UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Efeito de GA_3 e da condição de luminosidade no crescimento *in vitro* de *Leptotes unicolor* Barb.Rodr.

IGOR CHIARELLI PERDOMO

BIOTECNOLOGIA

DOURADOS
2013

Igor Chiarelli Perdomo

Efeito de GA_3 e da condição de luminosidade no crescimento *in vitro* de *Leptotes unicolor* Barb.Rodr.

Trabalho de conclusão de curso, apresentado como requisito parcial para a obtenção do grau de biotecnólogo no curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados sob a orientação da Dra. Yara Britto Chaim Jardim Rosa e coorientação do Dra. Simone Simionatto.

Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil
Setembro/2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD

584
C532e

Chiarelli Perdomo, Igor.
Efeito de GA3 e da condição de luminosidade no crescimento in vitro de Leptotes unicolor Barb.Rodr. / Igor Chiarelli Perdomo – Dourados-MS : UFGD, 2013.
15 f.

Orientadora: Profa. Dra. Yara Brito Chaim Jardim Rosa.
Monografia (Bacharelado em Biotecnologia) Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Orquídeas – Cultivo. I. Título.

Igor Chiarelli Perdomo

Efeito de GA_3 e da condição de luminosidade no crescimento *in vitro* de *Leptotes unicolor*

Barb.Rodr.

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para obtenção de titulo de Bacharel em Biotecnologia na Universidade Federal da Grande Dourados, pela comissão formada por:

Dra. Yara Britto Chaim Jardim Rosa
(Orientadora)
UFGD/FCA

Dra. Simone Simionatto
(Coorientadora)
UFGD/FCBA

Msc. Jackeline Schultz Soares
(Membro da banca)
UFGD/FCA

Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil
Setembro/2013

AGRADECIMENTOS

Ao finalizar mais uma etapa da minha formação, tanto acadêmica quanto humana, lembro-me de muitas pessoas que passaram na minha vida neste período, que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente.

Em primeiro lugar, meus agradecimentos são dedicados a Deus, fonte de vida, que com seu amor nos dá esperança em um mundo mais justo, mais humano e mais fraterno. Reconheço que sem Ele não estaria aqui e concluindo esta etapa.

Meus agradecimentos especiais àqueles familiares que me apoiaram, incentivaram e investiram no meu sonho, à minha mãe, meu pai, meu irmão e meus avós.

Agradeço a todos os professores com quem tive a oportunidade de aprender e que me instigaram e fomentaram a formação do meu conhecimento. Àqueles que me deram oportunidades de aprender novas técnicas, espaço em seus projetos, e à atenção deles dedicadas.

À Universidade Federal da Grande Dourados, pública e gratuita e de qualidade, que me ofereceu a oportunidade de me formar no curso de Biotecnologia, sendo da primeira turma da região Centro Oeste.

Ao Governo Federal, que por meio do CNPq me concedeu 4 anos de bolsa, incentivando a pesquisa, principalmente a oportunidade concedida, graduação sanduiche, em que tive chance de estudar em uma das instituições mais conceituadas no mundo, Politecnico di Milano, além de oportunizar a realização do estágio na Università degli Studi di Milano. Assim como todas as experiências vidadas neste período.

Agradeço enormemente a minha orientadora que me apoiou e me acolheu no seu grupo de pesquisa, do qual dedicou o seu e a mim confiou neste trabalho, à minha coorientadora que me apoiou em vários momentos, ao seu empenho e sua dedicação comigo.

Ao coordenador do meu estágio por ter me integrado ao seu grupo de pesquisa e ao grupo de pesquisa aos conhecimentos repassados e a introdução na área biotecnológica.

Agradeço também às outras instituições que me receberam, Universidade Federal de Santa Catarina e Universidade de São Paulo. Aos colegas que estiveram presente nesta jornada, e à todos aqueles que fizeram parte dos grupos de pesquisa em que participei.

Agradeço a banca por contribuírem na melhora deste trabalho aqui apresentado.

"Una volta che avrete imparato a Volare,

camminerete sulla terra guardando

il cielo perchè è là che siete stati

ed è là che vorrete tornare".

Da Vinci, Leonardo

SUMÁRIO

RESUMO...... 8

ABSTRATC...... 8

INTRODUÇÃO..... 9

MATERIAL E MÉTODOS...... 10

RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 11

CONCLUSÕES..... 20

AGRADECIMENTOS..... 20

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 20

EFEITO DE GA_3 E DA CONDIÇÃO DE LUMINOSIDADE NO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Leptotes unicolor* Barb.Rodr.

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito das concentrações de GA_3 (0; 1; 5; 10 ou 20 mg L^{-1}) e da condição de luminosidade (branca, amarela, azul, vermelha e verde) no crescimento *in vitro* de *Leptotes unicolor* Barb.Rodr. visando a propagação desta. Utilizou-se o delineamento experimental blocos casualizados, e os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial 5 x 5 com 3 repetições. Foram utilizados como explantes plantas de *L. unicolor,* com 1 cm de altura, providas de folhas e de sistema radicular. O meio nutritivo foi o MS½ acrescido das doses de GA_3 e as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento com temperatura de 25±2 ºC, fotoperíodo de 12 horas e submetidas às diferentes luminosidades, por 360 dias quando foram avaliadas quanto ao número de brotos e de raízes, altura, diâmetro, comprimento médio das raízes e massa fresca da touceira. Houve efeito conjunto das concentrações de GA_3 e das condições de luminosidade sobre as variáveis estudadas, sendo exceção ($p>0,05$) a massa fresca das touceiras, que apresentou média geral igual a 7,50 g, independentemente das combinações testadas. O maior número de brotos (215) foi observado na dose calculada de 7 mg L^{-1} de GA_3 sob luz amarela. O maior número de raízes (17) e o sistema radicular mais longo (15,1 mm) foram observados na presença de luz branca, os maiores diâmetros das touceiras (43,5 mm) foram registrados sob luz vermelha e, independentemente da cor da luz, as maiores alturas das touceiras (32,5 mm) foram observadas na ausência de GA_3 e as menores (inferiores a 5 mm) na maior dose estudada. *Leptotes unicolor* Barb.Rodr. apresentou maior crescimento in vitro na ausência de GA_3 e pode ser cultivado sob luminosidade branca, amarela ou vermelha.

Palavras chave: Orchidaceae; orquídeas nativas; reguladores de crescimento

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of GA_3 concentrations (0, 1, 5, 10 or 20 mg L^{-1}) and lighting condition (white, yellow, blue, red and green) on the in vitro growth of *Leptotes unicolor* Barb. Rodr. We used a randomized block design, and the treatments were arranged in a 5 x 5 factorial with three replications. Were used as explants plants of *L. unicolor*, with 1 cm of height,

leaves and roots. The medium was MS ½ increased of GA_3 doses and the cultures were placed in a growth room at 25 ± 2 º C, photoperiod of 12 hours and subjected to different light conditions, for 360 days when they were evaluated on the number of shoots and root, height, root length and fresh weight of the tussocks. There was joint effect of GA_3 concentrations and light conditions on the variables studied, with the exception ($p > 0.05$) fresh mass tussocks, which showed overall average equal to 7.50 g, regardless of the combinations. The highest number of shoots (215) was observed in the calculated dose of 7 mg L^{-1} GA_3 under yellow light. The highest number of roots (17) and the root system longer (15.1 mm) were observed in the presence of white light, the larger diameters of the tussocks (43.5 mm) were recorded under red light, regardless of the color of light the highest height of tussocks (32.5 mm) were observed in the absence of GA_3 and lower (below 5 mm) at the highest dose studied. *Leptotes unicolor* Barb.Rodr. shows higher growth in vitro in the absence of GA_3 and can be grown in bright white, yellow or red.
Keywords: Orchidaceae; native orchids; growth regulators

INTRODUÇÃO

Orchidaceae é uma das maiores e mais diversificadas famílias de Angiospermas, sendo constituída por aproximadamente 35.000 espécies (Dressler, 1993) das quais 2448 são nativas do Brasil (Barros et al, 2013). No entanto, devido ao crescente desmatamento, aliado às coletas predatórias, muitas espécies de orquídeas estão em risco de extinção. Uma das alternativas para evitar o processo contínuo de desaparecimento seria a produção intensiva de mudas de orquidáceas para programas de reintrodução ao habitat natural e mesmo para a comercialização (Bach e Castro, 2004).

A cultura em meio assimbiótico resulta em maiores percentuais de germinação em comparação à germinação natural (Araújo, 2007), entretanto a técnica ainda apresenta restrições quanto ao desenvolvimento *in vitro* e aclimatização das plantas produzidas (Kerbauy, 2008). A qualidade de luz no crescimento e no desenvolvimento dos tecidos de plantas cultivadas *in vitro* pode influenciar a eficiência biológica dos reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura, bem como o balanço hormonal nos tecidos (Erig e Schuch, 2005), que refletirá no

crescimento dos explantes e consequentemente na produção e aclimatização de mudas produzidas.

As salas de crescimento para cultivo *in vitro* quase sempre utilizam lâmpadas fluorescentes brancas (400 - 600 nm) que são desprovidas de ondas na faixa do vermelho (640 – 740 nm) (Kämp, 2005). Devido à importância da luz vermelha na fotomorfogênese, alguns autores têm estudado esse comprimento de onda como forma de propiciar maior crescimento e desenvolvimento de plantas cultivadas nessa condição. Araújo (2007) relatou que o cultivo *in vitro*, de plântulas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo', em frascos embalados com papel celofane vermelho aumentou o alongamento das plântulas, proporcionando melhores condições para aclimatização das mesmas.

Para uma otimização do processo de propagação, uma alternativa viável é a utilização de uma dose adequada de hormônio de crescimento que atue no alongamento das plântulas, Araújo (2007) cita que as giberelinas, entre elas o GA_3, são utilizadas no alongamento das partes aéreas e possem diversos efeitos que variam de acordo com cada espécie.

Aliadas às condições de luminosidade, a composição e concentração hormonal no meio de cultivo influenciam a morfogênese dos tecidos vegetais (Borgatto e Hayashi, 2002). Araújo (2007) observou que a presença de giberelinas (GA_3) no meio de cultura interferiu no desenvolvimento radicular e no acúmulo de massa seca de plântulas de *Cattleya loddigesii* 'Tipo'. Grattapaglia e Machado (1998) relataram que, quando as plantas produzidas *in vitro* não estão em condições de serem aclimatizadas, devido ao seu tamanho, o cultivo na presença de GA_3 pode propiciar o alongamento em algumas espécies encurtando o período de obtenção de mudas.

Dentre as espécies que ocorrem no Estado de Mato Grosso do Sul, *L. unicolor* destaca-se por seu elevado valor florístico e rusticidade, entretanto são poucas as informações relativas a germinação e desenvolvimento *in vitro* desta espécie. Em vista do exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito do GA_3 e da condição de luminosidade no crescimento *in vitro* de *L. unicolor*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultivo *in vitro* da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) de Dourados – MS, durante os meses de agosto de 2010 a julho de 2011.

Foram utilizadas plantas de *Leptotes unicolor* Barb.Rodr. com 180 dias, provenientes de semeadura *in vitro*, em meio MS (Murashige e Skoog, 1962), mantidas em sala de crescimento com temperatura média de 25±2 °C, fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de 20 µmol m^{-2} s^{-1} obtida por meio de duas lâmpadas brancas fluorescentes de 40 W cada.

Para a inoculação das plantas, utilizou-se o meio de cultivo MS (Murashige e Skoog, 1962) na metade da sua concentração, acrescido de 30 g L^{-1} de sacarose, 6 g L^{-1} de ágar bacteriológico e de GA_3 nas concentrações de 0,0; 1,0; 5,0; 10,0 ou 20,0 mg L^{-1}. Os meios de cultura foram transferidos para frascos de 600 mL providos de tampa metálica, sendo, a seguir, esterilizados em autoclave, por 20 minutos, a 120 °C e uma atmosfera de pressão. Em seguida à esterilização e solidificação dos meios, os frascos foram transferidos para câmara de fluxo laminar (previamente esterilizada com luz germicida por 30 minutos).

Foram inoculadas, por frasco de cultivo, sete plantas, com cerca de 1 cm de comprimento providas de folhas e de sistema radicular. Na sequência as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento, por 180 dias, sob temperatura de 25±2 ºC e fotoperíodo de 12h sob cinco condições de luminosidade, obtidas com a utilização de papel celofane: 1- amarela; 2- azul; 3- vermelha; 4- verde e 5- incolor.

Após esse período, as plântulas foram repicadas para frascos de igual volume e contendo os mesmos meios de estudo, permanecendo por mais de 180 dias em câmara de crescimento, sob as mesmas condições de luminosidade, temperatura e fotoperíodo, totalizando 360 dias de cultivo.

Decorrido este período, os frascos foram abertos e, após a total remoção do meio de cultura com água destilada, as plantas foram avaliadas quanto ao número de brotos e de raízes, altura, diâmetro, comprimento médio das raízes e massa fresca da touceira.

Foi utilizado o delineamento experimental blocos casualizados e os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial 5x 5 (cinco concentrações de GA_3 e cinco densidades de luz) com três repetições constituídas de um frasco cada. Todas as variáveis foram submetidas à análise de variância e havendo diferenças significativas as médias foram comparadas por regressão ou por teste de Tukey até 5 % de probabilidade com o auxílio do programa computacional SISVAR 5.3 (Ferreira, 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A significância dos fatores estudados, bem como a média geral das variáveis estudadas, são apresentadas na Tabela 1.

Houve efeito conjunto dos níveis de GA_3 e das densidades da luz sobre as variáveis estudadas, sendo exceção (p>0,05) a massa fresca das touceiras, que apresentou média geral igual a 7,50 g independentemente das combinações testadas (Tabela 1).

Tabela 1 Resumo das análises de variância da massa fresca (MFT), da altura (AT), do número de raízes (NR), do comprimento médio das raízes (CRT), do número de brotos (NBT) e do diâmetro médio (DT) das touceiras de *Leptotes unicolor* Barb.Rodr.. Dourados, UFGD, 2011.

		Quadrados médios					
F.V.	G.L.	NB	DT	AT	NRT	CRT	MFT
GA_3	4	57000,24**	1311,98**	986,48**	250,02**	143,54**	2335,90^{ns}
Luz	4	18187,71**	96,27ns	156,18*	58,55**	48,88**	1962,89^{ns}
GA3 x Luz	16	7753,86**	215,60*	123,02*	26,88**	41,16**	1646,18^{ns}
Erro	50	2282,01	118,17	60,00	6,01	11,25	1619,08
CV(%)		46,98	36,90	35,19	84,75	90,81	53,62
M.geral		101,68	29,46	22,01mm	2,89	3,69mm	7,50g

** significativo, ao nível de 1%, pelo teste F
* significativo, ao nível de 5%, pelo teste F
^{ns} não significativo

Não houve efeito dos níveis de GA_3 sobre a altura das touceiras quando cultivadas sob luz azul (Figura 1B). Independentemente da cor da luz, as maiores alturas das touceiras foram observadas na ausência deste regulador de crescimento e os menores na maior dose (Figura 1 A, C, D, E). A combinação que resultou as maiores (32,5 mm) e menores alturas de planta (valores inferiores a 5 mm) foi a luz vermelha combinada com 0,0 e 20 mg L^{-1} de GA_3, respectivamente (Figura 1E).

Araújo et al. (2009) relataram que plantas de *Cattleya loddigesii* cultivadas *in vitro* sob luz vermelha, proporcionada por papel celofane, apresentaram maior alongamento de parte aérea e Cybularz-urban et al. (2007) observaram o aumento do comprimento de broto para híbrido de *Cattleya*. Os resultados observados pelos autores confirmam a atuação da luminosidade vermelha em promover, de modo geral, o alongamento de parte aérea, uma vez que é absorvida pelos fitocromos que são responsáveis pela germinação de sementes fotoblásticas positivas, crescimento caulinar e controle fotoperiódico do florescimento (KERBAUY, 2008).

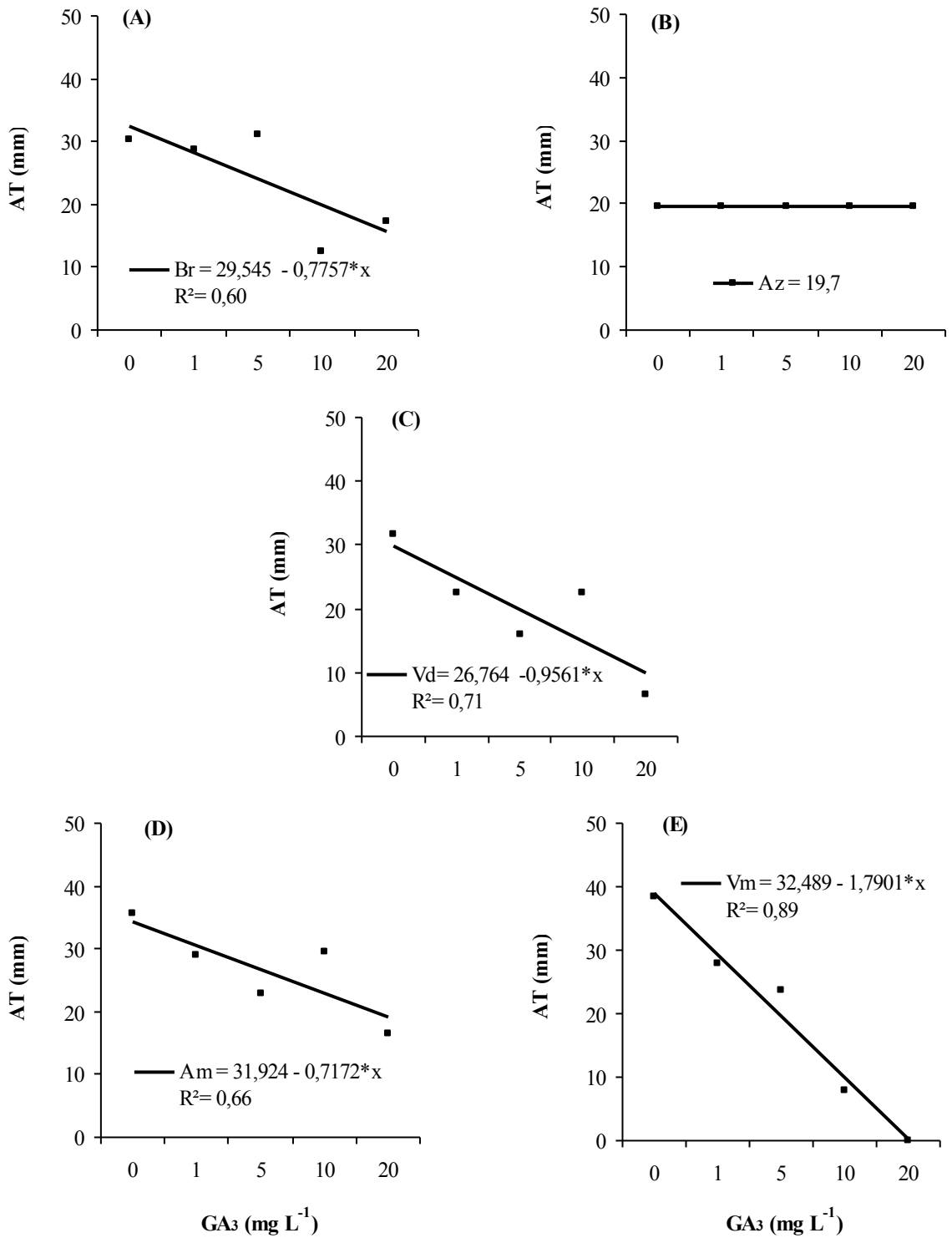

FIGURA 1: Efeito conjunto das doses de GA_3 e das condições de luminosidade sobre a altura das touceiras (AT) de *Leptotes unicolor* Barb.Rodr. **(A)** luminosidade branca; **(B)** luminosidade azul; **(C)** luminosidade verde; **(D)** luminosidade amarela**; (E)** luminosidade vermelha. Dourados-MS, UFGD, 2013.

O maior número de raízes e o sistema radicular mais longo foram observados na presença de luz branca (Figuras 2A e 3A). Ausência de GA_3 estimula a formação de maior número de raízes por touceira (Figura 2A) enquanto a dose de 20 mg L^{-1} estimula o crescimento do sistema radicular de *L. unicolor* na presença de luz branca (Figura 3A). Entretanto para sobrevivência de plântulas *ex vitro* é mais interessante um maior número de raízes embora de comprimento menor do que o inverso, uma vez que o sistema radicular é muito delicado e se rompe com facilidade no manuseio do transplante.

Quanto a influência da luminosidade, sabe-se que as folhas irradiadas com luz branca absorvem os comprimentos de ondas azul, vermelha e verde, necessários para ganhos energéticos pela fotossíntese, bem como para outros processos fisiológicos tais como a formação de raízes (Calvete, 2002). Por essa razão, é possível que as plantas cultivadas sob luz branca tenham obtido maior numero de raízes e com maior comprimento. Braga *et al.* (2009), estudando o efeito da qualidade de luz em crisântemo *Dendranthema grandiflorum* micropropagado,também verificaram maior emissão de raízes em plantas cultivadas sob luz branca enquanto que Galdiano Junior et al. (2012) e Araújo et al. (2009) registraram menor número de raízes em *Cattleya loddigesii* cultivada sob luz vermelha.

O maior número de brotos (215) foi observado na dose calculada de 7 mg L^{-1} de GA_3 e com luz amarela (Figura 4D), valores estes superiores aos observados para a luz branca (189), azul (155), verde (143) e a vermelha (194) na ausência do regulador de crescimento (Figura 4 A,B,C,E). Estes resultados são importantes quando se considera a multiplicação *in vitro* de determinada espécie uma vez que cada um dos brotos dará origem a uma nova planta.

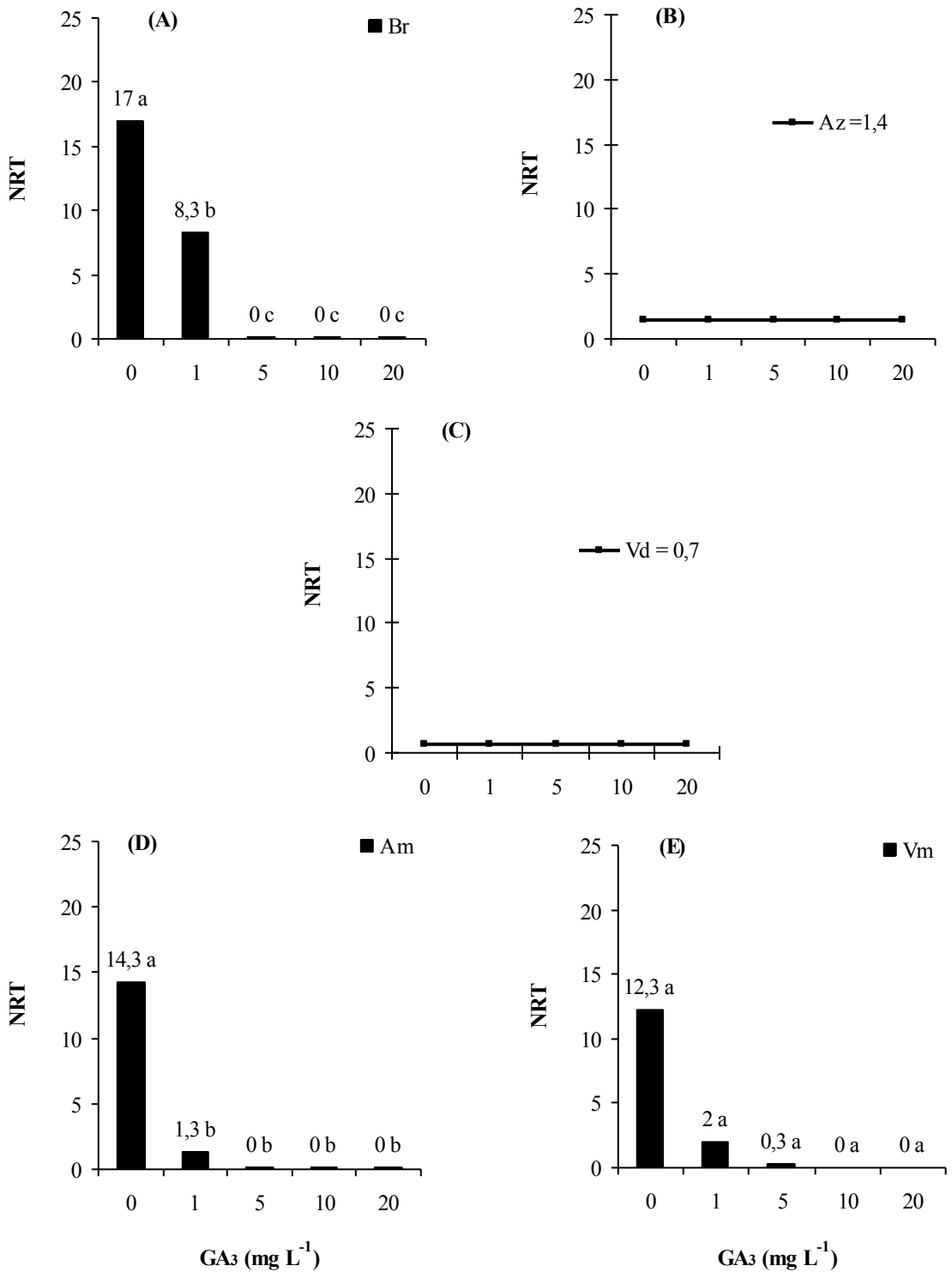

FIGURA 2: Efeito conjunto das doses de GA_3 e das condições de luminosidade sobre o número de raízes das touceiras (NRT) de *Leptotes unicolor* Barb.Rodr. **(A)** luminosidade branca; **(B)** luminosidade azul; **(C)** luminosidade verde; **(D)** luminosidade amarela**; (E)** luminosidade vermelha. Dourados-MS, UFGD, 2013.

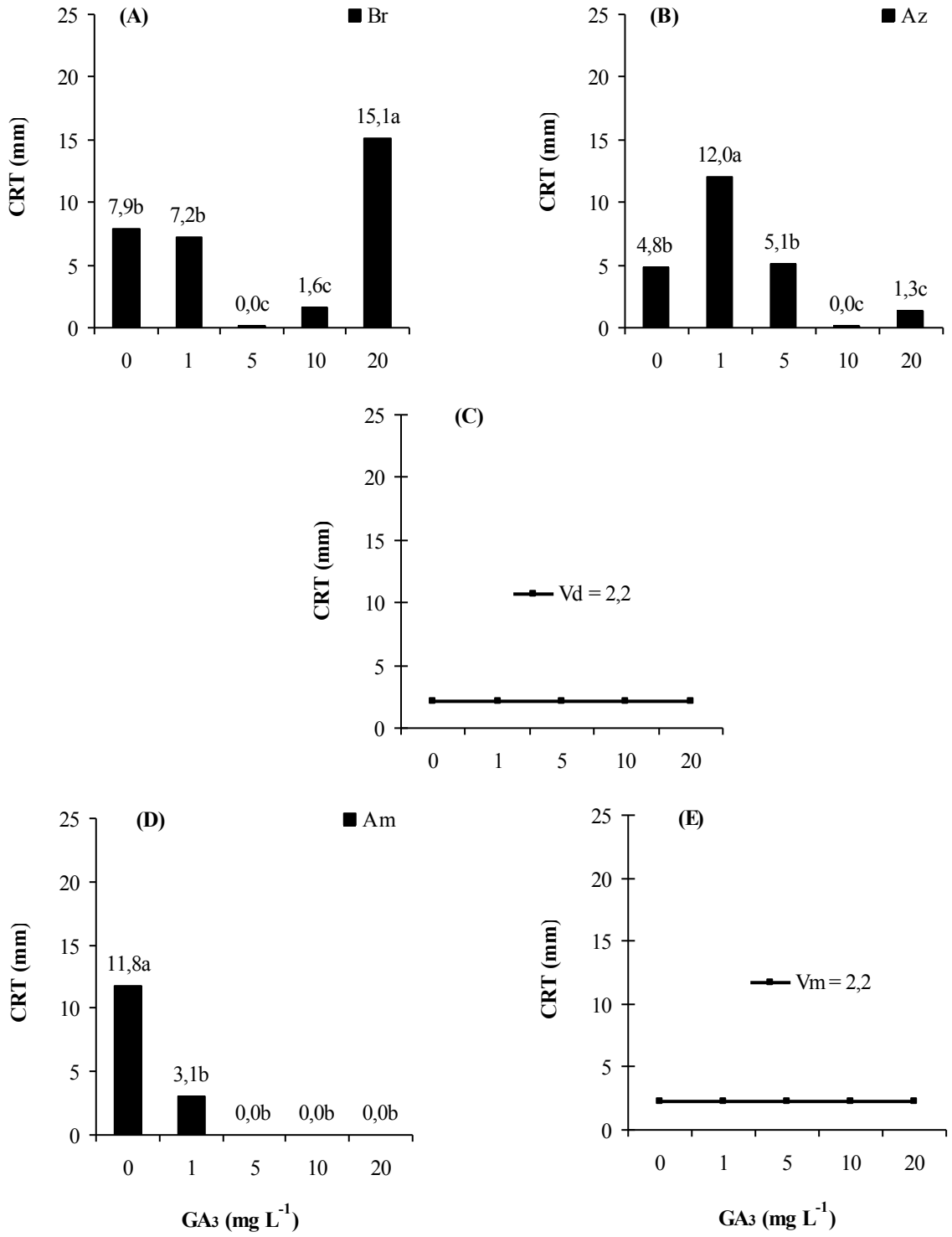

FIGURA 3: Efeito conjunto das doses de GA_3 e das condições de luminosidade sobre o comprimento médio de raízes das touceiras (CRT) de *Leptotes unicolor* Barb.Rodr. **(A)** luminosidade branca; **(B)** luminosidade azul; **(C)** luminosidade verde; **(D)** luminosidade amarela**;** **(E)** luminosidade vermelha. Dourados-MS, UFGD, 2013.

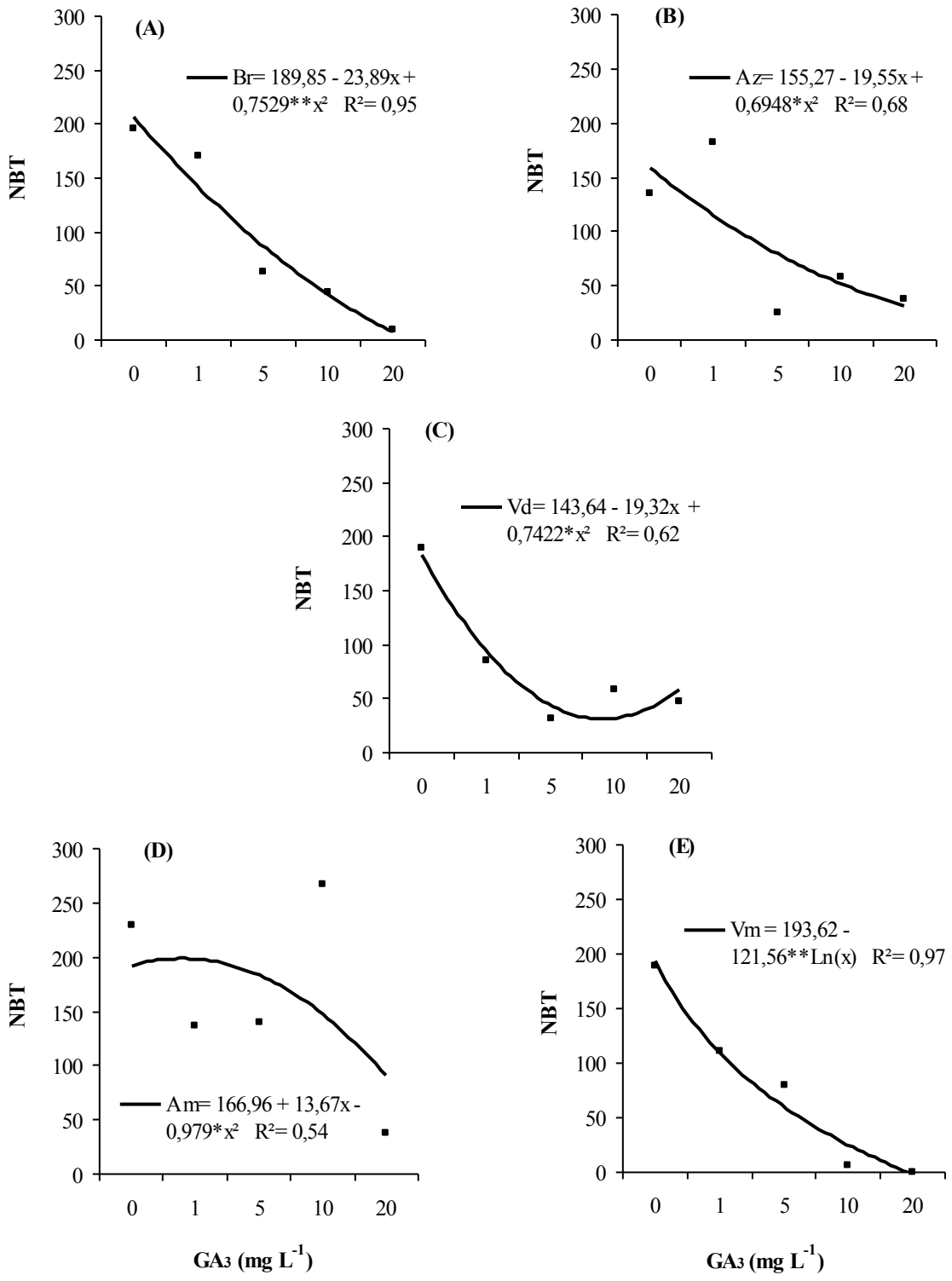

FIGURA 4: Efeito conjunto das doses de GA_3 e das condições de luminosidade sobre o número de brotos das touceiras (NBT) de *Leptotes unicolor* Barb.Rodr. **(A)** luminosidade branca; **(B)** luminosidade azul; **(C)** luminosidade verde; **(D)** luminosidade amarela**; (E)** luminosidade vermelha. Dourados-MS, UFGD, 2013.

Condições de luminosidade azul e verde associadas às diferentes concentrações de GA_3 não interferiram no diâmetro da touceira. Esses resultados permitem inferir que nessas duas condições de luz os brotos produzidos na ausência do regulador foram em maior número embora de menor tamanho, enquanto que aqueles produzidos nas maiores concentrações foram em menor número, mas de maior tamanho.

Os maiores diâmetros das touceiras foram registrados sob luz vermelha (43,5 mm), seguido da branca (40 mm) e da amarela (35,6 mm) na ausência do regulador de crescimento (Figura 5 A, D, E). Estas três condições luminosas também propiciaram as touceiras mais altas (Figura 1A, D, E) e com maior número de raízes (Figura 2A, D, E) condições estas interessantes para a aclimatização *ex vitro* das plantas produzidas.

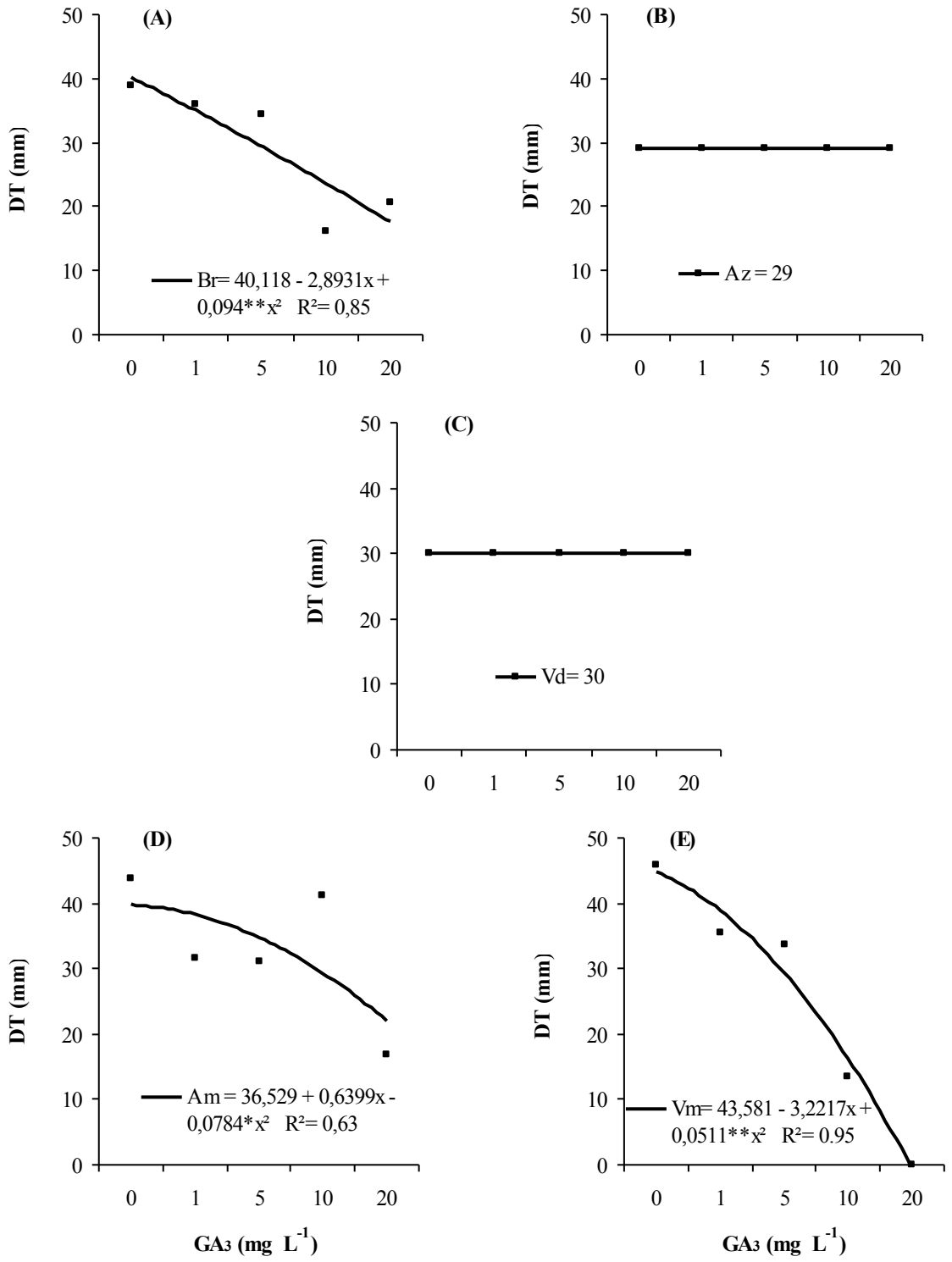

FIGURA 5: Efeito conjunto das doses de GA_3 e das condições de luminosidade sobre o diâmetro das touceiras (DT) de *Leptotes unicolor* Barb.Rodr. **(A)** luminosidade branca; **(B)** luminosidade azul; **(C)** luminosidade verde; **(D)** luminosidade amarela**; (E)** luminosidade vermelha. Dourados-MS, UFGD, 2013.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados observados conclui-se que:

1- Leptotes unicolor Barb.Rodr. apresenta maior crescimento *in vitro* na ausência de GA_3.

2- Luminosidade branca, amarela e vermelha podem ser utilizadas para promover o crescimento in vitro de *L. unicolor*.

AGRADECIMENTOS

À UFGD pela oportunidade concedida, à FUNDECT-MS pelo apoio financeiro e ao Grupo de Pesquisa de Plantas Ornamentais da UFGD (GPPO/CNPq) pelo apoio na execução desse trabalho.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; RODRIGUES, J. D.; CASTRO, E. M.; SANTOS, A. M. Crescimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* Lindl. em diferentes espectros luminosos associados com ácido giberélico. **Ceres**, Viçosa, v.56, p.542-546, 2009.

ARAÚJO, A.G. **Micropropagação de *Cattleya loddigesii* "Tipo": fontes de nitrogênio, qualidade de luz, sacarose e ácido giberélico.** Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2007.

BACH, E.E.; CASTRO, O.L. Germinação de sementes de *Cattleya* sp. (Orchidaceae) em cultura de tecido visando produção de mudas. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.71, p.1-749, 2004.

BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L. ***Orchidaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.

BRAGA, Francyane Tavares et al. Qualidade de luz no cultivo in vitro de Dendranthema grandiflorum cv. Rage: características morfofisiológicas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 2, p. 502-508, 2009.

BORGATTO, F.; HAYASHI, T.K.. Biotecnologia de plantas. In: CASTRO, P.R.C; SENA, J.O.A; KLUGE, R.A (Org.). **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá: Eduem, 2002. p.227-254.

CALVETE, Eunice Oliveira; KÄMPF, Atelene Normann; SUZIN, Marilei. Concentração de sacarose no enraizamento in vitro de morangueiro. **Horticultura brasileira**, v. 20, n. 2, p. 186-191, 2002.

CYBULARZ-URBAN, T.; HANUS-FAJERSKA, E.; SWIDERSKI, A. Effect of light wavelength on *in vitro* organogenesis of a *Cattleya* hybrid. **Acta Biologica Cracoviensia**, Cracow, v.49, p.113-118, 2007.

DRESSLER, R.L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Portland: Dioscorides press, 1993. 314p.

ERIG, A. C.; SCHUCH M. W. Tipo de luz na micropropagação *in vitro* de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) Batum. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, p.488-490, 2005.

FERREIRA, D. F. Programa de análises estatísticas (*Statistical Analysis Software*) e planejamento de experimentos – SISVAR 5.3. Universidade Federal de Lavras, 2010.

GALDIANO JUNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; PIVETTA, K. F. L.; LEMOS, E. G. M. Crescimento *in vitro* e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) com carvão ativado sob dois espectros luminosos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, . Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/2012nahead/a13212cr5881.pdf>. Acessado em: 11 dez. 2012.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In:TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. EMBRAPA: CBAB/EMBRAPA, v.1, p.183-260, 1998.

KÄMPF, A. N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. 2ed. Guaíba: Agropecuária. 2005. 254p.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 2008. 431p.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. ***Physiologia Plantarum***, Copenhagen, v.15, p. 473-497, 1962.