

Diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose na multiplicação *in vitro* de *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng. (copo-de-leite)¹

Different salt concentrations of MS environment and sucrose on the *in vitro* multiplication of *Zantedeschia aethiopica* L. Spreng. (Calla lily)

Márcia de Nazaré Oliveira Ribeiro², Moacir Pasqual³, Adriano Bortolotti da Silva⁴ e Vantuil Antônio Rodrigues⁵

Resumo - O objetivo deste trabalho foi determinar a concentração dos sais do meio MS e de sacarose que favoreça o melhor desenvolvimento *in vitro* de copo-de-leite. Explantes foram excisados e inoculados em concentrações de meio MS (0; 50; 100; 150 e 200%) e sacarose (0; 15; 30; 45 e 60 g L⁻¹). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando-se quatro repetições. O pH do meio foi ajustado para 5,8, antes da adição de 5,5 g L⁻¹ de ágar e da autoclavagem, a 121 °C e 1 atm, por 20 minutos. Após a inoculação, os explantes foram mantidos por 60 dias em sala de crescimento, a 27±1 °C, irradiância de 35 µmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas, avaliando-se número de brotos, folhas e raízes, comprimento dos brotos e das raízes, massa fresca da parte aérea e das raízes. Obtém-se maior número (3,5) e comprimento de brotos (3,4 cm) com 30 g L⁻¹ de sacarose e 125% de sais do meio MS (2,14 brotos), sem haver interação significativa entre os fatores sacarose e meio MS. Para as demais variáveis analisadas, número de folhas (4,13) e massa fresca da parte aérea (0,9 g), melhores resultados foram obtidos em meio MS 100% associado a 30 e 60 g L⁻¹ de sacarose, respectivamente.

Palavras-chave: Micropropagação. Crescimento *in vitro*. Planta ornamental.

Abstract - This work aimed to determine the salts of MS environment and sucrose concentrations to increase the efficiency of the *in vitro* multiplication of calla lily species. Explants were removed from the plant and inoculated in different concentrations of MS environment (0; 50; 100; 150 and 200%) and sucrose (0; 15; 30; 45 and 60 g L⁻¹). It was used a completely randomized block design with four replications. The medium pH was adjusted to 5.8 and solidified with 5.5 g L⁻¹ of agar before sterilization at 121 °C and 1 atm for 20 minutes. After inoculation, the tubes were transferred to growth room adjusted to 27±1 °C, irradiance of 35 µmol m⁻² s⁻¹ and photoperiod of 16 hours. After 60 days, the length of the aerial part and roots, the number of sprouts, roots and leaves, fresh mass of the aerial part and roots of seedlings were evaluated. There was higher number (3.5) and length (3.4 cm) of sprouting with 30 g L⁻¹ of sucrose and 125% of salt in the MS environment (2.14 sprouts), without significant interaction between sucrose and MS environment. For the variables, number of leaves (4.13) and fresh mass of the aerial part (0.9 g), the best result was obtained in MS environment 100% associated to 30 and 60 g L⁻¹ of sucrose, respectively.

Key words: Micro propagation, *In vitro* growth, Ornamental plant.

¹ Recebido para publicação em 06/02/2007; aprovado em 30/10/2007

Parte da dissertação do primeiro autor apresentada ao Departamento de Fitotecnia da UFPA.

² Eng. Agrônomo, M. Sc., Doutoranda em Agronomia/Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG, mribeiro@ufla.br

³ Eng. Agrônomo, D. Sc., Prof. Titular, Universidade Federal de Lavras (UFLA), CP. 3037, 37200-000, Lavras-MG.

⁴ Eng. Agrônomo, D. Sc., Prof., Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), 37130-000, Alfenas-MG.

⁵ Biólogo, Laboratorista, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG.

Introdução

A floricultura abrange o cultivo de plantas ornamentais, desde flores de corte e plantas envasadas, até a produção de sementes, bulbos e mudas de árvores de grande porte. A produção de flores e plantas ornamentais é um setor altamente competitivo, exigente em tecnologias avançadas, profundo conhecimento técnico por parte do produtor, e sistema eficiente de distribuição e comercialização (ROCHA, 1999).

O mercado de plantas ornamentais está crescendo, no Brasil e no mundo, o que traz a necessidade da melhoria da qualidade de mudas. Esse incremento de qualidade pode ser obtido por meio da micropropagação, que gera mudas isentas de fitopatógenos, com genótipo e fenótipo homogêneos (SEGEREN et al., 2003). As técnicas de cultivo *in vitro* são muito importantes para espécies que têm alto valor comercial como é o caso das ornamentais (TORRES et al., 1998; DONINI, 2004). O meio de cultura deve suprir tecidos e órgãos com nutrientes necessários ao crescimento e, basicamente, fornece macro e micronutrientes, e um carboidrato para substituir o carbono que a planta fixa da atmosfera, pela fotossíntese. Para promover maior crescimento, normalmente, incluem-se certos componentes orgânicos, como vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento (PASQUAL, 2001).

Tem sido relatada a possibilidade de reduzir a concentração de sais do meio MS, para diversas espécies, visando melhorar o desenvolvimento das plantas e à redução nos custos (GEORGE; SHERRINGTON, 1984). Paiva et al. (1997) utilizaram 50% dos sais do meio MS, obtendo um bom desenvolvimento *in vitro* de gloxínia. Concentrações de sais no meio básico MS, reduzidas a 1/2, 1/3 ou 1/4, possibilitaram melhor enraizamento *in vitro* de amoreira-preta, cultivar 'Caiguangue' (DANTAS et al., 2000). A concentração de sacarose também é um fator determinante no crescimento e é dependente do tipo de explante (CALDAS et al., 1998). Além disso, afeta a produção de metabólitos secundários de grande importância nos processos metabólicos e na composição da parede celular (PASQUAL, 2001). Estudos comprovaram que 75% a 85% do aumento da biomassa se devem à incorporação de carbono pela adição de sacarose (DE RIEK et al., 1997). A concentração mais utilizada no preparo do meio de cultura MS é 30 g L⁻¹, entretanto, modificações nesse número podem beneficiar o cultivo *in vitro*. (PASQUAL, 2001). A sacarose mesmo sendo essencial ao crescimento das culturas *in vitro*, o seu excesso pode ser prejudicial, pois inibe a síntese de clorofila, reduzindo a capacidade fotossintética das cultu-

ras, mesmo sendo essencial ao crescimento (YAMADA; SATO, 1978). Embora o açúcar não seja o componente de maior custo no preparo do meio de cultura, a redução de sua concentração pode ser economicamente favorável, especialmente para a produção comercial de mudas (HOFFMANN, 1999).

O copo-de-leite é uma cultura largamente utilizada como planta ornamental, muito apreciado pela beleza e versatilidade, utilizado na composição de jardins e em diversos arranjos florais. Suas inflorescências simbolizam a pureza e, por isso, é bastante utilizado em casamentos (ALMEIDA; PAIVA, 2004). Para a rápida multiplicação de plantas selecionadas, estão sendo utilizadas técnicas de micropropagação e esses híbridos estão sendo produzidos por todo o mundo para flor de corte (BROOKING; COHEN, 2002). Por meio do melhoramento genético, obtiveram-se variedades que proporcionaram grande diversidade de colorações em suas flores. Algumas dessas variedades estão sendo micropropagadas por empresas com a finalidade de produzir e comercializar tubérculos matrizes de qualidade (LISCHKA, 2005). Objetivou-se avaliar as concentrações dos sais (macro e micronutrientes) do meio MS e de sacarose, para se obter maior multiplicação *in vitro* de copo-de-leite.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, localizado no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. Plântulas de copo-de-leite branco, *Zantedeschia aethiopica*, foram obtidas a partir do estabelecimento *in vitro* de gemas em meio contendo os sais do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose e com pH ajustado para 5,8. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento, por 60 dias, com lâmpadas brancas frias proporcionando 35 µmol m⁻²s⁻¹, com 16 horas de fotoperíodo, a 27 ± 1 °C.

Os tratamentos foram constituídos de diferentes concentrações de sais (macro e micronutrientes) do meio MS (0; 50; 100; 150 e 200 %) e sacarose (0; 15; 30; 45 e 60 g L⁻¹), nas combinações possíveis para as concentrações testadas. Ao meio adicionaram-se 5 mg L⁻¹ de BAP e o mesmo foi solidificado com 5,5 g L⁻¹ de ágar, o pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 121 °C e 1 atm, por 20 minutos. Posteriormente à inoculação, os tubos foram transferidos para sala de crescimento, a 27 ± 1 °C, irradiância de 35 µmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas. Após 60 dias de cultivo,

foram realizadas avaliações quanto às variáveis: número e comprimento de brotos, número de folhas e massa fresca da parte aérea.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, constando de quatro repetições de três tubos cada, totalizando doze tubos por tratamento em esquema fatorial 5x5. Os resultados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o software Sisvar (Ferreira, 2000), com regressão polinomial para concentrações de MS e sacarose.

Resultados e Discussão

De acordo com a análise de variância, houve interação significativa entre os fatores sacarose e meio MS, para número de folhas (NF) e massa fresca da parte aérea (MFPA). Para as diferentes concentrações de sacarose houve diferença significativa para todas as variáveis analisadas, e para as concentrações do meio MS houve diferença significativa para número de folhas (NF), número de brotos (NB) e massa fresca da parte aérea (MFPA). O número de brotos foi estimulado pelo aumento da concentração de sais do meio MS e de sacarose (Figura 1), porém, não houve interação entre esses dois fatores. Maior número de brotos (3,5) foi observado em 30 g L⁻¹ de sacarose, na presença de 5 mg L⁻¹ de BAP. Concentrações maiores de sacarose promoveram diminuição no número de brotos (Figura 1A), podendo estar relacionado ao fato de que concentrações acima de 4% de sacarose promovem excessivo potencial osmótico do meio e deterioração das culturas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Nicoloso et al. (2003), compararam quatro concentrações de cinco fontes de carbono e a sacarose, nas concentrações de 30; 45 e 60 g L⁻¹, foi a melhor fonte de carboidrato para número e altura das brotações, média da altura de brotações e número total de segmentos nodais em ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*). A concentração de 125% de sais do meio MS proporcionou maior número de brotos (2,14) em copo-de-leite (Figura 1B). Em crisântemo (*Dendranthema grandiflora*), Paiva et al. (1996), observaram melhor desenvolvimento de brotos com concentrações entre 50% e 150% de sais do meio MS, combinados com 6% de sacarose. Na concentração de 50% do MS, o tamanho dos brotos obtidos não foi satisfatório. Pessoa et al. (2004) verificaram que cultivares de samambaia (*Nephrolepis exaltata*), não houve diferença quanto ao número de brotos, que variou entre 2,0 e 2,2, após 30; 60 ou 75 dias de cultivo, sob diferentes concentrações (25; 50 e

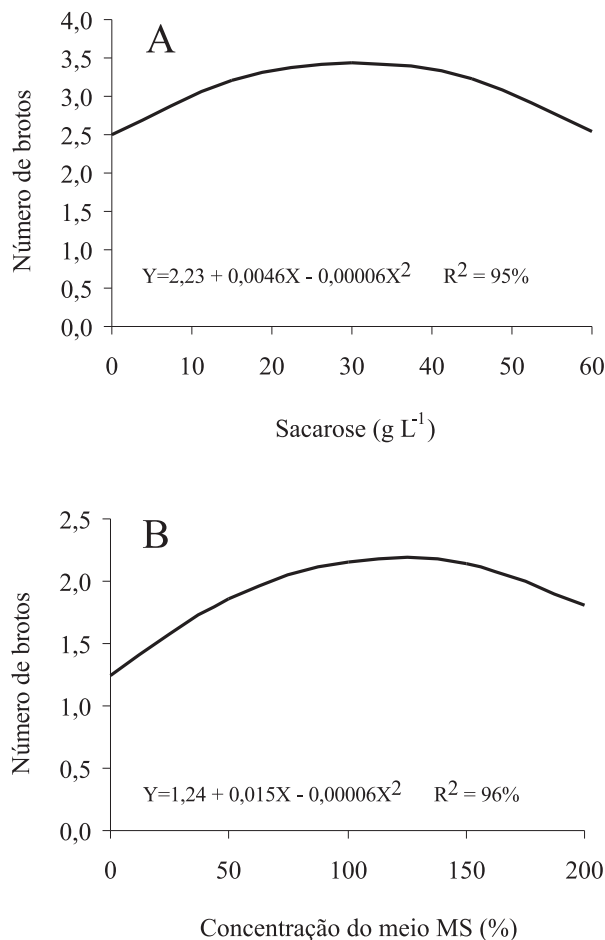


Figura 1 - Efeito das concentrações de sacarose (A) e dos sais do meio MS (B), no número de brotos copo-de-leite, após 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio acrescido de 5 mg L⁻¹ de BAP. UFLA, Lavras, MG, 2007

100%) de sais do meio MS. Em amoreira-preta (*Rubus* sp.) cultivar Ébano o número de brotos foi estimulado pelo aumento da concentração de sais do MS e maior número de brotos (3,9) foi observado em meio MS com 150% dos sais (VILLA et al., 2005). Naves (2001) verificou um aumento no tamanho dos brotos de bromélia-imperial (*Alcantarea imperialis*), até a concentração de 100% dos sais do meio MS. Com café 'Catuai' (*Coffea arabica*), objetivando determinar o efeito de diferentes proporções dos sais inorgânicos e componentes orgânicos do meio MS, Forni e Pasqual (1996) observaram que o aumento dos níveis dos sais do meio MS proporcionou maior número de brotos, número de folhas e peso da matéria seca. Resultados contraditórios foram obtidos por Chang et al. (2003), com a espécie *Zantedeschia albomaculata* (copo-de-leite) que apresentou maior número de brotos (2,0) em meio MS com 50% dos sais.

Maior comprimento de brotos (3,42) foi observado na presença de 30 g L⁻¹ de sacarose (Figura 2). De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), a sacarose é a principal fonte de carbono no meio de cultura, sendo responsável pelo fornecimento de energia para o crescimento *in vitro*, a regulação do potencial hídrico e o componente utilizado em maior concentração do meio de cultura.

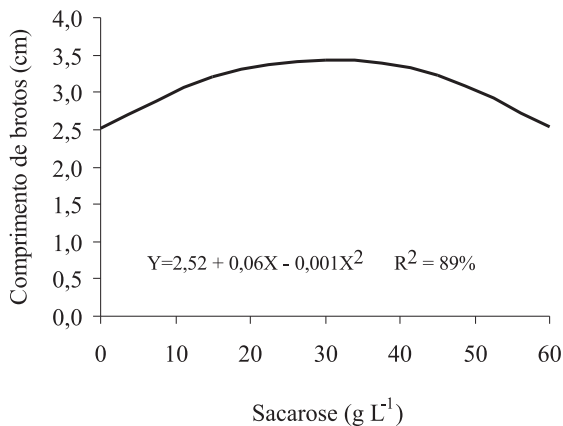


Figura 2 - Efeito de diferentes concentrações de sacarose, no comprimento de brotos de copo-de-leite, após 60 dias de cultivo *in vitro* e meio acrescido de 5 mg L⁻¹ de BAP. UFLA, Lavras, MG, 2007

Maiores números de folhas foram obtidos em meio MS com 150% (4,13) e 100% dos sais (3,98) associados a 30 g L⁻¹ de sacarose. Concentrações superiores, tanto de meio MS quanto de sacarose, diminuiriam o número de folhas. Esses resultados não diferiram estatisticamente, pelo teste de médias. Portanto, visando à redução de custos, a melhor porcentagem de meio a ser utilizada é a de 100% dos sais de MS, para esta variável (Figura 3). Tanto o crescimento quanto a morfogênese em culturas *in vitro* são sensivelmente influenciados pela disponibilidade de N e a forma em que o mesmo é apresentado. Pasqual e Lopes (1991) afirmam que o meio de cultura MS possui uma concentração de sais (macro e micronutrientes) considerada elevada, tornando-se, inclusive, prejudicial ao enraizamento de brotos em algumas espécies.

Resultados semelhantes em relação às concentrações de sais do meio MS foram encontrados nos estudos de Villa et al. (2005) em que maior número de folhas (7,89) em amoreira-preta (*Rubus sp.*), cultivar Ébano, foi obtido em MS 150% associado a 1 mg L⁻¹ BAP.

Esses resultados discordam dos obtidos por Pessoa et al. (2004), que encontraram 2,9 folhas/explante na cultivar *Bostoniensis* de samambaia (*Nephrolepis exaltata*),

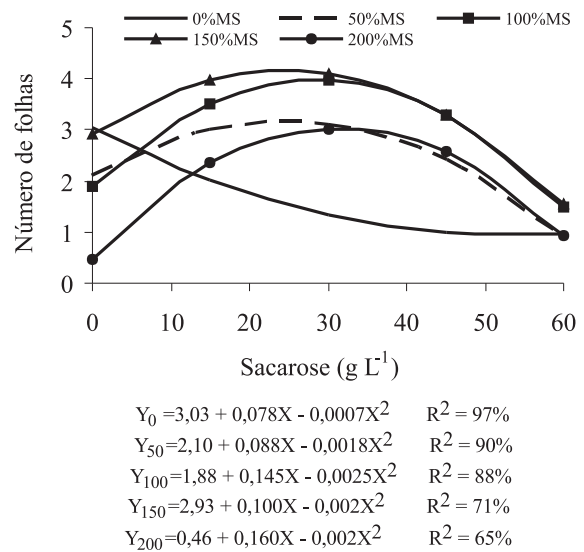


Figura 3 - Efeito das diferentes concentrações de sais do meio MS e sacarose, no número de folhas de copo-de-leite, após 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio acrescido de 5 mg L⁻¹ de BAP. UFLA, Lavras, MG, 2007

em 100% de sais do meio MS, após 30 dias de cultivo. Ribeiro et al. (2006) encontraram 1,32 folha/explante em copo-de-leite, com 37,33 g L⁻¹ de sacarose. Concentrações de sacarose de 3% para 5%, no meio de cultivo, promoveram aumento de massa, em folhas de rosa (*Rosa sp.*) micropropagadas, sob condições heterotróficas ou mixotróficas (CAPELLADES et al., 1991). Maior quantidade de massa fresca da parte aérea (0,9 g) foi observada na presença de 60 g L⁻¹ de sacarose e 100% dos sais do meio MS (Figura 4). A variação nas dosagens de sacarose influenciou claramente a produção de biomassa, tanto na parte aérea como no sistema da raiz, mas, na sua ausência, não houve formação de raiz, em morango (CALVETE et al., 2002). Dados semelhantes foram obtidos em morangueiro, batata, menta e videira, por Riquelme et al. (1991), em rosa por Capellades et al. (1991) e Dorion et al. (1991) e em aspargo, por Conner et al. (1992).

Villa et al. (2005) observaram maior massa fresca da parte aérea (1,52 g) de amoreira-preta (*Rubus sp.*) cultivar Ébano com 150% dos sais do meio MS. É importante ressaltar que o meio MS possui alta concentração de sais em sua composição, comparado a outros meios de cultura (SAKUTA, 1987). Dessa forma, os efeitos negativos causados por concentrações maiores do meio MS, provavelmente devem-se a uma elevação ainda maior do que a normalmente presente na composição original, tornando-se inadequada ao processo morfogênico (PASQUAL et al., 2002).

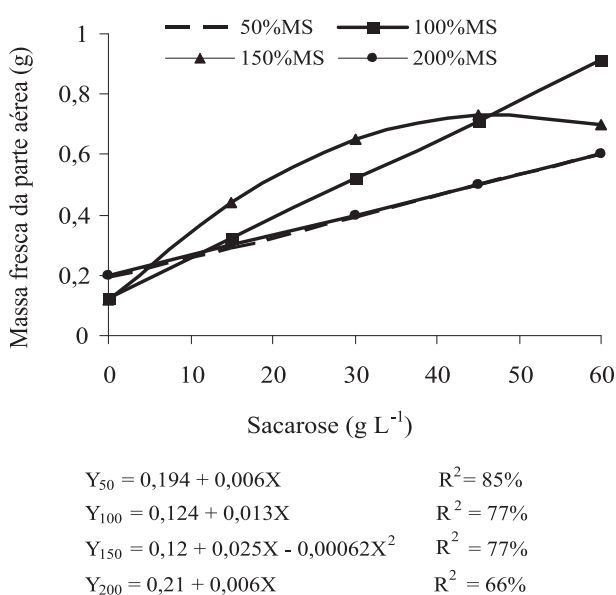


Figura - 4 - Efeito de diferentes concentrações de sais do meio MS e de sacarose, com 5 mg L⁻¹ de BAP, na massa fresca da parte aérea de copo-de-leite após 60 dias de cultivo *in vitro*. UFLA, Lavras, MG, 2007

Conclusões

1. Não houve interação significativa entre os fatores (sacarose x concentração de sais);
2. Maior número de brotos (3,5) foi quando se acrescentou 30 g L⁻¹ de sacarose e quando a concentração de sais foi de 125% do meio MS (2,14);
3. Observa-se maior comprimento de brotos (3,4 cm) em 30 g L⁻¹ de sacarose; e
4. Para as variáveis: número de folhas (4,13) e massa fresca da parte aérea (0,9 g), os melhores resultados foram obtidos utilizando-se a concentração de 100% do meio MS acrescido de 30 e 60 g L⁻¹ de sacarose, respectivamente.

Referências

ALMEIDA, E. F. A.; PAIVA, P. D. O. **Floricultura 2**: cultivo de copo-de-leite. Lavras: Editora UFLA, 2004. 28 p. (Texto Acadêmico).

BROOKING, I. R.; COHEN, D. Gibberellin-induced flowering in small tubers of *Zantedeschia* "Black Magic". **Scientia Horticulturae**, v. 95, n. 01/02, p. 63-73, 2002.

CALDAS, L. S. et al. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e**

transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa, 1998. v. 01, p. 87-132.

CALVETE, E. O.; KÄMPF, A. N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 02, p. 186-191, 2002.

CAPELLADES, M.; LEMEURE, R.; DEBERGH, P. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 25, n. 01, p. 21-26, 1991.

CHANG, H. S. et al. Micropropagation of Calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot proliferation. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 39, n. 02, p. 129-134, 2003.

CONNER, A. J.; ABERNETHY, D. J.; FALLOON, P. G. Importance of *in vitro* storage root development for the successful of micropropagated asparagus plants to greenhouse conditions. **HortScience**, v. 20, n. 04, p. 477-481, 1992.

DANTAS, M. C. A. et al. Enraizamento *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus* sp.) cultivar Caingangue. **Agropecuária de Clima Temperado**, v. 03, n. 02, p. 123-130, 2000.

DE RIEK, J.; PIQUERAS, A.; DEBERGH, P. C. Sucrose uptake and metabolism in a double layer system for micropropagation of *Rosa multiflora*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 47, n. 03, p. 269-278, 1997.

DONINI, L. P. **Preparo de lâminas foliares de Aráceas ornamentais: desinfestação e tratamento antioxidante**. 2004. 54 f. Monografia de conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

DORION, N.; KADRI, M.; BIGOT, C. *In vitro* preservation at low temperature of rose plantlets usable for direct acclimatization. **Acta Horticulturae**, n. 298, p. 335-343, 1991.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000. São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FORNI, R. C.; PASQUAL, M. Influência da citocinina BAP e concentrações dos componentes do meio MS na micropropagação do café 'Catuaí'. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 20, n. 4, p. 468-474, 1996.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Eversley: Exegetics, 1984. 709 p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA CNPH, 1998. p. 183-260.

HOFFMANN, A. **Enraizamento e aclimatização de mudas micropropagadas dos porta-enxertos de maceira 'Marubakaido' e 'M-26'**. 1999. 240 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

- LISCHKA, R. W. **Bioteecnologias aplicadas à cadeia produtiva do copo de leite (*Zantedeschia* sp.), com ênfase à aclimatização de mudas micropropagadas**. 2005. 44 f. Monografia de conclusão de curso (Graduação em Ciência Agrônômica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NAVES, V. C. **Propagação *in vitro* da bromélia imperial [*Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms]**. 2001. 64 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.
- NICOLOSO, F. T. et al. Efeito de concentrações e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 1, p. 84-90, 2003.
- PAIVA, P. D. O. et al. Propagação *in vitro* de gloxínia. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 3, n. 2, p. 29-41, 1997.
- PAIVA, P. D. O.; PASQUAL, M.; PAIVA, R. Efeito de diferentes concentrações do meio MS, nitrogênio e sacarose na micropropagação de crisântemo 'Orange Reagen'. **Bragantia**, v. 55, n. 1, p. 9-18, 1996.
- PASQUAL, M. Meios de cultura. In: PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. v. 1, 74 p.
- PASQUAL, M. et al. Cultivo *in vitro* de embriões imaturos de tangerina 'Poncã': concentrações do meio MS e da sacarose. **Revista Ceres**, v. 49, n. 282, p. 181-189, 2002.
- PASQUAL, M.; LOPES, P. A. Influência de diversos fatores sobre o enraizamento do porta-enxerto de pereira (*Pyrus calleryana*) *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 331-334, 1991.
- PESSOA, C. C. et al. Propagação *in vitro* de *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott. **Caderno de Pesquisa Série Biologia**, v. 16, n. 1, p. 43-49, 2004.
- RIBEIRO, M. N. O. et al. Influência das concentrações de sacarose e GA₃ no desenvolvimento *in vitro* de *Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng. In: CONGRESSO ARGENTINO DE FLORICULTURA, 3., 2006, La Plata. **Anais...** La Plata: INTA, 2006. 1 CD-ROM.
- RIQUELME, C.; GUIÑAZU, M. E.; TIZIO, R. Pre-acondicionamento y aclimatacion em condiciones de invernáculo de plantulas micropropagadas de frutilla, menta, papa y vid. **Phyton**, v. 52, n. 1, p. 73-82, 1991.
- ROCHA, M. T. R. **Cultura de tecidos: uma alternativa para a multiplicação dos gêneros *Anthurium* e *Caladium***. 1999. 81 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1999.
- SAKUTA, M. Effects of nitrogen source on betacyanin accumulation and growth in suspension culture of *Phytolacca americana*. **Physiology Plantarum**, v. 71, n. 4, p. 459-463, 1987.
- SEGEREN, M. I. et al. Avaliações de fitossanidade de clones de orquídeas no laboratório Proclone. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS, 1., 2003, Lavras. **Resumos...** Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. p. 423.
- TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, 1998. v. 1, 864 p.
- VILLA, F. et al. Multiplicação *in vitro* da amoreira-preta 'Ébano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 3, p. 582-589, 2005.
- YAMADA, Y.; SATO, F. The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. **Plant Cell Physiology**, v. 19, n. 4, p. 691-699, 1978.