenta*) que o número de folhas cresceu com o aumento da concentração de NH_4NO_3 , e na concentração de $41,20 \text{ mM L}^{-1}$ de NH_4^+ , se obteve o maior número de folhas, que equivale ao dobro da concentração de nitrato de amônio utilizada no meio MS.

Em relação ao comprimento da parte aérea, os meios MS e Hoagland acrescidos de sacarose, vitaminas e aminoácidos, apresentaram resultados superiores aos demais meios de cultura; entretanto, não diferiram entre si (Tabela 1). Este resultado sugere que a adição de compostos orgânicos pode favorecer o desenvolvimento da parte aérea de plantas de sorvetão *in vitro*. A sacarose é um componente significativo no meio de cultura, servindo como fonte de carbono e energia para as plântulas (Sorace et al., 2008).

O meio MS também proporcionou a maior biomassa da parte aérea (80,5 mg), seguido do Hoagland acrescido de sacarose, vitaminas e aminoácidos (59,14 mg); os demais meios propiciaram os menores valores e não diferiram entre si (Tabela 1).

Em relação ao sistema radicular das plantas de sorvetão *in vitro*, o meio MS promoveu o maior número de raízes (12), seguido do meio Hoagland acrescido de sacarose, vitaminas e aminoácidos (8) e os demais meios apresentaram menores números de raízes e não diferiram entre si (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios de número de raízes (NR), comprimento de raízes (CR) (cm) e biomassa seca do sistema radicular (BSSR) (mg) de plantas de sorvetão micropagadas em diferentes meios de cultura, aos 60 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, 2010

Table 2. Mean values of root number (NR), root length (CR) (cm) and dry root biomass (BSSR) (mg) of beehive ginger plants micropropagated in different culture media at 60 days *in vitro* cultivation. UFLA, Lavras, 2010

Meios de cultura	NR	CR	BSSR
Murashige & Skoog	12a	3,2 b	9,31 a
Knudson + vitam. + a.a.	5 c	2,6 b	1,02 b
Knudson	5 c	1,86 b	1,65 b
Pierik	6 c	2,28 b	1,83 b
Hoagland + sacarose	6 c	6,46 a	10,68 a
Hoagland + sacarose + vitam. + a.a.	8 b	5,96 a	12,98 a

Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade de erro

No entanto, o meio Hoagland, acrescido ou não de sacarose, vitaminas e aminoácidos, proporcionou comprimento de raízes maiores a todos os outros meios que não diferiram entre si (Tabela 2). Este resultado demonstra que os sais e os reguladores vegetais presentes nos meios de cultura influenciam no processo de enraizamento adventício *in vitro* (Souza & Pereira, 2007).

Os maiores valores de biomassa seca do sistema radicular foram obtidos com os meios MS e Hoagland acrescidos ou não de sacarose, vitaminas e aminoácidos; todos os outros meios apresentaram menores valores de biomassa e semelhantes entre si (Tabela 2).

O meio MS é conhecido por ser um meio altamente concentrado tendo, em sua composição, altas concentrações de nitrogênio ($840,90 \text{ mg L}^{-1}$), cálcio ($119,98 \text{ mg L}^{-1}$), manganês ($1,08 \text{ mg L}^{-1}$) e zinco ($1,96 \text{ mg L}^{-1}$) (Tabela 3). Por essas atribuições este meio teve bom desempenho na indução do sistema radicular de plantas de sorvetão cultivadas *in vitro*, pois esses nutrientes são requeridos no processo de formação de raízes.

Tabela 3. Concentração dos nutrientes (mg L^{-1}) nos meios de cultura utilizados na micropagação de plantas de sorvetão

Table 3. Nutrient concentrations (mg L^{-1}) in the culture media used in micropropagation of beehive ginger plant

Nutrientes	MS	Knudson	Pierik	Hoagland
N	840,90	162,90	420,32	210,00
P	38,72	56,94	19,35	31,00
K	782,65	71,70	391,96	234,60
Ca	119,98	162,87	48,18	160,30
Mg	36,50	24,60	18,25	48,60
S	55,53	159,55	30,67	64,00
Fe	5,59	5,59	5,59	5,00
B	1,08	0,24	1,08	0,51
Mn	5,59	3,69	4,16	0,79
Zn	1,96	1,5	1,96	0,05
Cu	0,01	0,01	0,01	0,02
Mo	0,09	0,01	0,09	0,01
Cl	212,25	-	85,24	-

Tabela 4. Coeficientes das Correlações de Pearson para número de raízes (NR), número de folhas (NF), comprimento de raízes (CR), comprimento da parte aérea (CPA), biomassa seca do sistema radicular (BSSR) e biomassa seca da parte aérea (BSPA) de plantas de sorvetão micropagadas em diferentes meios de cultura

Table 4. Coefficients of Pearson correlations for number of roots (NR), number of leaves (NF), length of roots (CR), shoot length(CPA), root biomass(BSSR) and dry biomass of shoots (BSPA) of beehive ginger plants micropagated in different culture media

Meios de cultura	Variáveis			
	BSSR x BSPA	NR x NF	NR x CPA	CR x CPA
Murashige & Skoog	0,4166 ^{ns}	0,9481*	0,0355 ^{ns}	-0,1517 ^{ns}
Knudson + vit. + a.a.	0,6883*	0,7875*	-0,2943 ^{ns}	0,5898 ^{ns}
Knudson	0,7987*	0,5599 ^{ns}	-0,1056 ^{ns}	-0,3396 ^{ns}
Pierik	0,1454 ^{ns}	0,6447*	-0,4293 ^{ns}	0,8362 ^{ns}
Hoagland + sacarose	0,8924*	0,1513 ^{ns}	-0,8178*	0,9937*
Hoagland + sac. + vit. + a.a.	0,9652*	0,8295*	0,9069*	0,7148*

^{ns} não significativo e * significativo a 5% de probabilidade

A importância do nitrogênio está relacionada com a síntese de proteínas, aminoácidos e ácidos nucléicos; tem papel importante na produção de triptofano, precursor natural do AIA e de substâncias de reserva. O zinco e o manganês influenciam o nível de auxinas endógenas; o cálcio é necessário para o crescimento e desenvolvimento das raízes visto que a interrupção no seu suprimento resulta imediatamente na não formação dos primórdios de raízes e, se já formadas, na redução do crescimento e consequente morte (Blazich, 1988).

O aspecto das plantas *in vitro* de sorvetão em diferentes meios de cultura pode ser observado na Figura 1.

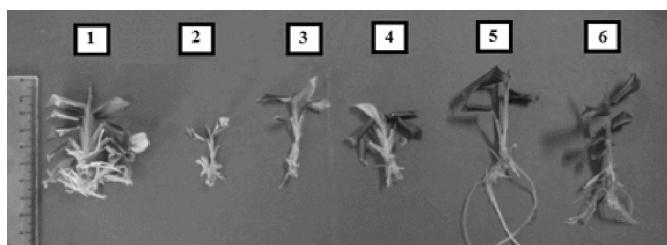


Figura 1. Plantas de sorvetão micropagadas em diferentes meios de cultura aos 60 dias de cultivo *in vitro*. (1) Meio MS, (2) Knudson, (3) Knudson + vitamina + aminoácidos, (4) Pierik, (5) Hoagland e (6) Hoagland + vitamina + aminoácidos. UFLA, Lavras, 2010

Figure 1. Beehive ginger plant micropagated in different culture media at 60 days in vitro cultivation. (1) MS medium, (2) Knudson, (3) + Knudson + vitamin + amino acids, (4) Pierik, (5) Hoagland and (6) Hoagland + vitamin + amino acids. UFLA, Lavras, 2010

O meio de cultura Knudson é considerado por muitos pesquisadores, um meio de baixas concentrações de nutrientes, sobretudo no que se refere a micronutrientes. Observa-se que a ausência de compostos orgânicos, como as vitaminas, aminoácidos e mio-inositol, prejudicaram o desenvolvimento da planta, tanto a parte aérea como o sistema radicular, porém a suplementação desses compostos no meio não incrementou o desenvolvimento da planta, mostrando que o baixo crescimento da planta está relacionado aos fatores nutricionais do meio de cultura de Knudson (Figura 1 e Tabelas 1 e 2).

No meio MS observou-se correlação positiva entre o número de raízes e o número de folhas indicando que, quanto maior o número de raízes maior também o número de folhas; este resultado é importante visto que referido meio foi o que proporcionou maior número de raízes e, desta forma, o transplantio de mudas pode ser favorecido com uma

sobrevivência maior (Tabela 4). Entre a biomassa seca de raiz e a biomassa seca da parte aérea, comprimento de raiz e comprimento da parte aérea, não foram observadas correlações significativas nesse meio em virtude, provavelmente, de ter proporcionado maior número de raízes com menores comprimentos, aptas a absorverem nutrientes do meio e promover melhor desenvolvimento da parte aérea.

Foram observadas correlações positivas (Tabela 4) entre a biomassa seca de raiz e a biomassa seca da parte aérea, número de raízes e número de folhas, número de raízes e comprimento da parte aérea e entre comprimento de raiz e comprimento da parte aérea, no meio Hoagland acrescido de sacarose, vitamina e aminoácidos, indicando que o crescimento do sistema radicular favorece o crescimento da parte aérea pela maior aérea explorada no meio, absorvendo nutrientes e compostos orgânicos nas plantas micropagadas de sorvetão.

Entre comprimento de raiz e comprimento da parte aérea foram observadas correlações positivas no meio Hoagland acrescido ou não de sacarose, vitaminas e aminoácidos, demonstrando que o maior comprimento de raízes foi importante na absorção dos nutrientes e dos compostos orgânicos já que o número de raízes nesses meios foi inferior ao do meio MS.

Os meios Knudson e Hoagland, ambos acrescidos com vitamina e aminoácidos e o meio Pierik demonstraram correlações positivas entre o número de raízes e o número de folhas, sinalizando que o número de raízes é uma variável importante para o desenvolvimento das plantas de sorvetão *in vitro* (Tabela 4).

Correlações positivas entre biomassa seca do sistema radicular e biomassa seca da parte aérea foram verificadas nos meios de cultura Knudson e Hoagland, acrescidos ou não de vitaminas e aminoácidos, indicando que maior acúmulo de matéria seca na raiz favoreceu o maior acúmulo de matéria seca na parte aérea pela maior absorção dos nutrientes presentes nesses meios (Tabela 4).

CONCLUSÃO

No cultivo *in vitro* de sorvetão o meio MS proporcionou maior crescimento dos explantes.

LITERATURA CITADA

- Arditti, J.; Ernst, R. *Micropropagation of orchids*. New York: John Wiley, 1993. 682p.

- Blazich, F.A. Chemicals and formulations used to promote adventitious rooting. In: Davis, T.D.; Haissig, B.E.; Sankhla, N. (Eds.). Adventitious root formation in cuttings. Portland: Dioscorides Press, 1988. v. 2, p.132-149.
- Debiasi, C.; Feltrin, F.; Micheluzzi, F.C. Micropopagation de gengibre (*Zingiber officinale*). Revista Brasileira de Agrociência, v. 10, n. 1, p. 61-65, 2004. <<http://www.ufpel.tche.br/faem/agrociencia/v10n1/artigo08.pdf>>. 21 Fev. 2011.
- Landgraf, P. R.C.; Paiva, P.D.O. Produção de flores cortadas no estado de Minas Gerais. Ciência e Agrotecnologia, v. 33, n. 1, p. 120-126, 2009. <<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v33n1/v33n1a17.pdf>>. 17 Fev. 2011. doi:10.1590/S1413-70542009000100017.
- Lorenzi, H.; Souza, H.M. Plantas Ornamentais no Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2001. 1088p.
- Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays 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](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x/pdf)>. 18 Jan. 2011. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Nagao, E.O; Pasqual, M.; Ramos, J.D. Efeitos da sacarose e do nitrogênio inorgânico sobre a multiplicação *in vitro* de brotações de porta-enxerto de citros. Bragantia, v. 53, n.1, p. 25-31, 1994. <<http://www.scielo.br/pdf/brag/v53n1/03.pdf>>. 07 Jan. 2011. doi:10.1590/S0006-87051994000100003.
- Pasqual, M.; Figueiredo, M.A.; Rezende, J.; Araújo, A.G.; Santos, F.C.; Ferreira, E.A.; Junqueira, K.P. Fontes de nitrogênio, polpa de banana e ágar no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de orquídea. Horticultura Brasileira, v. 27, n. 2, p.211-216, 2009. <<http://www.scielo.br/pdf/hb/v27n2/v27n2a16.pdf>>. 06 Fev. 2011. doi:10.1590/S0102-05362009000200016.
- Sato, A.Y.; Maria, J.; Sediyama, T.; Borém, A.; Cecon, P.R. ; Junqueira, C. S. Micropopagation da mandioca: influência da concentração de amônio com e sem BAP. Revista Ceres, v. 48, n.278, p. 405-413, 2001. <<http://www.ceres.ufv.br/ceres/revistas/V48N278P09701.pdf>>. 22 Dez. 2010.
- Sorace, M.; Faria, R.T.; Damasceno, C.V.J.; Gomes, G.P.; Barbosa, C.M.; Vieira, F.G.N.; Silva, G. L. Da; Takahashi, L. S. A.; Schnitzer, J. A. Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. Semina: Ciências Agrárias, v. 29, n. 4, p. 775-782, 2008. <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/2691/2337>>. 18 Jan. 2011.
- Souza, A.V.; Pereira, A.M.S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007. <http://www.ibb.unesp.br/Home/Departamentos/Botanica/RBPM-RevistaBrasileiraDePlantasMedicinais/artigo17_v9_n4.pdf>. 17 Fev. 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. <<http://www.sbfpo.com.br/rbho/index.php/rbho/issue/view/55>>. 15 Fev. 2011.
- Villa, F.; Pasqual, M.; Souza, A.G.; Vilela, X.M.S. Meios de cultura e reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta. Scientia Agraria, v. 11, n. 2, p. 109-117, 2010. <http://www.sumarios.org/sites/default/files/pdfs/37221_4657.PDF>. 15 Fev. 2011.