



Scientia Agraria

ISSN: 1519-1125

sciagr@ufpr.br

Universidade Federal do Paraná

Brasil

Golin MENGARDA, Liana Hilda; POVOAS, Luciano; DEBIASI, Clayton; PESCADOR, Rosete
ESTADO FÍSICO DO MEIO DE CULTURA NA PROPAGAÇÃO IN VITRO DE BROMELIACEAE
Scientia Agraria, vol. 10, núm. 6, noviembre-diciembre, 2009, pp. 469-474

Universidade Federal do Paraná
Paraná, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=99512492007>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto



Scientia Agraria

ISSN 1519-1125 (printed) and 1983-2443 (on-line)

ESTADO FÍSICO DO MEIO DE CULTURA NA PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE BROMELIACEAE

THE PHYSICAL STATE OF THE CULTURE MEDIUM ON THE BEHAVIOR *IN VITRO* OF BROMELIACEAE

Liana Hilda Golin MENGARDA¹
Luciano POVOAS¹
Clayton DEBIASI²
Rosete PESCADOR³

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do estado físico do meio de cultura sobre o comportamento de *Neoregelia cruenta*, *Tillandsia stricta*, *Vriesea gigantea*, *V. guttata* e *V. incurvata*. Brotos micropagados foram cultivados em meio de cultura MS, com 30 g de sacarose, 2,5 mg dm⁻³ BAP, e 0,5 mg dm⁻³ ANA estabelecendo os seguintes tratamentos: T1-semi-sólido com 7 g de ágar; T2- líquido estático; T3- líquido sob-agitação a 90 rpm; e T4- líquido com ponte de papel filtro. Após 30 dias de cultivo, a utilização do meio de cultura líquido estático apresentou melhores resultados em relação à taxa média proliferativa em todas as espécies (9,4 brotos explante⁻¹ em *N. cruenta*, 5,6 em *T. stricta*, 11,5 em *V. gigantea*, 9,2 em *V. guttata* e 3,9 em *V. incurvata*). Em relação à altura média dos brotos, destacou-se para *N. cruenta* o meio líquido sob agitação (2,83 cm), para *T. stricta* e *V. incurvata* o semi-sólido (1,76 cm e 2,02 cm, respectivamente) e para *V. gigantea* e *V. guttata* o líquido estático (0,61 cm e 1,48 cm, respectivamente). A utilização do meio de cultura MS líquido estático mostrou-se como sendo o mais adequado para o cultivo *in vitro* das espécies de bromeliáceas estudadas.

Palavras-chave: micropagação; conservação da biodiversidade; bromélias ornamentais.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of the physical state of the culture medium on the behavior *in vitro* of the bromeliaceas *Neoregelia cruenta*, *Tillandsia stricta*, *Vriesea gigantea*, *V. guttata* e *V. incurvata*. Micropropagated shoots had been cultivated in culture medium MS, with 30 g sucrose, 2,5 mg dm⁻³ BAP, and 0,5 mg dm⁻³ ANA, establishing the treatments: T1- half-solid with 7 g agar; T2- static liquid; T3- liquid under-agitation of 90 rpm; and T4- static liquid with bridge of paper filter. After 30 days, the use of static way of liquid culture presented better results in relation to the average proliferative rate in all the species (9.4 shoots in *N. cruenta*, 5.6 in *T. stricta*, 11.5 in *V. gigantea*, 9.2 in *V. guttata* and 3.9 in *V. incurvata*). In relation the average height of the shoots, was distinguished for *N. cruenta* the liquid under-agitation (2.83 cm), *T. stricta* and *V. incurvata* the semisolid (1.76 cm and 2.02 cm, respectively) and *V. gigantea* and *V. guttata* the static liquid (0.61 cm and 1.48 cm, respectively). The use of medium MS static liquid was more suitable for *in vitro* culture of bromeliads species studied.

Key-words: micropagation; biodiversity conservation; ornamental bromeliads.

¹Biólogo (a), Universidade Regional de Blumenau. Laboratório de Biotecnologia e Micropagação Vegetal, Universidade Regional de Blumenau (FURB), Blumenau, Santa Catarina, Brasil. E-mail: liana_ya@yahoo.com.br. e-mail: povoasbio@yahoo.com.br

²Engº Agrº, Drº em Agronomia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Laboratório de Micropagação, Universidade de Paulista "Júlio de Mesquita Filho"(UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil. E-mail: claytondebiasi@gmail.com

INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae é representada por aproximadamente 3.086 espécies distribuídas em 58 gêneros (Luther, 2006), cuja ocorrência vai desde o sul da América do Norte até a Patagônia (Wanderley et al., 2007). Possui grande diversidade nas florestas pluviais, sendo seu endemismo marcante, tem importância econômica em muitos países, seja como alimento, planta ornamental ou fornecedora de substâncias de interesse industrial (Reitz, 1983; Oliveira, 2004).

A importância das bromélias como plantas ornamentais é o principal fator que leva várias espécies nativas a categoria de ameaçadas de extinção, pois muitas vezes são foco de extrativismo (Reitz, 1983). Em função disto, é crescente o interesse na aplicação de técnicas de micropopulação na conservação destas espécies, permitindo a exploração eficiente das mesmas, em comparação com a multiplicação vegetativa natural, considerada lenta e de baixo rendimento em termos de número de mudas produzidas (Droste et al., 2005).

O estabelecimento e a propagação *in vitro* de uma espécie estão submetidos aos mais diversos fatores. Entre os mais importantes citam-se os nutrientes minerais e reguladores de crescimento no meio de cultura que, em combinação com outros fatores, como o estado físico, proporciona a propagação efetiva de cada espécie (Kozay et al., 1997; Fortes & Pereira, 2001). A alteração do estado físico do meio de cultura modifica a resistência física e de contato dos explantes com o meio, podendo influenciar no desenvolvimento de plântulas *in vitro* (Chen & Ziv, 2001). Assim, o maior contato dos explantes com meio, que acontece nos cultivos em meio líquido, pode aumentar a absorção de água e nutrientes quando comparado ao meio semi-sólido, favorecendo a taxa de assimilação de nutrientes, altura e multiplicação de brotos e, ainda, acúmulo de massa seca (Pereira & Fortes, 2003). O estado físico do meio de cultura, portanto, pode estar relacionado ao desempenho assimilatório das plantas durante o período de cultivo do material vegetal (Ziv, 1995). Sendo assim, o estabelecimento de protocolos de micropopulação requer a aplicação de vários ensaios, a fim de estabelecer o melhor meio de cultura para determinada espécie, já que, de acordo com as características genéticas, cada uma pode apresentar respostas diferentes sob as mesmas condições de cultivo (Ziv, 1995; Fortes & Pereira, 2001).

O estado físico do meio de cultura pode ser alterado pela exclusão ou adição de ágar, modificando, assim, a disponibilidade de água, nutrientes e dos reguladores de crescimento (Grattapaglia & Machado, 1998). A utilização de meios de cultura líquidos, ou seja, sem a adição do ágar, tem proporcionado igual ou até maior

sentido, alguns estudos relacionados com o físico do meio de cultura em bromeliáceas têm sido realizados, principalmente com abacaxi (Escalona et al., 1999; Feuser et al., 2001; Cunha et al., 2007), com o objetivo de facilitar o processo de manipulação da cultura e, especialmente, baratear os custos deste sistema de propagação. No entanto, poucas espécies de bromélias apresentam protocolo estabelecido e otimizado para a micropopulação. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito do estado físico do meio de cultura na micropopulação de espécies nativas de bromeliáceas, endêmicas da Mata Atlântica e com potencial ornamental, através da avaliação da taxa de proliferação e altura dos brotos formados.

MATERIAL E MÉTODOS

Exemplares de *Neoregelia ciliata*, *Tillandsia stricta*, *Vriesea gigantea*, *Vriesea sphaerocalyx* e *Vriesea incurvata*, estabelecidos *in vitro*, mantidos em meio de cultura MS 0 semi-sólido (desprezando os reguladores de crescimento) e conservados em câmara germinativa, forneceram os explantes iniciais (brotos com $\pm 1,0$ cm de altura). Os explantes (dez explantes/tratamento⁻¹) e os tratamentos foram transferidos para tubos de cultura (0,05 dm³), contendo 0,01 dm³ de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com sacarose (30 g), reguladores de crescimento (benzilaminopurina BAP (2,5 mg dm⁻³) e naftalenoacético ANA (0,5 mg dm⁻³), e pH ajustado para 5,8. Tais reguladores e concentrações foram utilizadas de acordo com ensaios preliminares publicados, nos quais tal protocolo se mostrou adequado para multiplicação de bromeliáceas *in vitro*. Foram estabelecidos os tratamentos: T1- meio semi-solidificado com 7 g ágar; T2- líquido estéril; T3- líquido sob agitação rotatória a 90 rpm; T4- líquido estático com ponte de papel filtro. O meio de cultura foi mantido em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h dia⁻¹ (50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

As características biológicas avaliadas após 30 dias de cultivo foram: taxa média proliferativa por explante (número médio de brotações formadas) e a altura média dos brotos, além da ocorrência de hiperidridicidade nos tratamentos. O experimento foi estabelecido em DIC (design inteiramente casualizado), com 10 repetições/tratamento (cada repetição representada por 10 explantes). A interpretação dos dados foi baseada em análise de variância (ANOVA) e teste de probabilidade de erro.

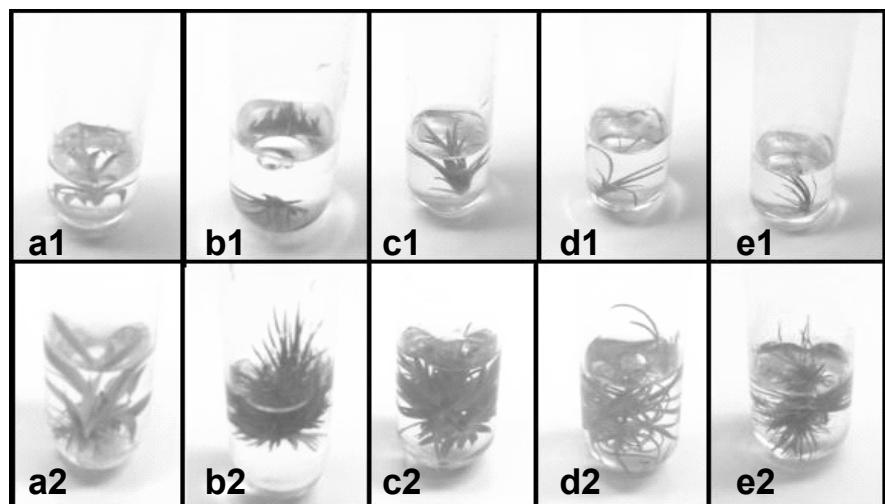
RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa média proliferativa dos explantes, após 30 dias de cultivo *in vitro*, foi significativamente conforme o estado físico do meio de cultura em todas as espécies estudadas (Figura 1).

TABELA 1 – Taxa média proliferativa *in vitro* (brotos explante⁻¹) de *N. cruenta*, *T. stricta*, *V. gigantea*, *V. guttata* e *V. incurvata*, aos 30 dias de cultivo, nos diferentes meios de cultura.

Tratamentos	<i>Neoregelia cruenta</i>	<i>Tillandsia stricta</i>	<i>Vriesea gigantea</i>	<i>Vriesea guttata</i>	<i>Vriesea incurvata</i>
T1	1,1 c	1,0 b	4,3 b	2,9 b	1,7 b
T2	9,4 a	5,6 a	11,5 a	9,2 a	3,9 a
T3	3,5 b	0,0 c	5,2 b	0,0 c	0,3 c
T4	2,0 bc	0,7 bc	4,9 b	5,1 b	0,8 bc
CV %	39,04	39,28	46,65	52,82	59,62
DMS	1,88	0,87	3,57	2,75	1,20

T1= meio semi-solidificado com 7g dm⁻³ de ágar; T2= meio líquido estático; T3= meio líquido sob agitação rotatória a 120 rpm; T4= meio líquido estático com ponte de papel filtro. Letras referem-se à diferença entre os tratamentos. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$), $n=10$. CV% = coeficiente de variação; DMS = diferença mínima significativa.

FIGURA 1 – Explantes de Bromeliaceae cultivados no tratamento 2 (líquido estático), sendo 1 representando o dia 0, e 2 representando o mesmo tratamento após 30 dias. a- *Neoregelia cruenta*. b- *Tillandsia stricta*. c- *Vriesea gigantea*. d- *Vriesea guttata*. e- *Vriesea incurvata*.

Para as bromélias do presente estudo, observou-se que, de modo geral, o tratamento T2 (meio líquido estático) foi o que proporcionou as maiores taxas proliferativas. Assim, observou-se para *N. cruenta* o número médio de 9,4 brotos explante⁻¹, bem como 5,6, para *T. stricta*, o valor de 11,5 para *V. gigantea*; 9,2 para *V. guttata* e por último 3,9 para *V. incurvata*, todos significativamente superiores aos números médios obtidos nos demais tratamentos para cada espécie.

Culturas como aspargo (*Asparagus officinalis*) e gengibre (*Zingiber officinale*), têm preferências pelo meio de cultura semi-sólido para seu estabelecimento e propagação *in vitro*, enquanto as bromélias, de forma geral, respondem melhor ao meio de cultura líquido (Murashige, 1974).

Ainda com relação aos representantes da família das bromeliáceas, o comparando com

(Bromeliaceae) observaram resultados eficientes com a utilização de meio de líquido e Oliveira et al. (2007), também verificaram melhores resultados quanto à multiplicação de abacaxi ornamental foi feita também em líquido.

Por outro lado, o uso de meio sólido pode não ser tão satisfatório para bromeliáceas. Barboza et al. (2004) destacaram a utilização do meio de cultura semi-sólido para propagação *in vitro* de dois genótipos de abacaxizeiro (*Ananas comosus*), a cultivar São Cayenne e o híbrido PExSC-52, apesar de promover taxas proliferativas satisfatórias, levaram à formação de aglomerados de gemas minúsculos brotos, o que dificulta o trabalho de subcultivo e individualização.

Os resultados referentes à taxa proliferativa obtidas para *N. cruenta*, no pr

líquido estático, com 9,2 brotos explante⁻¹, e T3-líquido sob agitação rotatória a 90 rpm, com 3,5 brotos explante⁻¹). Já o tratamento T1, que representava o meio de cultura semi-sólidificado com 7 g dm⁻³ ágar, induziu a menor média de produção de novos brotos nesta espécie (1,1 brotos explante⁻¹), não diferindo estatisticamente do T4-líquido estático com ponte de papel filtro (2,0 brotos explante⁻¹), conforme pode ser observado na Tabela 1.

Borges et al. (2001) descreveram que gemas laterais de *Ananas porteanus* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS líquido, suplementado com 1,0 mg dm⁻³ de BAP e 0,5 mg dm⁻³ ANA, após 60 dias de cultivo, apresentaram taxa média de proliferação de 13 novos brotos explante⁻¹, média significativamente superior àquelas obtidas em meio de cultura semi-solidificado suplementado com a mesma concentração de reguladores. Rech Filho et al. (2008) também observaram o melhor resultado quanto à taxa proliferativa ao utilizar meio de cultura MS líquido em culturas nodulares de *Vriesea reitzii* objetivando a formação de novos brotos.

Alvard et al. (1993) avaliaram o estado físico do meio de cultura (líquido e sólido), na multiplicação *in vitro* de bananeira em seis tratamentos: 1- semi-solidificado com ágar; 2- líquido com imersão das plantas; 3- líquido com suporte de papel; 4- líquido com imersão parcial das plantas; 5- líquido com aeração de borbulhas e; 6- líquido com imersão temporária – 20 min a cada 2 h. Após 20 dias de cultivo, três grupos estatisticamente diferenciados se destacaram: o primeiro grupo, formado pelos meios de cultura líquido com imersão das plantas e líquido com suporte de papel, nos quais praticamente não houve proliferação; o segundo grupo, pelos meios de cultura semi-solidificado com ágar e líquido com aeração de borbulhas, nos quais observaram taxas de proliferação média de 2,2 a 3,1 brotos e; o terceiro grupo, pelo meio de cultura líquido com imersão temporária – 20 min a cada 2 h, o qual apresentou média superior de 5 brotos explante⁻¹. Já Prasad & Gupta (2006) cultivaram brotos laterais de gladiolo (*Gladiolus hybridus* Hort. Cv. *Hedding Bouquet*) em meios de cultura semi-sólido (ágar), líquido com suporte de membrana, e líquido com suporte de espuma, todos adicionados com 1,0 mg dm⁻³ de ANA e 2,0 mg dm⁻³ de BAP e obtiveram a melhor resposta a partir da utilização do meio de cultura líquido com suporte de membrana, com média de 33,15 brotos explante⁻¹.

Segundo Alvard et al. (1993) e Grattapaglia & Machado (1998), normalmente os cultivos *in vitro* realizados em meios de cultura líquidos requerem suporte ou agitação para o fornecimento de oxigênio necessário ao metabolismo do explante, garantindo a divisão e a diferenciação para formação de brotos. No entanto, os protocolos variam de acordo com a espécie e o tipo de explante. No presente trabalho, os resultados observados para todos os parâmetros

melhores resultados em termos de proliferação (Tabela 1). A imersão constante dos explantes no meio de cultura parece não afetar negativamente o comportamento *in vitro* das espécies estudadas. Observou-se, ainda, que *T. stricta*, *V. guttata* e *V. incurvata*, quando cultivadas no meio líquido com agitação rotatória a 90 rpm (T3), praticamente não proliferaram, apresentando as menores médias estatisticamente diferentes dos demais tratamentos.

De acordo com os resultados apresentados, ficou evidente que a utilização de meio de cultura de consistência líquida sob condição estática proporcionou maior taxa de multiplicação. Este resultado tem suporte em trabalhos de Levin et al. (1997) e Chen et al. (2001), os quais apontam que no meio de cultura líquido ocorre aumento da disponibilidade de nutrientes, não existindo resistência física à absorção, quando comparado ao que ocorre nos meios de cultura de consistência semi-sólida. Caldas et al. (1990) e Ziv (1995) afirmam que o maior crescimento das explantes com o meio de cultura faz com que a taxa de assimilação de nutrientes pelo material vegetal, durante o cultivo *in vitro*, seja favorável, enquanto que o meio semi-solidificado tem a propriedade de impor restrições à velocidade de difusão de nutrientes, podendo até mesmo causar deficiência em alguns casos.

Verificaram-se resultados expressivos em praticamente todas as espécies estudadas, quando cultivadas em meio de cultura solidificado com 7 g dm⁻³ ágar (Tratamento T1), que é utilizado como agente gelificante no meio de cultura. O ágar age sobre o potencial mátrico, alterando a disponibilidade de água, nutrientes e reguladores para o crescimento, modificando assim a condição física do meio de cultura (Grattapaglia & Machado, 1998). Segundo Caldas et al. (1990), é possível obter concentrações ótimas de sais num meio de cultura solidificado devam ser mais elevadas que as ótimas em um meio líquido, além de ele impor restrições físicas à velocidade de difusão de nutrientes. Assim, a adição ou exclusão de um componente ao meio de cultura, pode apresentar efeitos significativos que estarão atuando de forma diferenciada sobre o desenvolvimento vegetativo.

Em relação à altura média dos explantes formados, observou-se pouca variação entre os tratamentos dentro de cada espécie estudiada (Tabela 2).

O tratamento T1 (semi-solidificado com 7 g dm⁻³ de ágar), que apresentou menor taxa de proliferação quando comparado com os demais tratamentos, no parâmetro altura média dos explantes, induziu médias superiores em três das quatro espécies em estudo (*T. stricta*, com 1,76 cm; *V. guttata*, com 1,48 cm; e *V. incurvata*, com 2,02 cm de altura), porém não havendo, para esta última espécie, diferença estatística entre T1 e T2. Debiasi et al. (2002), a média proliferativa e a altura média dos brotos *in vitro* não foram

menor será o seu tamanho, o que pode explicar os resultados obtidos no presente trabalho.

Para a espécie *V. gigantea* não houve diferença estatística quanto a altura dos brotos entre

os tratamentos testados. Já *N. cruenta* teve crescimento quando cultivadas no tratamento (meio líquido estático) não diferente estatisticamente de T1 e T3.

TABELA 2 - Altura média (cm) dos brotos formados *in vitro* de *N. cruenta*, *T. stricta*, *V. gigantea*, *V. guttata* e *V. incurvata*, aos 30 dias de cultivo, nos diferentes meios de cultura.

Tratamentos	<i>Neoregelia cruenta</i>	<i>Tillandsia Stricta</i>	<i>Vriesea gigantea</i>	<i>Vriesea guttata</i>	<i>Vriesea incurvata</i>
T1	1,7 ab	1,76 a	0,37 ab	1,48 ab	2,02 a
T2	2,83 a	1,51 ab	0,61 ab	1,3 ab	1,56 a
T3	2,07 ab	1,1 b	0,27 ab	1,2 ab	1,28 a
T4	1,57 b	1,47 ab	0,41 ab	1,35 ab	1,77 a
CV %	48,22	29,33	76,56	55,05	30,02
DMS	1,19	0,52	0,39	0,88	0,60

T1= meio semi-solidificado com 7g dm⁻³ de ágar; T2= meio líquido estático; T3= meio líquido sob agitação rotatória a 120 rpm; T4= meio líquido estático com ponte de papel filtro. Letras referem-se à diferença entre os tratamentos. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$, $n=10$). CV% = coeficiente de variação; DMS = diferença mínima significativa.

Segundo Carneiro et al. (1998), variações na taxa de multiplicação, e diferentes padrões de crescimento, podem ser atribuídos ao genótipo, sugerindo que as diferenças dos genótipos estudados no presente trabalho é que levaram às variações obtidas quanto à resposta às condições físicas do meio de cultura. Pode-se dizer, ainda, que o uso de um meio de cultura apropriado e ajustado para cada espécie é necessário para que se obtenha uma condição na qual o metabolismo das células vegetais em cultivo *in vitro*, estabeleça padrões que levem à diferenciação de tecidos, acompanhado também pelo crescimento dos mesmos.

Chen & Ziv (2001) apontam que, apesar das vantagens da utilização de meios de cultura líquidos sobre os semi-solidificados, o meio líquido pode não ser adequado para determinadas espécies, uma vez que pode induzir a hiperidricidade das brotações. Tal fato pode ser atribuído ao provável aumento na absorção dos

nutrientes e reguladores do meio que ocorrem apenas através da base, mas por toda superfície. A hiperidricidade pode drasticamente o processo de aclimatação de micropropagadas *in vitro*, pois estas possuem menor teor de massa seca que plantas normais, são menos lignificadas estando, assim, susceptíveis a perdas de material durante o processo (Hazarika, 2006). Neste trabalho, também não foram observados sinais de hiperidricidade em nenhuma das espécies estudadas, verificado, portanto, uma adequação dos genótipos para o cultivo em meio líquido.

CONCLUSÕES

De acordo com os parâmetros avaliados neste estudo, é possível concluir que a utilização de meio de cultura MS líquido é mostrada como sendo o mais adequado para o cultivo *in vitro* para todas as espécies de bromélias estudadas sem ocasionar sinais de hiperidricidade.

REFERÊNCIAS

1. ALVARD, D.; COTE, F.; TEISSON, C. Comparison of methods of liquid medium cultures for banana micropropagation: effect of temporary immersion of explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 32, n. 1, p. 55-60, 1993.
2. BARBOZA, S. B. S. C.; CALDAS, L. S.; SOUZA, L. A. C. Micropagragação do híbrido PExSC-52 e da cultivar Cayenne de abacaxizeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 39, n. 8, p. 725-733, 2004.
3. BORGES, N. S. S.; CORREIA, D.; LIMA, R. N. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de brotos de uma bromélia ornamental *Ananas porteanus* Hort Veitch ex C. Koch. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001. 5 p.
4. 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: ABCTP/EMBRAPA - CNPH, 1990. p. 37-69.
5. CARNEIRO, L. A. et al. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L. B. Smith, an ornamental bromeliad from Eastern Brazil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 55, n. 2, p. 79-83, 1998.
6. CHEN, J.; ZIV, M. The effect of ancyymidol on hyperhydricity, regeneration, starch and antioxidant enzymatic activity in liquid-culture *Narcissus*. *Plant Cell Reports*, v. 20, n. 1, p. 22-27, 2001.
7. DEBIASI, C. et al. Correlação entre a capacidade proliferativa *in vitro* e a dominância apical *in vivo* da bananeira grand naine e nanicão. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 24, n. 3, p. 597-600, 2002.
8. DROSTE, A. et al. *In vitro* culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocochuri*: Two vulnerable bromeliads from the Amazon. *Plant Cell Reports*, v. 21, n. 1, p. 10-14, 2002.

MENGARDA, L.H.G. et al. Estado físico do meio de cultura na propagação...

9. ESCALONA, M. et al. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Reports*, v. 18, n. 9, p. 743-748, 1999.
10. FEUSER, S.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Eficiência comparativa dos sistemas de cultura estacionária e temporária para a micropopulação do abacaxizeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 23, n. 1, p. 6-10, 2001.
11. FORTES, G. R. L.; PEREIRA, J. E. S. Estabelecimento *in vitro* da ameixeira cv. América. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 23, n. 1, p. 183-185, 2001.
12. GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropopulação. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. 1. ed. Brasília: EMBRAPA - SPI/EMBRAPA - CNPQ, p. 864.
13. HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, v. 108, n. 2, p. 120, 2006.
14. KOZAY, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B. R.; Environmental control for large-scale production of plants through techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 51, n. 1, p. 49-56, 1997.
15. LEVIN, R. et al. Methods and apparatus for liquid media and semi-automated micropopagation. *Acta Horticulturae*, v. 447, n. 1, p. 659-664, 1997.
16. LUTHER, H. E. *An alphabetical list of bromeliads binomial*. 10. ed. Sarasota: The Marie Selby Botanical Gardens, 2006. 119 p.
17. MURASHIGE, G.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tabaco tissues culture. *Physiologia Plantarum*, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
18. MURASHIGE, T. Plant propagation through Tissue Cultures. *Annual Review Plant Physiology*, v. 25, p. 135-166, 1974.
19. OLIVEIRA, M. K. T. et al. Propagação *in vitro* da cultura do abacaxizeiro ornamental (*Ananas lucidus* Miller). *Caatinga*, v. 20, n. 3, p. 167-171, 2007.
20. OLIVEIRA, R. R. Importância das bromélias epífitas na ciclagem de nutrientes da Floresta Atlântica. *Acta Brasiliensis*, v. 18, n. 4, p. 793-799, 2004.
21. PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 38, n. 9, p. 1035-1043, 2003.
22. PRASAD, V. S. S.; GUPTA, S. D. *In vitro* shoot regeneration of gladiolus in semi-solid agar versus liquid culture support systems. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 87, n. 3, p. 263-271, 2006.
23. RECH FILHO, A.; DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. Adventitious shoots from nodule cluster cultures of *Vriesea*, an endemic and endangered bromeliad from Atlantic forest. *Ciência Rural*, v. 39, n. 3, p. 909-912, 2008.
24. REITZ, R. *Bromeliaceas e a malária-bromélia endêmica*: flora ilustrada de Santa Catarina. Blumenau: H. Barbosa Rodrigues, 1983. 856 p.
25. WANDERLEY, M. G. L. et al. *Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo*. v. 5. São Paulo: Instituto de Botânica, 1995. 476 p.
26. ZIV, M. The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. *Acta Horticulturae*, v. 393, p. 25-38. 1995.