

BAP E AIB NO CULTIVO *in vitro* DE *Epidendrum ibaguense* KUNTH

BAP AND AIB ON *in vitro* CULTURE OF *Epidendrum ibaguense* KUNTH

MAURÍCIO REGINALDO ALVES DOS SANTOS¹; MARIA DAS GRAÇAS RODRIGUES FERREIRA²;
MAGUIANA GONÇALVES MARQUES³

¹ D.Sc. em Agronomia – pesquisador - Embrapa Rondônia, Caixa Postal 127 - 76815-800 - Porto Velho, RO - mauricio@cpafro.embrapa.br

² D.Sc. em Produção Vegetal - pesquisadora - Embrapa Rondônia, Caixa Postal 127 - 76815-800 - Porto Velho, RO - mgraca@cpafro.embrapa.br

³ Bióloga - Estagiária Embrapa Rondônia, Caixa Postal 127 - 76815-800 - Porto Velho, RO - meg_bio@hotmail.com

RESUMO

Neste trabalho objetivou-se avaliar o efeito dos reguladores de crescimento AIB e BAP no desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *Epidendrum Ibaguense* Kunth, visando ao estabelecimento de um protocolo eficiente de regeneração de plantas dessa espécie. Utilizaram-se plântulas oriundas de sementes germinadas *in vitro*, em meio Knudson, sem reguladores de crescimento, com aproximadamente 1,0 cm de comprimento. Foram realizados dois ensaios experimentais. No primeiro, utilizaram-se diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,9; 1,8; 2,7 e 3,6 mg L⁻¹) no meio Knudson e, no segundo, as plântulas foram subcultivadas em meio com diferentes concentrações de AIB (0,0; 0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mg L⁻¹). Nos 60 dias subsequentes ao estabelecimento de cada experimento, avaliou-se o comprimento total das plântulas, o comprimento da parte aérea e da parte radicular e o número de folhas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5 %. Houve diferença significativa entre os tratamentos utilizados. Os tratamentos mais eficientes para o desenvolvimento das plântulas foram: 3,6 mg L⁻¹ de BAP, para o desenvolvimento da parte aérea, seguido do subcultivo em meio com 1,6 mg L⁻¹ de AIB, visando ao enraizamento das mesmas.

Termos para indexação: orquídea, reguladores de crescimento, cultura de tecidos.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of growth regulators IBA and BAP in the development of *in vitro* seedlings of *Epidendrum Ibaguensis* Kunth, aiming to establish a protocol for efficient regeneration. It was used seedlings with approximately 1.0 cm in length from seeds germinated *in vitro*, in Knudson medium without growth regulators. Two experimental trials were conducted. The first using different concentrations of BAP (0.0, 0.9, 1.8, 2.7 and 3.6 mg L⁻¹) in the medium, and the second, on different concentrations of IBA (0.0, 0.8, 1.6, 2.4 and 3.2 mg L⁻¹). Seedlings, shoots and roots length and number of leaves were evaluated 60 days after the establishment of each experiment. The data were submitted to analysis of variance and averages compared by Tukey test at 5%. There was difference between the treatments. The most efficient for plantlets

development were: 3.6 mg L⁻¹ BAP for shoot development, followed by subculture in 1.6 mg L⁻¹ IBA for plantlet rooting.

Index terms: orchids, growth regulators, tissue culture.

INTRODUÇÃO

As orquídeas são encontradas em estado nativo em todos os continentes e nos mais variados climas, com exceção das regiões polares e de desertos extremamente secos. A família Orchidaceae é uma das maiores dentre as angiospermas, constituída por cerca de 700 gêneros e 30.000 espécies. Podem ser epífitas (raízes aéreas), vivendo em árvores, ou rupícolas, vivendo sobre pedras (nas regiões tropicais) e terrestres (nas zonas temperadas) (FARIA et al., 2004).

Como resposta à pressão seletiva, as orquídeas desenvolveram a capacidade de produzir numerosas e minúsculas sementes (ROBINSON & BURNS-BALOGH, 1982), podendo um só fruto, ou cápsula, conter de 376 a 3,7 milhões de sementes, dependendo da espécie (WITHNER, 1959). Porém, as sementes não possuem endosperma funcional, ou seja, não possuem reservas, e sua germinação em geral depende de associações micorrízicas. Essa simbiose mostra-se bastante delicada, e pode não acontecer em razão das condições ambientais adversas (SANTOS et al., 2007; FRÁGUAS et al., 2003).

Nesse contexto, a micropropagação apresenta-se como alternativa para a propagação eficiente de espécies de orquídea, uma vez que propicia o aproveitamento de praticamente todas as sementes produzidas nas cápsulas e a regeneração de plantas adultas a partir destas. Em

(Recebido em 29 de outubro de 2009 e aprovado em 10 de janeiro de 2011)

condições naturais, uma cápsula que possui cerca de 3.000 sementes dá origem a relativamente poucas plantas. Com os trabalhos de Lewis Knudson, na década de 20, desenvolveu-se meios de cultivo nos quais se tornou possível a germinação de sementes de diversas espécies de orquídea e o seu cultivo, promovendo o comércio de plântulas produzidas em laboratório e aliviando a pressão do extrativismo sobre as espécies nativas (ARAÚJO et al., 2006a; NOGUEIRA et al., 2005).

O crescimento *in vitro* é regulado pela interação e pelo balanço entre as substâncias adicionadas ao meio de cultura e por aquelas produzidas de forma endógena (CHAPLA et al., 2009). A adição de auxinas e citocininas ao meio é essencial para regular o crescimento e a morfogênese nos tecidos vegetais *in vitro* (VICTÓRIO et al., 2008). As citocininas são reguladores vegetais que participam ativamente dos processos de divisão e diferenciação celular. Dentre estas, a 6-benzilaminopurina (BAP) é uma das mais utilizadas (LINO et al., 2009), sendo considerada a mais eficiente na multiplicação de explantes e indução de gemas, além de ser a citocinina de menor custo no mercado (CAMPOS et al., 2007). No enraizamento, ácido indolbutírico (AIB) é frequentemente considerado como a auxina mais eficiente para a maioria das espécies vegetais (OLIVEIRA et al., 2008).

Epidendrum é um gênero botânico pertencente à família das orquídeas e inclui mais de 1.100 espécies. A espécie amazônica *Epidendrum ibaguense*, descrita em 1816, é uma orquídea terrestre que cresce em grandes touceiras, prostradas e enroscadas. No Brasil, desenvolve-se em afloramentos rochosos, em altitudes de 200 a 1.000 metros, nos estados do Amazonas, Pará e Roraima (MENEGUCE et al., 2004). Apresenta grande potencial para comercialização, visto que produz flores o ano inteiro, com coloração vermelha e amarela, podendo ser utilizada como flor de corte, de vaso ou para paisagismo (SANTOS et al., 2007).

Neste trabalho, objetivo-se o estabelecimento de um protocolo eficiente de produção de mudas *in vitro* de *Epidendrum ibaguense* Kunth, avaliando os efeitos dos

reguladores de crescimento BAP e AIB, em diferentes concentrações, no desenvolvimento de plântulas da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Rondônia, em Porto Velho-RO. Utilizaram-se, como explantes, plântulas com 30 dias de idade, aproximadamente 1,0 cm de altura e apenas uma folha, oriundas de sementes procedentes de uma planta de *Epidendrum ibaguense* Kunth cultivada no campo experimental da Embrapa Rondônia, germinadas *in vitro*, em meio Knudson, sem reguladores de crescimento. Foram realizados dois ensaios experimentais. No primeiro ensaio, os explantes foram inoculados individualmente, em tubos de ensaio contendo 10,0 mL de meio Knudson, suplementado com 0,0; 0,9; 1,8; 2,7 e 3,6 mg L⁻¹ de BAP, sendo quatro repetições, cada uma composta por cinco tubos com um explante cada. No segundo ensaio, utilizaram-se plântulas cultivadas durante 60 dias em meio suplementado com 3,6 mg L⁻¹ de BAP, aproximadamente 4,0 cm de altura e três folhas, as quais foram transferidas para meio Knudson contendo 0,0; 0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mg L⁻¹ de AIB. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento, sob irradiância de 35 mmol m⁻² s⁻¹, temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas, em delineamento experimental inteiramente casualizado.

Aos 60 dias após o estabelecimento de cada experimento, avaliou-se o comprimento da parte aérea e da parte radicular, o comprimento total das plântulas e o número de folhas e os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio 1 – Efeito do BAP no desenvolvimento das plântulas

Houve maior desenvolvimento da parte aérea das plântulas de orquídea no tratamento contendo 3,6 mg L⁻¹ de BAP, com média de 3,74 cm de comprimento por plântula, seguido pelos tratamentos com 2,7 mg L⁻¹ e 1,8 mg L⁻¹, com comprimentos de 3,29 cm e 3,16 cm, respectivamente. No

controle, observou-se média de 1,81 cm de comprimento da parte aérea (Figura 1).

Resultados semelhantes foram obtidos por Araújo et al. (2006b) que, em trabalho com *Brassocattleya* 'Pastoral' x *Laeliocattleya* 'Amber Glow' (Orquidaceae), compararam o efeito dos meios MS, WPM e Knudson em combinação com concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹). Esses autores obtiveram o maior crescimento das plântulas (comprimento da parte aérea) em meio WPM, suplementado com 4,0 mg L⁻¹ de BAP; e maior multiplicação (número de brotos) com meio MS, sem regulador de crescimento.

O desenvolvimento de protocormos de *Cypripedium candidum* Muhl. ex Willd (Orquidaceae) foi avaliado em função da suplementação do meio com as citocininas BAP, 2iP e cinetina (0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 mg L⁻¹). BAP e 2iP promoveram o maior crescimento dos protocormos, em concentrações inferiores a 1,0 mg L⁻¹. Cinetina promoveu menor crescimento, mas resultou em desenvolvimento normal dos tecidos, enquanto que BAP e 2iP resultaram em brotações múltiplas (PAUW et al., 1995).

O desenvolvimento de protocormos de *E. ibaguense* foi estudado comparando-se os meios MS,

Phytamax e Knudson C e Mitra, na presença e ausência de peptona (2,0 mg L⁻¹) e carvão ativado (2,0 mg L⁻¹). Identificou-se maior desenvolvimento nos meios MS e Phytamax, ambos com a adição de peptona e carvão ativado (HOSSAIN, 2008).

Estudando o crescimento *in vitro* de *Carissa carandas*, Rai & Misra (2005) observaram que o maior comprimento das plântulas foi atingido com a suplementação do meio de cultivo com 13,32 μM de BAP, decrescendo na concentração imediatamente superior, de 17,75 μM.

O maior comprimento radicular verificado foi de 0,79 cm, observado no tratamento contendo 2,7 mg L⁻¹ de BAP. A concentração imediatamente superior, 3,6 mg L⁻¹ de BAP, provocou redução no comprimento radicular, sendo observado o comprimento médio de 0,69 cm. No controle, o comprimento radicular verificado foi o de 0,68 cm (Figura 2). É possível que a concentração mais alta da citocinina tenha inibido a formação de raízes.

Araújo et al. (2006b), trabalhando com *Brassocattleya* Pastoral x *Laeliocattleya* Amber Glow, observaram que a utilização de BAP no meio de cultivo não promoveu nenhum efeito no número de raízes.

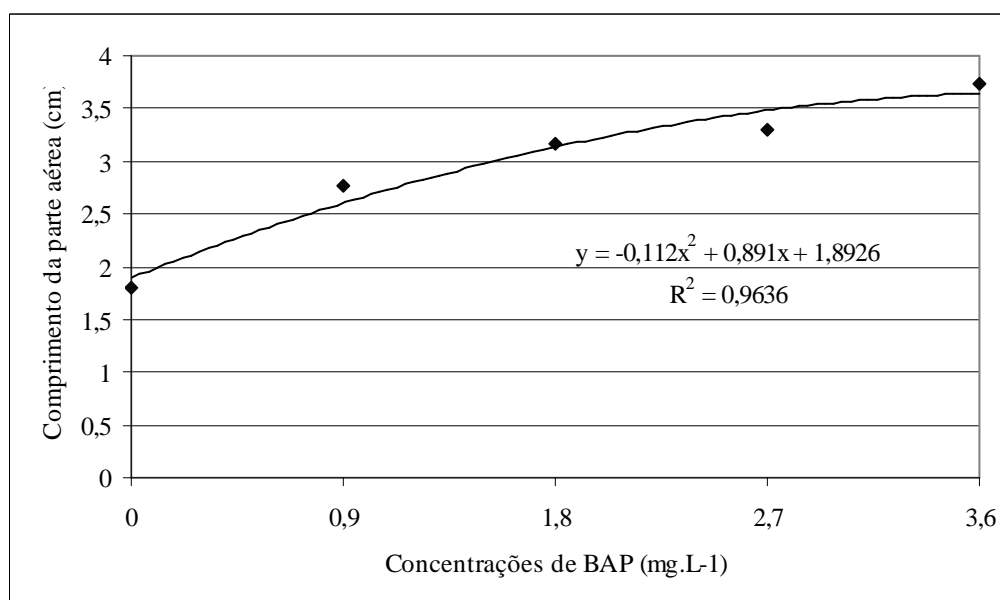


FIGURA 1 – Efeito de concentrações de BAP sobre o comprimento da parte aérea de plântulas de *E. ibaguense*, após 60 dias de cultivo *in vitro*.

Comparando os meios WPM, MS e Knudson C, os autores verificaram que o meio WPM resultou em maior número de raízes, seguido do meio MS, sendo os menores valores verificados no meio Knudson C.

De acordo com Pierik (1987), em concentrações mais elevadas, as citocininas podem induzir à formação de gemas adventícias, quebrando a dominância apical e retardando a formação de raízes.

O comprimento total das plântulas apresentou-se maior com o aumento na concentração de BAP. O menor comprimento foi verificado no tratamento controle, com média de 2,49 cm. O maior comprimento foi de 4,43 cm, no meio suplementado com a maior concentração de BAP, 3,6 mg L⁻¹ (Figura 3). Estudando o crescimento de *Carissa carandas* L., Rai & Misra (2005) observaram que o maior comprimento médio das plântulas foi atingido com a suplementação do meio de cultivo com 3,0 mg L⁻¹ de BAP (4,39 cm), decrescendo na concentração imediatamente superior, de 4,0 mg L⁻¹ (2,38 cm).

Quanto ao efeito do BAP sobre o número de folhas, esse valor aumentou do tratamento controle para as concentrações de 0,9 e 1,8 mg L⁻¹ do regulador, com 3,9,

4,70 e 4,85 folhas por plântula, respectivamente. Porém, o número de folhas decresceu em seguida, nas concentrações de 2,7 e 3,6 mg L⁻¹ de BAP (Figura 4).

O aumento seguido de decréscimo pode indicar toxicidade por altas concentrações da citocinina, estabelecendo uma faixa de utilização ótima da mesma para a variável estudada. Resultados diferentes foram obtidos por Talukder et al. (2003), que obtiveram maior número de folhas por plântula (4,25) em *Dendrobium* utilizando 2,25 mg L⁻¹ de BAP.

Ensaio 2 – Efeito do AIB no desenvolvimento das plântulas

Com relação ao comprimento da parte aérea, a maior média, 6,76 cm, foi obtida com a concentração de 1,6 mg L⁻¹ de AIB. Já, o menor comprimento médio, 4,60 cm, foi observado no tratamento contendo 3,2 mg L⁻¹ de AIB. No tratamento controle, o comprimento médio obtido para a parte aérea foi de 6,12 cm (Figura 5).

O crescimento radicular foi maior no tratamento contendo 1,6 mg L⁻¹ de AIB, que resultou no comprimento radicular médio de 1,64 cm. Na ausência de regulador de crescimento, verificou-se comprimento radicular médio de

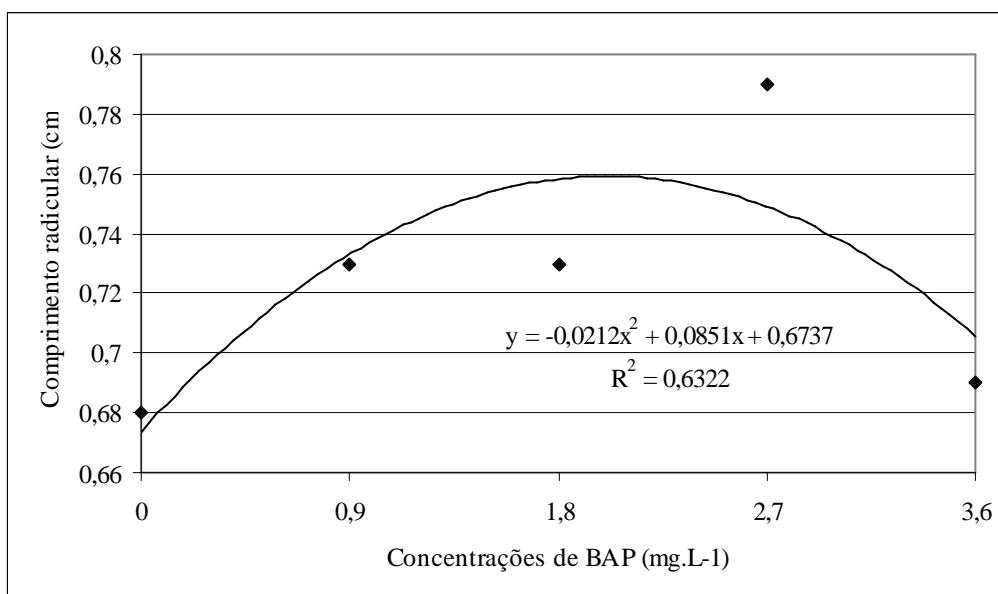


FIGURA 2 – Efeito de concentrações de BAP sobre o comprimento radicular de plântulas de *E. ibaguense*, após 60 dias de cultivo *in vitro*.

0,92 cm. Nas concentrações superiores, de 2,4 e 3,2 mg L⁻¹ de AIB, os comprimentos decresceram para 1,54 cm e 0,84 cm, respectivamente (Figura 6).

De forma similar, Aktar et al. (2007), estudando o desenvolvimento radicular em plântulas de *Dendrobium*

(Orchidaceae) em relação a diferentes concentrações de AIB (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹), observaram maiores número de raízes por plântula, comprimento e peso fresco radicular na concentração de 1,0 mg L⁻¹, que resultou também no menor tempo para a formação de raízes (10,8 dias).

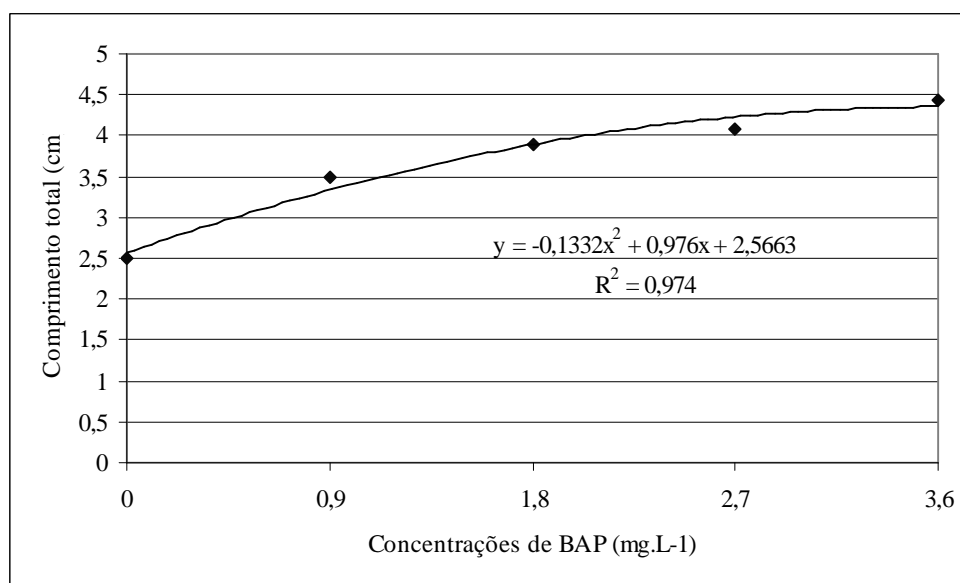


FIGURA 3 – Efeito de concentrações de BAP sobre o comprimento total de plântulas de *E. ibaguense*, após 60 dias de cultivo *in vitro*.

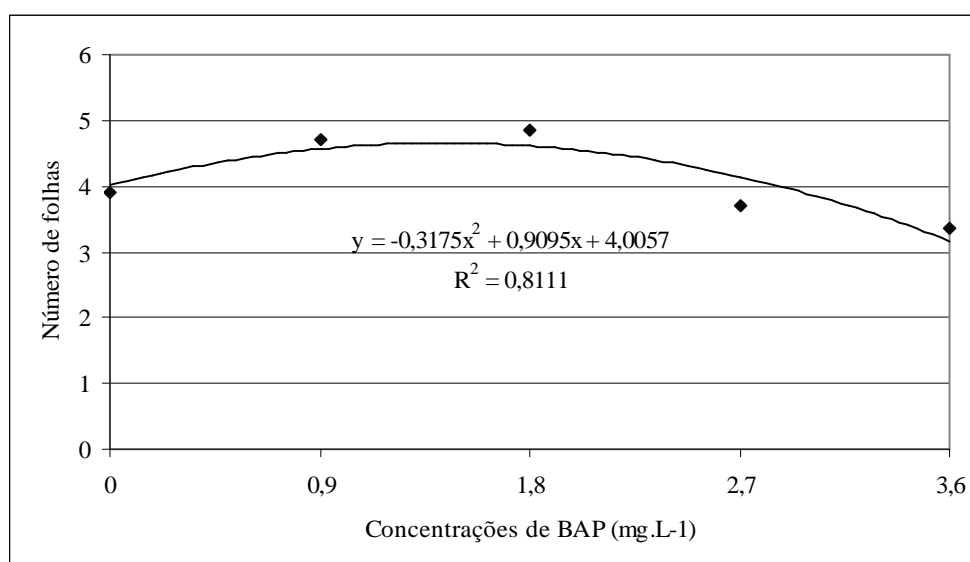


FIGURA 4 – Efeito de concentrações de BAP sobre o número de folhas por plântula de *E. ibaguense*, após 60 dias de cultivo *in vitro*.

Ribeiro et al. (2006) testaram o efeito de uma combinação fatorial de AIB e GA_3 (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L^{-1}) sobre o comprimento e o número de raízes em plântulas de *Zantedeschia aethiopica* (L.) Spreng., obtendo os

melhores resultados com a suplementação do meio com 2,0 mg L^{-1} de AIB, associados a 1,0 mg L^{-1} de GA_3 . Por outro lado, Rai & Misra (2005), estudando a micropropagação de *Carissa carandas* L., observaram que

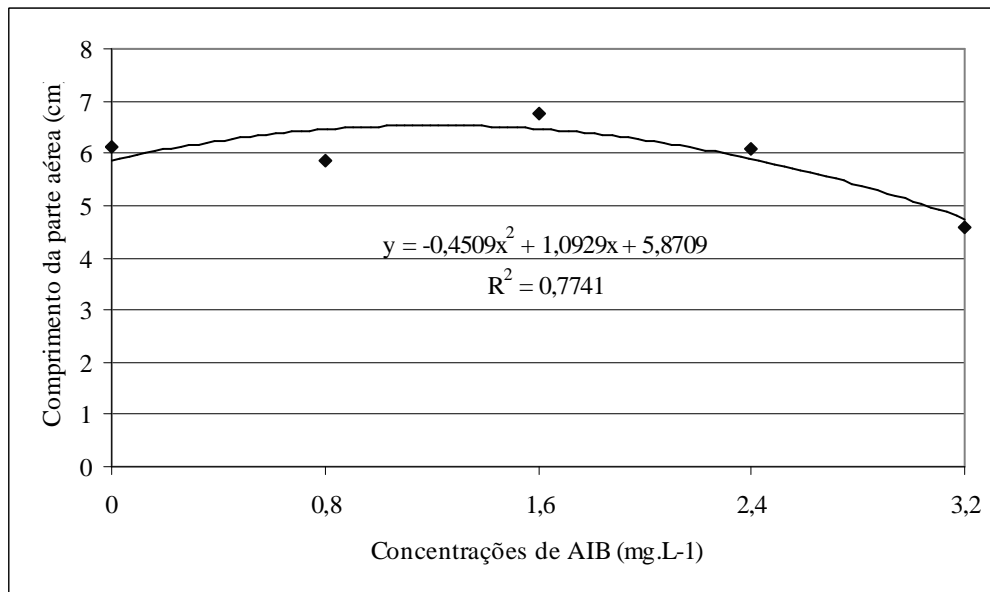


FIGURA 5 – Efeito de concentrações de AIB sobre o comprimento da parte aérea de plântulas de *E. ibaguense*, após 60 dias de cultivo *in vitro*.

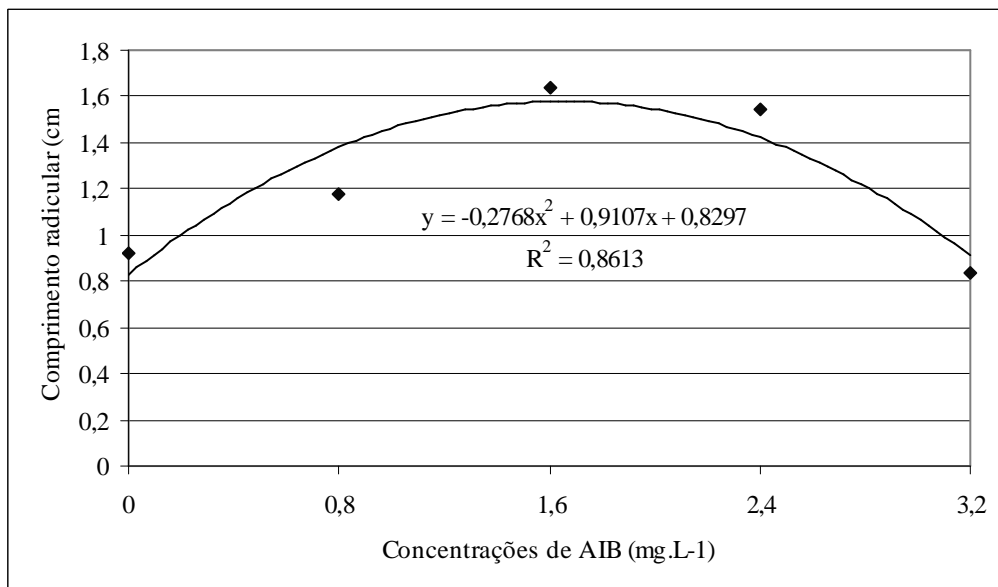


FIGURA 6 – Efeito de concentrações de AIB sobre o comprimento radicular de plântulas de *E. ibaguense*, após 60 dias de cultivo *in vitro*.

o AIB utilizado isoladamente, em diferentes concentrações testadas, não resultou em enraizamento satisfatório, formando raízes longas e finas.

Oliveira et al. (2008) testaram concentrações de AIB (0,0; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹) em combinação com concentrações dos sais macronutrientes do meio MS (25, 50 e 100%) para o enraizamento de plântulas de *Cereus jamacaru* P.DC., observando maior número de raízes com a concentração de 2,0 mg L⁻¹ de AIB e 50% dos macronutrientes do meio MS. Em relação ao comprimento das raízes, os autores não observaram diferença entre as concentrações de AIB, sendo que a concentração de sais de 100% promoveu o maior crescimento radicular (OLIVEIRA et al., 2008).

O comprimento total médio das plântulas foi maior na concentração de 1,6 mg L⁻¹ de AIB, 8,40 cm, enquanto obteve-se 7,04 cm de comprimento no controle. Porém, em concentrações superiores, de 2,4 mg L⁻¹ e 3,2 mg L⁻¹ de AIB, o comprimento total médio das plântulas diminuiu, atingindo valores de 7,64 cm e 5,44 cm, respectivamente (Figura 7). Esses resultados diferem bastante dos obtidos por Rai & Misra (2005), cuja avaliação do comprimento de

plântulas de *Carissa carandas* L. identificou maiores valores no meio de cultura sem reguladores de crescimento (2,01 cm), em comparação com o meio suplementado com AIB nas concentrações de 0,18 mg L⁻¹ (1,76 cm) e 0,46 mg L⁻¹ (1,52 cm).

As auxinas, especificamente o AIB, geralmente induzem a formação e o desenvolvimento de raízes, o que se verificou neste experimento. Conforme esperado, esse regulador de crescimento não estimulou o desenvolvimento da parte aérea. As auxinas são os únicos reguladores de crescimento que aumentam a formação de primórdios radiculares (TAIZ & ZEIGER, 1998), sendo predominantemente obtidas em tecidos jovens (DAVIES, 1995). De forma inversa, as citocininas são produzidas principalmente nas raízes (ITAI & BIRNBAUM, 1996), estimulando a iniciação de gemas caulinares (PILLARY & RAILTON, 1993). Embora as auxinas em geral induzam o enraizamento, as respostas a elas não são universais, ou seja, algumas espécies enraízam com dificuldade ou não enraízam, mesmo com a utilização dessa classe de regulador de crescimento (HARTMANN et al., 2002).

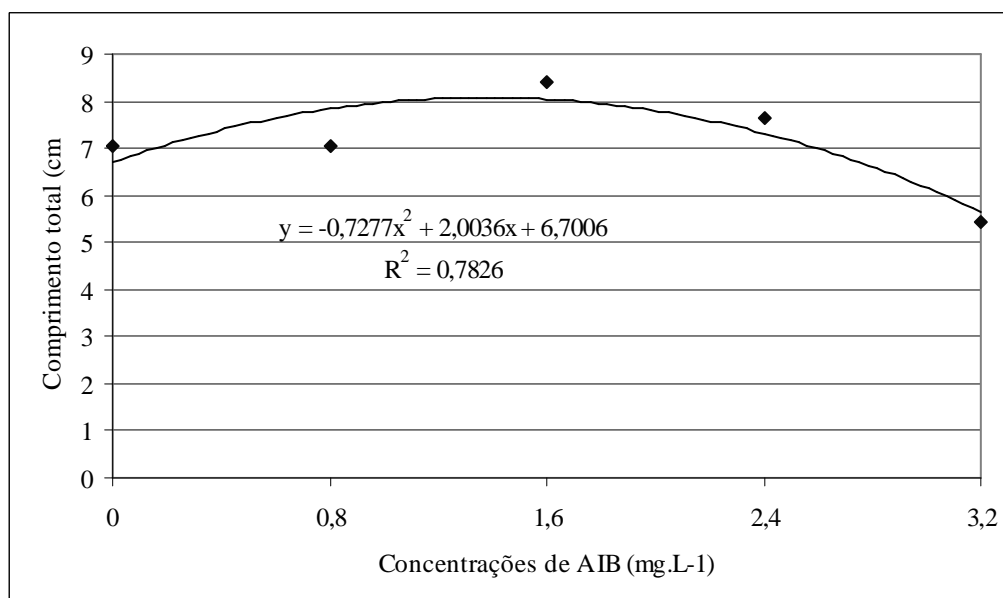


FIGURA 7 – Efeito de concentrações de AIB sobre o comprimento total de plântulas de *E. ibaguense*, após 60 dias de cultivo *in vitro*.

O número de folhas foi maior nas plântulas cultivadas na ausência de regulador de crescimento, seguido do tratamento contendo a concentração mais baixa de AIB, 0,8 mg L⁻¹ (Figura 8). As auxinas não têm ação reconhecida sobre essa variável, e sim sobre a organogênese e o desenvolvimento da parte radicular.

CONCLUSÃO

A concentração de 3,6 mg L⁻¹ de BAP proporciona maior desenvolvimento da parte aérea de plântulas de *Epidendrum ibaguense* Kunth. A concentração de 1,6 mg L⁻¹ de AIB resulta no maior desenvolvimento radicular dessas plântulas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKTAR, S.; NASIRUDDIN, K. M.; HUQ, H. *In vitro* root formation in *Dendrobium* orchid plantlets with IBA. **Journal of Agriculture & Rural Development**, Bangladesh, v. 5, n. 1/2, p. 48-51, 2007.
- ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A. R.; ROCHA, H. S. Crescimento *in vitro* de *Laelia tenebrosa* (Orquidaceae) em diferentes concentrações de sais de Knudson C e Carvão Ativado. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 2, n. 2, p. 61-67, 2006a.
- ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; SILVA, A. B.; VILLA, F.; ROCHA, H. S.; COSTA, F. C. Propagação *in vitro* de plântulas de orquídea em diferentes meios de cultura e concentrações de citocinina. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 2, n. 2, p. 68-73, 2006b.
- CAMPOS, R. V.; BIANCHI, V. J.; ROCHA, P. S. G.; SCHUCH, M. W.; FACHINELLO, J. C. BAP na multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de *Prunus* spp. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 3, n. 2, p. 55-60, 2007.
- CHAPLA, P. I.; BESSON, C. F.; OLIVEIRA, L. K.; SILVA, J. M.; ROCHA, A. C. S.; STEFANELLO, S. pH, carvão ativado e agentes geleificantes do meio de cultura no crescimento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 5, n. 2, p. 87-93, 2009.
- DAVIES, P. J. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: _____. (ed.). **Plant hormones: Physiology, biochemistry and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 1-12.
- FARIA, R. T.; VICENTE, A. P. R. M.; COSTA, T. M. M.; FONSECA, I. C. B.; SILVA, G. L.; TAKAHASHI, L.S.A. Seleção de genótipos de *Dendrobium* (Orchidaceae) na fase de propagação *in vitro*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 309-314, 2004.
- FRÁGUAS, C. B.; VILLA, F.; SOUZA, A. V.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídeas oriundas da hibridação entre *Cattleya labiata* e *Laelia itambana*. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 50, n. 292, p. 719-726, 2003.
- HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant Propagation: Principles and Practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 792 p.
- HOSSAIN, M. M. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Epidendrum ibaguense* Kunth. (Orchidaceae). **African Journal of Biotechnology**, Victoria Island, v. 7, n. 20, p. 3614-3619, 2008.
- ITAI, C.; BIRNBAUM, H. Synthesis of plant growth regulators by roots. In: WASEL, Y.; ESHEL, A.; KAFKAFI, V. (eds.) **Plant roots: The hidden half**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 273-284.
- LINO, L. O.; LUZ, J. M. Q.; NAVES, I. V.; RODRIGUES, T. M.; DIAS, L. A.; ARRUDA, A. S. Cinetina, ácido giberélico e BAP na indução de embriões somáticos a partir de anteras de cafeeiro *Coffea arabica* L. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 5, n. 2, p. 111-117, 2009.
- MENEGUCE, B.; OLIVEIRA, R. B. D.; FARIA, R. T. Propagação vegetativa de *Epidendrum ibaguense* Lindl. (Orchidaceae) em substratos alternativos ao xaxim. **Revista Ciências Agrárias**, Belém, v.25, n.2, p.101-106, 2004.
- NOGUEIRA, R. E.; PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M.; LANNA, M. C. S.; MENDONÇA, M. P. Fungos micorrízicos associados a orquídeas em campos rupestres na região do Quadrilátero Ferrífero, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 417-424, 2005.
- OLIVEIRA, A. B.; DINIZ, J. D. N.; ALMEIDA, J. L. Multiplicação e enraizamento *in vitro* do mandacaru (*Cereus jamacaru* P.DC.). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 4, n. 1, p. 48-54, 2008.

- PAUW, M. A.; REMPHREY, W. R.; PALMER, C. E. The cytokinin preference for *in vitro* germination and protocorm growth of *Cypripedium candidum*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 75, n. 3, p. 267-275, 1995.
- PIERIK, R. L. M. **In vitro culture of higher plants**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1987. 344 p.
- PILLARY, I.; RAILTON, I. D. Complete released of axillary buds from apical dominance in intact, light-growin seedlings of *Pisum sativum* L. following a single application of cytokinin. **Plant Physiology**, Durham, vol. 71, p. 972-974, 1993.
- RAI, R.; MISRA, K. K. Micropropagation of Karonda (*Carissa carandas*) through shoot multiplication. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 103, n. 2, p. 227-232, 2005.
- RIBEIRO, M. N. O.; PASQUAL, M.; VILLA, F.; ALBUQUERQUE, K. S. Efeitos do AIB e GA₃ na micropropagação de *Zantedeschia aethiopica*. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 53, n. 309, p. 568-573, 2006.
- ROBINSON, H.; BURNS-BALOGH, P. Evidence for a primitively epiphytic habit in orchid. **Systematic Botany**, Wyoming, v. 7, n. 4, p. 355-358, 1982.
- SANTOS, G. A.; SAITO, B. C.; MONTEIRO, D. P.; GUTIERRE, M. A. M.; ZONETTI, P. C. Utilização de reguladores hormonais na germinação e formação de plântulas *in vitro* de orquídeas. **Cesumar**, Maringá, v. 09, n. 01, p. 07-12, 2007.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 2.ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1998. 792 p.
- TALUKDER, S. K.; NASIRUDDIN, K. M.; YASMIN, S.; HASSAN, L.; BEGUM, R. Shoot proliferation of *Dendrobium* orchid with BAP and ANA. **Journal of Biological Sciences**, Bangladesh, v. 1, n. 3, p. 1058- 1062, 2003.
- VICTÓRIO, C. P.; CRUZ, I. P.; SATO, A.; KUSTER, R. M.; LAGE, C. L. S. Effects of auxins and cytokinins on *in vitro* development of *Alpinia purpurata* K. Schum and phenolic compounds production. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 4, n. 2, p. 92-98, 2008.
- WITHNER, C. L. Orchid physiology. In:_____. **The orchids: a scientific survey**. New York: Ronald Press, 1959. p. 155-188.