

## Scientific Electronic Archives

Issue ID: Sci. Elec. Arch. Vol. 11 (2)

April 2018

Article link

<http://www.seasinop.com.br/revista/index.php?journal=SEA&page=article&op=view&path%5B%5D=456&path%5B%5D=pdf>

Included in DOAJ, AGRIS, Latindex, Journal TOCs, CORE, Discoursio Open Science, Science Gate, GFAR, CIARDRING, Academic Journals Database and NTHRYS Technologies, Portal de Periódicos CAPES.



## Reaproveitamento de soluções-estoque com diferentes formulados para adubação de orquídea na fase de aclimatização

### Reusing stocks solutions with different formulated for orchid fertilizer acclimatization phase

C. G. C. Issa; W. J. Pereira; A. C. F. Miranda; R. C. Felício; A. R. Silva; M. C. Vieira.

Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí-GO

Author for correspondence: [mcvmuza@bol.com.br](mailto:mcvmuza@bol.com.br)

**Resumo.** O objetivo deste presente trabalho foi avaliar o desenvolvimento de orquídeas em diferentes níveis de adubação através da reutilização de nutrientes que compõem meio de cultura para cultivo *in vitro* analisando-se também os diferentes tempos de aclimatização. As orquídeas micropropagadas retiradas da sala de crescimento, foram transportadas para casa de vegetação compondo os diferentes tratamentos para aclimatização (0, 10, 20, 30, 40 e 50 dias). Ao serem transplantadas foram colocadas em substrato casca de *Pinus* e *Sphagnum* sendo colocadas em bandejas de isopor. Após 30 dias do transplante das mudas para a bandeja de isopor foi iniciada a adubação das plantas semanalmente com diferentes formulados administrando 5 mL de cada um deles (1° ácido húmico, 2° nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>), 3° ácido húmico + nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub> a 165 g L<sup>-1</sup>), 4° cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), 5° testemunha). Após seis meses da retirada das plantas da sala de crescimento foi realizada a avaliação do experimento, onde foi avaliada a sobrevivência das plantas, o número de brotos, o número de folhas, o comprimento da maior folha e a presença de raiz. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em fatorial 6 x 5, sendo o tempo de aclimatização (0, 10, 20, 30, 40 e 50 dias) o primeiro fator e o segundo, o tipo de adubação utilizada (4 formulados e a testemunha), com 8 repetições por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de deviance no *software* R. Neste estudo foi constatada a necessidade de adubar com formulados ricos em nutrientes para as orquídeas em fase de aclimatização e que estas devem permanecer por poucos dias dentro dos frascos em ambiente de casa de vegetação.

**Palavras-chave:** Micropropagação, Floricultura, Nutrição de plantas, *Catasetum*.

**Abstract.** The aim of this study was to evaluate the development of orchids at different levels of fertilization by reusing nutrients added to the culture medium for cultivation *in vitro* is also analyzing the different times of acclimatization. The micropropagated orchids removed from the growth chamber, were transported to greenhouse composing the different treatments for acclimatization (0, 10, 20, 30, 40 and 50 days). To be transplanted were placed in pine bark substrate and *Sphagnum* being placed in trays. After 30 days the seedlings were transplanted to styrofoam trays was initiated plant fertilization weekly with different formulated by administering 5 ml each (1 humic acid, 2nd potassium nitrate (KNO<sub>3</sub>), 3rd humic acid + Nitrate potassium (KNO<sub>3</sub>), 4th calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>), 5 ° control). Six months after withdrawal of the growth room the plants was carried out the evaluation of the experiment where the plant survival was evaluated by the number of shoots, number of leaves, the length of the largest leaf and root presence. The experimental design was completely randomized in a factorial 6x5, with the time of acclimatization (0, 10, 20, 30, 40 and 50 days) the first factor and the second, the type of fertilizer used (4 formulated and the witness) with 8 replicates per treatment. The data were submitted to deviance analysis in the *software* R. In this study, the need to fertilize with nutrient rich formulations for orchids in the acclimatization phase was contacted and that these should remain for a few days inside the jars in a greenhouse environment.

**Keywords:** Micropropagation, Floriculture, Nutrition plant, *Catasetum*.

### Introdução

As orquídeas são plantas da família Orchidaceae, amplamente distribuídas no planeta

em aproximadamente, 19.500 espécies de 788 gêneros diferentes que ocorrem com maior abundância em regiões tropicais. Estas plantas se

destacam pelo grande número de espécies ornamentais apresentando enorme importância econômica (Judd et al., 2009).

A micropropagação através da cultura de células é uma das técnicas mais promissoras para a obtenção de grandes quantidades de mudas qualificadas com baixos custos de produção (Matsumoto & Silva Neto, 2003) em que as altas taxas de multiplicação e qualidade fitossanitárias das plantas micropropagadas constituem importante ferramenta para a obtenção de clones superiores (Kozai, Kubota & Byoung, 1997).

A aclimatização é importante e a última fase do processo de micropropagação vegetal. Nesta período as vitroplantas que em sua maioria não possuem estômatos funcionais e podem estar sujeitas não só ao estresse hídrico, questões relacionadas à fotossíntese e absorção de nutrientes pela plântula, mas também por estarem mais sensíveis a injúrias e alterações patológicas ocasionadas por fungos e bactérias, que podem se desenvolver neste estágio (Tombolato & Costa, 1998). A aclimatização de plantas consiste na retirada destas do cultivo *in vitro* e sua transferência para condições *ex vitro*. A adaptação a esta condição é considerada delicada devido à influência de diversos fatores ambientais e de manejo em que a temperatura, luminosidade, umidade, substrato e nutrientes podem ser decisivos no sucesso de evento para as vitroplantas (Kozai et al., 1992).

Segundo Cid (2014), os meios de culturas utilizados no cultivo *in vitro* de plantas contêm os micronutrientes boro, cobre, cloro, ferro, manganês, molibdênio e zinco, e os macronutrientes cálcio, enxofre, fósforo, magnésio, nitrogênio e potássio. Na preparação dos meios nutritivos são utilizadas soluções estoques contendo estes nutrientes, soluções as quais podem apresentar contaminações atraídas pela presença de nutrientes, inviabilizando o uso destas soluções no preparo dos meios de cultura.

A recomendação de adubação para estas plantas geralmente fica por conta das fábricas de fertilizantes e da experiência dos produtores, pois estudos relacionados a nutrição de orquídeas são escassos e limitados a poucas espécies apesar de serem conhecidas a tanto tempo (Rodrigues, 2005).

Através do avanço das fronteiras do conhecimento no sentido de elucidar os parâmetros no que tange ao propagação seminal, vegetativa e micropropagação de diversas espécies vegetais e em orquídeas, trabalhos já foram desenvolvidos (Gratapaglia & Machado, 1990; Skrebsky et al., 2004; Camargo, 2012; Stefanello et al., 2009; Dorneles & Trevelin, 2011). No entanto, ainda urge que pesquisas sejam realizadas sobre a aclimatização de orquídeas e a influência da adubação destas, quando do reaproveitamento de soluções-estoque que poderiam ser descartadas, mas podem ser reaproveitadas para otimizar os processos de produção e que estes possam estar disponíveis aos pequenos produtores de plantas

ornamentais.

Este estudo foi realizado com objetivo de analisar o desenvolvimento de orquídeas em diferentes níveis de adubação através da reutilização de nutrientes que compõem meio de cultura para cultivo *in vitro*, bem como, a análise de diferentes tempos de aclimatização.

## Métodos

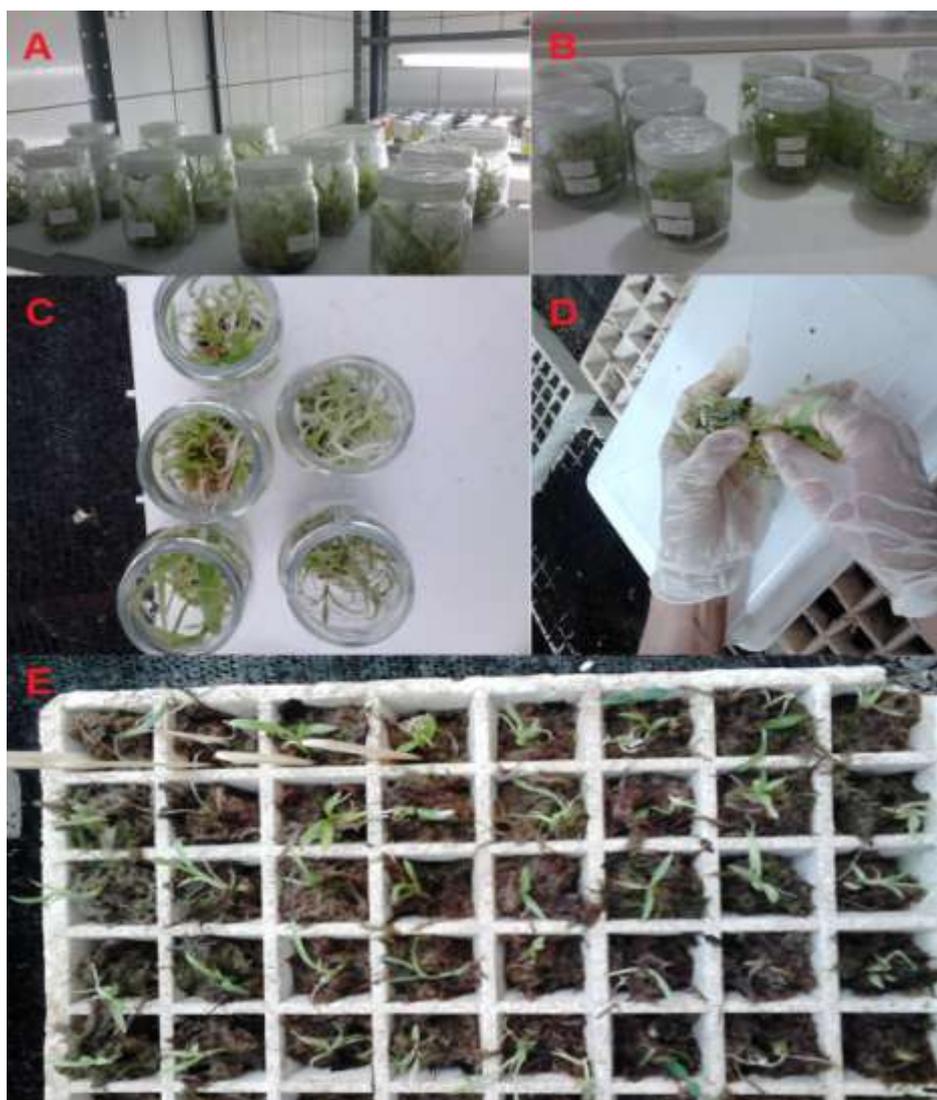
O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia LABIOTEC do Instituto Federal Goiano *campus* Urutaí. Orquídeas (*Catasetum fimbriatum*) micropropagadas foram retiradas da sala de crescimento, após 10 meses da semeadura *in vitro*, e ainda dentro do frasco (vidros). Foram transportadas para casa de vegetação anexa ao Laboratório de Biotecnologia, compondo diferentes tempos de tratamentos (T) para aclimatização e adubação. Para o presente estudo foram utilizadas plântulas de orquídeas de aproximadamente 3 centímetros e já com 2 folhas.

Os frascos com as orquídeas para o T0, assim que levados para casa de vegetação foram abertos, e após dois dias, as plântulas foram transplantadas para o substrato casca de *Pinus* e *Sphagnum* sendo colocadas em bandejas de isopor (Poliestireno Expandido - EPS) e submetidos a irrigação a cada 2 dias. Nos demais tratamentos, as orquídeas permaneceram nos frascos correspondendo aos diferentes tempos para aclimatização *in vitro* (T10, T20, T30, T40 e T50 dias) (Figura 1) seguindo os mesmos procedimentos do tratamento T0 e posterior transplante para a bandeja de isopor e aclimatização *ex vitro*.

Após 30 dias do transplante das mudas para a bandeja de isopor foi iniciada a adubação das plantas. Semanalmente realizava-se adubação com diferentes formulados, administrando 5 mL de cada um deles. O Tratamento 1 para a adubação foi o ácido húmico, o T2 foi o nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$  a  $165 \text{ g L}^{-10}$ ), o T3 foi o ácido húmico + nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$  a  $165 \text{ g L}^{-10}$ ) + cloreto de cálcio e o T4 foi composto por cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$  a  $44 \text{ g L}^{-10}$ ), além do tratamento controle que não recebeu adubação (T0).

Foi realizada a avaliação semanal de sobrevivência e após seis meses do transplante das plantas foi realizada a avaliação final do experimento, com a avaliação da sobrevivência das plantas, o número de brotos, o número de folhas, o comprimento da maior folha e a presença de raiz.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em fatorial 6x5, sendo o tempo de aclimatização *in vitro* antes do transplante (T0, T10, T20, T30, T40 e T50 dias) o primeiro fator e o segundo, o tipo de adubação utilizada (4 formulados e a testemunha), com 8 repetições por tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de deviance no *software* R versão 3.2.1.



**Figura 1:** Processo de instalação para avaliação de aclimatização e adubação de orquídeas *Catasetum fimbriaum*. (A): Orquídeas *in vitro* em sala de crescimento; (B): Material Selecionado; (C): Orquídeas expostas as condições ambientais; (D): Seleção das plântulas para processo de transplante; (E): Experimento implantado. IF Goiano – campus Urutaí.

### Resultados e discussão

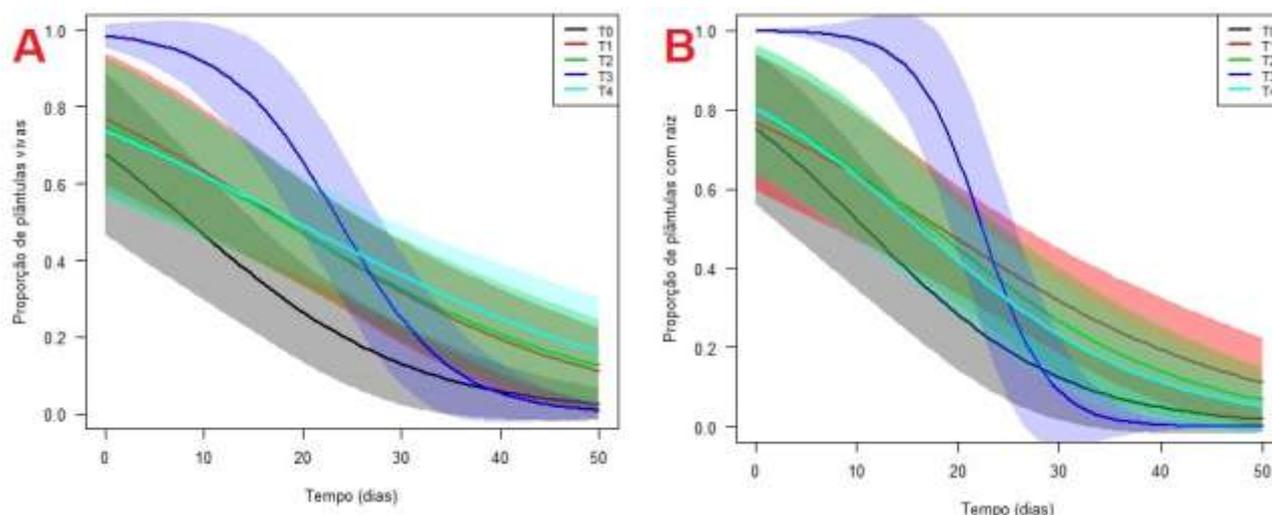
Os dados obtidos no experimento demonstraram interação entre os fatores estudados no quesito tempo e adubação. As variáveis que mais contribuíram para explicar a diferença existente no comportamento das plantas conservadas em diferentes tempos para a adaptação de aclimatização, bem como para a influência na adubação foram o índice de sobrevivência, o índice de raiz e o número e comprimento de folhas. Essas variáveis são fundamentais para o estabelecimento de protocolos para a aclimatização de adubação de orquídeas. O índice de folhas e raízes oriundas da plantas cultivadas *in vitro*, quando o objetivo é a aclimatização, é um atributo desejável, desde que seja adequadamente manejado na casa de vegetação. Por isso estudos sobre estas variáveis após cultivo *in vitro* são importantes.

A aclimatização pode ser definida como o

período em que se retira a plântula da condição *in vitro* para conduzi-la até a casa-de-vegetação. Esse período, por objetivo tenta superar as dificuldades que as plântulas obtidas por cultura de tecidos enfrentam quando são removidas dos frascos. Esse processo é complicado, pois a plântula passa de um local de baixa transpiração, em que as vitroplantas ainda não estão com seus estômatos totalmente funcionais, para outro que exige maior incremento, podendo ocorrer estresse hídrico, com a passagem de um estado heterotrófico para outro autotrófico. Nesta condição, a disponibilidade de sais é diferente em que a microplanta deixa um local asséptico para ficar exposta aos diversos fatores do ambiente (Gratapaglia & Machado, 1990). A abordagem dos autores, talvez justifique a taxa de sobrevivência abaixo de 50%. Todavia, quando a queda da taxa ao estender a permanência desse material ainda *in vitro*, talvez reflita a preferência por esta espécie por ambientes com temperaturas

mais amenas, haja vista que quando em frascos e em casa de vegetação, a temperatura interna do recipiente tende a atingir maiores alturas. Na Figura 2-A, é possível constatar a proporção de plântulas

vivas e a proporção de plântulas com raiz (Figura 2-B) em cada um dos tempos em que os frascos permaneceram vedados na casa de vegetação.



**Figura 2:** Gráfico ajustado ao modelo completo para os fatores tempo e tratamento considerando a distribuição binomial com função de ligação logit com intervalos de 95% de predição da Proporção de plântulas vivas e da Proporção de plântulas com raiz, respectivamente, para cada tratamento. Urutai-GO, 2016.

A sobrevivência das mudas apresentou maiores índices nos primeiros tempos (0, 10 e 20), e decaiu nos tempos seguintes. Este resultado pode ter sido causado pela diminuição da vigorosidade das plântulas com o passar dos dias na casa de vegetação em frasco fechado, ou algum fator relacionado a genética da própria planta. Os valores de sobrevivência encontrados nestes tratamentos foram maiores que os encontrados por Dorneles & Trevelin (2011) na aclimatização da orquídea *Cattleya intermedia* que obtiveram uma sobrevivência de 27% em substrato de casca de *Pinus*, e também por Stefanello et al. (2009) que aos 90 dias após o transplante alcançaram uma sobrevivência menor que 20% em substratos com casca de *Pinus*. Estes baixos valores podem ser em decorrência das alterações sentidas nas condições de cultivo do meio *in vitro* para o meio *extra vitro*.

As condições *in vitro*, também podem determinar os índices de sobrevivência *ex vitro*. Skrebsky et al. (2004) observaram em trabalhos com ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen), que quanto à porcentagem de sobrevivência das plantas cultivadas *ex vitro*, tanto aos 21 dias de cultivo em câmara climatizada, como aos 24 dias de cultivo sob sombrite que aquelas retiradas do cultivo *in vitro* aos 25 DAI na presença de 15 e 75g L<sup>-1</sup> de sacarose foram as que apresentaram as menores percentagens de sobrevivência. Para as plantas desenvolvidas na presença de 30, 45 e 60g L<sup>-1</sup> de sacarose, não houve diferenças entre aquelas retiradas aos 25 e 32 DAI, as quais obtiveram 100% de sobrevivência.

Desta feita, a adubação com compostos que visem o reaproveitamento de soluções-estoque, pode ser benéfica para a sobrevivência e adaptação de orquídeas oriundas do cultivo *in vitro* e, em

especial para algumas espécies de orquídeas como seria o caso da *Catasetum fimbriatum*.

A diferença entre a presença de raízes e a sobrevivência das plântulas pode ser notada pelas plantas que mesmo com parte aérea verde já havia perdido as raízes ou apresentavam raiz senescente.

Quanto ao número total de brotos (Figura 3-A), não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos, quando as orquídeas foram transplantadas aos 20 dias após a retirada da sala de crescimento. Esse ausência de diferenças pode ser em razão dos fatores genéticos reportados a espécie já que esta apresenta sua fase de brotação normalmente no período de junho a agosto (Ferreira et al., 2005), ainda nesse quesito Taiz & Zeiger (2013) abordam que nem todo nutriente é essencial para o crescimento da planta. Um elemento é essencial quando possui efeito claro fisiológico sendo que sua ausência torna-se prejudicial ao ciclo vital da planta. Se os elementos essenciais são dados as plantas, assim como a energia luminosa, esta pode sintetizar todos os componentes necessários para o seu crescimento normal. Já para as plântulas do T1, embora não houvesse diferença entre os tratamentos, observou-se a ocorrência de brotação que foi presente por um período de tempo mais amplo, variando de quando eram retiradas da sala de crescimento dos 10 até os 40 dias, com pico aos 30 dias após a sua retirada.

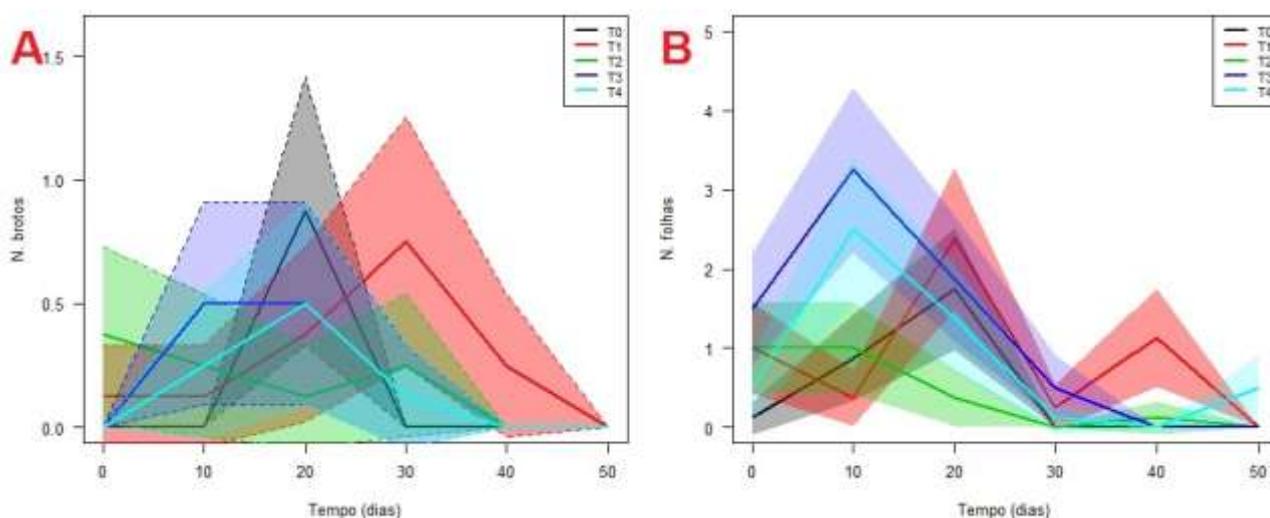
Ao observar a Figura 3-A, constata-se que o número de brotos foi superior entre os tempos de 30 e 40 dias pela necessidade de maior adaptação das plantas às condições da casa de vegetação para que estas apresentem brotações após o transplante, diferentemente do número de folhas que se destaca em tempos menores, demonstrando que as plantas transplantadas emitem novas folhas com maior

rapidez. Constata-se também que o T1 (ácido húmico) foi o mais expressivo nestas condições.

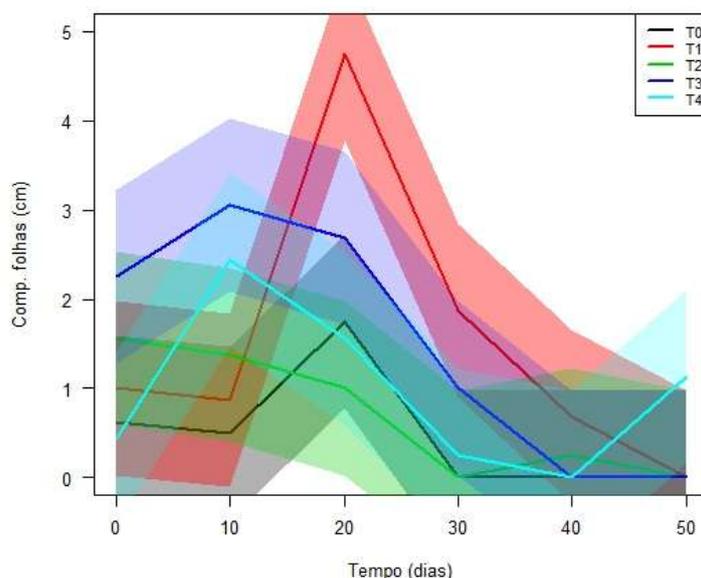
O número de folhas (Figura 3-B) foi superior no tratamento que englobou maior número de nutrientes (T3), formado pela junção das demais adubações, demonstrando que adubações elaboradas proporcionam maior vigor às plantas e geração de novas folhas, resultado também encontrado por Araújo et al. (2007), que observou melhores resultados na adubação de orquídeas na fase de aclimatização quando estas foram submetidas a uma composição mais elaborada. Entretanto torna-se necessário determinar a concentração ótima de nutrientes para cada espécie ou variedade. Neste sentido Camargo (2012) salienta que para a ocorrência maior de produtividade é necessário que os nutrientes

estejam em quantidades adequadas às plantas para alcançar assim uma produção agrícola adequada.

Quanto a Figura 4, constata-se que o T1 obteve o melhor resultado para o comprimento de folhas com tempo de 20 dias de frasco fechado na casa de vegetação, e o valor desta variável é inferior anteriormente e posteriormente a este tempo, fator que pode ter sido determinado pelos níveis dos ácidos húmicos utilizados. Dependendo da dosagem, eles podem contribuir no desenvolvimento da parte aérea assim como, do sistema radicular, mas seu uso fica limitado às fontes de sua extração e a sua faixa de utilização (Pinheiro, 2009). Durante a aclimatização, as folhas formadas *in vitro* podem persistir ou sofrer senescência.



**Figura 3:** Gráfico ajustado ao modelo completo para os fatores tempo e tratamento considerando a distribuição Poisson com função de ligação logarítmica, com intervalos de 95% de predição do Número médio de brotos por planta e do Número médio de folhas por planta, respectivamente, para cada tratamento. Urutai-GO, 2016.



**Figura 4:** Gráfico ajustado ao modelo completo para os fatores tempo e tratamento considerando a distribuição Normal com função de ligação identidade, com intervalos de 95% de predição do Comprimento de maior folha para cada tratamento. Urutai-GO, 2016.

A persistência das folhas depende da espécie e das condições do ambiente durante a

aclimatização. As plantas cultivadas *in vitro* podem apresentar um aparato fotossintético competente ou não. Nas culturas não competentes como o morango, as folhas deterioram rapidamente durante a aclimatização, contribuindo somente com os nutrientes preexistentes. Já em *Cymbidium* 'Joy Polis' as folhas formadas *in vitro* se mantiveram no período de 45 dias avaliados, indicando que, apesar das alterações anatômicas observadas, a cultivar aparentava um aparato fotossintético competente. No trabalho de Dorneles & Travelin (2011), os autores perceberam uma influência grande do substrato no número médio de folhas, visto que, em substrato de *Pinus*, ocorreu uma diminuição gradativa enquanto que, em substrato *Sphagnum*, o número médio de folhas oscilou entre as medições (Grout & Millam, 1985; Fabbri et al., 1986; Mayer et al. 2008, citados por Dornelles & Travelin, 2011).

Folhas provenientes de plantas desenvolvidas em cultivo *in vitro*, apresentam a parede espessa e lignificada e está associada com a proteção contra perda de água por transpiração. Este fator pode ocasionar a redução de peso fresco em decorrência do fluxo transpiratório elevado presente nestas plantas (Tomlinson, 1969). Nesse sentido é relevante que estudos sobre a aclimatização sob diferentes fontes de adubação (Figura 5 - A, B), sejam observadas para que possam servir de subsídios para estabelecimento de protocolos alternativos de adubação para

produtores, colecionadores e instituições de pesquisas que trabalham com orquídeas.

Mesmo as soluções-estoques utilizadas estando contaminadas, não houve registro de agentes fitopatogênicos nas plântulas estudadas. Constata-se que as soluções utilizadas e aviadas no presente estudo podem ser aproveitadas no processo de aclimatização de orquídeas *Catasetum fimbriatum*.

Apesar de todos os aspectos abordados, para determinar o momento em que os materiais cultivados *in vitro* possam ser aclimatizados e sob quais condições devem focalizar principalmente o vigor e a viabilidade das plantas. Outrossim, entender as diferentes formas de manejo e estabelecer protocolos de aclimatização para orquídeas do gênero *Catasetum* é um fator crucial para a exploração racional e eficiente desta planta ornamental.

Estudos sobre a aclimatização de plântulas de orquídeas, são relevantes pois estão cada vez mais sendo submetidas ao processo de antropização nos locais de origem. Além disso, é necessário oferecer ao produtor dessas espécies, subsídios quanto a produção de mudas e o manejo correto quanto aos itens, aclimatização, adubação, utilização de recipientes, substratos e pragas, para que se possa produzir mudas de melhor qualidade que visam os critérios com a finalidade de uniformizar a produção sendo este um instrumento que pode otimizar toda a cadeia produtiva.



Figura 5: A, B) Plantas de orquídeas *Catasetum fimbriatum* em aclimatização. Urutaí-GO, 2016.

## Conclusão

O transplante das mudas dos frascos para a bandeja deve ocorrer entre 10 e 30 dias após a retirada da sala de crescimento;

Deve ser realizada adubação em orquídeas *Catasetum fimbriatum* durante a aclimatização pois produz mudas mais vigorosas;

Uma adubação mais completa deve ser fornecida, visando uma mesclagem de nutrientes importantes;

Soluções estoques podem ser reaproveitadas na adubação de orquídeas;

É necessária a realização mais estudos para determinar as exigências minerais das orquídeas.

## Referências

ARAUJO, A. G. de.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F.; CARVALHO, J. G. de.; SOARES, G. de. A. Alternative substrates to xaxim and fertilization on orchids plantlets acclimatization phase. *Ciência Rural* 37: 569–571, 2007.

- CAMARGO, M. S. de. A importância do uso de fertilizantes para o meio ambiente. Pesquisa & Tecnologia 9: 2012.
- CID, L. P. B. Cultivo *in vitro* de plantas. Embrapa, Brasília, DF. 325 p. 2014.
- DORNELES, L. T.; TREVELIN, V. Aclimatização e reintrodução de *Cattleya intermedia* Graham ex Hook (Orchidaceae) obtidas por propagação *in vitro*. Iheringia, Série Botânica 66: 167–174, 2011.
- FERREIRA, A. W. C.; LIMA, M. I. S.; COIMBRA, G. Fenologia de *Catasetum fimbriatum* (Morren) Lindl. (Catasetinae, Orchidaceae) na região de São Carlos, São Paulo, Brasil. **Anais...Resumos do 56º Congresso Nacional de Botânica**. Curitiba-PR, 2005.
- GRATAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.L.; CALDAS, L.S. eds. Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA - CNPH, 1990, 89 - 164 p.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DANOGHUE, M. J. Sistemática vegetal: um enfoque filogenético. Artmed, Porto Alegre, RS. 632 p. 2009.
- KOZAI, T.; FUJIWARA, K.; HAYASHI, M.; AITKEM-CITRISTIE, J. The *in vitro* environment and its control in micropopagation. IN: K. Kurata; T. Kozai. Transplant production systems. Kluwer Academic, Dordrecht, 247-282, 1992.
- KOZAI, T.; KUBOTA, C.; BYOUNG, R. J. Environmental control for the large scale production of plants through *in vitro* techniques. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 51: 49-56, 1997.
- MATSUMOTO, K.; SILVA NETO, S. P. Micropropagation of bananas. IN: S. M. Jain; K. Ishii. (Org.). Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers: 353-380, 2003.
- PINHEIRO, G. L. Crescimento e nutrição de clone de eucalipto em função da aplicação de C-ácidos húmicos. 55p. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil, 2009.
- RODRIGUES, D. T. Nutrição e fertilização de orquídeas *in vitro* e em vasos. 90f. (Tese de Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil, 2005.
- SKREBSKY, E. C.; FERNANDO TEIXEIRA NICOLOSO, F. T.; FERRÃO, G. E. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). Ciência Rural 34: 1471-1477, 2004.
- STEFANELLO, S.; SILVEIRA E. V.; OLIVEIRA, L. K.; BESSON, J. C. F.; DUTRA, G. M. N. Eficiência de substratos na aclimatização de plantas de *Miltonia flavescens* Lindl. propagadas *in vitro*. Revista em Agronegócio e Meio Ambiente 2: 467–476, 2009.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.
- TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. Micropropagação de plantas ornamentais. (Boletim técnico, 174) - Instituto Agrônomo, Campinas, 1998.
- TOMLINSON, P.B. Commelinales-Zingiberales. In: METCALF, C.R. (ed.). Anatomy of the Monocotyledons. Clarendon Press, Oxford 3: 1-446, 1969.