

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**REGULADORES VEGETAIS NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE
BROMÉLIA (*Aechmea blanchetiana*)**

SÔNIA MARIA GONÇALVES DA SILVA

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP – Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestre em
Agronomia (Horticultura).

BOTUCATU – SP

Dezembro – 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**REGULADORES VEGETAIS NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE
BROMÉLIA (*Aechmea blanchetiana*)**

SÔNIA MARIA GONÇALVES DA SILVA

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elizabeth Orika Ono

Co-Orientador: Prof. Dr. Márcio Crhistian Serpa Domingues

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP – Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestre em
Agronomia (Horticultura).

BOTUCATU – SP

Dezembro – 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

S586r Silva, Sônia Maria Gonçalves da, 1966-
Reguladores vegetais no desenvolvimento *in vitro* de bromélia (*Aechmea blanchetiana*) / Sônia Maria Gonçalves da Silva. - Botucatu : [s.n.], 2010

viii, 45 f. : gráfs., tabs., fots. color.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2010
Orientador: Elizabeth Orika Ono
Co-orientador: Márcio Christian Serpa Domingues
Inclui bibliografia

1. Bromeliaceae. 2. Cultura de tecido. 3. Auxina. 4. Citocinina. I. Ono, Elizabeth Orika. II. Domingues, Márcio Christian Serpa. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

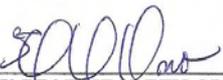
TÍTULO: "REGULADORES VEGETAIS NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE
BROMÉLIA (*Aechmea blanchetiana*)"

ALUNA: SÔNIA MARIA GONÇALVES DA SILVA

ORIENTADORA: PROFª DRª ELIZABETH ORIKA ONO

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCIO CHRISTIAN SERPA DOMINGUES

Aprovado pela Comissão Examinadora



PROFª DRª ELIZABETH ORIKA ONO



PROF. DR. JOÃO DOMINGOS RODRIGUES



PROF. DR. ARMANDO REIS TAVARES

Data da Realização: 04 de abril de 2011.

Eu procuro por mim.
Eu procuro por tudo o que é meu e que em mim se esconde.
Eu procuro por um saber que ainda não sei, mas que de alguma forma já sabe em mim.
Eu sou assim...
processo constante de vir a ser.
O que sou e ainda serei são verbos que se conjugam sob áurea de um mistério fascinante.
Eu me recebo de Deus e a Ele me devolvo.
Movimento que não termina porque terminar é o mesmo que deixar de ser.
Eu sou o que sou na medida em que me permito ser.
E quando não sou é porque o ser eu não soube escolher.

Pe. Fábio de Melo

A minha mãe, Raimunda Nunes Gonçalves, pela beleza da simplicidade em forma de pessoa, é para você que **DEDICO** com amor este trabalho.

Aos meus sobrinhos, João Victor Emanuel Gonçalves Luduvig e a Cátia Queli Gonçalves Lins, por ser um amor constante e incondicional em minha vida.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À DEUS por me permitir realizar mais este sonho.

À Nossa Senhora por ser a luz que me conduz.

À minha mãe por todos os dias da minha vida me presentear com seu amor.

Às minhas irmãs, Lúcia, Creuza e Laura por me ajudarem sempre nesta caminhada com atos concretos de carinho e apoio incondicional.

À amiga e colega de trabalho, minha sobrinha Cátia por me “puxar” quando tudo parecia que ia desmoronar, por tudo que passamos nesta jornada e por tudo que fez e faz, meu muito obrigada.

Aos amigos “boquinhos nervosas” Andréa Higuti, Marcelo (Mala) e o Felipe, adquiridos em Botucatu que ficarão para sempre em minha vida, pelos momentos de descontração e apoio, em especial a amiga Andréa Higuti por estar sempre presente quando menos espero.

Às “Fers”, Sotrate e Martinez por me receberem em sua república com amor e carinho.

Ao “Chefe”, Prof. Dr. Paulo César Costa, pela amizade, carinho e, principalmente, pelo profissionalismo com que conduz nossos trabalhos no laboratório.

À Simone Bragantini, sempre prestativa, que com boa vontade e profissionalismo muito me auxiliou nesta jornada.

Ao Furlan e Andréa pelo incentivo e ajuda em vários momentos.

Aos futuros colegas de profissão Foca e Leilane pelos momentos de aprendizagem compartilhados.

Ao meu sobrinho George pelo carinho e disposição em ajudar para que este trabalho tivesse um final feliz e bem “formatado”.

Ao Prof. Dr. João Domingos Rodrigues, “Mingo”, pelo carinho com o qual me recebeu e por ter me guiado até minha Orientadora.

Desejo expressar um agradecimento especial a minha orientadora Prof^a Dr^a Elizabeth Orika Ono pela seriedade e ensinamentos e por sempre responder aos meus e-mails. E ao meu co-Orientador Prof. Dr. Márcio Christian Serpa Domingues pela amizade, carinho e apoio ao longo deste trabalho e por acreditar em mim (e por sempre atender meus telefonemas).

Ao Instituto de Botânica de São Paulo na pessoa do Dr. Armando Tavares Reis pela doação das plântulas e sugestões preciosas.

À Faculdade Integral Cantareira por ter me dado esta oportunidade única, muito obrigada.

À Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP pela oportunidade de realização do curso.

E por fim, a todos que, de uma forma ou de outra, me apoiaram e me incentivaram no decorrer destes anos e contribuíram para a realização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 Família Bromeliaceae	7
2.2 <i>Aechmea blanchetiana</i>	8
2.3 Propagação <i>in vitro</i> de bromélias	10
2.4 Cultura de tecidos	12
2.5 Estado físico do meio de cultura	14
2.6 Reguladores vegetais e a cultura de tecidos	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Material Vegetal	20
3.2 Obtenção dos Explantes	21
3.3 Inoculação dos explantes e subcultivos	21
3.4 Delineamento experimental e análise estatística	23
3.5 Avaliações	24
4 RESULTADO E DISCUSSÃO	26
5 CONCLUSÃO	38
6 REFERÊNCIAS	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de reguladores vegetais utilizados na cultura de tecidos de plantas (Caldas et al., 1990).	18
Tabela 2. Composição do Meio de Cultura Básico de Murashigue e Skoog (1962) e o meio MS modificado segundo Takane et al. (1994).	23
Tabela 3. Massa de matéria fresca da parte aérea (g) de <i>Aechmea blanchetiana</i> mantidas <i>in vitro</i> por 90 dias sob a influência de diferentes reguladores vegetais.....	35
Tabela 4. Massa de matéria seca da parte aérea (g) de plântulas de <i>Aechmea blanchetiana</i> mantidas <i>in vitro</i> por 90 dias sob a influência de diferentes reguladores vegetais.	35
Tabela 5. Massa de matéria fresca de raízes (g) de plântulas de <i>Aechmea blanchetiana</i> mantidas <i>in vitro</i> por 90 dias sob a influência de diferentes reguladores vegetais.	36
Tabela 6. Massa de matéria seca de raízes (g) de plântulas de <i>Aechmea blanchetiana</i> mantidas <i>in vitro</i> por 90 dias sob a influência de diferentes reguladores vegetais.	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Aechmea blanchetiana</i> cultivada na Seção de Ornamentais do Instituto de Botânica, São Paulo, SP.	10
Figura 2. Plântulas de <i>Aechmea blanchetiana</i> cedidas pela Seção de Ornamentais do Instituto de Botânica, em São Paulo – SP.....	21
Figura 3. Plântulas de <i>Aechmea blanchetiana</i> advindas do meio semi-sólido e inoculadas em meio MS líquido acrescido de diferentes reguladores vegetais em 21/05/2010.....	27
Figura 4. Plântulas de <i>Aechmea blanchetiana</i>: A) plântulas utilizadas para o a realização do presente trabalho cultivadas em meio semi-sólido; B) plântulas após 75 dias de cultivo em meio líquido; C) plântula após 90 dias de cultivo.....	29
Figura 5. Número médio de raízes em <i>Aechmea blanchetiana</i> cultivadas <i>in vitro</i> sob a influência de diferentes reguladores vegetais.....	30
Figura 6. Comprimento médio da maior raiz em <i>Aechmea blanchetiana</i> cultivadas <i>in vitro</i> sob a influência de diferentes reguladores vegetais.....	31
Figura 7. Número de médias de folhas em <i>Aechmea blanchetiana</i> cultivadas <i>in vitro</i> sob a influência de diferentes reguladores vegetais.....	32
Figura 8. Número de médias de comprimento da maior folha em <i>Aechmea blanchetiana</i> cultivadas <i>in vitro</i> sob a influência de diferentes reguladores vegetais.....	33

RESUMO

Plântulas provenientes da germinação de sementes *in vitro* da bromélia *Aechmea blanchetiana* foram cultivadas em meio líquido para o estudo do crescimento sob a influência de diferentes reguladores vegetais. Os tratamentos consistiram da combinação de concentrações (mg L^{-1}) de BAP (0,2), Kt (0,2), NAA (0,1) e IBA (0,1) adicionados aos meios de cultivo líquido MS. As plântulas foram cultivadas sob fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, durante 90 dias e subcultivos a cada 15 dias. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado para todas as variáveis consideradas com 9 tratamentos e 4 repetições, totalizando 36 parcelas, sendo cada parcela composta por 4 plântulas perfazendo um total de 144 plântulas. Foram medidas e analisadas as seguintes características: comprimento da maior folha, número de folhas, número de raízes, comprimento da maior raiz, massa fresca e seca de plântulas e raízes. O BAP promoveu o melhor resultado para as variáveis número de raízes e comprimento da maior raiz. Os tratamentos com NAA e IBA apresentaram o melhor resultado quanto ao comprimento da maior folha, gerando ambos melhores desempenho para a massa de matéria fresca de plântulas.

Palavras chave: bromeliaceae, cultura de tecido, auxina, citocinina.

PLANT GROWTH REGULATORS ON THE DEVELOPMENT IN VITRO OF *Aechmea blanchetiana*. December, 2010. 44p.

Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura) - Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: SÔNIA MARIA GONÇALVES DA SILVA

Adviser: PROF.^a DR.^a ELIZABETH ORIKA ONO

Co-Adviser: PROF. DR. MÁRCIO CRHISTIAN SERPA DOMINGUES

ABSTRACT

Seedlings from *in vitro* seed germination of the bromeliad *Aechmea blanchetiana* were cultured in liquid medium to study growth under influence of different plant growth regulators. Treatments were combined concentrations (mg L⁻¹) of BAP (0.2), Kinetin (0.2), NAA (0.1) and IBA (0.1) added to MS liquid culture media. Seedlings were cultured under 16h photoperiod and 25 °C ± 2 for 90 days and subcultured every 15 days. Experimental design was completely randomized for all variables, with 9 treatments and 4 replicates totaling 36 plots, each one composed of 4 seedlings, 144 in total. Length of the largest leaf, number of leaves, number of roots, length of the largest root, and fresh and dry matter of seedlings and roots were measured and analyzed. BAP led to the best results for number of roots and length of the largest root. Treatments with NAA and IBA led to the best values as to length of the largest leaf, both resulting in higher values of seedling fresh matter.

Key words: Bromeliaceae, culture of tissue, auxin, cytokinin.

1 INTRODUÇÃO

A floricultura brasileira passou a ser visualizada e ganhar espaço como atividade econômica há aproximadamente 20 anos, no entanto, somente na última década foi possível visualizar seu crescimento. A produção apresenta qualidade compatível para atender as exigências das exportações, mas o setor aposta no abastecimento interno dirigindo em média 95% da sua produção para atender este mercado (REVISTA CAMPO E NEGÓCIO, 2008).

Para Uzzo (2008) as espécies brasileiras de flores podem ser agrupadas em dois grupos: tropicais, neste grupo encontram-se as plantas originárias de áreas de clima quente situadas entre os trópicos de Câncer e de Capricórnio; e subtropicais, onde neste grupo estão as plantas provenientes de áreas localizadas em latitudes além dos trópicos, com climas mais frios. A autora enfatiza que o “Brasil possui grande vantagem quanto à produção de plantas e isto se deve, principalmente, aos microclimas privilegiados e à disponibilidade de luz e água, o que possibilita a produção durante o ano todo”.

Os projetos paisagísticos estão povoados pela intrigante beleza apresentada pelas bromélias e estas estão se tornando a cada dia, mais populares em nosso

meio. No entanto, esta condição tem como consequência direta o extrativismo da espécie como um todo (LEME e MARIGO, 1993).

No Brasil é possível verificar um número abundante desta espécie e o destaque é dado para a Mata Atlântica. Portanto, nosso território detém o maior número de espécies, uma vez que aqui estas encontram condições adequadas para seu desenvolvimento (ENGLERT, 2000).

Além de acrescentar incontestável beleza aos projetos paisagísticos, o cultivo desta espécie favorece a redução do extrativismo predatório de bromélias nativas, possibilitando que estas sejam mantidas em seu *habitat* natural. As bromélias são plantas, cujo desenvolvimento se restringe às Américas, sendo encontrada na América do Sul, América Central e no sul da América do Norte. A exceção fica restrita a espécie *Pitcairnia feliciana*, cujo desenvolvimento acontece exclusivamente na África (ENGLERT, 2000).

As bromélias pertencem à família Bromeliaceae e entre os diversos gêneros que a compõe pode-se destacar *Navia*, *Canistrum*, *Pitcairnia*, *Cryptanthus*, *Dyckia*, *Hohenbergia*, *Hechtia*, *Neoregelia*, *Puya*, *Nidularium*, *Catopsis*, *Orthophytum*, *Guzmania*, *Portea*, *Tillandsia*, *Quesnelia*, *Vriesea*, *Streptocalix*, *Alcantarea*, *Wittrockia*, *Aechmea*, *Ananas*, *Billbergia* e *Bromelia* que são os mais usados e conhecidos para compor projetos paisagísticos e ornamentação (ENGLERT, 2000).

Paula e Silva (2001) relataram que só no Brasil são catalogadas em torno de 73% dos gêneros de toda família Bromeliaceae, sendo estas encontradas quase que inteiramente em todos os ecossistemas terrestres, destaque seja dado a Mata Atlântica e seus ecossistemas, bioma este que por sua vez é contemplado com o maior número de plantas desta família.

A partir do século XX as bromélias ornamentais ganharam destaque no cenário comercial, passando a ser muito apreciadas e isto está diretamente ligado ao trabalho de profissionais como pesquisadores, colecionadores e paisagistas. Assim, as bromélias se encontram em franco processo de popularização (PAULA, 2000). Esta popularização está associada ao fato das espécies apresentarem elevada gama de formas e cores, passando a ter representatividade no volume comercial. O fenômeno “Burle Max”, marca o início da utilização das bromélias no paisagismo, onde o traçado deste arquiteto que até então era marcado pelo estilo francês caracterizado por utilizar arbustos de clima temperado, coníferas,

roseiras entre outras, passa a utilizar o traçado naturalista inglês que é realçado pela biodiversidade tropical inerente às famílias *Araceae*, *Musaceae*, *Palmae*, *Bromeliaceae* e outras que passaram a sublinhar nossos jardins, parques e praças, definindo volumes, dando um novo contorno às composições paisagísticas e ampliando texturas e cores (MELLO, 1996).

Devido a esta nova visão atribuída às bromélias, o seu *habitat* natural passou a ser alvo de coleta indiscriminada visando a atender não só o mercado interno como também a exportação com o intuito único de atender a colecionadores e produtores europeus e norte americanos.

Atualmente, a produção comercial de bromélias, segundo Viana (2007), configura-se como uma atividade viável e rentável, marcada por diversas espécies que ostentam as características desejáveis para ornamentação. Dentre estas características o autor cita o colorido intenso e a durabilidade das brácteas de suas inflorescências.

O interesse por esta espécie se deve também ao fato que apesar da beleza incontestável, esta também é uma espécie rústica, não necessitando, portanto, de muitos cuidados para que sua sobrevivência seja garantida.

A popularização crescente das bromélias é notória segundo Melo (1996), e esta nova posição da espécie poderia provocar maior pressão sobre as populações nativas. Os empresários do setor da floricultura, impulsionados pelo movimento preservacionista em conjunto com ações que buscam a conscientização da necessidade da proteção das espécies e seus ecossistemas, caminham de forma a investir neste mercado em franca expansão. Segundo o mesmo autor, produtores rurais especializados, produzem mudas de qualidade utilizando como ferramenta a micropropagação.

As bromélias podem ser propagadas de forma sexuada ou assexuada. Na propagação assexuada ou vegetativa, a planta matriz emite brotações que podem ter origem na base da planta por estolho ou rizomas, ou no interior da própria roseta. O processo sexual ocorre a partir de sementes, possibilitando a formação de elevado número de plântulas. A propagação vegetativa ocorre de forma lenta e isto acontece devido aos poucos brotos laterais emitidos pela planta (PEREIRA et al 2009).

A propagação *in vitro* segundo Grattapaglia e Machado (1999) apresenta vantagens em comparação às técnicas até então aplicadas para a propagação da

espécie como redução de tempo, espaço e custos. Pode-se utilizar diversos explantes nos protocolos de micropropagação *in vitro* de bromélias.

Desta forma, levando em consideração os fatores apresentados o presente trabalho teve como objetivo comparar o desenvolvimento *in vitro* da bromélia *Aechmea blanchetiana* em diferentes concentrações de reguladores vegetais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A família Bromeliaceae

As bromélias ocorrem nas zonas tropicais e subtropicais das Américas. Naturalmente estas podem ser encontradas desde os estados da Virginia, Texas e Califórnia, nos Estados Unidos, até a Argentina (REITZ, 1993). No entanto, de acordo com Leme e Marigo (1993) é na América do Sul que está localizada a grande maioria das espécies, em torno de 40% e o Brasil ganha destaque por 73% dos gêneros desta espécie se concentrar em seu território. É no oeste do continente africano, que se encontra a única exceção da espécie, a *Pitcairnia feliciana*. A região leste do Brasil, nos apontamentos de Costa e Fontoura (1989), abriga o maior número de bromélias, sendo a mata Atlântica detentora de 81,8% da espécie.

A família Bromeliaceae apresenta por volta de 3000 espécies dispostas em 54 gêneros e inúmeros híbridos (COSTA, 1996). *Pitcairnioideae*, *Tillandsioideae* e *Bromelioideae*, segundo Nunes (1997), são as três subfamílias que representa a família Bromeliaceae, tomando como direção os caracteres florais e a morfologia dos frutos e sementes.

Carvalho e Mercier (2005) apontam que esta espécie pode ser encontrada em todos os climas do planeta e diante desta diversidade é possível deparar-se com espécies que podem ser epífitas e, assim, apresentam raízes que garantem a sua fixação na planta hospedeira, como também pode ser vista as espécies terrestres, onde as raízes assumem a função não só de fixação, mas também a retirada de água e nutrientes do solo. Constituída por plantas terrestres, rupícolas e epífitas, e não raro é possível registrar que podem ser também encontradas em solos sujeitos a inundação (PEREIRA et al., 2009).

Dentre as diversas bromélias cultivadas, Andrade e Demattê (1999) apontam os gêneros *Aechmea*, *Neoregelia* e *Vriesea* como as mais cultivadas nas regiões sul e sudeste do país. Já na região do estado do Rio de Janeiro o cultivo apreciado é por *A. imperialis*, *N. marmorata*, *A. blanchetiana*, *V. fosteriana* e *V. hieroglyphica* que são plantas de grande porte. Nos estudos realizados por Vitari (1994) as espécies *A. reginae*, *A. blanchetiana*, *N. compacta* e *A. imperialis* são descritas como as bromélias que detêm a preferência dos paisagistas.

As bromélias ganham espaço cada vez maior por despertar o interesse ornamental, uma vez que a espécie é dotada de uma diversidade interessante de formas e cores, e com isto acabam gerando volume comercial significativo. Para Moreira et al. (2006) é neste fato que reside a importância econômica da família Bromeliaceae, pois esta vem sendo cultivada visando atender a utilização cada vez maior em decorações de interiores e projetos paisagísticos. Destaque para o abacaxi, *Ananas comosus* (L.) Merrill, cujo fruto é muito utilizado na alimentação servindo de fonte para a produção de bebidas, doces e sobremesas. O “caroá-verdadeiro”, *Neoglaziovia variegata* (Arr.Cam) Mez, é apontada como outra espécie de grande valor econômico, utilizada para a produção de fibras. Outra forma de utilização desta espécie é na medicina natural, como digestiva, depurativa e com outras funções. Há que se ressaltar o uso da enzima “bromelina”, que pode ser encontrada em algumas espécies do gênero *Bromelia*.

2.2 *Aechmea blanchetiana*

Nos estudos realizados por Reitz (1983) o gênero *Aechmea* pode ser encontrado desde o México e Antilhas até o Uruguai e Norte da Argentina. Constituído por 172 espécies em oito subgêneros (SMITH e DOWNS, 1979). A espécie apresenta porte herbáceo, com altura variando de 40 a 80 centímetros, e são utilizadas para compor a ornamentação de paisagens domésticas. Nas folhas podem ser visualizadas faixas transversais brancas sobre o fundo verde na parte adaxial e roxo escuro na parte abaxial. A reprodução deste gênero é realizada por brotações do rizoma e por sementes.

De acordo com os autores consultados por Moreira (2008) estas plantas são mais duráveis e demonstram uma inflorescência simples e vistosa com forma piramidal, apresentam flores com pétalas e sépalas, ovário ínfero, fruto do tipo baga, com colorido intenso.

A espécie *A. blanchetiana* segundo Leme e Marigo (1993) é mais comum nas restingas por ser heliófila, onde forma grandes touceiras, com folhagem de coloração amarelada, podendo invadir a mata onde vive como epífita, quando então perde a coloração amarelo-ouro que antes a caracterizava. Lorenzi e Souza (1998) e Lorenzi e Melo-Filho (2001) afirmaram que a *A. blanchetiana* é cultivada isoladamente ou em grupos formando maciços densos, a pleno sol ou a meia sombra, em canteiros ricos em matéria orgânica mantidos umedecidos, podendo eventualmente ser cultivada em vasos. São plantas herbáceas epífitas, perenes, rizomatosas, robustas, de 60 a 90 cm de comprimento, de folhagem e florescimento decorativo e nativas do Brasil. Apresentam folhas longas, rijas, laminares, verde-claras, côncavas, basais e em roseta, sem espinhos nas margens (Figura 1).



Figura 1. Espécime da bromélia *Aechmea blanchetiana* cultivada na Seção de Ornamentais do instituto de Botânica, São Paulo, SP.

2.3 Propagação *in vitro* de bromélias

Mundialmente, o Brasil é reconhecido como o detentor do maior número de bromélias, apesar desta posição, as exportações brasileiras estão bem abaixo quando se compara a de outros países como a Bélgica, Alemanha, Holanda e Austrália (CORREIA et al., 2000). Com este título atribuído ao Brasil faz-se necessário adotar uma nova postura a fim de garantir e ampliar este posto, haja vista, que o cultivo de bromélias ornamentais são sinônimos de um segmento de importância econômica para os países ligados ao mercado de flores e plantas ornamentais.

Reitz (1983) afirma a importância das bromélias como plantas ornamentais e este, é o fator primordial que conduz de forma direta, diversas espécies nativas a condição de ameaçadas de extinção, isto porque estas espécies passam a ser alvo do extrativismo.

Para Mengarda (2009) este fato passa ser o motivo que impulsiona a busca na obtenção por técnicas de micropropagação visando a conservação destas espécies e, conseqüentemente, possibilitando que estas espécies tenham a exploração efetivada de forma coerente, já que a técnica de micropropagação leva vantagem sobre a multiplicação vegetativa natural, uma vez que esta última é vista como ferramenta lenta e de baixo rendimento quando associada a número de mudas produzidas.

A multiplicação de bromélias pode ocorrer de forma sexuada ou assexuada. Na propagação assexuada ou vegetativa, utilizam-se os brotos provenientes da planta matriz, que surgem da base da planta por estolhos ou rizomas, ou mesmo do interior da roseta da planta. O processo sexual é a formação a partir de sementes e neste processo, é possível a obtenção de diversas plântulas. Moreira (2008) ressalta que embora o processo sexual seja demorado, uma vez que a maturação das sementes pode ocorrer somente após um ano da polinização, dependendo da espécie, possibilita a diversidade genética e a geração de inúmeros híbridos.

A utilização da micropropagação para a propagação de algumas bromélias vem sendo discutido na literatura, com resultados característicos para cada espécie (ARANDA-PERES, 2005). Pasqual et al. (1998) confirmam esta informação ao relatar o cultivo *in vitro* da espécie mais famosa, o abacaxizeiro *Ananas comosus*, e para este fim é utilizado o meio nutritivo MS (Murashigue e Skoog, 1962) suplementado com auxinas e citocininas, tendo como material propagativo gemas laterais e apicais de coroas e filhotes.

Em bromélias ornamentais, a formação de plântulas a partir do cultivo *in vitro* tem como material propagativo viável gemas apicais de brotos, gemas axilares e folhas removidas de plântulas adultas (KANASHIRO, 2005). O autor ressalta que é possível a propagação via sementes e esta vem sendo apontada como vital na conservação de germoplasma de bromélias ameaçadas de extinção, assegurando a variabilidade natural dessas espécies.

Mercier e Nievola (2003) descreveram algumas estratégias de multiplicação *in vitro* de bromélias, já que os métodos naturais não são capazes de fornecer um grande número de plantas num curto espaço de tempo. Os autores consideraram que a germinação de semente *in vitro* é uma ótima opção para se conseguir plantas assépticas e a partir delas se iniciar a cultura de explantes, como folhas, segmentos nodais, entre outras. Nos segmentos nodais, cada gema encontrada na axila foliar origina um novo eixo caulinar. Já o cultivo de folhas inteiras ou de suas bases em meio contendo reguladores vegetais, geralmente benzilaminopurina (BAP) e ácido naftalenoacético (NAA), dá origem há um conjunto de gemas adventícias, as quais se desenvolvem formando novos eixos caulinares. Após o enraizamento em meio indutor apropriado, as novas plantas podem ser transferidas para casa de vegetação ou servir como doadoras de novas folhas, continuando o processo de propagação *in vitro*.

A utilização de plantas oriundas da germinação *in vitro* como forma de gerar novos explantes é sem dúvida uma opção viável para exercitar a micropropagação, fornecendo plântulas assépticas e explantes saudáveis para se iniciar o cultivo *in vitro*.

2.4 Cultura de tecidos

A cultura de tecidos, células ou órgãos excisados de plantas é caracterizado por ser conduzida em condições assépticas, desenvolvidas em meio nutritivo, e mantidas em sala de crescimento com controle de luminosidade, fotoperíodo e temperatura. Explante é a definição dada a toda parte da planta que dela é excisada. Alguns termos técnicos como cultivo *in vitro* e micropropagação são comumente usados como sinônimo de cultura de tecidos (TORRES et al., 2001).

As técnicas de cultivo *in vitro* podem ser empregadas em ambas as formas de propagação, tanto na sexuada como na assexuada. Segundo Guerra et al. (1999) a propagação vegetativa apoiada na cultura *in vitro* tende a produzir mudas uniformes, com qualidade superior e isenção de doenças, e concomitante a estas possibilidades pode-se obter

tanto a multiplicação em menor tempo como plantas geneticamente confiáveis que darão novos cultivares e híbridos.

Araújo (2004) concorda com a afirmação de Guerra e acrescenta que o cultivo *in vitro* “apresenta expressiva superioridade na produção e qualidade das flores e com maior valor comercial”.

Complementando as definições apresentadas até aqui para a cultura de tecidos, Peres (2001) apresenta a seguinte definição: “o processo de cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas nas quais um explante (célula, tecido ou um órgão) é isolado sob condições assépticas e cultivados em meio artificial”. Kerbauy (1998) complementa que este processo tem amparo na totipotencialidade das células, o que significa que qualquer célula do organismo vegetal contém todas as informações genéticas necessárias que possibilitarão a regeneração de uma planta completa.

Ao se fazer uso da técnica de cultura de tecido de forma racional pode obter excelentes resultados quanto a produção comercial de ornamentais, Grattapaglia e Machado (1999), ressaltam que esta técnica pode impulsionar a produtividade, possibilitando a produção de um grande número de mudas, fato este relevante também para a conservação *in vitro* de germoplasma e acrescenta que este processo pode também favorecer o melhoramento genético.

A geração de plantas matrizes sadias é o principal fator que torna a cultura de tecidos primordial, Barrueto Cid (2001) salienta que este método não só garante a aquisição de inúmeras plantas em um período de tempo relativamente curto, com qualidade genética, como também possibilita a propagação de clones independente da época do ano, além de propiciar a propagação de espécies que dificilmente seriam propagadas pelos métodos convencionais, suprimindo, assim, a necessidade dos produtores de flores ou plantas ornamentais na aquisição de mudas com qualidade comprovada.

Como é notório esta está se tornando ferramenta vital para o setor produtivo, como cita Fráguas et al. (1999) que observam que a cultura de tecidos ou micropropagação de plantas ornamentais e sua atuação frente ao âmbito comercial é uma realidade em países como Holanda, França, Espanha, Japão e também para o mais novo integrante deste quadro, o Brasil.

Nos últimos anos tem-se observado uma crescente preocupação pela conservação e propagação de espécies nativas (Rodrigues et al. 2004), e dentro deste contexto pode-se ressaltar a família Bromeliaceae que nos apresenta com inúmeras espécies de interesse à horticultura ornamental, destaque seja dado aos gêneros *Alcantarea*, *Tillandsia*, *Vriesea*, *Guzmania*, *Aechmea* e *Neoregelia* que são tidas como as plantas mais comercializadas. A família desperta tamanho interesse devido a sua beleza e com isso passa a ser usada em larga escala nos mais diversos projetos paisagísticos.

De acordo com Coffani-Nunes & Forzza (2001) houve uma intensificação do uso das espécies da família Bromeliaceae em projetos paisagísticos, desta forma o extrativismo passou a ser visto como ferramenta ideal ao abastecimento do mercado.

A cultura de tecidos de Bromeliaceae se configura como alternativa viável para que o mercado seja abastecido de forma coerente e com isso possibilite a redução ou a nulidade do extrativismo.

2.5 Estado físico do meio de cultura

Ao se propor o um determinado meio de cultura para a propagação de uma espécie há que se considerarem diversos fatores. Dentre estes fatores destacam-se pela sua importância os nutrientes minerais e os reguladores vegetais que compõe o meio de cultura, e estes por sua vez, em associação com os outros fatores, como o estado físico do meio, vão interferir de forma efetiva para o estabelecimento da cultura, ou seja, vão agir diretamente na propagação da espécie (FORTES e PEREIRA, 2001). Segundo os mesmos autores, alguns experimentos e diversos meios de cultura são estudados a fim de melhorar os fatores descritos acima. Esta não é uma das tarefas mais fáceis, uma vez que os resultados discutidos são por vezes divergentes dificultando sua reprodução. Esta situação se deve ao fato em primeiro lugar da cultura de tecidos sendo utilizado como ferramenta para a propagação vegetativa, sofrer adaptações correspondentes a cada espécie e cultivar que será estudada, isto porque geneticamente estas diferem entre si, assim uma mesma espécie poderá apresentar resultados diferentes sob as mesmas condições de cultivo.

Mengarda (2009) ressalta que a mudança do estado físico do meio de cultura altera a forma como ocorre o contato dos explantes com o meio, pois com isto está se modificando, ou melhor, retirando uma possível barreira de resistência física entre a planta (explante) e o meio, podendo causar alterações no desenvolvimento de plântulas *in vitro*.

Pereira e Fortes (2003) diante desta questão exemplifica melhor ao relatar que é no meio de cultura líquido que ocorre maior contato dos explantes com o mesmo, fato este que pode propiciar o aumento de absorção de água e nutrientes quando este é analisado em relação ao meio de cultura semi sólido. Este maior contato entre plântulas e meio de cultura que ocorre no meio líquido tem como vantagem o favorecimento da taxa de assimilação de nutrientes, altura e multiplicação dos brotos, como também maior acúmulo de massa seca.

Entre os agentes que compõe o meio nutritivo, o ágar é utilizado para enrijecer o meio, ou seja, usado na solidificação do meio de cultura. Peixoto e Pasqual (1995) recomendam reduzir o uso deste elemento no preparo do meio, embora o mercado disponha de diversas marcas, este elemento é tido como um dos que mais encarece o meio de cultura. Oliveira (1994) reforça esta idéia e demonstra em seu trabalho com micro estacas de crisântemo que ao se elevar a concentração de ágar no meio de cultura, isto dificulta o contato do explante com o meio, reduzindo a absorção de compostos.

Pereira e Fortes (2003) em suas pesquisas realizadas para obtenção de protocolo *in vitro* para a propagação de batata em meio líquido, demonstram que esta cultura se desenvolve bem em meio de cultura semi-sólido. Entretanto, o meio de cultura líquido, para diversas espécies vegetais, tem proporcionado resultados superiores ou iguais aos obtidos com o cultivo em meio semi-sólido e nesta situação pode-se citar como exemplos o abacaxi, a banana e a cana-de-açúcar. Outro quesito a favor do meio líquido é a questão da facilidade em seu preparo bem como sua manipulação e, principalmente, a redução do custo total empregado para compor o meio de cultura.

2.6 Reguladores vegetais e a cultura de tecidos

A composição dos meios nutritivos utilizados na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas tem por finalidade disponibilizar as substâncias necessárias ao crescimento como também o de exercer certo controle na forma como ocorre o desenvolvimento *in vitro*. Para Caldas et al. (1998) a presença de reguladores vegetais no meio de cultura bem como sua composição e concentração tem papel fundamental no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de micropropagação.

Os reguladores vegetais são substâncias sintéticas que apresentam função semelhante ao dos hormônios vegetais e, para tanto, devem ser adicionados ao meio de cultura em baixas concentrações, uma vez que, encontram-se em atividade em diversos processos de desenvolvimento da planta (SILVA, 2003).

Borgatto e Hayashi (2002) justificam o acréscimo de reguladores vegetais no meio de cultura porque estes tem a incumbência de preencher a falta dos teores endógenos de hormônios vegetais que os explantes apresentam por estarem desligados das regiões produtoras na planta matriz. Além desta função, estes compostos têm condições de propiciar determinadas respostas às plantas *in vitro* como crescimento, alongamento ou multiplicação da parte aérea. No entanto, para que estas respostas aconteçam, os autores ressaltam que há que se considerar o estado fisiológico dos explantes, que por sua vez, está diretamente ligado com a época do ano e o estado geral da planta matriz.

O desenvolvimento das plantas *in vitro* associadas à adição de auxinas e/ou citocininas no meio de cultura está bem fundamentada na literatura. Nascimento (2007) demonstra que a relação citocinina:auxina favorece a multiplicação de brotos e impede o desenvolvimento de raízes, no entanto, ao se diminuir a relação citocinina:auxina esta nova proporção favorece o desenvolvimento de raízes. A produção de calos é beneficiada quando se tem concentrações iguais desses dois reguladores vegetais. Desta forma, ao se fazer uso dos reguladores vegetais, esta decisão deve ser tomada de forma criteriosa, pois em determinados casos, em fases específicas do desenvolvimento, estas substâncias poderão provocar respostas não desejáveis.

Caldas et al. (1990) citam que dentre as citocininas podem ser percebidas determinadas diferenças, onde a BAP induz a formação de grande número de brotações e alta taxa de multiplicação em sistemas de micropropagação, enquanto a cinetina (Kt) e a dimetilalil-aminopurina (2iP) causam apenas o crescimento normal, sem brotações múltiplas, as concentrações devem ser determinadas considerando a espécie e o tipo de explante

Tagliacozzo (1998) aponta que as citocininas possibilitam a divisão celular, alongamento e diferenciação celular e também retardam a senescência das plantas, promovem a quebra da dominância apical e induzem proliferação de gemas axilares, constituindo-se elemento essencial para a multiplicação da parte aérea e indução de gemas adventícias. As citocininas mais utilizadas são 6-benzilaminopurina (BAP), 6-furfurilaminopurina ou cinetina (Kt) e N-6-benziladenina (BA).

As citocininas influenciam também no desenvolvimento dos cloroplastos, na regulação do crescimento dos caules e raízes (TAIZ E ZEIGER, 2009).

As auxinas são essenciais no sentido de promover o crescimento inicial do meristema e a extremidade do broto dos explantes. Quando se pretende alcançar multiplicações de brotações acrescenta-se auxinas em combinação com citocininas e, para tanto, deverão ser utilizadas baixas concentrações de auxinas combinadas com altos níveis de citocinina. O autor descreve que quando se pretende alcançar um maior crescimento das plântulas *in vitro* devem-se usar altas concentrações de auxinas, sem induzir a formação de calos. No entanto, se o caso for este, indução de calos, faz-se necessário um ajuste nos níveis de auxina e citocinina (PASQUAL, 2001).

De acordo com Caldas et al. (1998) no cultivo *in vitro* várias auxinas como o ácido naftalenoacético (NAA), ácido indolilacético (IAA), ácido indolilbutírico (IBA) e ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2,4-D) tem proporcionado diferentes respostas neste tipo de cultivo. As auxinas podem desempenhar papel de complementar o teor endógeno ou mesmo suprir as necessidades de meristemas isolados. Observando a ação que as auxinas exercem na germinação de sementes e crescimento posterior de três espécies de Bromeliaceae, a auxina NAA, presente no meio de cultura apresentou o melhor desempenho na promoção do crescimento de brotos e raízes, sendo utilizada em concentrações entre 0,5 e 0,8 mg L⁻¹.

A disponibilidade e a ação recíproca entre as auxinas e citocininas regulam a formação de raiz, parte aérea e calo em cultura de tecidos. Caldas et al. (1990) demonstram na Tabela 1 as diversas substâncias que pertencem a cada uma destas classes de reguladores vegetais e que, para tanto, podem ser usadas nos meios de cultura levando em consideração o objetivo do estudo.

Tabela 1. Exemplos de reguladores vegetais utilizados na cultura de tecidos de plantas (Caldas et al., 1990).

Classe de reguladores	Abreviaturas	Nome Químico
AUXINAS	IAA	Ácido 3-idolilacético
	NAA	Ácido naftalenacético
	IBA	Ácido indolbutírico
	CPA	Ácido (4-clorofenoxi) acético
	2,4-D	Ácido 2, 4-diclorofenoxiacético
	Picloran	Ácido 4-amino-3,4,6-tricloropicolínico
	NOA	Ácido naftoxiacético
CITOCININAS	Cinetina (Kt)	6-furfurilamino-purina
	BAP (BA)	6-Benzilaminopurina = 6-benziladenina
	2 i P	Isopenteniladenina
	Zeatina	N ⁶ -(4-hidroxi-3-metibut-2 enil) aminopurina
	PBA	(6-Benzilamino)-9-2-tetraidropiranyl-9-H-purina
GIBERELINAS		Ácido giberélico (GA3) 2, 4 ^a , 7-trihidroxi-1-metil-8-metilenegib-3-ene-1,10-ácido carboxílico-1-4-lactona
INIBIDORES	ABA	Ácido abscísico

Mendes et al. (2007) em seu trabalho com multiplicação *in vitro* da Bromeliaceae *Billbergia distanckia* obtiveram aumento significativo no número de brotações quando na presença de BAP, no entanto, na ausência desta citocinina, as taxas de multiplicação foram significativamente reduzidas.

Pasqual et al. (2008) trabalhando com micropropagação de abacaxizeiro concluíram que é viável a multiplicação *in vitro* desta espécie em meio líquido acrescido de BAP $1,5 \text{ mg L}^{-1}$.

A propagação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana*, no trabalho realizado por Galvanese et al. (2007), mostrou que o maior número de brotações foi obtido no tratamento composto por $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de NAA + $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 6-BA em meio líquido e para a variável tamanho de raízes observaram incremento significativo quando houve aumento nas concentrações de NAA.

A cultura de tecidos está diretamente ligada a uma série de fatores como os reguladores vegetais, luz, temperatura, pH e nutrientes, entre outros. Castro et al. (2002) citam que os hormônios vegetais apresentam a “capacidade de promover, inibir e modificar as diferentes respostas fisiológicas, atuando em baixas concentrações”. Os autores complementam que estas substâncias provocam alterações fisiológicas e/ou morfológicas, agindo de forma direta nos processos que vão desde a germinação, crescimento, florescimento, frutificação, culminando com a senescência e abscisão. A ação destas potentes substâncias, no entanto, está diretamente ligada às condições ambientais e também às potencialidades genéticas das plantas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Centro de Apoio Tecnológico Cantareira (CEATEC) da Faculdade Integral Cantareira, São Paulo, SP.

3.1 Material Vegetal

O material botânico, plântulas da espécie *Aechmea blanchetiana* procedentes de sementes germinadas *in vitro* em meio de cultura Murashigue e Skoog (MS) semi-sólido, utilizados no experimento foram cedidos pela Seção de Ornamentais do Instituto de Botânica de São Paulo, SP.



Figura 2. Plântulas de *Aechmea blanchetiana* cedidas pela Seção de Ornamentais do Instituto de Botânica, em São Paulo – SP.

3.2 Obtenção dos Explantes

As plântulas foram removidas do meio semi sólido sob condições de câmara de fluxo laminar e lavadas em água destilada e esterilizada a fim de remover resíduos do meio nutritivo.

3.3 Inoculação dos explantes e subcultivos

Plântulas de *Aechmea blanchetiana* foram utilizadas no estudo da ação dos reguladores vegetais no desenvolvimento *in vitro* os tratamentos consistindo da combinação de concentrações de benzilaminopurina (BAP a $0,2 \text{ mg L}^{-1}$), cinetina (Kt a $0,2 \text{ mg}$

L⁻¹), ácido naftalenoacético (NAA a 0,1 mg L⁻¹) e ácido indolilbutírico (IBA a 0,1 mg L⁻¹) adicionados aos meios de cultivo MS (Murashigue e Skoog, 1962 modificado segundo Takane et al., 1994) líquido (sem adição de ágar) suplementado com 30 g de sacarose, mio-inositol (100 mg L⁻¹) e glicina (2,0 mg L⁻¹) em formulação líquida, com pH ajustado a 5,8 (Tabela 2), perfazendo os seguintes tratamentos:

- T1 - Testemunha (apenas meio básico MS líquido)
- T2 – MS líquido + BAP (0,2 mg L⁻¹)
- T3 – MS líquido + Kt (0,2 mg L⁻¹)
- T4 – MS líquido + NAA (0,1 mg L⁻¹)
- T5 – MS líquido + IBA (0,1 mg L⁻¹)
- T6 – MS líquido + BAP (0,2 mg L⁻¹) + NAA (0,1 mg L⁻¹)
- T7 – MS líquido + BAP (0,2 mg L⁻¹) + IBA (0,1 mg L⁻¹)
- T8 – MS líquido + Kt (0,2 mg L⁻¹) + NAA (0,1 mg L⁻¹)
- T9 – MS líquido + Kt (0,2 mg L⁻¹) + IBA (0,1 mg L⁻¹)

Frascos de vidro com capacidade volumétrica de 180 mL, contendo 30 mL do meio de cultura descrito acima foram autoclavados a 121°C durante 20 minutos. Em temperatura ambiente, as plântulas foram inoculadas e os frascos vedados com dupla camada de filme transparente PVC. As plântulas permaneceram durante 90 dias em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, sob fotoperíodo de 16 horas luz com intensidade luminosa 35 μmol⁻²s⁻¹, sofrendo agitação a cada dois dias durante 10 segundos e subcultivos aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias nas mesmas condições.

Tabela 2. Composição do Meio de Cultura Básico de Murashigue e Skoog (1962) e o meio MS modificado segundo Takane et al. (1994).

Macronutrientes	Meio MS (1962)	Meio MS modificado
	mg L ⁻¹	
NH₄NO₃	1.650	1.650
KNO₃	1.900	1.900
CaCL₂. 2H₂O	440	1.760
MGSO₄.7H₂O	370	370
KH₂PO₄	170	170
Micronutrientes	mg L ⁻¹	
MnSO₄.4H₂O	22,3	22,3
ZnSO₄. 7H₂O	8,6	8,6
H₃BO₃	6,3	6,3
KI	0,83	0,83
Na₂MoO₄. 2H₂O	0,25	0,25
CuSO₄. 5H₂O	0,025	0,025
COCL₂. 6H₂O	0,025	0,025
FeSO₄. 2H₂O	37,3	37,3
NaEDTA. 2H₂O	27,8	27,8
Glicina	2	2
Ácido nicotínico	0,5	--
Piridoxina. Hcl	0,5	--
Tiamina.Hcl	0,1	0,1
Mio-inositol	100	100
Sacarose	30.000	30.000

3.4 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com 9 tratamentos e 4 repetições, totalizando 36 parcelas, sendo cada parcela composta por 4 plântulas totalizando 144 plântulas.

Para a comparação das médias de todas as características avaliadas foi utilizado o teste Tukey a 5% de probabilidade.

3.5 Avaliações

Para a avaliação dos efeitos dos reguladores vegetais adicionados no meio de cultura para o desenvolvimento de plântulas de *Aechmea blanchetiana* as seguintes características foram observadas aos 90 dias:

- **Comprimento da maior folha**

O comprimento da maior folha foi mensurado com paquímetro, marca Digimess, com escala em milímetros.

- **Número de folhas**

O número de folhas foi avaliado pela contagem das folhas de plantas individualmente, desconsiderando-se as folhas senescentes da parte basal.

- **Número de raízes**

O número de raízes foi avaliado pela contagem das raízes individualmente, desconsiderando aquelas menores que 1,0 mm.

- **Comprimento da maior raiz**

O comprimento da maior raiz foi mensurado com paquímetro, marca Digimess, com escala em milímetros, considerando-se a medida compreendida entre a inserção no caule e o ápice da raiz com maior tamanho.

- **Massa fresca de plântulas e raízes**

As plântulas retiradas do frasco foram previamente secas em papel toalha para eliminação do líquido aderido à superfície e destacadas da raiz e a massa de ambas determinada individualmente sendo pesadas em balança analítica, marca Marconi, modelo Chyo JK - 200, com precisão de centésimos de grama, obtendo-se a massa fresca das folhas e das raízes.

- **Massa seca de plântulas e raízes**

As plântulas separadas em órgãos (folha e raízes) foram acondicionadas individualmente em sacos de papel Kraft e secas em estufa dotada de sistema para circulação forçada de ar, a uma temperatura de 65 °C, até atingir peso constante. Após o processo de secagem, o material foi mantido em dessecador, contendo sílica gel, para evitar a rehidratação da amostra. A determinação da massa seca de folhas e raízes foi realizada em balança analítica, marca Marconi modelo Chyo JK 200.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho observou-se que o desenvolvimento da espécie *Aechmea blanchetiana in vitro* apresentou melhor conformação das plântulas quando foram retiradas do meio semi-sólido e inoculadas em meio de cultura líquido MS acrescido de reguladores vegetais (Figura 3). Na literatura é possível observar diversos trabalhos que propõe como ideal para a proliferação de bromélias o meio líquido MS acrescido de reguladores vegetais visando promover o melhor desenvolvimento da espécie.

O meio de cultura ou meio nutritivo pode apresentar constituição líquida ou semi-sólida, considerando que no meio líquido faz-se necessário que este receba algum tipo de agitação que tem por objetivo propiciar aeração ao meio proporcionando condições ideais para a respiração dos explantes (HELLER et al., 1968). Segundo Kampf (1995) a escolha por meio líquido para o cultivo *in vitro* de bromélias se deve ao fato destas espécies apresentarem melhor absorção de nutrientes neste tipo de meio. Raven et al. (1999) ampliam a questão ao ressaltar que as bromélias em sua grande maioria absorvem água e nutrientes, principalmente, pela parte aérea, via pelos absolvedentes das folhas, denominados de pelos peltados, portanto, resultando em melhor desempenho no meio líquido.



Figura 3. Plântulas de *Aechmea blanchetiana* advindas do meio semi-sólido e inoculadas em meio MS líquido acrescido de diferentes reguladores vegetais.

As plântulas de *Aechmea blanchetiana* cultivadas *in vitro* apresentavam tamanho reduzido, folhas estreitas e menos vigorosas, com coloração mais clara. Estas plântulas em contato com o meio nutritivo MS líquido acrescido de reguladores vegetais após o primeiro subcultivo que ocorreu aos 15 dias do início do experimento já não se encontravam submersas no meio líquido.

Alguns autores ressaltam a relevância do cultivo *in vitro* e os diversos protocolos com formulações de meios básicos suplementados com diferentes concentrações e/ou combinações de reguladores vegetais e a utilização destes nos meios de cultura, objetivando adequá-los às necessidades de cada espécie vegetal, buscando obter melhor crescimento, alongamento, enraizamento e multiplicação da parte aérea (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1999; BARBOZA et al., 2004; SILVA et al., 2008). Em conformidade com os autores acima, Tagliacozzo (1998) demonstra que nestes protocolos, a adição de reguladores

vegetais tem a missão de suprir as deficiências dos teores endógenos de hormônios vegetais nos explantes isolados da planta matriz. Lembrando que a concentração e o tipo de regulador vegetal devem estar diretamente relacionados com o tecido utilizado como explante e da espécie vegetal. No presente trabalho os benefícios alcançados pelas plântulas de *Aechmea blanchetiana* com a adição de auxina e citocinina podem ser visualizados na Figura 4, mostrando o desenvolvimento destas plântulas ao final de 90 dias do cultivo *in vitro* quando comparadas com as mesmas plântulas do início do experimento.



Figura 4. Plântulas de *Aechmea blanchetiana*: A) plântulas utilizadas para o a realização do presente trabalho, cultivadas em meio semi-sólido; B) plântulas após 75 dias de cultivo em meio líquido; C) plântulas após 90 dias de cultivo, advindas do meio líquido. Nov. 2010 - Centro de Apoio tecnológico Cantareira. São Paulo-SP

Na Figura 5 são apresentados os resultados para número de raízes e observou-se que tratamento com BAP (T2) diferiu estatisticamente da testemunha, embora não tenha apresentado diferenças estatísticas com relação aos tratamentos com BAP+IBA (T7), NAA (T4), Kt (T3), IBA (T5) e Kt+IBA (T9). Os tratamentos BAP + NAA

(T6) e Kt + NAA (T8) apresentaram os menores valores para esta variável não diferindo estatisticamente da testemunha.

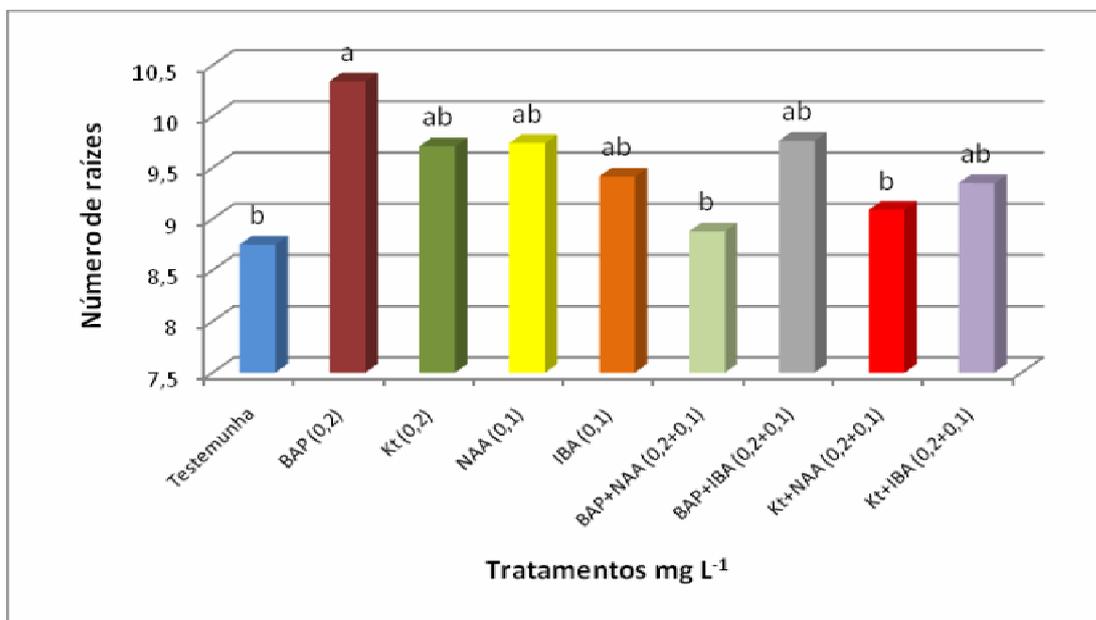


Figura 5. Número médio de raízes em *Aechmea blanchetiana* cultivadas *in vitro* sob a influência de diferentes reguladores vegetais. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade.

O mesmo comportamento pode ser visualizado na Figura 6 quanto ao comprimento da maior raiz, apresentando o tratamento com BAP raízes em torno de 107,75 mm diferindo estatisticamente da testemunha que apresentou valor em torno de 76,75 mm. O tratamento com BAP + NAA apresentou resultado inferior quando comparado aos demais tratamentos com reguladores vegetais, raízes com comprimento em torno de 79,25 mm.

O efeito negativo do tratamento com BAP + NAA também foi observado por Mercier e Kerbaux (1992) em seu trabalho com micropropagação de *Vriesea fosteriana*, empregando as mesmas concentrações do presente trabalho. Nos relatos dos autores estes dois reguladores vegetais estimularam o desenvolvimento de brotações nas combinações estudadas, no entanto, não houve enraizamento em nenhuma das concentrações por eles testadas. Os mesmos autores observaram que a adição de NAA ao meio nutritivo favoreceu o enraizamento quando aplicado isoladamente, cessando assim, a proliferação de

brotos e posteriormente promovendo o alongamento dos explantes. O mesmo ocorreu no presente trabalho em que os tratamentos com IBA e Kt não diferiram estatisticamente do melhor resultado representado neste trabalho pelo tratamento com BAP. Os autores ressaltam que no trabalho com *Vriesea* foi necessário adicionar NAA ao meio para promover o retorno da dominância apical e este fato favoreceu o processo de enraizamento.

Grattapaglia e Machado (1999) afirmam o contrário do que foi observado no presente trabalho ao relatar que se o “objetivo é o enraizamento dos explantes, a adição de reguladores vegetais, que não sejam as auxinas, é desnecessária ou mesmo prejudicial”. Pasqual e Hoshika (1992) com seu trabalho em *Gymnocalidium buldiamur/Mammillaria bocassana* L. e Barbosa et al. (1993) em seu trabalho com *Gerbera jamesonii* concordam com Grattapaglia e Machado (1999) demonstrando a ocorrência de enraizamento na ausência de BAP.

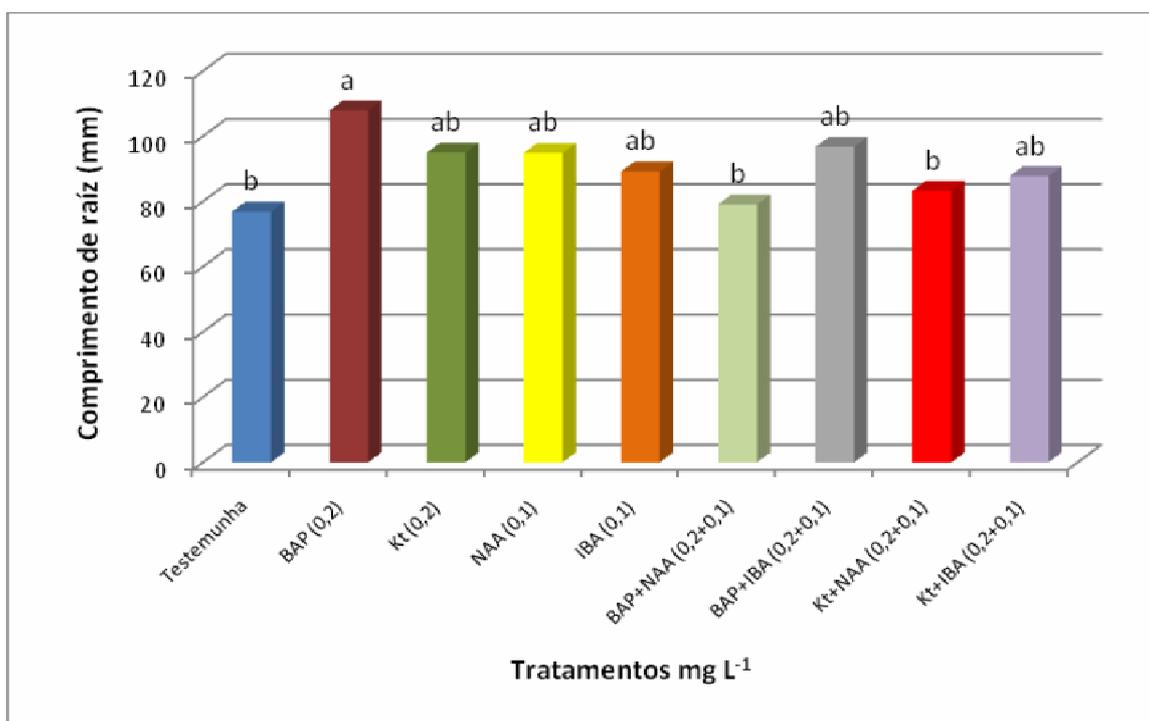


Figura 6. Comprimento médio da maior raiz em *Aechmea blanchetiana* cultivadas *in vitro* sob a influência de diferentes reguladores vegetais. Centro de Apoio Tecnológico Cantareira. São Paulo – SP – Nov. 2010. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Na Figura 7 o tratamento de melhor resposta em relação ao número de folhas foi a testemunha (MS sem reguladores vegetais) e foi possível notar, visualmente, menor número de folhas quando utilizado o tratamento com Kt + NAA (T8). Nos tratamentos com Kt, NAA, IBA, BAP + IBA e Kt + IBA foram obtidas respostas mais eficazes, porém sem diferenças estatísticas entre si. Os tratamentos com BAP e BAP + NAA apresentaram resultados inferiores, diferindo estatisticamente da testemunha.

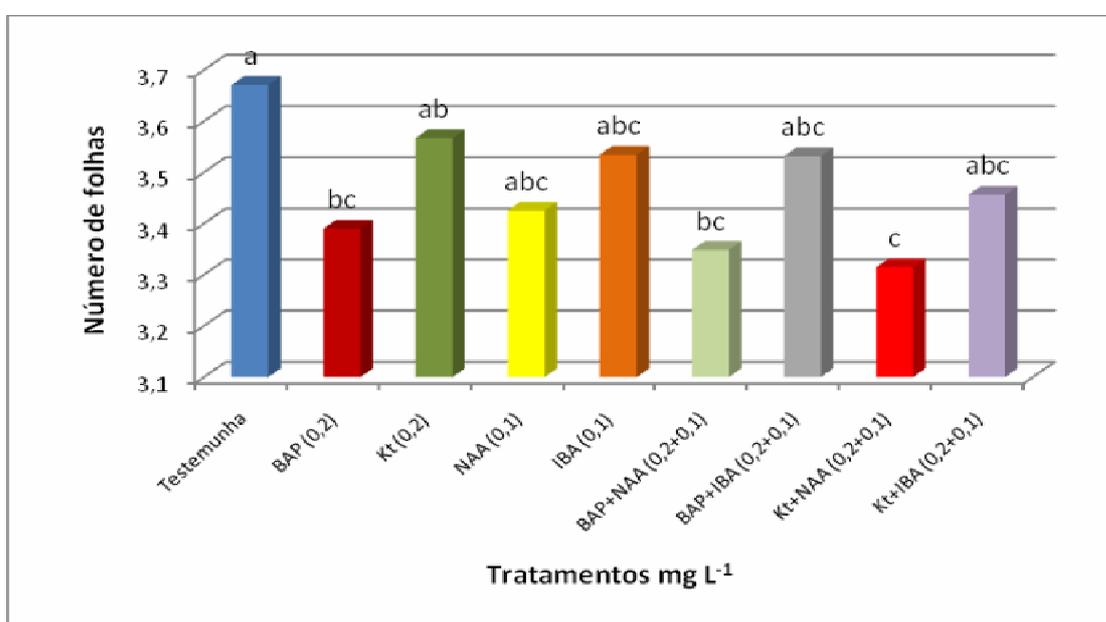


Figura 7. Número de folhas em *Aechmea blanchetiana* cultivadas *in vitro* sob a influência de diferentes reguladores vegetais. Centro de Apoio Tecnológico Cantareira. São Paulo – SP – Nov. 2010. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste T ao nível de 5% de probabilidade.

Este melhor desempenho apresentado pela testemunha, dependendo do objetivo do trabalho, pode ser interessante, pois favorece a redução de custos para a produção de mudas micropropagadas.

Resultado semelhante foi encontrado por Praxedes et al. (2001) em seu trabalho com estiolamento *in vitro* do abacaxizeiro ‘Pérola’ em presença de NAA e IAA, em que o tratamento controle foi superior.

Esta não diferença estatística entre os tratamentos para a variável número de folhas também foi observada por Macedo et al. (2003) na micropropagação de abacaxizeiro sob diferentes concentrações de NAA e BAP não ocorrendo diferenças significativas entre os três tratamentos estudados pelos autores ao longo dos 90 dias de experimento.

O comprimento em extensão das folhas (Figura 8) apresentou resposta significativa em função dos níveis de NAA e IBA, tratamentos T4 e T5 respectivamente. Taiz e Zeiger (2004) fazendo referência ao hormônio IBA, atribuíram a esta auxina o incremento no crescimento como sendo resultante do alongamento celular, uma vez que este hormônio tem a capacidade de propiciar a extensão da parede celular. Davis (1987) também relata que as auxinas são amplamente utilizadas no cultivo *in vitro* com o objetivo na indução de enraizamento, em baixas concentrações, além de promover a divisão celular e a alongamento dos tecidos.

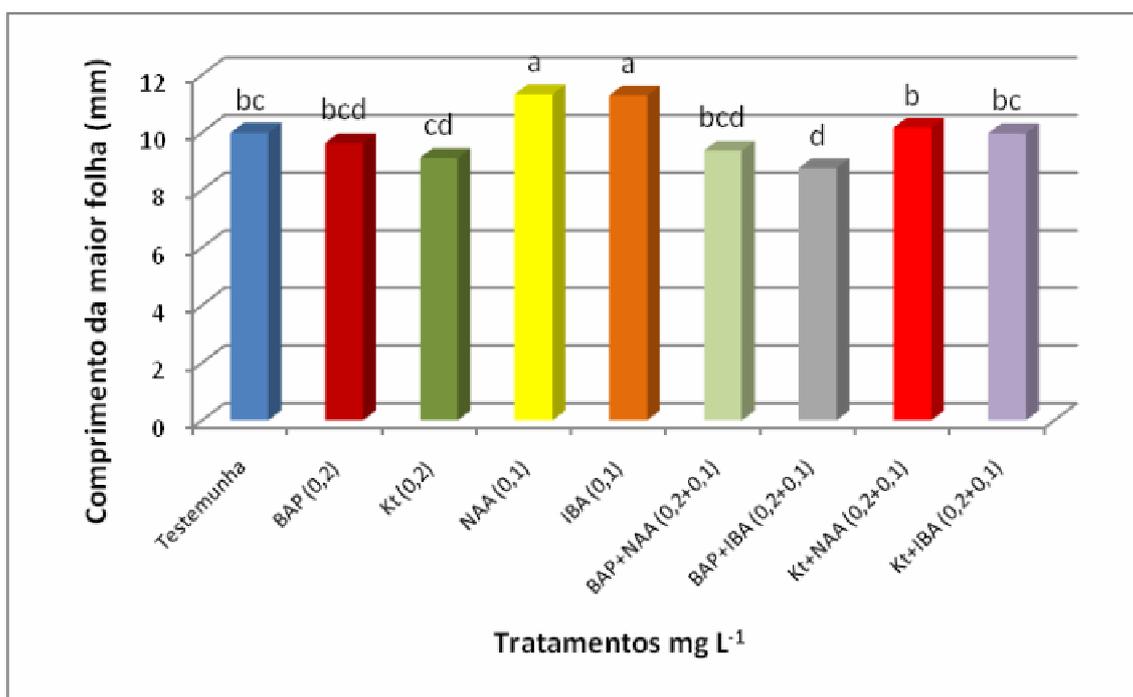


Figura 8. Comprimento da maior folha em *Aechmea blanchetiana* cultivadas *in vitro* sob a influência de diferentes reguladores vegetais. Centro de Apoio Tecnológico Cantareira. São Paulo – SP – Nov. 2010. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste T ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados mostrados na Figura 8 permitiram constatar que o tratamento de BAP em combinação com IBA (T7) apresentou desempenho insatisfatório, quanto ao comprimento da maior folha, quando comparado ao tratamento testemunha e aos melhores tratamentos.

Alguns fatores podem ter contribuído para o bom desenvolvimento da parte aérea *in vitro* de *Aechmea blanchetiana*, entre eles, a produção endógena de auxina pelas plantas, pois de acordo com Coll et al. (1988) as partes aéreas são fontes de intensa produção de auxina. Outro fator pode estar relacionado à raiz, pois ao se observar no presente trabalho os tratamentos com NAA e IBA nas Figuras 6 e 8, observa-se que o crescimento das mesmas não diferiram estatisticamente da testemunha, apresentando desenvolvimento intermediário quando comparado aos demais. Esta constatação está de acordo com Cuzzuo et al. (1996) que relatam em seus estudos que a raiz uma vez estabelecida tende a promover o crescimento da parte aérea.

O melhor resultado de matéria fresca da parte aérea foi obtido quando as plântulas de *Aechmea blanchetiana* foram cultivadas com BAP em combinação com NAA (T6) e também, quando cultivadas com IBA e NAA isoladamente (Tabela 3), apresentando massa fresca em torno 2,30 g diferindo estatisticamente do tratamento controle que apresentou 1,69 g. Este resultado pode ser observado também para os demais tratamentos, tendo o tratamento com Kt apresentado a menor massa de matéria fresca de plântulas (1,43g).

Resultado semelhante foi discutido por Lima et al. (2007), trabalhando com hortelã verde (*Mentha viridis* L.), que alcançaram as maiores médias de massa fresca da parte aérea com 2 mg L⁻¹ e 0,5 mg L⁻¹ de NAA, valores estes próximos aos utilizados no presente trabalho. Macedo et al. (2003) trabalhando com diferentes concentrações de BAP e NAA na micropropagação de abacaxizeiro com os mesmos níveis de reguladores vegetais usados por Lima et al. (2007) obtiveram vantagens não só no aumento de massa fresca como no aumento de maior número de brotos.

Tabela 3. Massa de matéria fresca da parte aérea (g) de *Aechmea blanchetiana* mantidas *in vitro* por 90 dias sob a influência de diferentes reguladores vegetais.

Reguladores vegetais	Médias
5-IBA (0,1 mg L ⁻¹)	2,35a
6-BAP (0,2 mg L ⁻¹) + NAA (0,1 mg L ⁻¹)	2,35a
4-NAA (0,1 mg L ⁻¹)	2,30a
1-Testemunha	1,69b
9-Kt (0,2 mg L ⁻¹) + IBA (0,1 mg L ⁻¹)	1,63b
2-BAP (0,2 mg L ⁻¹)	1,50b
7-BAP (0,2 mg L ⁻¹) + IBA (0,1 mg L ⁻¹)	1,48b
8-Kt (0,2 mg L ⁻¹) + NAA (0,1 mg L ⁻¹)	1,48b
3-Kt (0,2 mg L ⁻¹)	1,43 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

A massa de matéria seca da parte aérea, que é a expressão do crescimento real da parte aérea, no presente trabalho, não apresentou diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4. Massa de matéria seca da parte aérea (g) de plântulas de *Aechmea blanchetiana* mantidas *in vitro* por 90 dias sob a influência de diferentes reguladores vegetais.

Reguladores vegetais	Médias
3- Kt (0,2 mg L ⁻¹)	0,15a
4- NAA (0,1 mg L ⁻¹)	0,15a
7- BAP (0,2 mg L ⁻¹) + IBA (0,1 mg L ⁻¹)	0,15a
6- BAP (0,2 mg L ⁻¹) + NAA (0,1 mg L ⁻¹)	0,14a
2- BAP (0,1 mg L ⁻¹)	0,14a
5- IBA (0,1 mg L ⁻¹)	0,13a
1-Testemunha	0,13a
8- Kt (0,2 mg L ⁻¹) + NAA (0,1 mg L ⁻¹)	0,13a
9- Kt (0,2 mg L ⁻¹) + IBA (0,1 mg L ⁻¹)	0,13a

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

No cultivo *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* a maior massa de matéria fresca de raízes (Tabela 5) ocorreu na presença de NAA (T4) e este tratamento diferiu estatisticamente dos demais inclusive da testemunha. Apresentando massa na ordem de 0,24 g, valor este superior aos demais tratamentos, principalmente, em relação à testemunha que apresentou peso de 0,11g.

Tabela 5. Massa de matéria fresca de raízes (g) de plântulas de *Aechmea blanchetiana* mantidas *in vitro* por 90 dias sob a influência de diferentes reguladores vegetais.

Reguladores vegetais	Médias
4- NAA (0,1 mg L⁻¹)	0,24 a
3- Kt (0,2 mg L⁻¹)	0,20 b
7- BAP (0,2 mg L⁻¹) + IBA (0,1 mg L⁻¹)	0,18 b
8- Kt (0,2 mg L⁻¹) + NAA (0,1 mg L⁻¹)	0,18 b
6- BAP (0,2 mg L⁻¹) + NAA (0,1 mg L⁻¹)	0,16 bc
9- Kt (0,2 mg L⁻¹) + IBA (0,1 mg L⁻¹)	0,13 cd
2- BAP (0,2 mg L⁻¹)	0,13 cd
1-Testemunha	0,11 d
5- IBA (0,1 mg L⁻¹)	0,11 d

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Os tratamentos T6 (BAP + NAA) e T9 (Kt + IBA) embora apresentem os melhores resultados na avaliação de massa de matéria seca de raízes, estes não diferiram estatisticamente da testemunha e dos demais tratamentos (Tabela 6).

Tabela 6. Massa de matéria seca de raízes (g) de plântulas de *Aechmea blanchetiana* mantidas *in vitro* por 90 dias sob a influência de diferentes reguladores vegetais.

Reguladores vegetais	Médias
6- BAP (0,2 mg L ⁻¹) + NAA (0,1 mg L ⁻¹)	0,05 a
9- Kt (0,2 mg L ⁻¹) + IBA (0,1 mg L ⁻¹)	0,05 a
7- BAP (0,2 mg L ⁻¹) + IBA (0,1 mg L ⁻¹)	0,04 a
2- BAP (0,2 mg L ⁻¹)	0,04 a
3- Kt (0,2 mg L ⁻¹)	0,04 a
4- NAA (0,2 mg L ⁻¹)	0,04 a
1- Testemunha	0,04 a
8- Kt (0,2 mg L ⁻¹) + NAA (0,1 mg L ⁻¹)	0,03 a
5- IBA (0,1 mg L ⁻¹)	0,02 a

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

No presente estudo, embora os efeitos observados não tenham sido pronunciados quanto aos encontrados na literatura para os diversos reguladores vegetais utilizados, os resultados indicam o potencial dessas substâncias que podem influenciar no crescimento de plântulas da espécie *Aechmea blanchetiana*. No entanto, há necessidade de se averiguar o efeito dessas substâncias no meio de cultura visando estabelecer a concentração ótima para o melhor desenvolvimento da espécie em estudo.

5 CONCLUSÃO

Considerando os resultados observados no presente trabalho, pode-se concluir que a utilização de BAP, Kt, NAA e IBA em meio de cultura estimula o desenvolvimento *in vitro* da bromélia *Aechmea blanchetiana*.

BAP na concentração de 0,2 mg L⁻¹ estimulou maior número de raízes e maior comprimento de raiz, propiciando raízes em torno de 107,75 mm.

A presença dos reguladores NAA e IBA no meio líquido propiciaram o melhor resultado para o comprimento das folhas, ambos gerando desempenho satisfatório para a massa de matéria fresca de plântulas.

6 REFERÊNCIAS

ANDRADE, F. S. A.; DEMATTÊ, M. E. S. P. Estudo sobre a produção e comercialização de bromélias nas regiões sul e sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 5, n. 2, p. 97-110, 1999.

ARANDA-PERES, A. N. **Cultivo *in vitro* de bromélias da Mata Atlântica: micropropagação, avaliação nutricional e substrato para aclimação**. 2005. 125 f. (Tese Doutorado)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

ARAÚJO, A. G. **Crescimento *in vitro* e aclimação de plântulas de orquídeas**. 2004. 73 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

BARBOSA, M. H. P. et al. Efeitos da benzilaminopurina e ácido índole-3-acético sobre a propagação *in vitro* de *Gérbera jamesonii* Bolus ex. Hook cv. Appelbloesem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, n. 1, p. 15-19, 1993.

BARBOZA, S. B. S. C.; CALDAS, L. S.; SOUZA, L. A. C. Micropropagação do híbrido PExSC- 52 e da cultivar Smooth Cayenne de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, n. 8, p. 725-733, 2004.

BARRUETO CID, L. P. A propagação *in vitro* de plantas. **Biotecnologia Ciência & desenvolvimento**, Brasília, DF, n. 19, p. 16-21, mar./abr. 2001.

BORGATTO, F.; HAYASHI, T. K. Biotecnologia de plantas. In: CASTRO, P. R. C.; SENA, J. O. A.; KLUGE, R. A. (Eds.). **Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal**. Maringá: Eduem, 2002. p. 227-253.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Eds.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA, 1990. p. 37-70.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA/CNPH, 1998. v. 1, p. 87-132.

CARVALHO A. C. P. P.; MERCIER, H. Bromeliaceae. In: TEREIO, D.; CARVALHO, A. C. P. P.; BARROSO, T. C. S. F. (Eds.). **Flores tropicais**. Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológicas. 2005. p. 59-83.

CASTRO, P. R. C. Utilização de reguladores vegetais no sistema de produção da cana-de-açúcar. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE FISILOGIA DA CANA-DE-AÇÚCAR, 2002, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: STAB, 10 p. 1 CD-ROM.

COFFANI-NUNES, J. V.; FORZZA, R. C. Bromélias: a exploração e utilização dos recursos, seus impactos sócio-econômicos atuais e potencialidade de manejo sustentável. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE RECURSOS FLORESTAIS DA MATA ATLÂNTICA. RESERVA DA BIOSFERA, 1., Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Fundação S.O.S Mata Atlântica, EMBRAPA/CENARGEM. 2001. p. 40-44.

COLL, J. B. et al. **Fisiologia vegetal**. 6. ed. Madri: Pirâmide, 1988. cap.8. p. 569-570.

CORREIA, D. et al. **Efeito do ácido indolbutílico e do carvão ativado no enraizamento *in vitro* de brotos de abacaxi ornamental (*Ananas lucidus* Miller)**. Fortaleza: Embrapa, 2000. 3 p.

COSTA, A. **Estudo em bromélias**. Rio de Janeiro: UNIRIO, 1996. 21 p.

COSTA, A.; FONTOURA, T. Bromélias do Rio de Janeiro. **Ciência Hoje**, São Paulo, n. 9, p. 8-9, 1989.

CUZZUO L, G. R. F.; GALLO, L. A.; CROCOMO, O. J. Enraizamento de cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) *in vitro* e *ex vitro*. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 53, p. 60-66, 1996.

DAVIS, P. J. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: _____. **Plant hormones and their role in plant growth and development**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1987. p. 1-11.

ENGLERT, S. I. **Orquídeas e bromélias: manual prático de cultivo**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 96 p.

FORTES, G. R. L.; PEREIRA, J. E. S. Estabelecimento *in vitro* da ameixeira cv. América. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 23, n. 1, p. 183-185, 2001.

FRÁGUAS, C. B. et al. **Propagação *in vitro* de espécies ornamentais**. Lavras: Editora UFPA, 1999. (Boletim Técnico).

GALVANESE, M. S. et al. Efeito de ANA, 6-BA e ágar na propagação *in vitro* de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith, bromélia nativa da Mata Atlântica. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 54, n. 311, p. 63-67, jan./fev. 2007.

GRATTAPAGLIA, D. E.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa – SPI/Embrapa-CNPq, 1999. p. 183-260.

GUERRA, M. P. et al. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 34, p. 1557-1563, 1999.

HELLER, R. et al. Absorption et exsorption des tissus et fragments vegetaux en culture. In: SHIN, B. S.; MANGOLD, H. K.; STABA, E. J. **Les cultures de tissus de plantes**. Paris: CNRS. 1968. p. 149-169.

KAMPF, N. A. Argila expandida: um substrato para bromélias. **Revista da Sociedade Brasileira de Bromélias**, Rio de Janeiro, v. 2, p. 10-14, 1995.

KANASHIRO, S. **Nitrogênio, fósforo, potássio, calico e o crescimento de Plântulas de *Aechmea blanchetiana* (baker) l.b. smith *in vitro***. 2005. 187 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2005.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: CBAB/EMBRAPA, 1998. p. 519-531.

LEME, E. M. C.; MARIGO, L. C. **Bromélia na natureza**. Rio de Janeiro: Marigo Comunicação Visual, 1993. 183 p.

LIMA, C. S. M. et al. Influência de fitorreguladores no crescimento *in vitro* de partes aéreas de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 669-671, 2007.

LORENZI, H.; MELLO-FILHO, L. E. **As plantas tropicais de R. Burle Max**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2001. 488 p.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1998. 1088 p.

MACEDO, C. E. C. et al. Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro L. Merrill (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p. 501-504, 2003.

MELO, T. B. As bromélias no paisagismo. **Bromélia**, Rio de Janeiro, n. 1, v. 3, p. 3-7, 1996.

MENDES, G. C. et al. Multiplicação *in vitro* de explantes de *Billbergia distachia* (Vellozo) MEZ (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 972-974, 2007.

MENGARDA, L. H. G. et al. Estado físico do meio de cultura na propagação *in vitro* de bromeliácea. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 10, n. 6, p. 469-474, 2009.

MERCIER, H.; KERBAUY G. B. *In vitro* multiplication of *Vriesea fosteriana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 30, p. 247-249, 1992.

MERCIER, H.; NIEVOLA, C. C. Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. **Vidalia**, Viçosa, v. 1, n. 1, p. 57-62, jul./dez. 2003.

MOREIRA, B. A.; WANDERLEY, M. G. L.; BARROS, M. A. V. C. **Bromélias: importância ecológica e diversidade. Taxonomia e Morfologia.** Curso de capacitação de monitores e educadores. São Paulo: Instituto de Botânica, 2006. 12 p.

MOREIRA, M. J. S. **Conservação *in vitro* de bromeliáceas.** 2008. 61 f. Dissertação (Mestrado)- Centro de Ciências e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2008.

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

NASCIMENTO, M. G. A. **Morfogênese *in vitro* do híbrido de orquídea *Brassavola flagellaris* x *Cattleya harrisoniana*.** 2007. 42 f. Dissertação (Mestrado)-Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2007.

NUNES, J. V. C. **Estudo florístico e fenomorfológico de tillandsioideae: Bromeliaceae na Serra do Cipó, MG.** 1997. 129 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)-Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

OLIVEIRA, P. D. 1994. **Propagação *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* Tzelev.) cv. *Orange reagen*.** 1994. 116 f. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1994.

PASQUAL, M. **Meios de cultura.** Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 74 p. (Textos Acadêmicos).

PASQUAL, M.; HOSHIKA, E. Efeitos do ácido naftalenoacético e 6-benzilaminopurina sobre a proliferação *in vitro* de cactos *Gymnocalycium buldianum* L. e *Mammillaria bocassana* L. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, n. 4, p. 589-593, 1992.

PASQUAL, M.; MOREIRA, M. A.; ANJOS SOBRINHO, A. Biotecnologia aplicada à produção de mudas de abacaxi. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 19, n. 195, p. 20-23, 1998.

PASQUAL, M. et al. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 26, n. 1, p. 45-49, 2008.

PAULA, C. C. **Cultivo de bromélias**. Viçosa: Aprenda Fácil. 2000. 140 p.

PAULA, C.C.; SILVA, H. M. P. **Cultivo prático de bromélias**. Viçosa: UFV, 2001. 73 p.

PRAXEDES, S. C. et al. **Estiolamento *in vitro* do abacaxizeiro pérola em presença de ANA e AIA**. **Caatinga**, Mossoró, v. 14, n.1/2, p. 13-15, dez. 2001.

PEIXOTO P. H. P.; PASQUAL, M. Micropropagação da videira: efeitos do pH e do ágar. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 42, p. 431-443, 1995.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 38, n. 9, p. 1035-1043, 2003.

PEREIRA, E. O. et al. Desenvolvimento de protocolos para micropropagação de espécies de *Bromeliaceae*. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 13.; ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 9., São José dos Campos. **Anais...** São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2009.

PERES, L. E. P. As bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*: um conhecimento útil para o desenvolvimento de protocolos biotecnológicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, n. 25, p. 44-48, 2002.

RAVEN P. H.; EVERT R. F.; EICHHORN S. E. **Biology of plants**. 6. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1999. 944 p.

REITZ, R. Bromeliaceas e a malaria: bromélia endêmica. **Flora Ilustrada Catarinense**, Itajaí, v. 1, p. 1-518, 1983.

RODRIGUES, T. M. et al. Desenvolvimento de mudas de bromélia-imperial (*Alcantarea imperialis*) em diferentes substratos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, p. 757-763, 2004.

SILVA, E. F. **Multiplicação e crescimento *in vitro* de orquídea *Brassiocattleya* (Pastoral x *Laeliocattleya Amber Glow*)**. 2003. 62 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SILVA, A. L. L. et al. Micropropagação de *Dyckia maritima* Baker: Bromeliaceae. **Iheringia**, Série Botânica, Porto Alegre, v. 63, n. 1, p. 135-138, 2008.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. **Flora neotropica**. Bromeliodeae (Bromeliaceae). New York: The New York Botanical Garden, 1979, p. 1491-2141.

TAGLIACOZZO, G. M. D. Fitohormônios e seus efeitos biológicos *in vitro in vivo*. In: TOMBOLATO, A. F.; COSTA, A. M. M. (Coords.). Micropropagação de plantas ornamentais. **Boletim Técnico Instituto Agrônomo de Campinas**, Campinas, n. 174, p. 1-72, 1998.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 820 p.

TAKANE, R. J. et al. Influência do cloreto de cálcio no crescimento de explantes de *Gypsophila paniculata* L. (Caryophyllaceae) cultivados *in vitro*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 52, n. 2, p. 235-239, 1994.

TORRES, A. C. et al. Meio e condições de incubação para cultura de tecidos de plantas. **Embrapa Hortaliças**, Brasília, DF, n. 24, 2001. 20 p. (Circular Técnica).

UZZO, R. P. Panorama da floricultura no cenário nacional. **Revista Campo e Negócio**, Uberlândia, n. 39, p. 68-70, 2008.

VIANA, F. A. P. **Morfologia, anatomia e desenvolvimento pós-seminal de cinco espécies de Bromeliacea**. 2007. 79 f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

VITARI, M. Bromélia: produção e proteção. **Ecologia e Desenvolvimento**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 37, p. 15-17, 1994.