

## Fontes de nitrogênio no crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae)

Aparecida Gomes de Araújo<sup>1\*</sup>, Moacir Pasqual<sup>1</sup>, Filipe Almendagna Rodrigues<sup>1</sup>, Janice Guedes de Carvalho<sup>2</sup> e Danielle Zampiere Arce Zarraga<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Cx. Postal 3037, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências do Solo, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil. \*Autor para correspondência. E-mail: agaraujo2003@hotmail.com

**RESUMO.** Objetivou-se avaliar diferentes concentrações de nitrato de cálcio e nitrato de amônio no crescimento *in vitro* de orquídea. Plântulas de *Cattleya loddigesii* oriundas de sementes germinadas *in vitro*, com 1,0 cm de comprimento, foram inoculadas em frascos contendo 60 mL de meio de cultura WPM modificado em suas concentrações de nitrato de cálcio (0, 278, 556, 834 e 1112 mg L<sup>-1</sup>) e nitrato de amônio (0, 200, 400, 600 e 800 mg L<sup>-1</sup>). O meio foi acrescido de 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 150 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana ‘nanica’ madura e 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, pH ajustado para 5,7 ± 0,1 e solidificado com 6 g L<sup>-1</sup> de ágar, antes da autoclavagem a 121°C e 1,5 atm, por 20 min. Após a inoculação, os frascos foram transferidos para sala de crescimento a 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16h e 35 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de intensidade luminosa. Decorridos 90 dias, observaram-se melhores resultados para número de folhas e de brotos com 400 e 450 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de amônio, respectivamente, enquanto que o maior número de raízes foi obtido com 600 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de amônio e 278 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de cálcio. Recomenda-se a utilização do meio WPM em sua composição original, sem nitrato de cálcio na micropropagação desta espécie.

**Palavras-chave:** *Cattleya*, nitrato de cálcio, nitrato de amônio, micropropagação.

**ABSTRACT. Nitrogen sources in the *in vitro* development of the *Cattleya loddigesii* Lindl. (Orchidaceae).** This work aimed to evaluate the effect of different concentrations of calcium and ammonium nitrate on the *in vitro* development of orchids. *Cattleya loddigesii* orchid plantlets, 1.0 cm in size produced by self pollinization and also by *in vitro* germinated seeds, were inoculated in flasks containing 60 mL of WPM culture medium, modified with different concentrations of calcium nitrate (0, 278, 556, 834 and 1112 mg L<sup>-1</sup>) and ammonium nitrate (0, 200, 400, 600 and 800 mg L<sup>-1</sup>). The culture medium was supplemented with 20 g L<sup>-1</sup> of sucrose, 150 g L<sup>-1</sup> of ‘nanica’ banana pulp, activated charcoal 2 g L<sup>-1</sup>, solidified with agar 6 g L<sup>-1</sup>, and pH adjusted to 5.7 ± 0.1 before being autoclaved at 121°C, 1.5 atm pressure during 20 minutes. After inoculations, the flasks were transferred to a growth room with controlled temperature around 25 ± 2°C, 16h photoperiod regime, with a light intensity of 35 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. After 90 days, it was observed that the best results in terms of number of leaves was achieved with 400 mg L<sup>-1</sup> of ammonium nitrate, and the highest number of sprouts was obtained with 450 mg L<sup>-1</sup> of ammonium nitrate, but the major number of roots was verified in the treatment with 600 mg L<sup>-1</sup> of ammonium nitrate and 278 mg L<sup>-1</sup> of calcium nitrate. In resume, it is recommended to use the WPM medium in its original composition, without calcium nitrate to micropropagate *C. loddigesii* orchid plantlets.

**Key words:** *Cattleya*, calcium nitrate, ammonium nitrate, micropropagation.

### Introdução

A espécie *Cattleya loddigesii* ocorre nos Estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo, em locais situados entre 500 e 900 m de altitude. Seu cultivo é mais fácil em locais de temperatura mais amena, protegidos da luminosidade excessiva, com maior umidade nos meses mais quentes e inverno mais seco. Seu período

de florescimento vai do outono até a primavera. Produz flores de até 9 cm de diâmetro, com coloração desde o rosa-claro até o rosa mais intenso pintalgado, além da variedade alba (ARAÚJO, 2004).

A cultura assimbiótica, ou sementeira *in vitro* de orquídeas, constitui uma técnica bastante relevante, do ponto de vista comercial e também ecológico. As plantas produzidas dessa forma são altamente interessantes para

programas de reintrodução de espécies nativas em áreas de preservação ambiental, resultando em maiores percentuais de germinação, em comparação com a germinação em condições naturais, a qual é dependente da infecção por fungos micorrízicos simbiotes, muitas vezes espécie-específicos.

Neste contexto, a produção de orquídeas, a partir de técnicas de cultura de tecidos, é uma alternativa viável para a obtenção de um grande número de plantas, em curto espaço de tempo, suprimindo, assim, a necessidade dos produtores de orquídeas na aquisição de mudas com qualidade comprovada.

O meio de cultura utilizado na micropropagação é um fator determinante para o sucesso do cultivo *in vitro* de orquídea. A fonte de sais minerais fornecida aos explantes é extremamente importante, assim como sua concentração. O nitrogênio é um dos principais nutrientes essenciais e ativos, sendo absorvido, principalmente, na forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ). Por ser constituinte de várias biomoléculas essenciais, como aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas e outros, sua assimilação se dá em diversos processos metabólicos da planta (SAKUTA et al., 1987).

O efeito das diferentes formas inorgânicas de nitrogênio sobre o crescimento e o desenvolvimento em cultura de tecidos é marcante: o nitrato, como única fonte de nitrogênio, sustenta boa taxa de crescimento em muitas espécies, sendo também a melhor forma de nitrogênio para algumas culturas, tais como cenoura, roseira e várias outras espécies (CALDAS et al., 1998). No entanto, há espécies que não crescem bem com presença de nitrato no meio de cultura, como, por exemplo, calos de arroz, indicando que este tecido é incapaz de utilizar o nitrato como fonte de N (CALDAS et al., 1998).

Mercier e Kerbauy (1998), comparando fontes de nitrogênio (glutamina e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) em culturas *in vitro* de *Tillandsia pohliana* (Bromeliaceae), verificaram que  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  induziu aumento nas concentrações de citocininas e, paralelamente, declínio no conteúdo de ácido indol acético (AIA) em tais tecidos, além de proporcionar maior produção de massa fresca e seca nas plântulas. No entanto, os mesmos autores citam que, dependendo do hábito de crescimento das bromélias, há preferência pela forma de N orgânico que a planta utiliza.

Dijk e Eck (1995b) formularam meios de cultura com 0 a 12  $\text{mM L}^{-1}$  de N, utilizando como fonte o  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , e os testaram no cultivo *in vitro* de plântulas de *Dactylorhiza*, obtendo resultados diversos quanto ao crescimento das plântulas: as de *D. incarnata* apresentaram decréscimo na massa fresca, *D. praetermissa* incremento, enquanto *D.*

*majalis* foi indiferente ao aumento das concentrações de N no meio.

Outro elemento, o cálcio, desempenha papel importante na morfogênese, por causa da interação com substâncias reguladoras de crescimento e parece haver associação entre o cálcio e as citocininas, principalmente nas áreas onde está ocorrendo diferenciação (ARRUDA et al., 2000). Segundo George et al. (1988), a formação de protocormos, a partir de calos de *Dendrobium fibriatum* (Orchidaceae), foi baixa na ausência de cálcio.

Pelo fato do cálcio ser um elemento pouco móvel dentro da planta e, em decorrência da maior demanda dos tecidos mais jovens por esse elemento, sua importância na cultura *in vitro* assume caráter particular. É transportado basicamente por processos passivos, os quais são extremamente influenciados pela taxa transpiratória. Dessa forma, muitas vezes, ocorrem sintomas de necrose nas gemas terminais, em consequência da baixa atividade transpiratória dos explantes cultivados *in vitro*. Esses sintomas podem ser evitados pela diminuição das taxas de crescimento, pela modificação do ambiente de cultura ou pelo aumento dos níveis de cálcio no meio (McCOWN; SELLMER, 1987).

O cálcio auxilia na desintoxicação de altas concentrações de outros elementos minerais na planta (MARSCHNER, 1986) e exerce também função estrutural (atuando na formação da parede celular) e nos processos de divisão celular (ARRUDA et al., 2000).

A interação entre cálcio e amônio na produção de massa fresca em plântulas de *Dactylorhiza incarnata*, cultivadas *in vitro* e provenientes de sementes, foi pesquisada por Dijk e Eck (1995a). Para tanto, variaram a concentração de amônio 0 a 8  $\text{mM L}^{-1}$  no meio de cultura, utilizando sulfato de amônio [ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ], em combinação com sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ), nas concentrações de 0 a 2  $\text{mM L}^{-1}$ . A biomassa das plântulas de *D. incarnata* foi significativamente incrementada na presença de 1  $\text{mM L}^{-1}$  de sulfato de cálcio no meio de cultura.

Existem poucos trabalhos, realizados *in vitro* em orquídeas, com a finalidade de estudar fontes de nitrogênio em substituição e/ou redução ao nitrato de amônio, cuja comercialização é controlada pelo exército.

Diante do exposto, avaliou-se o efeito de concentrações de nitrato de cálcio ( $\text{CaNO}_3\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) e nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), adicionados ao meio de cultura WPM, sobre o crescimento *in vitro* de plântulas de *C. loddigesii*.

## Material e métodos

Plântulas de *Cattleya loddigesii* oriundas de

sementes produzidas por autofecundação e germinadas *in vitro*, com aproximadamente 1,0 cm de comprimento e com raízes, foram inoculadas em frascos com capacidade para 250 cm<sup>3</sup>, contendo 60 mL de meio de cultura. Após um ensaio prévio, determinou-se o melhor meio para essa espécie como sendo o Wood Plant Medium (WPM) de Lloyd e McCown (1980).

Os tratamentos consistiram de concentrações de nitrato de cálcio (0, 278, 556, 834 e 1112 mg L<sup>-1</sup>) e de nitrato de amônio (0, 200, 400, 600 e 800 mg L<sup>-1</sup>) em todas as combinações possíveis. O meio foi acrescido de 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 150 g L<sup>-1</sup> de polpa de banana 'nanica' madura, 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, solidificado com 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado para 5,7 ± 0,1, antes da autoclavagem a 121°C e 1,5 atm, por 20 min.

Após a inoculação, os explantes foram transferidos para sala de crescimento a 25 ± 2°C, fotoperíodo de 16h e 35 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de intensidade luminosa, onde permaneceram por 90 dias. Os parâmetros analisados foram: número de folhas, número de raízes, número de brotos, comprimento da parte aérea (cm), comprimento de raiz (cm) e massa seca de plântulas (g).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x5, com cinco repetições de cinco plântulas cada. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparados por regressão polinomial, com auxílio do programa Sisvar (FERREIRA, 1999).

## Resultados e discussão

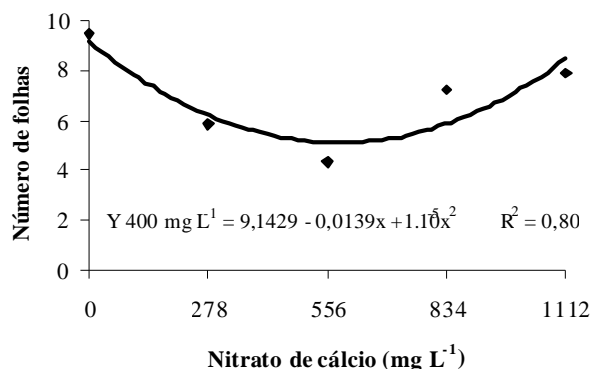
Os parâmetros avaliados – número de folhas, de brotos e de raízes – apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. A interação foi significativa para número de folhas e raízes, enquanto o fator nitrato de amônio foi significativo apenas para número de brotos. As demais variáveis não apresentaram diferenças entre os tratamentos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Resumo da análise de variância para as características número de folhas (NF), número de brotos (NB), comprimento da parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento de raízes (CR) e massa seca de plântulas (MSP), em *Cattleya loddigesii* cultivadas em diferentes concentrações de nitrato de amônio e nitrato de cálcio.

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios					
		NF	NB	CPA	NR	CR	MSP
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4	8,9756**	0,3971 <sup>ns</sup>	0,2306 <sup>ns</sup>	0,7470 <sup>ns</sup>	0,7008 <sup>ns</sup>	0,00007 <sup>ns</sup>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	4	3,7586 <sup>ns</sup>	0,7456*	0,7556 <sup>ns</sup>	1,3490*	3,4616 <sup>ns</sup>	0,00012 <sup>ns</sup>
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16	4,0196*	0,3276 <sup>ns</sup>	0,3916 <sup>ns</sup>	1,1447**	1,3640 <sup>ns</sup>	0,00017 <sup>ns</sup>
Resíduo	75	1,9825	0,2344	0,4088	0,5031	1,4247	0,00013
CV (%)		22,05	29,32	26,61	27,18	24,59	58,87

\*\* , \* significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.  
ns – não-significativo

Pelo teste F, apenas a concentração de 400 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de amônio proporcionou significância na interação com nitrato de cálcio, para o parâmetro número de folhas. Melhores resultados foram observados com a utilização de 400 mg L<sup>-1</sup> (5 mM L<sup>-1</sup>) de nitrato de amônio, na ausência de nitrato de cálcio (Figura 1), ocorrendo a formação média de 9,14 folhas por explante. Essa concentração de nitrato de amônio corresponde à concentração original do meio WPM.



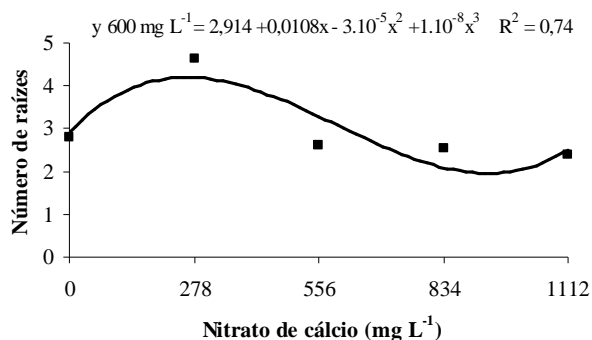
**Figura 1.** Número de folhas em plântulas de *Cattleya loddigesii* cultivadas em meio WPM, contendo diferentes concentrações de nitrato de cálcio e 400 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de amônio.

Observou-se que não há necessidade da utilização de nitrato de cálcio no meio WPM para estimular emissão de folhas. Contudo, o meio WPM contém outra fonte de cálcio, o cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O). No entanto, Kanashiro et al. (2007) recomenda a utilização de 9,38 mM L<sup>-1</sup> de nitrato de cálcio [Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O] como fonte de cálcio a ser adicionada ao meio líquido MS modificado, em vez de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, para crescimento *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae).

À medida que houve incremento nas doses de nitrato de cálcio, registrou-se redução no número de folhas até a concentração de 695 mg L<sup>-1</sup>, a partir da qual se verificou aumento crescente do número de folhas (6,05), até a dose máxima utilizada (1.112 mg L<sup>-1</sup>). Pode-se, assim, inferir que o efeito estimulante do nitrato de cálcio continuaria e/ou estabilizaria em concentrações superiores.

Em plântulas de *C. loddigesii*, maior número de raízes (4,3) foi verificado com 600 mg L<sup>-1</sup> (7,5 mM L<sup>-1</sup>) de nitrato de amônio (1,5 vez a concentração original do meio WPM) e 278 mg L<sup>-1</sup> (1,18 mM L<sup>-1</sup>) de nitrato de cálcio, que corresponde à metade da concentração original do meio WPM (Figura 2). A partir desse ponto, houve decréscimo no número de raízes. Essa tendência, provavelmente, indica que, para essa variável, uma menor relação NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> é

necessária para obter melhores resultados. Quanto ao comprimento das raízes de *Oncidium varicosum*, Kerbaux (1993) também obteve resultados favoráveis com a adição de nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) no meio de cultura MS.

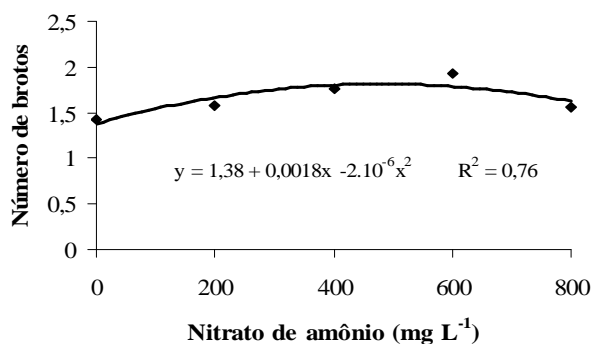


**Figura 2.** Número de raízes em plântulas de *Cattleya loddigesii* cultivadas em meio WPM, contendo diferentes concentrações de nitrato de cálcio e 600 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de amônio.

Araújo et al. (2005) e Mercier e Kerbaux (1998) verificaram que concentrações crescentes de amônio favoreceram aumento no número de raízes em orquídea (*Cattleya nobile*) e aumento no número de raízes em *Pitcairnia flammaea* e *Vriesia philippocoburgii*, respectivamente. Villa et al. (2007) verificou que a adição de cloreto de potássio ao meio Knudson C não influenciou no aumento do comprimento da parte aérea das duas frutíferas e na massa fresca de calos do porta-enxerto de videira 'R110'. Segundo Pasqual (2001), a emissão de novas raízes é favorecida pela presença do cálcio e do boro em meio de cultura.

O cálcio é essencial no desenvolvimento radicular. A secreção  $\text{H}^+$ , induzida pela auxina nas células meristemáticas, ocorre pela troca de  $\text{Ca}^{+2}$  por  $\text{H}^+$ . Com isso, há diminuição do pH da parede celular, que se torna menos rígida e permite aumento do volume (TAKANE, 2002). Embora algumas espécies cresçam *in vitro* na presença apenas de nitrato, a maioria dos explantes derivados de plantas intactas, tecidos e órgãos incorpora nitrogênio e cresce mais rapidamente em soluções contendo íons nitrato e amônio do que na presença de apenas uma dessas fontes (PASQUAL, 2001).

Para número de brotos, não houve interação entre os fatores testados, apenas para a adição de nitrato de amônio. O maior número de brotos (1,76) foi obtido com 450 mg L<sup>-1</sup> (5,6 mM L<sup>-1</sup>) de nitrato de amônio (Figura 3), concentração próxima à original (400 mg L<sup>-1</sup>) utilizada no meio WPM. Na ausência de nitrato de amônio, foi registrado 1,38 broto por explante.



**Figura 3.** Número de brotos formados em plântulas de *Cattleya loddigesii*, em diferentes concentrações de nitrato de amônio acrescidas ao meio WPM.

A pouca diferença observada entre os tratamentos com 0 e 450 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de amônio, pode ser explicada, provavelmente, pelo fato de a polpa de banana ter suprido grande parte do nitrogênio utilizado pelo explante, na ausência de nitrato de amônio (comunicação pessoal<sup>1</sup>).

Poddar et al. (1997), em *Eleusine coracana*, observaram que concentrações de duas a seis vezes maiores de nitrato de amônio, utilizadas no meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), podem favorecer a regeneração de brotos na ausência do regulador de crescimento. Já em altas concentrações de nitrato de amônio e de ANA, o meio de cultura tornou-se tóxico. De acordo com os mesmos autores, o nitrato pode funcionar como um regulador de crescimento, estimulando brotações. Similarmente, Silva et al. (2005) registraram que o incremento das concentrações de nitrato de amônio, na ausência de cinetina, aumentou o número de gemas e brotos em *Dyckia maritima* (Bromeliaceae).

Mercier e Kerbaux (1991) constataram que distintas fontes de nitrogênio provocam diferenças nas taxas de síntese de certas substâncias, como 2iP, zeatina e clorofila, assim como na atividade metabólica e no desenvolvimento de protocormos de *Epidendrum fulgens*.

De acordo com George e Sherrington (1984), o desenvolvimento e a morfogênese em cultura de tecidos são, acentuadamente, influenciados pela disponibilidade de nitrogênio e pela forma como o mesmo é fornecido. Segundo Sakuta et al. (1987), altas concentrações de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) podem ser críticas no processo de morfogênese e crescimento dos explantes. Provavelmente, esses resultados estão relacionados com a própria função metabólica do nitrogênio, como constituinte de aminoácidos, enzimas e proteínas.

O estudo de diferentes concentrações de nitrato de amônio e nitrato de cálcio em meio WPM altera a

<sup>1</sup> Professora Janice Guedes de Carvalho – Departamento de Ciência do Solo da UFLA.

razão das fontes de nitrogênio  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ . Esta razão parece ser determinante no crescimento *in vitro* e o amônio deve ser, no máximo, 1/3 do N total. Esse desequilíbrio de íons pode ter influenciado os resultados obtidos no presente estudo.

### Conclusão

Para o crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya loddigesii*, recomenda-se a utilização do meio de cultura WPM em sua formulação original, mas modificado pela retirada do nitrato de cálcio.

O enraizamento é favorecido com a utilização de 600 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de amônio e 278 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de cálcio.

### Referências

- ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, V. A.; SILVA, A. B.; SOARES, G. A. Concentração de  $\text{KNO}_3$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  no crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, v. 1, n. 1, p. 31-36, 2005.
- ARAÚJO, D. Cultivo de orquídeas - *Cattleya*, as mais belas orquídeas brasileiras. **Revista Brasil Orquídeas**, n. 8, p. 18-26, 2004.
- ARRUDA, S. C. C.; SOUZA, G. M.; ALMEIDA, M. A.; GONÇALVES, A. N. Anatomical and biochemical characterization of the calcium effect on *Eucalyptus urophylla* calli morphogenesis *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 63, p. 143-154, 2000.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas**. Brasília: Embrapa/CNPQ, 1998. p. 87-132.
- DIJK, E.; ECK, N. Ammonium toxicity and nitrate response of axenically grown *Dactylorhiza incarnata* seedlings. **New Phytologist**, v. 131, n. 3, p. 361-367, 1995a.
- DIJK, E.; ECK, N. Axenic *in vitro* nitrogen and phosphorus response of some Dutch marsh orchids. **New Phytologist**, v. 131, n. 3, p. 353-359, 1995b.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.3**: sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, 1999. (Software estatístico).
- GEORGE, E. F.; PUTTOCK, D. J. M.; GEORGE, H. J. **Plant culture media**. Edington: British Library, 1988. v. 2.
- GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**: handbook and directory of commercial laboratories. Eversley: Exegetics, 1984.
- KERBAUY, G. B. Indução *in vitro* de protocormóides em raízes de *Oncidium varicosum*: efeitos de fontes nitrogenadas, auxinas e citocininas. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 16, n. 1, p. 1-8, 1993.
- KANASHIRO, S.; RIBEIRO, R. C. S.; GONCALVES, A. N.; DIAS, C. T. S.; JOCYS, T. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetina* (Baker) L.B. Sm. cultivada *in vitro*. **Hoehnea**, v. 34, p. 59-66, 2007.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings International Plant Propagation Society**, v. 30, p. 421-427, 1980.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1986.
- McCOWN, B. H.; SELLMER, J. C. General media and vessels suitable for wood plant culture. In: BONGA, J. M.; DURZAN, D. J. (Ed.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. v. 2, p. 4-16.
- MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. Effects of nitrogen source on growth rates and levels of endogenous cytokinins and chlorophyll in protocorms of *Epidendrum fulgens*. **Journal of Plant Physiology**, v. 138, n. 2, p. 195-199, 1991.
- MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. Endogenous IAA and cytokinin levels in bromeliad shoots as influenced by glutamine and ammonium nitrate treatments. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, n. 3, p. 225-228, 1998.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais**: meios de cultura. Lavras: UFLA, 2001.
- PODDAR, K.; VISHNOI, R. K.; KOTHARI, S. L. Plant regeneration from embryogenic callus of finger millet *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. on higher concentrations of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  as a replacement of NAA in the medium. **Plant Science**, v. 129, n. 1, p. 101-106, 1997.
- SAKUTA, M.; TAKAGI, T.; KOMAMINE, A. Effects of sucrose source on betacyanin accumulation and growth in suspension cultures of *Phytolacca americana*. **Physiologia Plantarum**, v. 71, n. 4, p. 459-463, 1987.
- SILVA, A. L. L.; FRANCO, E. T. H.; BISOGNIN, D. A.; DORNELLES, E. B.; WALTER, J. M. Efeitos do nitrato de amônia na multiplicação e regeneração de gemas laterais de *Dyckia maritima* Baker - Bromeliaceae. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 11, n. 3, p. 369-371, 2005.
- TAKANE, R. J. **Influência da sacarose e do cloreto de cálcio na aclimação e no crescimento inicial de plântulas de *Oncidium varicosum* Lindl. & Paxton (Orchidaceae) germinadas *in vitro***. 2002. 79f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Jaboticabal, 2002.
- VILLA, F.; PASQUAL, M.; RIBEIRO, M. N. O.; FERREIRA, E. A.; PEREIRA, A. R.; ARAUJO, A. G. Fosfato de sódio e cloreto de potássio na micropropagação de videira e amoreira-preta. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 29, n. 4, p. 541-547, 2007.

Received on October 25, 2007.

Accepted on July 2, 2008.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.