

## Enraizamento *in vitro* e *ex vitro* de *Dyckia distachya* Hassler, sob diferentes concentrações de AIB

Marcelo Francisco Pompelli<sup>1</sup>, Miguel Pedro Guerra<sup>2</sup>

Doutorando em Fisiologia Vegetal – Universidade Federal de Viçosa – Departamento de Biologia Vegetal –  
Viçosa – MG – 36571-000 – mpompelli@yahoo.com.br<sup>1</sup>

Doutor em Fisiologia Vegetal e Professor titular do CCA da Universidade Federal de Santa Catarina –  
mpguerra@cca.ufsc.br<sup>2</sup>

Recebido em 19 de Outubro de 2004

### Resumo

*Dyckia distachya* é uma bromélia endêmica terrestre nativa do Brasil e ameaçada de extinção uma vez que seu habitat natural, a Mata Atlântica, encontra-se extremamente vulnerável. Por ser uma bromélia terrestre, suas raízes são funcionais e absorvem nutrientes do solo. Este trabalho estudou duas formas de indução ao enraizamento, *in vitro* e *ex vitro*, utilizando como explante inicial, brotações micropropagadas. Os resultados obtidos mostraram que o enraizamento das brotações de *D. distachya* deve ser realizado *in vitro* com a utilização de AIB nas concentrações de 10-15  $\mu$ M por 10-15 dias e posterior expressão em meio isento de AIB, antecedendo a transferência para as condições *ex vitro*.

**Palavras-chaves:** bromélia, micropropagação, enraizamento e aclimatização.

### *In vitro* and *ex vitro* rooting of *Dyckia distachya* Hassler, under different concentrations of iba

#### Abstract

*Dyckia distachya* is a terrestrial endemic bromeliad native of Brazil. This species is threatened with extinction since its habitat, the Atlantic Forest is endangered. Considering that this bromeliad is terrestrial their roots are functional and absorb nutrients from the soil. In the present work it was evaluated two methods of root induction: *in vitro* and *ex vitro* using micropropagated shoots as explants. The results showed that the rooting of *D. distachya* shoots should be done *in vitro* with the use of IBA in the concentrations of 10-15 mM during 10-15 days and subsequent transference to *ex vitro* conditions.

**Key words:** bromeliad, micropropagation, rooting and acclimatization.

#### Introdução

As bromélias são plantas típicas do Continente Americano e provavelmente originárias do topo dos Andes, donde suas espécies espalharam-se, no decorrer dos milênios, e alcançaram as florestas tropicais há cerca de 200.000 anos (Benzing, 2000; Horres et al, 2000).

No Brasil, onde incidem 45% das espécies, o principal centro de disseminação situa-se no domínio da Mata Atlântica, cujo processo de devastação, aliado ao endemismo, ameaça de extinção inúmeras espécies (Rundel & Dillon, 1998).

Atualmente, a Mata Atlântica é um dos biomas mais ameaçados no mundo (Heringer & Montenegro,

2000), não sendo mais uma floresta homogênea, e os fragmentos remanescentes não excedem a 8% da área original. Visto que as bromélias são, em sua maioria, endêmicas, com a destruição de seus habitats naturais e com o aumento da população humana, bem como com a ação indiscriminada do homem sobre o meio ambiente, elas correm sérios riscos de extinção (Pompelli & Guerra, 2004).

As bromélias da subfamília Pitcairnioideae, onde *Dyckia distachya* está incluída, são essencialmente terrestres (Benzing, 2000), supondo-se que as raízes não sirvam apenas de suporte, mas desempenhem papel na absorção de nutrientes do solo. Já foram observadas, em raízes de inúmeras espécies de bromélias, incluindo *Dyckia distachya*, a presença de micorrizas vesiculares-arbusculares, as quais, possivelmente, auxiliam na solubilização dos nutrientes do solo pelas mesmas (Rowe & Pringle, 2005; Rains et al., 2003; Allen et al., 1993; Rabatin et al., 1993).

Um dos entraves à micropropagação é o desenvolvimento de plantas capazes de sobreviverem fora dos frascos de cultura. A maioria das plantas derivadas de cultura *in vitro* sofre desidratação nesta fase e isto é crucial durante os primeiros dias de aclimatização (Malda et al., 1999).

As auxinas, suplementadas aos meios de cultura, atuam nos processos de expansão, alongamento e divisão celular, com reflexos no enraizamento. Entre elas, o Ácido Indol Acético (AIA), parece ser a auxina mais eficaz para estimular o enraizamento *in vitro*, embora não a mais utilizada nos protocolos em geral (Hu e Wang, 1983). Sendo que para a maioria das espécies, as auxinas exógenas são adicionadas ao meio de cultura na fase de indução das raízes, enquanto que na fase de diferenciação dos primórdios e crescimento destas, sua presença no meio de cultura costuma inibir o processo (Hopkins, 1999). Entretanto, na micropropagação de *Ananas comosus* Merr a formação de raízes só foi possível quando na presença de Ácido Naftalenoacético (ANA) e 6-Benzilaminopurina (BAP) em concentrações que variam de 0,5-10,7  $\mu\text{M}$  e 0,4-9,0  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Teng, 1997). Esta faixa de concentração também foi descrita como ótima por Macêdo et al. (2003), os quais estudaram o efeito de diferentes fitoreguladores na micropropagação desta espécie.

Entretanto, na micropropagação de *Cryptanthus sinuosus* (L.B. Smith) a melhor combinação de fitoreguladores que promoveu a formação de raízes foi de 2,2  $\mu\text{M}$  de BAP associado a 0,05  $\mu\text{M}$  de ANA (Arrabal et al., 2002), bem diferente a faixa de 2,5-4,0  $\mu\text{M}$  de ANA descrito por Pierik et al. (1984) na micropropagação de três bromélias, duas do gênero *Guzmania* e uma do gênero *Vriesea*. Além destes, outras substâncias podem ativar o processo de enraizamento em diferentes espécies de plantas (Zaid et al., 2003), bem como em bromeliáceas (Barbosa et al., 2003).

A promoção do enraizamento pode ser realizada *in vitro* ou *ex vitro*. Há controvérsias se as raízes induzidas *in vitro* são ou não funcionais. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar as duas formas de indução (indução *in vitro* e *ex vitro*), bem como estudar o efeito do Ácido Indol Butírico (AIB) na indução radicular de brotos micropropagados de *D. distachya*.

## Material e Métodos

O estudo foi realizado no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina, entre os anos de 2000-2002. As fontes de explantes foram brotações micropropagadas *in vitro* sob diferentes concentrações de fitoreguladores (Pompelli & Guerra, 2005). Para avaliar a melhor forma de promoção ao enraizamento, o estudo foi subdividido em duas partes ① promoção *in vitro* e ② *ex vitro*. Previamente a cada teste foi realizado ajuste das concentrações a serem utilizadas.

### 1. Enraizamento *in vitro*

Brotações de *D. distachya* micropropagados por organogênese direta (Pompelli & Guerra, 2005) com tamanho superior a 1,5 cm e pelo menos dois pares de folhas foram cultivadas em frascos de 250 mL contendo 30 mL de meio de cultura constituído pelos sais de Murashige & Skoog (1962), vitaminas de Morel & Wetmore (1951), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, e suplementado com diferentes concentrações de AIB (5, 10, 15, 20 e 50  $\mu\text{M}$ ). Passado o período de indução, quinze dias, estes brotos foram subcultivados em frascos com o mesmo meio de cultura da fase de indução,

porém gelificado com ágar (6 g L<sup>-1</sup>) isento de AIB. Os brotos permaneceram nestes frascos por mais trinta dias, quando a porcentagem de enraizamento foi visualmente observada e fotografada.

Após a adequação da concentração ótima de AIB a ser utilizada, partiu-se para a adequação do tempo ótimo para indução com AIB. Neste experimento, as plântulas foram submetidas ao mesmo meio de indução, descrito acima, acrescido de 12,5 µM de AIB em diferentes tempos de indução (0, 5, 10, 15 e 20 dias). Posteriormente, as plântulas foram transferidas para frascos de 250 mL contendo 30 mL do mesmo meio de cultura da fase anterior, porém gelificado com ágar e isento de fitorregulador. As plântulas permaneceram nestes frascos por mais trinta dias, quando a porcentagem de enraizamento, o número de raízes por explante e o comprimento das raízes foram avaliados.

Todos os experimentos foram realizados sob condições assépticas e mantidos em câmara de crescimento sob irradiância de 60 µM m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2°C.

Utilizou-se delineamento experimental completamente casualizado, com três repetições, cada qual constituído por três frascos com três brotos por frasco. Quando necessário, o número e o comprimento das raízes foram transformados em  $\sqrt{x+1}$  e, através do programa *Statgraphics for DOS*, submetidos à ANOVA, ao teste de contraste de médias SNK (p£0,05) e à Análise de Regressão (p£0,05) (Sokal e Rohlf, 1995).

## 2. Enraizamento *ex vitro*

Brotas de *D. distachya* micropropagados por organogênese direta (Pompelli & Guerra, 2005) com tamanho superior a 1,5 cm e pelo menos dois pares de folhas foram transferidos para condições *ex vitro*. Para promover a indução do sistema radicular, as bases dos brotos foram mergulhadas em solução aquosa contendo diferentes concentrações de AIB (0, 50 e 100 µM) em diferentes períodos de indução (0 e 60 minutos).

Utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições, cada qual constituído por trinta plântulas. Os dados de porcentagem de enraizamento, número de raízes por

explante e comprimento médio das raízes foram coletados após 60 dias. Quando necessário, o comprimento das raízes formadas foi transformado em log (x+2), e a porcentagem e o número de raízes foram transformados em  $\sqrt{x+1}$  e submetidos à análise de variância e ao teste de separação de médias Newman-Keuls (p£0,05).

Após as avaliações, todas as plântulas foram plantadas em bandejas alveoladas, de 48 ou 96 células, contendo como substrato uma mistura de xaxim:areia:vermiculita (2:2:1) e transferidas para casa de vegetação com 50% de redução solar, proporcionada por sombrite®, e irrigação a cada 6 horas por sistema automático de aspersão. A cada 30 dias, por um período de 12 meses, a porcentagem de sobrevivência e aclimatização foi avaliada.

## Resultados e Discussão

### 1. Enraizamento *in vitro*

Choque auxínico de 15 dias em AIB (10 ou 15 µM), em meio de cultura de indução foi suficiente para induzir o enraizamento em 60% dos brotos (**Figura 1-A**). Brotos induzidos na presença de 10 µM apresentaram um número médio de 1,5 raízes por planta, enquanto na presença de 15 µM os brotos apresentaram um número médio de 0,9 raízes por planta (**Figura 1-B**), sendo que estes não diferiram entre si (SNK p£0,05). Sendo assim, adotou-se uma média entre estes dois melhores valores, sendo 12,5 µM a concentração de AIB utilizada para os testes de tempo de indução na presença de ácido indolbutírico.

Utilizando-se a concentração de 12,5 µM de AIB, verificou-se que um choque auxínico de 10 dias com AIB nesta concentração resultou na indução do enraizamento de mais de 96% dos brotos (Figura 2-A). Estes brotos apresentaram um número médio de 4,48 raízes por planta (Figura 2-B) e um comprimento médio de 13,42 mm (Figura 2-C). Choques auxínicos de AIB superiores a dez dias resultaram na diminuição da porcentagem de enraizamento e do número de raízes por broto.

Para a indução do enraizamento de brotos *in vitro*, com elevadas concentrações de auxinas e a posterior transferência para meio de cultura isento de

fitorreguladores, possibilita obter os melhores resultados na formação de raízes (George, 1993). Em microestacas de *Acca sellowiana* (goiabeira serrana) observou-se 68,9% de enraizamento em resposta a choque auxínico de seis dias na presença de 20  $\mu\text{M}$  de AIB (Oltamari et al., 2000). No entanto, maior percentagem de enraizamento foi obtida quando se utilizou 15  $\mu\text{M}$  de AIB para o enraizamento de brotos micropropagados de *Salix humboldtiana* Willd (salgueiro) (Gomes et al., 2001).

Alguns autores afirmam que as raízes formadas *in vitro* não são funcionais, por lhes faltarem pêlos radiculares e conexão vascular e por não desenvolverem um câmbio secundário após o período em cultura (George, 1993). Em experimentos de enraizamento *in vitro* e *ex vitro* de morango, Borkowska (2001) observou que o sistema radicular formado *in vitro* consistia em somente raízes principais (sem raízes laterais) sendo elas finas, frágeis e facilmente quebráveis durante a retirada do ágar e plantio no substrato. Entretanto, como observado no presente trabalho, raízes de *D. distachya* formadas *ex vitro* também mostraram esse mesmo fenótipo, sendo, portanto uma característica não exclusiva do enraizamento *in vitro*.

Muitas raízes formadas *in vitro* morrem e novas são formadas quando transferidas para o campo. Contudo, é possível que as raízes formadas *in vitro* possam servir de sustentação e reserva de nutrientes até que novas raízes sejam formadas (Debergh & Maene, 1981). Este aspecto assume importância no presente trabalho, uma vez que brotos micropropagados de *D. distachya* não sobreviveram nas condições *ex vitro* quando não possuíam raízes (dados prévios, não mostrados).

O número de raízes e a posterior aclimatização não foram influenciados pelo tamanho do explante. Sendo assim, brotos de *D. distachya* com tamanho a partir 1,5 cm foram enraizados e aclimatizados com sucesso. Uma vez que a utilização de explantes de menor tamanho reduz no tempo de permanência dessas plântulas *in vitro*, reduzem-se os custos da micropropagação. A mesma premissa não foi verdadeira para a micropropagação de abacaxi, uma vez que Guerra et al. (1999) e Dal Vesco (2001) observaram que boas percentagens de enraizamento e

sobrevivência de brotos micropropagados de abacaxi só foram possíveis quando foram empregadas plântulas maiores do que 3 e 7 cm, nos dois trabalhos, respectivamente. Segundo Teng (1997), para a micropropagação de abacaxi, o tamanho das plântulas a serem aclimatizadas parece ser fundamental para o sucesso da micropropagação, uma vez que brotos inferiores a 2 cm têm baixas taxas de enraizamento e sobrevivência. Fato semelhante foi descrito por Mekers & Onsem (1983) para plântulas de *Vriesea* sp., onde plântulas com menos de 4 cm têm dificuldades para aclimatarem, excepcionalmente se não possuírem raízes funcionais. Segundo Guerra et al. (1999), além do tamanho das plântulas ser fundamental para a aclimatização de *Ananas comosus*, a percentagem de 95,5% de sobrevivência de plantas micropropagadas, mostrada por estes autores, somente foi possível quando os brotos foram mantidos em sala de cultura, com temperatura e luminosidade controladas. Estes resultados contrastam com aqueles obtidos no presente trabalho, no qual a aclimatização deu-se no em casa-de-vegetação e com 93% de sobrevivência após 120 dias (dados não mostrados).

## 2. Enraizamento *ex vitro*

A percentagem de enraizamento e o tamanho das raízes formadas *ex vitro* não foram significativamente influenciados pelo AIB (SNK  $p \leq 0,05$ ). Entretanto mais de 79% dos brotos transferidos diretamente para substratos formaram raízes (Tabela 1). Essa taxa de enraizamento pode ser considerada elevada se comparada aos valores de 31,6% de enraizamento obtidos por Duarte et al. (1992) em estacas semilenhosas de *Acca selowiana* em resposta ao AIB (5.000 ppm), sendo, contudo, inferior aos 92% de enraizamento e sobrevivência obtidos por Oltamari et al. (2000) para o enraizamento de microestacas dessa mesma espécie usando 100  $\mu\text{M}$  deste fitorregulador.

Microestacas de *Pyrus calleryana* apresentaram 100% de enraizamento quando expostas ao AIB (150  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas (Pasqual & Lopes, 1991). Já em estacas de *Psidium guajava* (Coelho et al., 2001) não se obteve mais do que 70% de enraizamento mesmo com a aplicação exógena de AIB (1,5  $\mu\text{M}$ ). No entanto, há na literatura alguns trabalhos repor-

tando que a melhor taxa enraizamento de estacas de laranjeira doce seria com o uso de 25 µM de AIB, podendo ser, ainda, combinado com 7 µM de Paclobutrazol (PBZ) (Habbermann et al., 2001). Para o porta-enxerto de macieira Marubakaido, a percentagem de enraizamento e a sobrevivência das plantas não foram estatisticamente diferentes, quando as microestacas foram tratadas *in vitro* e *ex vitro* com AIB (Martins & Pedrotti, 2001). Os dados apresentados por estes autores contrastam com aqueles obtidos no presente trabalho, onde observou-se 94% de sobrevivência das plantas de *D. distachya* induzidas pelo enraizamento *in vitro* após 120 dias.

As raízes de *D. distachya* formadas *ex vitro* foram limitadas e frágeis, fato este que dificultou muito a retirada das plantas do substrato para que as mesmas fossem medidas e contadas. Em contraposição, as raízes formadas *in vitro* foram mais

numerosas.

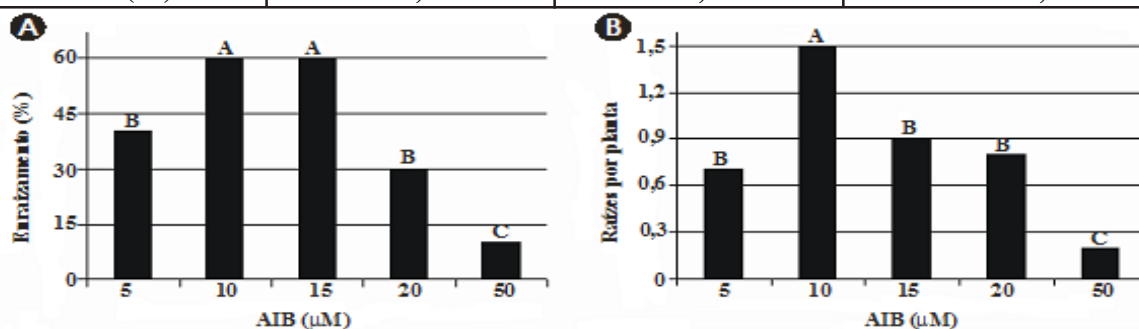
### Conclusão

Os resultados do presente trabalho sugerem que a indução do enraizamento dos brotos maiores que 1,5 cm deve ser realizada *in vitro* com o emprego de AIB. Mesmo considerando a taxa de 85% de enraizamento *ex vitro* dos brotos micropropagados, sua eficácia não pode ser considerada satisfatória, tendo em vista o baixo número de raízes formadas e a conseqüente diminuição da sobrevivência das plantas após 120 dias de aclimação. Sugere-se, entretanto, que quando houver a necessidade de enraizamento de brotos micropropagados de *Dyckia distachya*, esse procedimento seja re-

**Tabela 1.** Efeito do AIB (0, 50 e 100 mM) em brotos micropropagados de *Dyckia distachya* induzidos *ex vitro* por 60 minutos sobre a porcentagem de enraizamento, número médio e comprimento das raízes, 60 dias após a transferência para o substrato. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si (SNK P£0,05).

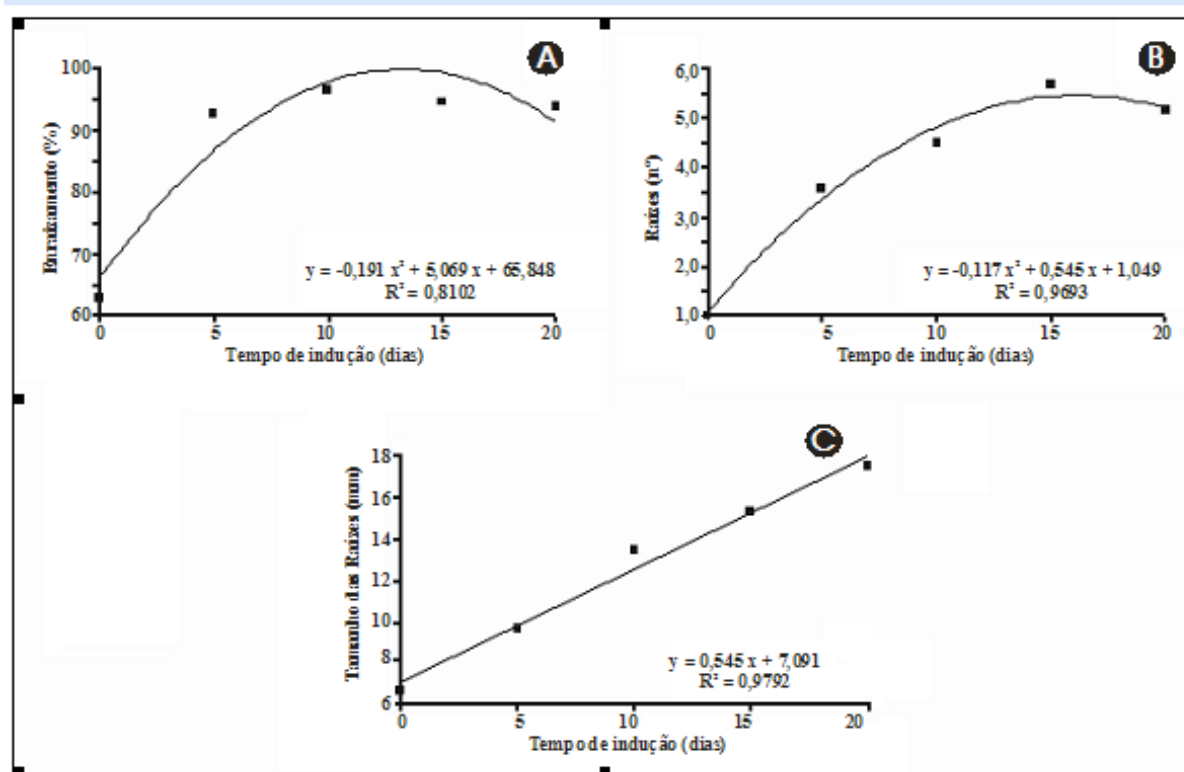
**Table 1.** Effects of IBA applied *ex vitro* during 60 minutes on the rooting, number and length of *Dyckia distachya* after 60 days. Means followed by the same letter are statistically similar (SNK P£0.05).

AIB (µM)	Enraizamento (%)	Número de raízes	Tamanho das raízes (mm)
0	81,94 A	2,51 A	18,24 A
50	79,37 A	1,90 A	25,54 A
100	85,19 A	1,53 A	26,71 A
CV (%)	12,31	29,05	20,04



**Figura 1** – Indução de enraizamento *in vitro* em brotos de *Dyckia distachya* com diferentes concentrações de AIB adicionado ao meio de cultura MS líquido, 30 dias após a indução e expressão em MS isento de fitoregulador e gelificado com ágar (6 g L<sup>-1</sup>). (A) Porcentagem de enraizamento e (B) Número de raízes por planta. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (SNK Pd”0,05).

**Figure 1** – Rate of *in vitro* rooting (A) and root number of *Dyckia distachya* shoots cultured in MS culture media, supplemented with different IBA levels after 30 days in culture in the absence of this plant regulator. Means followed by the same letter are statistically similar (SNK P£0.05).



**Figura 2** = Análise de regressão para o potencial de enraizamento *in vitro* de plântulas de *Dyckia distachya* cultivadas *in vitro*. (A) percentagem de enraizamento, (B) número de raízes e (C) comprimento médio das raízes em função do tempo de indução (0, 5, 10, 15 e 20 dias) em AIB 12,5 mM, adicionado ao meio de cultura MS, 30 dias após a indução.

**Figure 2** – *In vitro* rooting (A), root number (B) and root length (C) of *Dyckia distachya* shoots in response to different induction times in the presence of IBA (12,5 mM).

alizado em condições *in vitro*, assim como demonstrado nesse estudo.

### Referências Bibliográficas

ALLEN, M.F.; RINCON, E.; ALLEN, E.B.; HUANTE, P.; DUNN, J.J. Observations of canopy bromeliad roots compared with plants rooted in soils of a seasonal tropical forest, Chamela, Jalisco, Mexico. *Mycorrhiza*, Heidelberg, v.4, n.1, p.27-28, 1993.

ARRABAL, R.; AMANCIO, F.; CARNEIRO, L.A.; NEVES, L.J.; MANSUR, E. Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (L.B. Smith) for *in vitro* preservation. *Biodiversity and Conservation*, Netherlands, v.11, p.1081-1089, 2002.

BARBOSA, N.M.L.; CUNHA, G.A.P.; REINHARDT, D.H.; BARROS, P.G.; SANTOS, A.R.L. Indução de alterações morfológicas e anatômicas em folhas de abacaxizeiro ‘pérola’ pelo ácido 2-(3-clorofenoxi) propiônico. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.25, n.3, p.386-389, 2003.

BENZING, D.H.. **Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation**. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 690 p.

BORKOWSKA, B. Morphological and physiological characteristics of micropropagated strawberry plants rooted *in vitro* or *ex vitro*. *Scientia Horticulturae*, Skierniewice, v.89, p.195-206, 2001.

COELHO, G.V.A.; MIRANDA, C.S.; CHALFUN,

- N.N.J.; NORBERTO, P.M.; HOFFMANN, A.; VITORINO, P.F.P.G. Efeito do AIB e da sacarose no enraizamento de estacas herbáceas de goiabeira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, VIII, 2001, Ilhéus. Anais... Londrina: Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, 2001. p.67.
- DAL VESCO, L.L.; PINTO, A.A.; ZAFFARI, G.R.; NODARI, R.O.; REIS, M.S.; GUERRA, M.P. Improving pineapple micropropagation protocol through explant size and medium composition manipulation. *Fruits*, Florianópolis, v.56, n.3, p.143-154, 2001.
- DEBERGH, P.C.; MAENE, L.J. A scheme for commercial propagation for ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v.14, n.4, p.335-345, 1981.
- DUARTE, O.R.; FACHINELLO, J.C.; SANTOS, B.G.F. Multiplicação da goiabeira serrana através de estacas semilenhosas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Jaboticabal, v.21, n.1, p.60-64, 1992.
- GEORGE, E.F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 2. Exegetic: Edington, 1993. 574p.
- GOMES, G.A.C.; SANTOS, B.R.; PAIVA, R.; CARDOSO, M.G.; PAIVA, P.D.O.; SANTOS, C.G.; SANTANA, J.R.F.; REZENDE, R.K.S.; SANTOS, M.B. Enraizamento *in vitro* de brotações de *Salix humboldtiana* Willd. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, VIII, 2001, Ilhéus. Anais... Londrina: **Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 2001. p.264.
- GUERRA, M.P.; DAL VESCO, L.L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A.R. NODARI, R.O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.34, n.9, p.1557-1563, set. 1999.
- HABERMANN, G.; ALVAREZ, R.C.F.; MACHADO, R.; FORTES, A.M.T. RODRIGUES, J.D.; ONO, E.O. Enraizamento de estacas de laranja-doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck cv. Valência) sadias e com CVC (clorose variegada dos citros), através do uso de fitorreguladores. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, VIII, 2001, Ilhéus. Anais... Londrina: **Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 2001. p.65.
- HERINGER, H.; MONTENEGRO, M.M. (Org.). **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos**. Brasília: MMA/SBF, 2000. 40p.
- HORRES, R.; ZIZKA, G.; KAHL, G.; WEISING, K. Molecular phylogenetics of Bromeliaceae: evidence from trnL (UAA) intron sequences of the chloroplast genome. *Plant Biology*, London, v.2, p.306-315, 2000.
- HOPKINS, W.G. **Introduction to Plant Physiology**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1999. 512p.
- HU, C.Y.; VANG, P.J. **Meristem, shoot tip, and bud cultures**. In: EVANS, D.A. (Eds.) *Handbook of plant cell culture*. New York: Macmillan, 1983, v.1, p.177-227.
- MACÊDO, C.E.C. 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.
- MALDA, G.; SUZÁN, H.; BACKHAUS, R. In vitro culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae*, Tempe, v.81, p.71-87, 1999.
- MARTINS, L.; PEDROTTI, E.L. Enraizamento *in vitro* e *ex vitro* dos porta-enxertos de macieira M.7, M.9 e Marubakaido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.1, p.11-19, abr. 2001.
- MEKERS, O.; ONSEM, J.G.V. In vitro propagation of *Vriesea* cultivars in comparison with other ornamental bromeliaceae. *Acta Horticulturae*, Lincoln, v.131, p.125-130, 1983.

- MOREL, G.M.; WETMORE, R.H. Fern callus tissue culture. **American Journal of Botany**, v.38, p.141-143, 1951.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
- OLTRAMARI, A.C.; DAL VESCO, L.; PEDROTTI, E.L.; DUCROQUET, J.P.; NODARI, R.O. Protocolo de Micropropagação de Goiabeira Serrana (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.1, p.61-68, 2000.
- PASQUAL, M.; LOPES, P.A. Efeitos da concentração e tempo de incubação em ácido indolbutírico sobre o enraizamento e posterior desenvolvimento de brotos de *Pyrus calleryana* L. obtidos *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.26, n.7, p.975-980, 1991.
- PIERIK, R.L.M. The influence of naphthaleneacetic acid on the growth of in vitro cultivated seedlings of *Bromeliaceae*. **Scientia Horticulturae**, New York, v.24, n.2, p.193-199, 1984.
- POMPELLI, M.F.; GERRA, M.P. Ex situ conservation of *Dyckia distachya*: an endangered bromeliad from South Brazil. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v.4, n.3, p.273-279, 2004.
- POMPELLI, M.F.; GERRA, M.P. Micropropagation enables the mass propagation and conservation of *Dyckia distachya* Hassler. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v.5, n.1, p.117-126, 2005.
- RABATIN, S.C.; STINNER, B.R.; PAOLETTI, M.G. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi, particularly *Glomus tenue*, in Venezuelan bromeliad epiphytes. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v.4, n.1, p.17-20, 1993.
- RAINKS, K.C.; NADKARNI, N.M.; BLEDSOE, C.S. Epiphytic and terrestrial mycorrhizas in a lower montane Costa Rican cloud forest. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v.13, n.2, p.257-264, 2003.
- ROWE, A.R.; PRINGLE, A. Morphological and Molecular Evidence of arbuscular mycorrhizal fungal association in Costa Rican epiphytic bromeliads. **Biotropica**, Connecticut, v.37, n.2, p.245-254, 2005.
- RUNDEL P.W.; DILLON, M.O. Ecological patterns in the *Bromeliaceae* of the lomas formations of Coastal Chile and Peru. **Plant System Evolution**, Austria, v.212, n.3-4, p.261-278, 1998.
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**. 3. ed. New York: W.H. Freeman and Co, 1995, 881p.
- TENG, W.L. An alternative propagation method of *Ananas* through nodule culture. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v.16, p.454-457, 1997.
- ZAID, H. Does ethylene mediate cluster root formation under iron deficiency? **Annals of Botany**, London, v.92, p.673-677, 2003.