

MULTIPLICAÇÃO “IN VITRO” DE *Cattleya x mesquitae* PELO MÉTODO DE ESTIOLAMENTO DE SEGMENTOS CAULINARES¹

Tatiana Vieira Ramos², Iraídes Fernandes Carneiro³

ABSTRACT

MULTIPLICATION “IN VITRO” OF *Cattleya x mesquitae* BY ETIOLATION OF STEM SEGMENTS METHOD

The objective of this study was to stimulate the formation of larger number of shoots and new explants by growth regulators addition to culture medium of *in vitro* stem segment orchid *Cattleya x mesquitae*. The stem segments were cut off plants obtained from *in vitro* seedlings, standardized to 1.0 cm long and grown at temperature of $25\text{C} \pm 2\text{C}$, in the dark, for sixty days. The culture medium was MS with reduction of macronutrients by half, containing three concentrations of ANA (0 mg L^{-1} , 0.1 mg L^{-1} , and 2.0 mg L^{-1}) and three concentrations of BAP (0 mg L^{-1} , 0.5 mg L^{-1} , and 2.0 mg L^{-1}). In general, there was a higher shoot production on the base than on the nodes, what indicates a low development of the axillary shoots. With the addition of 0.5 mg L^{-1} of BAP there was an average production of five shoots per etiolated explant, which represented an increase of up to two shoots as related to the absence of the growth regulator. A higher concentration of BAP in the medium (2.0 mg L^{-1}) revealed to be harmful, causing a 50% reduction in new shoot production. The absence of light was determinant for stem lengthening, whereas the application of growth regulators was unnecessary, although a larger formation of nodes has occurred when 2.0 mg L^{-1} of ANA was used.

KEY WORDS: Orchidaceae, orchid, micropropagation, growth regulators.

INTRODUÇÃO

A família das orquídeas encontra-se distribuída por todo o mundo, embora o maior número de espécies ocorra em regiões tropicais (Suttleworth *et al.* 1997). São conhecidos em torno de 800 gêneros e 35 mil espécies pertencentes a esta família (Miller &

RESUMO

O objetivo deste estudo foi estimular a formação de maior número de brotações e de novos explantes, por meio de fitorreguladores adicionados ao meio de cultura no cultivo *in vitro* de segmentos caulinares da orquídea *Cattleya x mesquitae*. Os segmentos caulinares foram excisados de plântulas originadas de sementeira *in vitro*, uniformizados para 1,0 cm de comprimento e cultivados em temperatura de $25\text{C} \pm 2\text{C}$, no escuro, durante sessenta dias. O meio de cultura foi o MS com redução dos macronutrientes à metade, contendo três concentrações de ANA (0 mg L^{-1} ; $0,1\text{ mg L}^{-1}$ e $2,0\text{ mg L}^{-1}$) e três concentrações de BAP (0 mg L^{-1} ; $0,5\text{ mg L}^{-1}$ e $2,0\text{ mg L}^{-1}$). De modo geral, houve maior produção de brotações na base do que nos nós, indicando um baixo desenvolvimento das gemas axilares. Com a adição de $0,5\text{ mg L}^{-1}$ de BAP houve uma produção média de cinco brotações por explante estiolado, o que significou um incremento de até duas brotações comparado ao cultivo na ausência de fitorreguladores. A maior concentração de BAP no meio de cultura, $2,0\text{ mg L}^{-1}$, mostrou-se prejudicial, promovendo uma redução de 50% na produção de novas brotações. A ausência de luz foi o fator determinante para o alongamento caulinar, enquanto a aplicação de fitorreguladores foi desnecessária, embora tivesse ocorrido maior formação de nós quando se utilizou $2,0\text{ mg L}^{-1}$ de ANA.

PALAVRAS-CHAVE: Orchidaceae, orquídea, micropropagação, fitorreguladores.

Warren 1996). Somente no Brasil já foram descritos cerca de 190 gêneros e 2.300 espécies (Mello 2000).

Em condições naturais, a propagação das orquídeas se dá pela proliferação de mudas laterais ou pela disseminação natural das sementes, as quais são produzidas em cápsulas. A cápsula contém milhares de sementes desprovidas de endocarpo e

1. Trabalho recebido em jun./2005 e aceito para publicação em dez./2006 (registro nº 642).

2. Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás (EA-UFG), Caixa Postal 131, CEP 74001-970 Goiânia, GO. E-mail: tati_vieira@pop.com.br

3. EA-UFG, Setor de Horticultura. Cx. Postal 131, Goiânia, GO. Telefone: (62)3215-1848. E-mail: iraides@agro.ufg.br

com tamanho muito pequeno, contendo um embrião de aproximadamente 0,1 mm que, durante a germinação, dilata-se para formar uma pequena estrutura denominada de protocormo ou protocormóide (Hoffmann *et al.* 1997). Um fator que contribui para a dificuldade da propagação das orquídeas em condições artificiais é a baixa ou nula germinação de suas sementes na ausência de micorrizas. Naturalmente, ocorre a deiscência das cápsulas e as sementes são lançadas no ambiente e, ao entrarem em contato com as micorrizas nas raízes das plantas adultas da mesma espécie, se associam e germinam.

A germinação *in vitro* vem sendo utilizada com sucesso, desde 1962, quando o pesquisador Lewis Knudson, obteve a germinação assimbiótica de sementes de orquídeas (Faria & Stancato 1998). Nos anos subseqüentes, outros métodos de micropropagação, utilizando as mais diferentes fontes de explantes, foram testados com sucesso. A micropropagação é hoje uma alternativa que maximiza a propagação de várias espécies, tendo como vantagens a fixação de ganhos genéticos em populações clonais e a obtenção de um grande número de plantas saudáveis e de alta qualidade, em pequeno espaço físico e em curto tempo, independentemente de fatores climáticos limitantes (Grattapaglia & Machado 1998).

Para espécies nativas, tem-se a dificuldade de obtenção de explantes em quantidade suficiente para iniciar uma cultura, devendo-se adotar novas técnicas para esse fim. Uma delas é o estiolamento, em que se obtém o desenvolvimento de brotos, caules ou partes desses, na ausência de luz, o que causa o crescimento, geralmente alongado, e com coloração amarela ou branca, em razão da ausência de clorofila (Hartmann & Kester 1990). Suzuki (1999) afirma que plantas de *Catasetum fimbriatum*, quando cultivadas *in vitro* no escuro, apresentam estiolamento caulinar, podendo seus segmentos nodais serem utilizados para a propagação vegetativa. Nesta e em outras espécies de orquídeas os caules estiolados apresentam folhas bastante reduzidas, escamiformes, com alongamento dos entrenós. Cada nó apresenta uma gema lateral, que poderá dar origem a um novo broto ou explante (Kerbaui *et al.* 1995).

O estiolamento tem sido utilizado com sucesso na micropropagação de outras espécies cultivadas. Em abacaxizeiro, cultivar Pérola, Moreira *et al.* (2003) obtiveram 10,26 brotações, após quarenta dias de cultivo *in vitro* no escuro, utilizando meio MS +

1,8 mg L⁻¹ ANA + 2,0 mg L⁻¹ BAP (6-benzilaminopurina), sendo que os maiores brotos estiolados (10,86 cm em média) foram produzidos na ausência de fitoreguladores. Após sessenta dias de cultivo *in vitro*, na ausência de luz, Barboza & Caldas (2001) obtiveram, em média 11,3 brotos para o híbrido PE-SC 52 de abacaxizeiro. Verificaram, ainda, que a adição de ANA (ácido naftaleno acético) e AIA (ácido 3-idolacético) não foi eficiente para estimular a formação de brotos estiolados.

Este trabalho teve como objetivo verificar o efeito da adição de fitoreguladores ao meio de cultura para obtenção de novas brotações em cultivo *in vitro* de *C. x mesquitate*, mediante o estiolamento de segmentos caulinares.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Cultura de Tecidos do Setor de Horticultura, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, utilizando-se explantes do híbrido natural de *C. x mesquitate*, obtidos através de sementeira *in vitro*. As sementes foram retiradas de cápsulas obtidas a partir de autofecundação realizada em plantas mantidas sob telado com 50% de sombreamento.

A sementeira *in vitro* foi realizada em frascos contendo meio de cultura de Murashige & Skoog (1962), com redução de seus macronutrientes à metade, após o ajuste do pH para 5,8, solidificação do meio com 0,7% (7,0 g.L⁻¹) de ágar e autoclavagem a 120°C por vinte minutos. Em condições assépticas e após a descontaminação das cápsulas, a sementeira foi realizada de forma homogênea sobre o meio de cultura, sendo os frascos mantidos em temperatura de 25°C ± 2°C e luminosidade de 35 µEinstein m⁻²s⁻¹ por um período de dezesseis horas diárias.

Após a germinação, as plântulas foram mantidas em câmara de crescimento no meio MS até a instalação do experimento, fazendo-se subcultivos periódicos. Fez-se, então, uma seleção das plântulas mais desenvolvidas, com aspecto viçoso e com coloração verde escura. Estas, em câmara de fluxo laminar, tiveram seu tamanho reduzido para 10 mm, mantendo-se sempre segmentos caulinares basais, totalmente desprovidos de raízes e folhas. Em seguida, fez-se a incubação dos explantes em meio MS, com diferentes concentrações de fitoreguladores, em tubos de ensaio de 150 mm x 25 mm

contendo 30 mL do meio de cultura. Este meio foi preparado e autoclavado do mesmo modo que o meio de semeadura.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com nove tratamentos e quarenta repetições, arranjados em um fatorial 3 x 3 (concentrações de ANA x concentrações de BAP). Cada repetição constituiu-se de um tubo de ensaio contendo um explante. Os tratamentos utilizados foram: 1) sem fitorreguladores; 2) 0,1 mg L⁻¹ ANA; 3) 2,0 mg L⁻¹ ANA; 4) 0,5 mg L⁻¹ BAP; 5) 2,0 mg L⁻¹ BAP; 6) 0,5 mg L⁻¹ BAP + 0,1 mg L⁻¹ ANA; 7) 0,5 mg L⁻¹ BAP + 2,0 mg L⁻¹ ANA; 8) 2,0 mg L⁻¹ BAP + 0,1 mg L⁻¹ ANA; e 9) 2,0 mg L⁻¹ BAP + 2,0 mg L⁻¹ ANA.

Após a inoculação dos segmentos caulinares na posição vertical, os tubos de ensaio foram envoltos em papel alumínio e mantidos em câmara de crescimento, no escuro, sob temperatura de 25°C ± 2°C. Aos sessenta dias foram avaliados o número de brotações totais, número de brotações surgidas na base e nos nós, número de nós e altura da maior brotação ou segmento caulinar estiolado. Os dados obtidos foram transformados para $(x + 0,5)^{1/2}$ e submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Decorridos sessenta dias de incubação no escuro, observou-se que grande parte das plântulas mostrava o fenótipo de plantas estioladas e aclorofiladas, ou seja, caules esbranquiçados, com aspecto translúcido, apresentando as folhas pequenas e os entrenós mais longos. Em todos os tratamentos surgiram novas brotações a partir da base e, ou, nos nós, as quais também se apresentavam estioladas. Torres *et al.* (1998) e Taiz & Zeiger (1998) citam a ocorrência destas características em plantas mantidas no escuro por determinado tempo, sendo que Taiz & Zeiger (1998) afirmam, ainda, que nestes casos há a inibição do desenvolvimento de cloroplastos e a diminuição nos conteúdos de pigmentos fotossintéticos. Raven *et al.* (2001) ratificaram estas afirmações, acrescentando que tais plantas, quando colocadas na presença de luz, retomam a expansão e o desenvolvimento normal. No presente trabalho, as plântulas estioladas assim que retornaram às condições de

luminosidade da câmara de crescimento foram readquirindo a coloração verde.

Para as variáveis produção de brotações na base do segmento caulinar estiolado e produção total de brotações, as concentrações de ANA mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de F (Tabela 1). As concentrações de BAP também influenciaram significativamente a produção de nós na brotação principal ($p < 0,01$), enquanto para altura da brotação principal, a utilização de diferentes concentrações e fitorreguladores não mostrou efeito significativo ($p > 0,05$).

Nas Tabelas 2 e 3 são apresentadas as médias das características avaliadas para as diferentes concentrações de ANA e BAP, respectivamente, para as quais não se obtiveram diferenças significativas ($p > 0,05$) em produção de brotações totais, brotações na base, brotações nos nós e altura da brotação principal.

Tabela 1. Análise de variância para as variáveis número de brotos emitidos na base (NB base), número de brotos emitidos nos nós (NB nós), número de brotos totais (NB total), número de nós da brotação principal (Nnós BP) e altura da brotação principal de *Cattleya x mesquitae* cultivada *in vitro*, após sessenta dias, submetida a diferentes combinações de ANA e BAP no meio de cultura.

F.V.	G.L.	Quadrado Médio				
		NB base ¹	NB nós ¹	NB total ¹	Nnós BP ¹	Altura
ANA	2	0,8964*	0,2589	1,3579*	0,2137	0,3924
BAP	2	0,2225	0,4413	0,6141	0,9924**	0,5380
ANA x BAP	4	0,5509	0,2815	0,3458	0,5243**	0,5188
Erro	149	0,2306	0,2240	0,2923	0,1026	0,2682
CV (%)		25,5227	44,4140	26,0490	19,7304	28,1335

* , **: valores significativos aos níveis de 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F; ¹ - dados transformados em $(x + 0,5)^{1/2}$.

Tabela 2. Número de brotos emitidos na base (NB base), número de brotos emitidos nos nós (NB nós), número de brotos totais (NB total) e altura da brotação principal de explantes de *Cattleya x mesquitae* em diferentes concentrações de ANA no meio de cultura.

ANA (mg L ⁻¹)	NB base ¹	NB nós ¹	NB total ¹	Altura
0	2,7801	1,0224	3,8087	1,9843
0,1	2,4353	0,1959	2,6615	1,7620
2,0	1,7850	0,3657	3,1700	2,0803

¹ - Médias obtidas de quarenta repetições; dados transformados em $(x + 0,5)^{1/2}$.

Tabela 3. Número de brotos emitidos na base (NB base), número de brotos emitidos nos nós (NB nós), número de brotos totais (NB total) e altura da brotação principal de explantes de *Cattleya x mesquitae* em diferentes concentrações de BAP no meio de cultura.

BAP (mg L ⁻¹)	NB base ¹	NB nós ¹	NB total ¹	Altura
0	2,7800	1,0224	3,8087	1,9843
0,5	4,3707	0,9644	5,3351	1,7594
2,0	3,8736	0,8604	1,8044	1,5483

¹ - Médias obtidas de quarenta repetições; dados transformados em $(x + 0,5)^{1/2}$.

Quando se adicionou BAP ao meio de cultura, mesmo não ocorrendo diferença significativa (teste Tukey a 5% de probabilidade), observou-se um incremento de aproximadamente duas brotações no tratamento em que o meio foi suplementado com 0,5 mg L⁻¹ de BAP, comparativamente à ausência de fitorreguladores. Considerando uma produção *in vitro* em escala comercial, o acréscimo obtido, de aproximadamente 73% na produção de novos explantes, pode ser um fator decisivo para a tomada de decisão quanto à utilização desta citocinina no meio de cultura.

O uso de BAP na dose 2,0 mg L⁻¹ mostrou-se prejudicial, havendo um decréscimo de cerca de 41% na produção de novas brotações totais, na ausência de luz, quando comparado à testemunha. Suzuki (1999) verificou que em *C. fimbriatum* o nível endógeno de citocininas no escuro é maior do que na presença de luz. Este fato pode ter ocorrido também com os explantes de *C. x mesquिताe* cultivados sob ausência de luz, no presente trabalho. Possivelmente houve um aumento excessivo do nível endógeno desse fitorregulador, quando se utilizou a maior concentração de BAP no meio de cultura.

A adição de 2,0 mg L⁻¹ de ANA ao meio de cultura para a propagação *in vitro* de gengibre influenciou significativamente no aumento da produção de nós por explante (Arimura *et al.* 1997). Resultados semelhantes foram obtidos no presente estudo, utilizando-se a mesma concentração de ANA. Nem sempre esses nós apresentaram brotações em desenvolvimento, o que leva a concluir que, havendo continuidade do cultivo *in vitro*, as gemas axilares presentes nos nós poderiam originar novas brotações, ou seja, seriam fontes de novos explantes (Figura 1).

A interação significativa ANA x BAP pôde ser observada para a produção de nós da brotação principal (Tabela 1). Observando-se as médias obtidas para as diferentes combinações dos fitorreguladores (Tabela 4), nota-se que a melhor resposta ocorreu com a adição de 2,0 mg L⁻¹ de ANA. Entretanto, ao se adicionar BAP em conjunto com ANA, houve redução significativa (p<0,05) na produção de nós a partir da brotação principal.

As plântulas estioladas obtidas nos diferentes tratamentos, aos sessenta dias após a instalação do experimento, são mostradas na Figura 1. Nos tratamentos em que se utilizou 0,5 mg L⁻¹ de BAP e 2,0 mg L⁻¹ de BAP + 0,1 mg L⁻¹ de ANA, verificou-se uma maior produção de brotações na base dos explantes em detrimento de seu crescimento em



Figura 1. Explantes de *Cattleya x mesquिताe* cultivados em meio MS com metade dos macronutrientes e diferentes concentrações de fitorreguladores, após sessenta dias, na ausência de luz: 1) sem fitorreguladores; 2) 0,1 mg L⁻¹ de ANA; 3) 2,0 mg L⁻¹ de ANA; 4) 0,5 mg L⁻¹ de BAP; 5) 2,0 mg L⁻¹ de BAP; 6) 0,5 mg L⁻¹ de BAP + 0,1 mg L⁻¹ de ANA; 7) 0,5 mg L⁻¹ de BAP + 2,0 mg L⁻¹ de ANA; 8) 2,0 mg L⁻¹ de BAP + 0,1 mg L⁻¹ de ANA; 9) 2,0 mg L⁻¹ de BAP + 2,0 mg L⁻¹ de ANA.

altura. Suzuki (1999) afirma que a benziladenina (BA) inibiu de forma significativa o crescimento caulinar das plantas de *C. fimbriatum*, tanto na ausência como na presença de luz.

Quanto à emissão de brotações, pôde-se observar um comportamento diferente em relação a outras espécies descritas na literatura. *C. x mesquिताe* produziu maior número de brotações na base e, ou em nós próximos à base, apresentando também caules de pequeno tamanho (1,54 cm a 2,08 cm), provavelmente pela própria característica da espécie. Isso justifica a baixa produção de nós na brotação principal,

Tabela 4. Número médio¹ de nós da brotação principal de explantes de *Cattleya x mesquिताe* na presença e ausência de ANA e BAP.

ANA (mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)		
	0,0	0,5	2,0
0,0	2,3705 ab A	2,1670 a A	1,8044 a A
0,1	1,8775 b AB	2,7188 a A	1,4222 a B
2,0	3,7198 a A	2,1215 a B	1,6957 a B

¹ - Médias (de quarenta repetições) seguidas da mesma letra minúscula (coluna) e maiúscula (linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

que foi de 3,72 nós para o melhor tratamento. Em micropropagação de abacaxizeiro, Barboza (1999) obteve até dezesseis nós por broto caulinar estiolado, ao passo que Moreira *et al.* (2003) observaram brotos estiolados de aproximadamente 12 cm, que apresentaram entre dez e doze nós. Para a cultivar Smooth Cayenne, os brotos estiolados atingiram comprimento entre 6 cm e 0 10 cm, com seis a nove nós por broto, depois de mantidos por trinta a trinta e cinco dias no escuro (Kiss *et al.* 1995). Outras espécies, como por exemplo a batata, apresentam uma produção mais reduzida, de cinco nós por broto estiolado, quando cultivada na presença de auxinas (Roca *et al.* 1978, Marinus 1984).

A altura da brotação principal não apresentou diferença significativa quando se utilizou diferentes concentrações e fitorreguladores (Tabela 1). Apesar disso, sabe-se que esta é uma variável importante, pois está diretamente relacionada com o número de nós que serão recuperados em novas brotações, quando colocados em condições de luz (Moreira *et al.* 2003). Suzuki (1999), em *C. fimbriatum*, obteve plantas com caules significativamente maiores, quando incubados na ausência de luz do que na presença de luz, independentemente da natureza do regulador de crescimento e das concentrações utilizadas. O mesmo autor verificou nesta espécie que a giberelina foi o fitorregulador mais efetivo, influenciando favoravelmente o crescimento das plantas no escuro.

Como se observa na Figura 1, quando se produziram mais brotações (0,5 mg L⁻¹ de BAP), estas foram de menor tamanho, ao passo que o uso dos dois fitorreguladores (0,5 mg L⁻¹ de BAP + 0,1 mg L⁻¹ ANA) proporcionou a formação de brotações de tamanho médio e mais robustas, indicando maiores possibilidades de regeneração e formação de novos explantes.

CONCLUSÕES

1. *Cattleya x mesquittae*, quando cultivada *in vitro* na ausência de luz, produz maior número de brotações na base dos explantes do que nos nós.
2. O fitorregulador 6-benzilaminopurina (BAP) é mais efetivo para a produção de novas brotações, enquanto o ácido naftaleno acético (ANA) estimula a produção de nós em segmentos caulinares estiolados de *C. x mesquittae*.

3. O alongamento caulinar de *C. x mesquittae* cultivada *in vitro* é obtido com a ausência de luz, não necessitando da aplicação de ANA e BAP.

REFERÊNCIAS

- Arimura, C.T., F.L. Finger & J. Maria. 1997. Propagação *in vitro* de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) por meio de segmentos nodais estiolados. p. 82. In Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 6. Belém, Pará. 559 p. Resumos.
- Barboza, S.B.S.C. 1999. Comparação de protocolos para micropropagação do abacaxizeiro, *Ananas comosus* (L.) Merrill. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Brasília, Distrito Federal. 76 p.
- Barboza, S.B.S.C. & L.S. Caldas. 2001. Estiolamento e regeneração na multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro híbrido PE x SC-52. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 36: 417-423.
- Faria, R.T. & G.C. Stancato. 1998. Orquídea-semeadura. p. 37-39. In A.F.C. Tombolato & A.M.M. Costa. (Coord). Micropropagação de plantas ornamentais. IAC, Campinas. 72 p. (Boletim Técnico 174).
- Grattapaglia, D. & M.A. Machado. 1998. Micropropagação. p. 183-260. In A.C. Torres, L.S. Caldas & J.A. Buso. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Vol. I, Embrapa-SPI-CNPq, Brasília. 509 p.
- Hartmann, H.T. & D.E. Kester. 1990. Propagation de plantas: principios y practices. Continental, México. 760 p.
- Hoffmann, A.M. Pasqual, G.R. Carvalho, N.N.J. Chalfun & J.D. Ramos. 1997. Cultura de tecidos: aplicações na propagação de plantas. Universidade Federal de Lavras, Lavras. 130 p.
- Kerbaui, G.B., S.I. Colli & N. Majerowicz. 1995. Manutenção da atividade meristemática apical em caules de *Catsetum* (Orchidaceae) pelo etileno: implicações com uma nova estratégia de micropropagação. p. 3. In Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 5. Lavras, Minas Gerais. 563 p. Resumos.
- Kiss, E., J. Kiss, G. Gyulai & L.E. Heszky. 1995. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. HortScience, 30: 127-129.
- Marinus, J. 1984. Methods for rapid multiplication of potatoes. Potato Research, 27: 317-317.
- Mello, C.M.C. 2000. Conservação de sementes de orquídeas no cerrado. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Brasília, Distrito Federal. 48 p.
- Miller, D. & R. Warren. 1996. Orquídeas do alto da serra da mata atlântica pluvial do sudeste do Brasil. Salamandra Consultoria, Rio de Janeiro. 256 p.

- Moreira, M.A., M. Pasqual, J.G. de Carvalho & C.B. Fráguas. 2003. Estiolamento na micropropagação do abacaxizeiro cv. Pérola. *Ciência Agrotecnica*, 27: 1002-1006.
- Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-479.
- Raven, P.H., R.F. Evert & S.E. Eichorn. 2001. *Biologia vegetal*. 6. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 906 p.
- Roca, W.M., N.O. Espinoza, M.N. Roca & J.E. Bryan. 1978. A tissue culture method for rapid propagation of potatoes. *American Potato Journal*, 55: 691-706.
- Suzuki, R.M. 1999. Efeito hormonal endógeno e exógeno sobre o desenvolvimento de plantas de *Catsetum fimbriatum* (Orchidaceae) incubadas na presença e ausência de luz. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 83 p.
- Suttleworth, F.S., H.S. Zim & G.W. Dillon. 1997. *Orquídeas: Guia dos orquidófilos*. 5. ed. Expressão e Cultura, Rio de Janeiro. 158 p.
- Taiz, L. & E. Zeiger. 1998. *Plant Physiology*. 2. ed. Sinauer Associates, Massachusetts. 792 p.
- Torres, A.C., S.R. Teixeira & L. Pozzer. 1998. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. p. 133-145. In A.C. Torres, L.S. Caldas & J.A. Buso (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Vol. I, Embrapa-SPI-CNPq, Brasília. 509 p.