

# Fosfato de sódio e cloreto de potássio na micropropagação de videira e amoreira-preta

Fabíola Villa<sup>1\*</sup>, Moacir Pasqual<sup>2</sup>, Márcia de Nazaré Oliveira Ribeiro<sup>1</sup>, Ester Alice Ferreira<sup>1</sup>, Alba Regina Pereira<sup>1</sup> e Aparecida Gomes de Araujo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Departamento de Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Cx. Postal 3037, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil. \*Autor para correspondência. E-mail: fvilla2003@libero.it

**RESUMO.** Objetivou-se no presente trabalho testar diferentes concentrações de fosfato de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e cloreto de potássio (KCl) do meio White e adicionadas ao meio Knudson, na multiplicação *in vitro* de videira e amoreira-preta. O meio foi constituído de sais do Knudson, acrescido de  $25 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose e  $6 \text{ g L}^{-1}$  de ágar, e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a  $121^\circ\text{C}$  e 1 atm por 20 minutos. Os tratamentos consistiram de concentrações de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0, 125, 250, 500 e  $1.000 \text{ mg L}^{-1}$ ) e de KCl (0, 125, 250, 500 e  $1.000 \text{ mg L}^{-1}$ ), em todas as combinações possíveis e do porta-enxerto de videira 'R110' e da amoreira-preta cv. Cherokee. Segmentos nodais, oriundos de plântulas preestabelecidas *in vitro* foram excisados e introduzidos em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura. Posteriormente, os tubos de ensaio foram transferidos para sala de crescimento a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , irradiância de  $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas diárias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando-se 4 repetições com 12 plântulas cada. O experimento foi avaliado após 60 dias de cultivo *in vitro* e o maior comprimento da parte aérea e peso fresco de calos foram verificados em meio Knudson, na ausência de cloreto de potássio. A adição de cloreto de potássio ao meio Knudson não influenciou no aumento do comprimento da parte aérea das duas frutíferas e na massa fresca de calos do porta-enxerto de videira 'R110'. Não é necessário adicionar fosfato de sódio ao meio para se obter maior massa fresca da parte aérea das frutíferas.

**Palavras-chave:** meio Knudson, cloreto de potássio, fosfato de sódio.

**ABSTRACT.** Sodium phosphate and potassium chloride concentrations: micropropagation of grapevine and blackberry. This work aimed to test different concentrations of sodium phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) and potassium chloride (KCl) taken from the White medium and added to the Knudson culture medium, in the *in vitro* multiplication of grapevine rootstocks and blackberry. The culture medium was constituted of Knudson salts, added of  $25 \text{ g L}^{-1}$  of sucrose and  $6 \text{ g L}^{-1}$  of agar, and the adjusted pH to 5.8 before the sterilization at  $121^\circ\text{C}$  and 1 atm for 20 minutes. The treatments consisted of concentrations of  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0, 125, 250, 500 and  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) and of KCl (0, 125, 250, 500 and  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ), in all possible combinations, and of grapevine rootstocks 'R110' and blackberry cv. Cherokee. Nodal segments originated from *in vitro* pre-established plants were excised and introduced in test tubes containing 15 mL of culture medium. Subsequently, the tubes were transferred into a growth room at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , irradiance of  $32 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  and photoperiod of 16 hours. The experiment design was completely randomized, with 4 repetitions and 12 plants each. The experiment was evaluated after 60 days of *in vitro* cultivation. The largest length of the aerial part and fresh weight of the callus were verified in the Knudson culture medium, in the absence of potassium chloride. The addition of potassium chloride in the Knudson culture medium did not influence length increase of the aerial part in both fruit trees; neither did it influence the increase of fresh mass of callus of grapevine rootstocks 'R110'. It is not necessary to add sodium phosphate to Knudson in order to obtain larger fresh mass in the aerial part of both fruit trees.

**Key words:** Knudson culture medium, potassium chloride, sodium phosphate.

## Introdução

A fruticultura de clima temperado apresenta grande importância no contexto da produção mundial de frutas. Algumas das frutas produzidas em maior volume em todo o mundo, tais como a

macieira e a videira, são de espécies pertencentes a esta classe (Chalfun *et al.*, 1998).

No Brasil, a amoreira-preta vem sendo cultivada por pequenos produtores do Rio Grande do Sul (principal produtor brasileiro), Santa Catarina e

Paraná, objetivando a exportação dos frutos (Antunes, 1999). O sul de Minas Gerais tem apresentado elevado potencial para esta fruta, destacando-se o município de Caldas.

A sua propagação se faz por meio de estacas de raízes, ou ainda por brotos (rebentos), originados de plantas cultivadas e estacas herbáceas. Além destes, com a micropropagação, é possível obter plantas livres de vírus, geneticamente uniformes e em curto espaço de tempo, como uma alternativa viável.

A videira é uma espécie frutífera propagada vegetativamente. A utilização da micropropagação apresenta vantagens em relação a métodos tradicionais de propagação vegetativa, dentre os quais se destacam a rapidez do processo e a possibilidade de obtenção e manutenção de plantas matrizes livres de vírus (Peixoto e Pasqual, 1996).

Devido à grande variabilidade genética, à maior dificuldade de crescimento e à diferenciação *in vitro*, a micropropagação de espécies lenhosas requer estudos mais específicos e desenvolvimento de metodologias que atendam às exigências do explante. Os meios nutritivos utilizados na micropropagação fornecem substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (Caldas *et al.*, 1998).

Embora o meio MS (Murashige e Skoog, 1962) tenha favorecido o crescimento e desenvolvimento de várias espécies, a utilização de composições mais diluídas, como o meio Knudson (Knudson, 1946), para algumas espécies lenhosas, tem fornecido melhores resultados (Grattapaglia e Machado, 1998).

Existe grande variedade de meios para micropropagação. Entretanto, a maioria das descrições de meios de cultura alternativos não demonstram de maneira comparativa se o novo meio é ou não melhor do qual foi originado. O meio de cultura deve ser selecionado em função da espécie e tipo de cultivo ou do estágio cultural que está sendo efetivado (Pasqual, 2001).

Várias modificações na composição de meios de cultura foram propostas na tentativa de otimizar o crescimento *in vitro*. Essas modificações visam principalmente à redução ou incremento de alguns componentes que podem promover melhor crescimento em tecidos de plantas (Hoffmann *et al.*, 1998).

O potássio entra como íon acompanhante do nitrato, fosfato ou, em alguns casos, do cloreto. O íon exerce suas funções metabólicas e bioquímicas na planta como íon livre, sem incorporação em compostos orgânicos (Caldas *et al.*, 1998). Já o fósforo, nos meios de cultura, é fornecido como fosfato de sódio solúvel ou fosfato de potássio mono

e di-hidrogenado. Altas concentrações de fosfato dissolvido no meio podem diminuir o crescimento do explante, possivelmente porque o cálcio e alguns microelementos são precipitados da solução ou sua absorção é reduzida (Pasqual, 2001).

O fosfato de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) é um componente do meio White (1943) e B5 (Gamborg *et al.*, 1968). O cloreto de potássio (KCl) é encontrado somente no meio White. O meio MS possui baixas concentrações de sódio e de cloro. Contudo, estudos com a micropropagação de orquídeas demonstraram a necessidade de se adicionar ao meio de cultura concentrações maiores desses sais. Em estudos com orquídeas *Phalaenopsis nebula*, verificou-se regeneração de plantas por meio de cultura de calos, em meio MS, com a adição de  $170 \text{ mg L}^{-1}$  de fosfato de sódio (Chen *et al.*, 2000).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de uma modificação do meio Knudson, testando diferentes concentrações de fosfato de sódio e de cloreto de potássio no crescimento *in vitro* de duas frutíferas de clima temperado.

## Material e métodos

Segmentos nodais do porta-enxerto de videira (*Vitis* spp.) 'R110' e de plântulas de amoreira-preta (*Rubus* sp.) cv. Cherokee, com cerca de 2,5 cm de comprimento, oriundos de plântulas preestabelecidas *in vitro*, foram excisados e inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura. Os tratamentos consistiram de diferentes concentrações de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0, 125, 250, 500 e  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) e KCl (0, 125, 250, 500 e  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ), originadas do meio White e adicionadas ao meio de cultura Knudson.

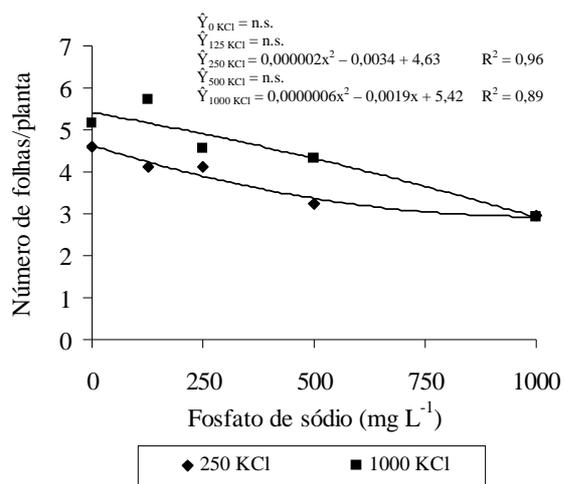
O meio foi acrescido de  $25 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose e solidificado com  $6 \text{ g L}^{-1}$  de ágar e o pH ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a  $121^\circ\text{C}$  e 1 atm por 20 minutos. Posteriormente à inoculação, os explantes foram transferidos para sala de crescimento a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , irradiância de  $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas diárias, permanecendo nestas condições por 60 dias. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial ( $5 \times 5$ ), utilizando-se de quatro repetições com 12 brotações cada.

Foi avaliado o número de folhas, número de brotos e de raízes por planta, comprimento da parte aérea, peso da matéria fresca da parte aérea, peso fresco de calos e peso da matéria seca da parte aérea do porta-enxerto de videira 'R110' e o número de folhas, número de brotos por planta, comprimento da parte aérea, peso da matéria fresca da parte aérea e peso fresco de calos de amoreira-preta cv. Cherokee. Os dados foram analisados pelo software Sisvar (Ferreira, 2000), utilizando regressão polinomial para os sais.

## Resultados e discussão

Neste estudo, observou-se para as variáveis estudadas, interação significativa entre as concentrações de sais para número de folhas e número de brotos e peso fresco da parte aérea das duas frutíferas e para peso seco da parte aérea do porta-enxerto de videira e para comprimento da parte aérea e peso fresco de calos de plântulas de amoreira-preta. Para número de raízes do porta-enxerto de videira, não foi verificada interação significativa.

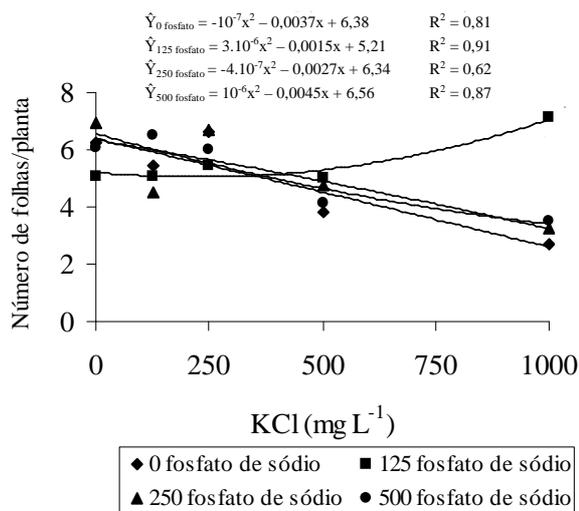
Houve um decréscimo do número de folhas do porta-enxerto de videira em relação ao aumento das concentrações do fosfato de sódio (Figura 1A) e cloreto de potássio (Figura 1B). Mesmo na ausência dos sais, houve formação de folhas nas plântulas estudadas, porém, com o aumento das dosagens dos mesmos, observou-se queda no número de folhas, talvez pelo fato de que altas dosagens são tóxicas aos explantes.



**Figura 1A.** Número de folhas em plântulas de porta-enxerto de videira 'R110', em função de diferentes concentrações de cloreto de potássio e de fosfato de sódio. Lavras, Estado de Minas Gerais, 2005.

Maior número de folhas do porta-enxerto de videira (5,72) e de amoreira-preta foram obtidos na presença de 1.000 mg L<sup>-1</sup> de cloreto de potássio no meio Knudson, associado a 125 mg L<sup>-1</sup> de fosfato de sódio, contradizendo com estudos de micropropagação de crisântemo, em que Junqueira *et al.* (2003) verificaram que, com a adição de 1.000 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de cálcio, sem a presença do cloreto de potássio, é possível obter maior número de folhas desta ornamental.

Provavelmente, as duas frutíferas estudadas requerem um meio de cultura mais pobre em fosfato de sódio e mais rico em cloreto de potássio para se desenvolverem melhor.

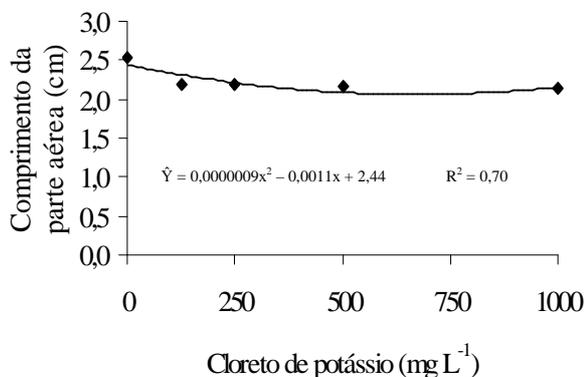


**Figura 1B.** Número de folhas em plântulas de amoreira-preta cv. Cherokee, em função de duas concentrações de cloreto de potássio e diferentes concentrações de fosfato de sódio. Lavras, Estado de Minas Gerais, 2005.

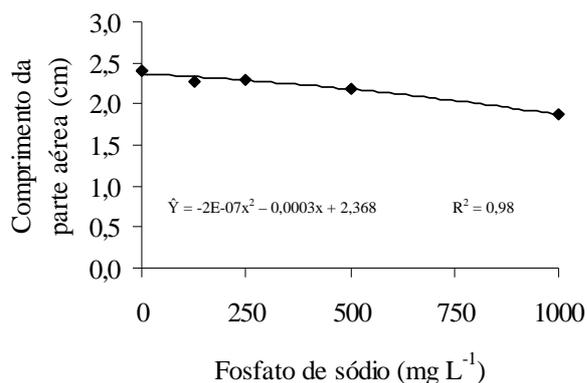
Amarelecimento das folhas e enfraquecimento das hastes também foram observados nos tratamentos que continham o cloreto de potássio, corroborando Pasqual (2001), que afirma que concentrações muito elevadas de cloro em algumas espécies lenhosas podem favorecer o aparecimento desses sintomas.

A hiperhidricidade também foi verificada nas folhas das duas frutíferas estudadas. O excesso de cloro pode ser uma dessas causas. Como o cloro tem pouca influência sob o ponto de vista nutricional, estudos têm sido realizados para reduzir sua concentração (Pasqual, 2001).

Analisando-se as Figuras 2A e 2B, pode-se observar que o comportamento do KCl foi independente do fosfato de sódio para o porta-enxerto de videira.



**Figura 2A.** Comprimento da parte aérea em plântulas de porta-enxerto de videira 'R110', em função de diferentes concentrações de cloreto de potássio. Lavras, Estado de Minas Gerais, 2005.

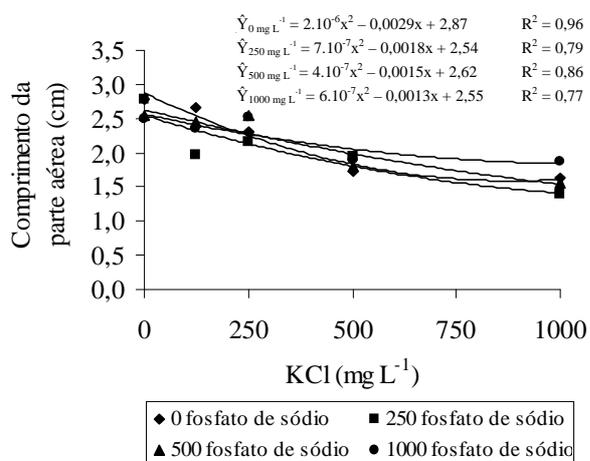


**Figura 2B.** Comprimento da parte aérea em plântulas de porta-enxerto de videira 'R110', em função de diferentes concentrações de fosfato de potássio. Lavras, Estado de Minas Gerais, 2005.

Este fato ocorreu, provavelmente, porque não houve interação entre os fatores e o fosfato de sódio não foi significativo. Incrementos nas concentrações de KCl, adicionadas ao meio Knudson, proporcionaram diminuição de forma quadrática no comprimento das plântulas de 'R110'.

Deste modo, menor comprimento das plantas foi observado na concentração de 611,1 mg L<sup>-1</sup> de KCl e maior comprimento (2,54 cm) foi observado na ausência deste sal, diferindo assim dos resultados obtidos por Junqueira et al. (2003) que, estudando o crescimento *in vitro* de crisântemo, obtiveram maior comprimento da parte aérea com 125 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de cálcio combinado com 1.000 mg L<sup>-1</sup> de cloreto de potássio.

Nota-se que os melhores resultados para o comprimento da parte aérea de brotações de 'Cherokee' foram obtidos na ausência do cloreto de potássio e na adição de fosfato de sódio ao meio de cultura (Figura 2C).

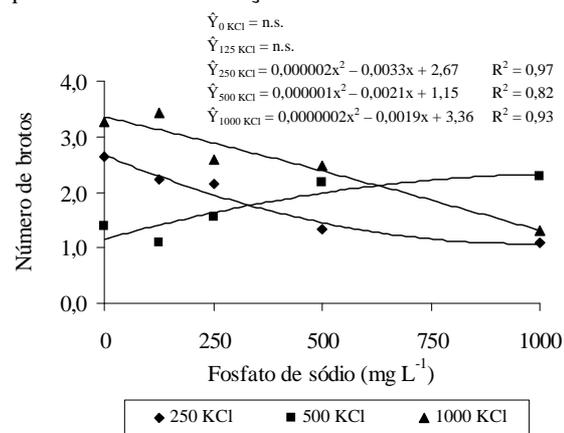


**Figura 2C.** Comprimento da parte aérea em plântulas de amoreira-preta cv. Cherokee, em função de diferentes concentrações de cloreto de potássio. Lavras, Estado de Minas Gerais, 2005.

Altas concentrações de fosfato de sódio diminuíram o crescimento desse explante, conforme já citado por Pasqual (2001), possivelmente porque o sódio e alguns microelementos são precipitados da solução ou sua absorção é reduzida. A taxa de incorporação de íons fosfato depende do genótipo, que é usualmente constante e proporcional à taxa de crescimento da cultura.

Araujo (2004) verificou que incrementos nas concentrações de KNO<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, adicionadas ao meio Knudson C, proporcionaram aumento no comprimento das plântulas de *Cattleya leopoldii* de forma linear, sendo observado maior comprimento de plântulas com 100% da concentração de sais de KNO<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.

Verificou-se interação significativa para número de brotos entre os fatores estudados das duas frutíferas. Maior número de brotos de 'R110' (3,43) foi obtido na presença de 1.000 mg L<sup>-1</sup> de cloreto de potássio, associado a 125 mg L<sup>-1</sup> de fosfato de sódio (Figura 3A). A adição de fosfato de sódio ao meio de cultura favoreceu o aumento no número de brotos na presença do cloreto de potássio, provavelmente porque o meio Knudson é considerado um meio pobre em sais em relação ao meio MS.

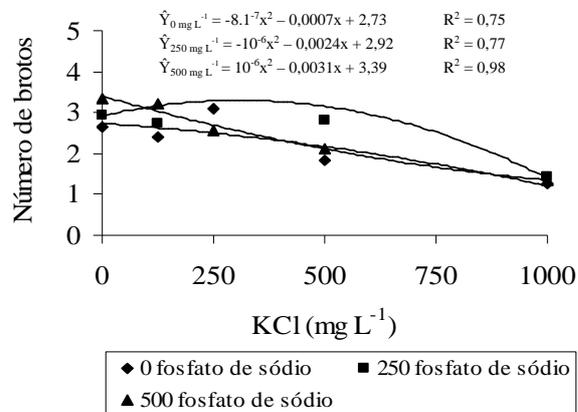


**Figura 3A.** Número de brotos em plântulas de porta-enxerto de videira 'R110', em função de três concentrações de cloreto de potássio e diferentes concentrações de fosfato de sódio. Lavras, Estado de Minas Gerais, 2005.

Pode-se observar multiplicação de brotos de amoreira-preta na ausência do KCl, porém o número de brotos das plantas foi menor em função de maiores concentrações de cloreto de potássio (Figura 3B).

Talvez as combinações de concentrações dos sais tenham interferido na absorção ou na translocação de outros nutrientes essenciais ao aumento no número de brotos/explante. Várias interações entre os íons estão envolvidas com a absorção e utilização

deles pela planta, como a competição, o sinergismo e a relação cátion-ânion, sendo importante que os sais se encontrem nos substratos em proporções quantitativas equilibradas (Ziegler, 1993).

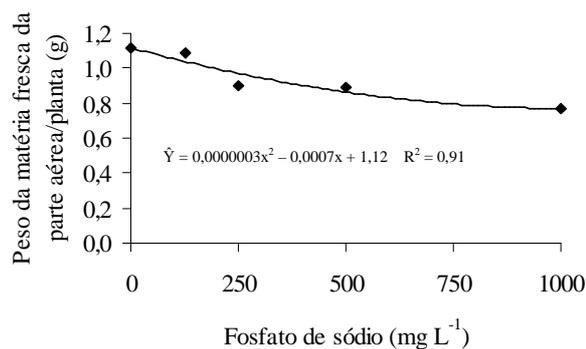


**Figura 3B.** Número de brotos em plântulas de amoreira-preta cv. Cherokee, em função de três concentrações de cloreto de potássio e diferentes concentrações de fosfato de sódio. Lavras, Estado de Minas Gerais, 2005.

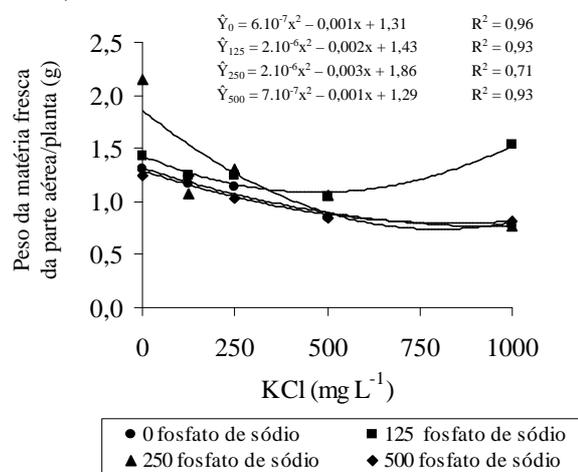
Poddar *et al.* (1997) estudaram altas concentrações de nitrato de amônio em *Eleusine coracana* e observaram que o nitrato pode funcionar como um regulador de crescimento, estimulando brotações. Dessa forma, Araujo (2004) estudando as espécies de orquídea *Cattleya nobilior* x *Cattleya nobilior* e *Cattleya leopoldii*, observou que o nitrato de potássio estimulou o crescimento de brotações até um certo ponto, tornando-se tóxico a partir do mesmo, com o aumento das concentrações.

O incremento das concentrações de fosfato de sódio e cloreto de potássio adicionadas ao meio Knudson promoveram diminuição no peso da matéria fresca das plântulas de forma quadrática de 'R110' e 'Cherokee', respectivamente (Figuras 4A e 4B). Maior peso da matéria fresca de plântulas de porta-enxerto de videira (1,113 g) foi obtido na ausência do fosfato, corroborando assim com Mhatre *et al.* (2000) que, em estudos com cvs. de *Vitis vinifera*, observaram na ausência desse mesmo sal em metade do meio MS um aumento de mais de 80% no peso da massa fresca das plântulas e no seu enraizamento.

Com o aumento das concentrações de cloreto de potássio, houve uma queda no peso da matéria fresca da parte aérea de plântulas de amoreira-preta. Com 125 mg L<sup>-1</sup> de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, as plantas tiveram respostas positivas para esta variável, verificando-se um crescimento no peso da matéria fresca a partir de 500 mg L<sup>-1</sup> de KCl (Figura 4B).



**Figura 4A.** Peso da matéria fresca da parte aérea em plântulas de porta-enxerto de videira 'R110', em função de diferentes concentrações de fosfato de sódio. Lavras, Estado de Minas Gerais, 2005.

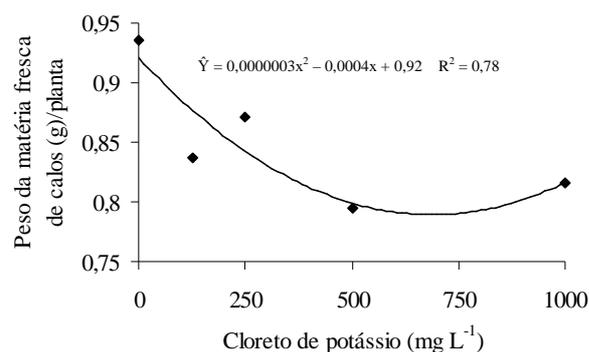


**Figura 4B.** Peso da matéria fresca da parte aérea em plântulas de amoreira-preta cv. Cherokee, em função de diferentes concentrações de fosfato de sódio. Lavras, Estado de Minas Gerais, 2005.

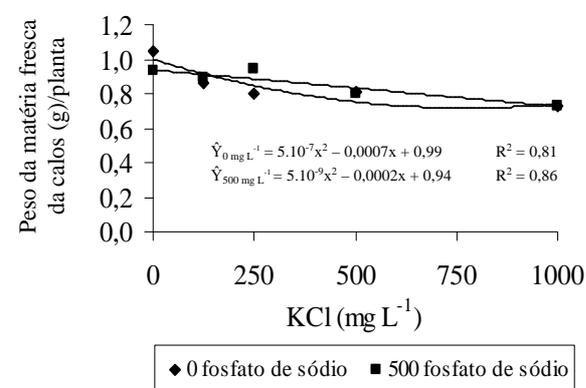
Silva *et al.* (2001), estudando fontes de nitrogênio no desenvolvimento *in vitro* do porta-enxerto 'Trifoliata' em meio MS, concluíram que melhores resultados são obtidos com 75% da composição dos sais da fonte KNO<sub>3</sub> associada a altas concentrações de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> para altura e peso das brotações dos explantes.

O incremento das concentrações de KCl adicionadas ao meio Knudson promoveram diminuição de forma quadrática na massa fresca de calos do porta-enxerto de videira, obtendo-se menor massa fresca na concentração de 666,67 mg L<sup>-1</sup> do sal e maior massa fresca de plântulas (0,936 g) na ausência do sal (Figura 5A).

Maior peso da matéria fresca de calos de amoreira-preta (1,05 g) foi obtido na ausência dos dois sais no meio MS (Figura 5B). Em estudos com orquídeas *Phalaenopsis nebula*, verificou-se regeneração de plantas através de cultura de calos, em meio MS, com a adição de 170 mg L<sup>-1</sup> de fosfato de sódio (Chen *et al.*, 2000).



**Figura 5A.** Peso da matéria fresca de calos de plântulas de porta-enxerto de videira 'R110', em função de diferentes concentrações de cloreto de potássio. Lavras, Estado de Minas Gerais, 2005.



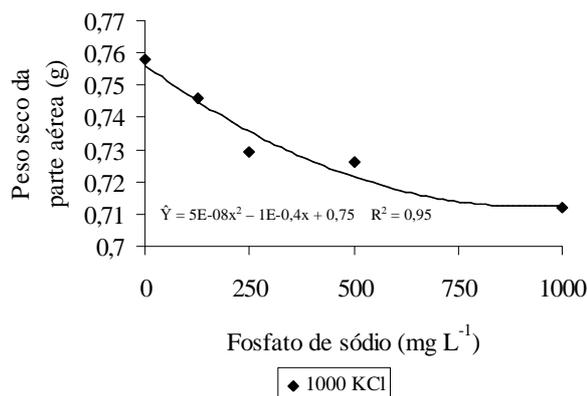
**Figura 5B.** Peso da matéria fresca de calos de plântulas de amoreira-preta cv. Cherokee, em função de diferentes concentrações de cloreto de potássio. Lavras, Estado de Minas Gerais, 2005.

Oziak-Akins e Vasil (1985) observaram que embriões de trigo formaram calos brancos e que a formação desses foi aumentado pelo dobro da concentração de potássio em meio MS. Song et al. (1981) verificaram que a formação de calos em anteras de arroz cultivadas *in vitro* foi maior quando a concentração de fósforo e potássio foi reduzida.

Para a massa seca da parte aérea das plântulas do porta-enxerto 'R110', verificou-se o efeito do KCl somente na concentração de 1.000 mg L<sup>-1</sup> (Figura 6). O comportamento da curva foi semelhante ao observado para o peso fresco da parte aérea do porta-enxerto.

Concentrações muito elevadas de cloro em espécies lenhosas podem causar amarelecimento em folhas, enfraquecimento de hastes e até mesmo a morte de algumas plantas, conforme verificado neste experimento, corroborando assim com Pasqual (2001).

A absorção de nutrientes minerais é afetada pela composição do meio de cultura, composição do tecido da planta e o ambiente da cultura (Willians, 1991), fatores que poderiam prognosticar e/ou prever a adequada composição do meio de cultura baseada nas análises de tecido de plantas crescidas *in vitro*.



**Figura 6.** Peso da matéria seca da parte aérea do porta-enxerto de videira 'R110', em função de diferentes concentrações de fosfato de sódio e cloreto de potássio. Lavras, Estado de Minas Gerais, 2005.

## Conclusão

A adição de cloreto de potássio ao meio Knudson não influencia no aumento do comprimento da parte aérea e massa fresca de calos do porta-enxerto de videira 'R110'. Não é necessário adicionar fosfato de sódio ao meio Knudson para se obter maior massa fresca da parte aérea.

O número de brotos e o comprimento da parte aérea de 'Cherokee' foram menores em função de maiores concentrações de cloreto de potássio. Melhores resultados foram obtidos na ausência de KCl e na presença de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, principalmente para comprimento e peso da matéria fresca.

## Referências

- ANTUNES, L.E.C. *Aspectos fenológicos, propagação e conservação pós-colheita de frutas de amoreira-preta (Rubus spp.) no sul de Minas Gerais*. 1999. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.
- ARAUJO, A.G. de. *Crescimento in vitro e aclimatização de plântulas de orquídea*. 2004. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- CALDAS, L.S. et al. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C. et al. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa/CNPQ, 1998. v. 1, p. 87-132.
- CHALFUN, N.N.J. et al. *Fruticultura comercial: frutíferas de clima temperado*. Lavras: UFLA-Faepe, 1998. v. 7.
- CHEN, Y. et al. A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis*. *Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, Arkansas, v. 36, n. 5, p. 420-423, 2000.
- FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. *Anais...* São Carlos: UFSCar. 2000. p. 255-258.

- GAMBORG, O.L. *et al.* Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, New York, v. 50, p. 151-158, 1968.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. *et al.* (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa/CNPq, 1998. v. 1, p. 183-260.
- HOFFMANN, A. *et al.* *Cultura de tecidos-Tecnologia e aplicações: aplicação na propagação de plantas*. Lavras: UFLA/Faepe, 1998.
- JUNQUEIRA, K.P. *et al.* Crescimento *in vitro* de crisântemo: efeito do nitrato de cálcio ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) e cloreto de potássio (KCl). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 14.; CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. *Anais ...* Lavras: UFLA, 2003. p. 197.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *Am. Orchid Soc. Bull.*, West Palm Beach, v. 14, p. 214-217, 1946.
- MHATRE, M. *et al.* Micropropagation of *Vitis vinifera* L.: towards an improved protocol. *Scientia Horticult.*, Amsterdam, v. 84, p. 357-363, 2000.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I.K. Nutrition of plant tissue cultures. In: VASIL, I.K. (Ed.). *Cell culture and somatic cell genetics of plants: cell growth nutrition, cytodifferentiation and cryopreservation*. Orlando: Academic Press, 1985. v. 1, p. 129-147.
- PASQUAL, M. *Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações*. Meios de cultura. Lavras: UFLA/Faepe, 2001.
- PEIXOTO, P.H.P.; PASQUAL, M. Influência da origem dos explantes na multiplicação e no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de videira. *Cienc. Agrotecnol.*, Lavras, v. 20, n. 3, p. 293-300, 1996.
- PODDAR, K. *et al.* 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 Sci.*, Limerick, v. 129, p. 101-106, 1997.
- SILVA, A.B. *et al.* Influência das fontes de nitrogênio  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$  no desenvolvimento *in vitro* do porta-enxerto 'Trifoliata'. *Rev. Cient. Rural*, Bagé, v. 6, n. 2, p. 147-152, 2001.
- SONG, H.G. *et al.* Studies of increasing the induction rate of callus tissue and pollen from anthers of *Oriza sativa in vitro*. In: SYMPOSIUM OF PLANT TISSUE CULTURE, 4., 1981 London. *Proceedings...* London: Pitman Publishing, 1981. p. 97-106.
- WILLIAMS, R.R. Factors determining mineral uptake *in vitro*. *Acta Horticult.*, Wageningen, v. 289, p. 165-166, 1991.
- WHITE, P.R. *A handbook of plant tissue culture*. Lancaster: Pennsylvania, Costel e Company, 1943.
- ZIEGLER, H. Los nutrientes y su transformación en la planta. In: DENFER, D.V. (Ed.). *Strasbourg, tratado de botánica*. 32. ed. Barcelona: Edições Omega, 1993. p. 314-370.

Received on April 26, 2006.

Accepted on March 29, 2007.