

## Micropropagação do abacaxizeiro ornamental

Moacir Pasqual<sup>1</sup>; Flávia C Santos<sup>2</sup>; Milene A de Figueiredo<sup>3</sup>; Keize P Junqueira<sup>4</sup>; Juliana C de Rezende<sup>2</sup>; Ester A Ferreira<sup>5</sup>

<sup>1</sup>UFLA-DAG, C. postal 37; 37200-000 Lavras-MG; <sup>2</sup>Doutoranda Agronomia/Fitotecnia, UFLA; <sup>3</sup>Doutoranda Agronomia/Fisiologia, UFLA; <sup>4</sup>Doutoranda Inst. Ciências Biológicas; Fitopatologia, UnB; <sup>5</sup>Pos-doutoranda, UFLA; <sup>2,4</sup>Bolsista CNPq; <sup>3</sup>Bolsista CAPES;

<sup>5</sup>Bolsista FAPEMIG; mpasqual@ufla.br

### RESUMO

O *Ananas comosus* var. *erectifolius*, cultivar de abacaxi ornamental, tem apresentado grande interesse para paisagistas e floricultores do Brasil e do exterior, por ser uma planta ornamental tropical, exótica e rústica. A produção de plantas ornamentais a partir de técnicas de cultura de tecidos apresenta-se como uma alternativa viável para a obtenção de um grande número de plantas com qualidade genética e fitossanitária, em um curto espaço de tempo, suprimindo, assim, a necessidade do mercado na aquisição de mudas com qualidade comprovada. Estudou-se a influência das concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup>) e ANA (0,0; 0,12; 0,24; 0,48 mg L<sup>-1</sup>) no meio de cultura MS com 0; 2,5; 5,0; e 7,5 g L<sup>-1</sup> de ágar, visando estabelecer um protocolo para multiplicação e enraizamento *in vitro* de brotos de abacaxizeiro ornamental. Brotações com 1,5 ± 0,5 cm, já estabelecidas *in vitro*, oriundas das gemas da coroa do fruto do abacaxizeiro ornamental, foram inoculados assepticamente nos frascos. Após inoculados, os explantes foram mantidos em sala de crescimento com luminosidade em torno de 35 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 26±1°C e fotoperíodo de 16 horas. Após 45 dias observou-se que a multiplicação *in vitro* do abacaxi ornamental é viável em meio MS líquido acrescido de BAP 1,5 mg L<sup>-1</sup> e o enraizamento também em meio MS líquido, na ausência de reguladores de crescimento.

**Palavras-chave:** *Ananas comosus* var. *erectifolius*, bromeliceae, cultura de tecidos, enraizamento, multiplicação.

### ABSTRACT

#### Protocol for *in vitro* micropropagation of ornamental pineapple

The *Ananas comosus* var. *erectifolius* is an ornamental pineapple cultivar which greatly interests Brazilians and foreign landscapers and flower producers for being an exotic and rustic tropical ornamental plant. The market demand for high quality of cuttings requires efficient methods of propagation and in this context the tissue culture stands out as a viable alternative to obtain plants with genetic and phytosanitary quality in a short time. In the present work we studied the influence of concentrations of BAP (0; 0.5; 1.0; 1.5 mg L<sup>-1</sup>) and NAA (0; 0.12; 0.24; 0.48 mg L<sup>-1</sup>) in the MS medium culture within 0; 2.5; 5.0; 7.5 g L<sup>-1</sup> of agar, in order to establish an *in vitro* protocol for multiplication and rooting of ornamental pineapple. Plantlets with 1.5±0.5 cm already established *in vitro*, extracted from buds of ornamental pineapple fruits crown were inoculated aseptically in flasks. After inoculation the plantlets were kept in a growth room at 26±1°C, 35 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> irradiance and a 16-hour photoperiod. After 45 days we observed that the multiplication of ornamental pineapple is viable at liquid MS medium with BAP 1.5 mg L<sup>-1</sup> and the rooting is also increased in liquid MS medium in absence of growth regulators.

**Keywords:** *Ananas comosus* var. *erectifolius*, Bromeliaceae, tissue culture, rooting, multiplication.

(Recebido para publicação em 20 de julho de 2007; aceito em 13 de fevereiro de 2008)

Os sistemas de produção de plantas ornamentais evoluíram muito por constituírem uma atividade extremamente competitiva, exigente em tecnologias, conhecimentos avançados e comercialização eficiente.

A produção de plantas ornamentais a partir de técnicas de cultura de tecidos pode ser uma alternativa viável na obtenção de grande número de plantas com qualidade genética e fitossanitária em curto espaço de tempo, suprimindo assim a necessidade dos produtores de flores e plantas ornamentais na aquisição de mudas com qualidade comprovada.

O *Ananas comosus* var. *erectifolius*, cultivar de abacaxi ornamental, tem apresentado grande interesse para paisagistas e floricultores do Brasil e do exterior, por ser uma planta ornamental

tropical, exótica e rústica. Atualmente, o Brasil é o único país que possui plantios comerciais de *A. comosus* var. *erectifolius* (Borges *et al.*, 2003). O abacaxizeiro ornamental caracteriza-se por ser terrestre, desenvolvendo-se geralmente em campo aberto sob alta luminosidade, em ambientes de solos arenosos e de clima tropical. Apresenta folhagens rígidas, eretas, sem espinhos e de coloração púrpura. As folhas crescem até 1,0 m de comprimento com largura de aproximadamente 3,5 cm, em margens lisas e ápice de ponta aguda (Smith & Dows, 1979), porém, mais finas quando comparadas com a folhagem do abacaxi comestível. Apresenta inflorescência globosa, sustenta brácteas com flores completas e pequenas (Leal & Amaya, 1991). Sua infrutescência mede de 8 a 10 cm, disposta na posição

apical da haste que pode medir até 80 cm (Correia *et al.*, 1999).

O processo de cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas nas quais um explante (célula, tecido ou órgão) é isolado sob condições assépticas, em meio nutritivo artificial. Este processo baseia-se no princípio da totipotencialidade das células, ou seja, qualquer célula de organismo vegetal apresenta todas as informações genéticas necessárias à regeneração de uma planta completa (Pasqual *et al.*, 2001; Gallo & Crocomo, 1995).

A propagação de espécies vegetais *in vitro* apresenta vantagens em relação aos métodos convencionais, como a multiplicação de clones em qualquer época do ano, produção de espécies que dificilmente seriam propagadas por

métodos convencionais, rápida multiplicação clonal de espécies raras, além da eliminação de vírus (Gallo & Crocomo, 1995). Dependendo da finalidade da propagação, conforme descrito por Murashige (1974), a cultura de tecidos de plantas pode ser feita utilizando como propágulo inicial tecidos meristemáticos (gemas axilares, regiões apicais e o meristema propriamente dito) e/ou explantes não meristemáticos (pecíolo, pedúnculos e o limbo foliar).

Os meios utilizados para cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (Caldas *et al.*, 1998).

As citocininas são utilizadas em cultura de tecidos para estimular a divisão celular e atuam, conseqüentemente, no processo de morfogênese (George, 1996). Das citocininas comercialmente disponíveis, o BAP (6-benzilaminopurina) é a que geralmente proporciona melhores resultados (Grattapaglia & Machado, 1998). O BAP é uma citocinina sintética muito utilizada devido à sua efetividade e baixo custo em relação às outras (Krikorian, 1991). Este regulador de crescimento induz à formação de grande número de brotos e leva a alta taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação (Hu & Wang, 1983), cuja concentração pode variar bastante em função da espécie e do tipo do explante.

Várias auxinas (ANA, AIA, AIB, 2,4-D, entre outras) têm proporcionado respostas diferentes *in vitro* (Caldas *et al.*, 1998). As auxinas podem ser necessárias para complementar o teor endógeno ou suprir as necessidades de meristemas isolados. Pierik *et al.* (1984), examinando a influência da ação de auxinas na germinação de sementes e crescimento posterior de plântulas de três espécies de Bromeliaceae, constataram que o ANA, adicionado ao meio MS, foi a auxina mais eficiente para promover o crescimento de brotos e de raízes, sendo utilizada em concentrações entre 0,5 e 0,8 mg L<sup>-1</sup>.

O ágar é o agente comumente utilizado na solidificação dos meios de cultura (George, 1993; Singha, 1984). Existem diversas marcas comerciais de ágar,

porém recomenda-se otimizá-lo no preparo do meio, visto que o ágar é considerado o componente de custo mais elevado do meio de cultura (Peixoto & Pasqual, 1995; George, 1993; Singha, 1984). As concentrações mais elevadas de ágar dificultam o contato do explante com o meio, limitando a absorção de compostos, fato este observado por Oliveira (1994) em microestacas de crisântemo. Peixoto & Pasqual (1995) e Singha (1982) verificaram ainda que o aumento da concentração de ágar não foi prejudicial tanto para a taxa de multiplicação das brotações, como para o crescimento; além disso, os valores das massas fresca e seca foram fortemente reduzidos. O mesmo foi constatado com o ganho relativo de massa fresca das culturas de ápices de brotações de kiwi (Monette, 1986). O objetivo do trabalho foi estabelecer um protocolo para multiplicação e enraizamento *in vitro* de brotos de abacaxizeiro ornamental.

## MATERIAL E MÉTODOS

Brotos com 1,5±0,5 cm provenientes de gemas da coroa do fruto do abacaxizeiro ornamental foram inoculados em meio de cultura MS. O pH do meio foi ajustado para 5,8±1. Após o preparo, 60 mL de meio de cultura foram distribuídos em frascos com capacidade de 250 mL, os quais foram vedados com tampas de polipropileno, identificados e autoclavados a 121°C por 20 min. A inoculação foi feita em câmara de fluxo laminar horizontal. Após a inoculação, os frascos foram colocados em sala de crescimento com luminosidade em torno de 35 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 26±1°C e fotoperíodo de 16 h, onde permaneceram por 45 dias.

Os tratamentos do primeiro experimento constituíram-se de quatro concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup>) combinadas com quatro de ágar (0; 2,5; 5,0; e 7,5 g L<sup>-1</sup>), e no segundo experimento quatro concentrações de ANA (0; 0,12; 0,24 e 0,48 mg L<sup>-1</sup>) e quatro de ágar (0; 2,5; 5,0; e 7,5 g L<sup>-1</sup>), perfazendo um fatorial 4 x 4 com quatro repetições e três frascos por parcela, em delineamento inteiramente casualizado.

No primeiro experimento foram avaliadas as características: altura e núme-

ro de brotos, massas fresca e seca da plântula; no segundo experimento foram realizados: altura da parte aérea, número de raízes e comprimento do sistema radicular, massas fresca e seca da plântula.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

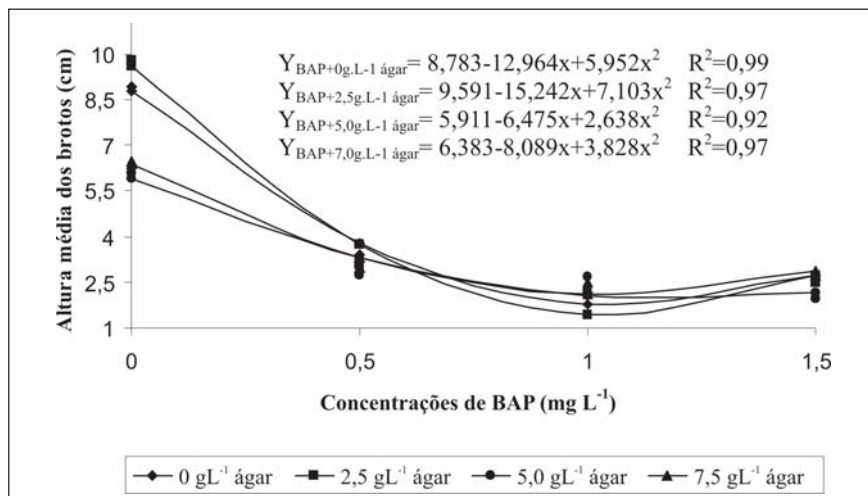
Para a variável altura média dos brotos, os melhores resultados foram obtidos utilizando-se 2,5 g L<sup>-1</sup> de ágar na ausência de BAP, registrando-se 9,60 cm. Os tratamentos utilizando 0; 1,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP respectivamente, apresentaram comportamento semelhante, ou seja, com o acréscimo das concentrações de BAP houve redução na altura média de brotos (Figura 1). Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores, a exemplo de Paiva *et al.* (1997) que, trabalhando com gloxínia, observaram redução do tamanho de brotos com o aumento das concentrações de BAP. Moreira (2001), trabalhando com abacaxizeiro cv. Pérola, observou resultados semelhantes, sendo que o meio MS sem regulador de crescimento mostrou-se mais eficiente para se obter melhor desenvolvimento das plantas. Outros autores também têm observado efeitos negativos desse regulador de crescimento no alongamento de brotações em espécies como crisântemo e morangueiro (Pasqual *et al.*, 1998; Oliveira, 1994).

O aumento das concentrações de BAP, na ausência de ágar, promoveu aumento linear no número de brotos e quando se utilizou 1,5 mg L<sup>-1</sup> do regulador alcançou-se o número máximo de 21 brotações por explante (Figura 2). A concentração de 1,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP promoveu a melhor resposta para o número de brotações na micropropagação de *Ananas comosus* (L.) (Almeida *et al.*, 2002). Segundo Zaerr & Mapes (1985), o BAP é a citocinina mais potente para promover multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias e é também economicamente mais viável por apresentar menor custo. À medida que se aumentaram as concentrações de ágar, houve redução na formação de brotos, provavelmente devido a menor disponibilidade de nutrientes. Moreira (2001), estudando suplementação

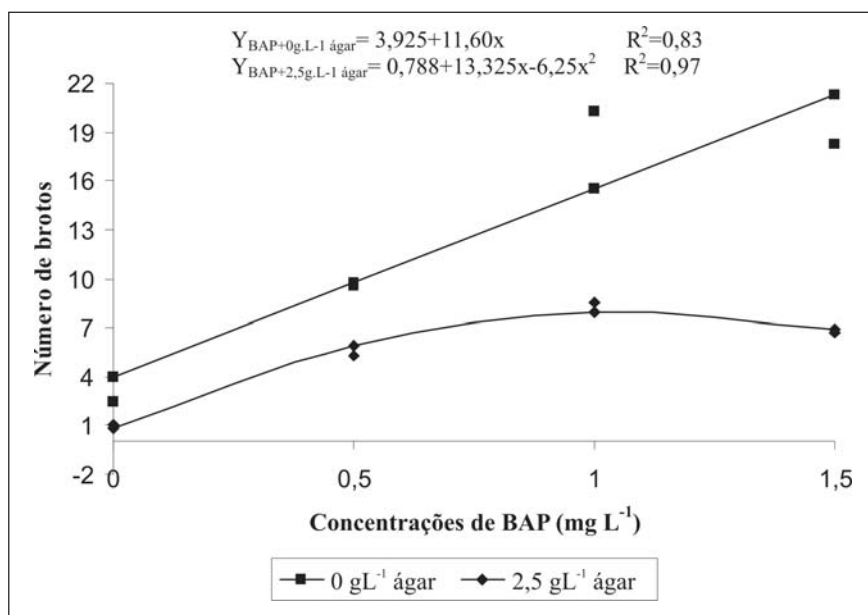
hormonal do meio MS no crescimento *in vitro* de mudas de abacaxizeiro cv. Pérola, verificou que o número máximo de brotações ocorreu na ausência de ágar. As concentrações 5,0 e 7,5 g L<sup>-1</sup> de ágar não foram apresentadas na Figura 2 devido a não significância entre suas médias pelo teste de regressão. O BAP é uma das citocininas mais utilizadas na indução de brotos (Rocca & Mroginski, 1991). Entretanto, a concentração recomendada varia consideravelmente entre laboratórios que trabalham com micropropagação de *Ananas* sp. Para a cultivar de abacaxizeiro Red Spanish, a maior proliferação de brotos ocorreu em meio MS líquido suplementado com 0,3 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Liu *et al.*, 1988), enquanto Marciani-Bendezú *et al.* (1990) e Kiss *et al.* (1995) obtiveram as maiores taxas de multiplicação quando utilizaram respectivamente 4,5 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> do referido fitoregulador. Por outro lado, Calixto & Siqueira (1996) verificaram que não houve diferença significativa entre os níveis de BAP, que variaram de 0 a 14 mg L<sup>-1</sup>, na proliferação de brotos de abacaxizeiro. As discrepâncias entre os resultados obtidos pelos diversos autores e os obtidos neste trabalho devem-se provavelmente às diferenças varietais, bem como aos diferentes protocolos utilizados.

Para massa fresca das plântulas, o uso de 1,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP na ausência de ágar foi superior aos demais (4,46 g), como mostra a Figura 3. Segundo Macedo *et al.* (2003), pequenas concentrações de BAP (1,0 mg L<sup>-1</sup>), conjugadas com ANA (0,5 mg L<sup>-1</sup>), proporcionaram maior peso da massa fresca de plântulas de abacaxizeiro. Ainda, de acordo com esses autores, os meios semi-sólidos e líquidos não apresentaram vitrificação, podendo ser recomendados em virtude da redução de custo e maior agilidade na preparação dos mesmos. Não houve diferença significativa pelo teste de regressão entre as concentrações 5,0 e 7,5 g L<sup>-1</sup> de ágar.

Para a variável massa seca das plântulas, que apresenta o crescimento real dos explantes, apenas as concentrações de ágar mostraram resultados significativos, obtendo-se melhores respostas na ausência deste componente. O



**Figura 1.** Altura média de brotos de abacaxizeiro ornamental em diferentes concentrações de BAP e ágar, 45 dias após a inoculação dos explantes (Sprout average high of ornamental pineapple plantlets, 45 days after inoculation with various BAP and agar concentrations). Lavras, UFLA, 2006.



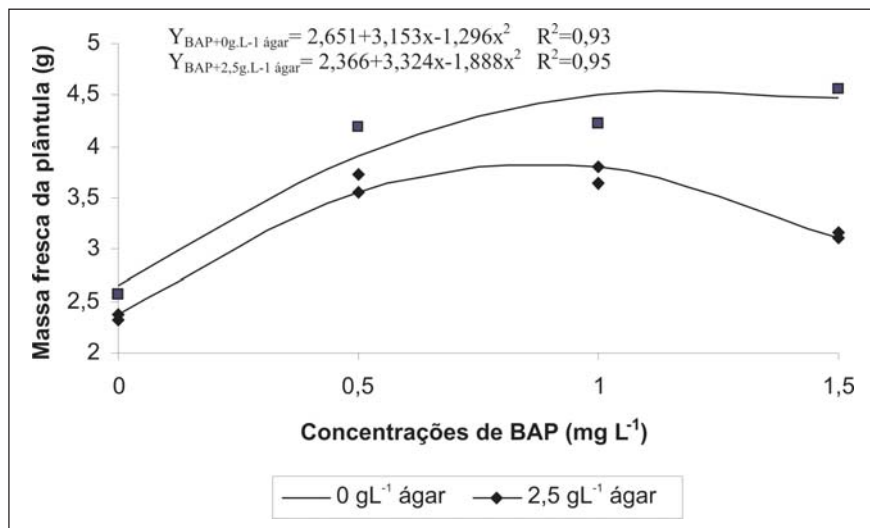
**Figura 2.** Número médio de brotos de abacaxizeiro em diferentes concentrações de BAP e ágar, 45 dias após a inoculação dos explantes (Average sprouts number of ornamental pineapple plantlets, 45 days after inoculation with various BAP and agar concentrations). Lavras, UFLA, 2006.

aumento das dosagens de ágar proporcionou queda linear desta variável ( $Y=0,226-0,005x$   $R^2=0,93$ ). Segundo Caldas *et al.* (1998), os meios líquidos possuem a vantagem de preparo mais rápido e mais barato do que os sólidos, além de favorecerem a absorção de nutrientes e minerais pelas plântulas, viabilizando o crescimento vegetativo.

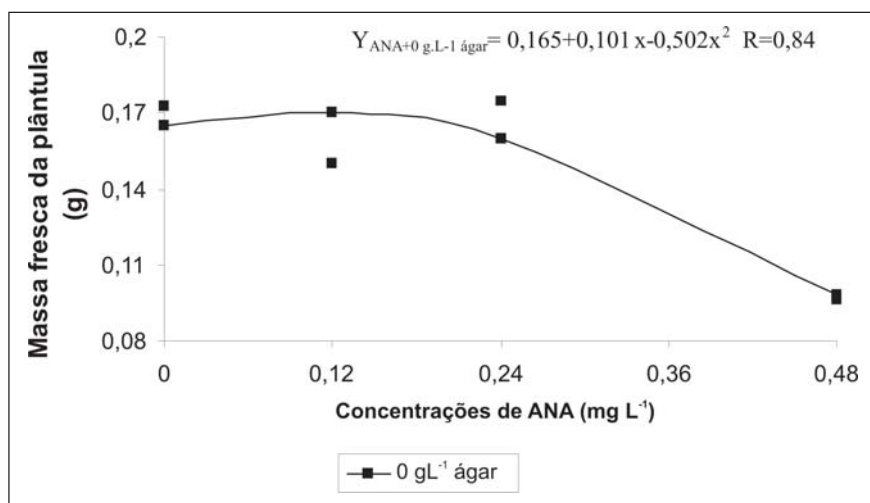
Os melhores resultados para comprimento médio da parte aérea foram obtidos com o emprego de 0,48 mg L<sup>-1</sup> de

ANA em combinação com 2,5 g L<sup>-1</sup> de ágar, atingindo em média 9,11 cm. Contrariamente, Macedo *et al.* (2003), observaram maior alongamento da parte aérea do abacaxizeiro com o uso de concentrações menores de ANA. Os autores observaram maior altura utilizando 0,25 mg L<sup>-1</sup> de ANA combinado a 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,12 mg L<sup>-1</sup> de ANA combinado a 0,25 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Utilizando 2,5 g L<sup>-1</sup> de ágar, o comprimento da parte aérea aumentou proporcional-





**Figura 3.** Massa fresca de plântulas de abacaxizeiro ornamental em diferentes concentrações de BAP e ágar, 45 dias após a inoculação dos explantes (Fresh mass of ornamental pineapple plantlets, 45 days after inoculation with various BAP and agar concentrations). Lavras, UFLA, 2006.



**Figura 4.** Massa fresca de plântulas de abacaxizeiro ornamental em diferentes concentrações de ANA e ágar, 45 dias após a inoculação dos explantes (Fresh mass of ornamental pineapple plantlets, 45 days after inoculation with various ANA and agar concentrations). Lavras, UFLA, 2006.

mente às concentrações de ANA testadas. Pierik *et al.* (1984), já haviam constatado a eficiência do ANA para promover o crescimento da parte aérea de bromeliáceas.

O número médio de raízes obtido com a concentração de 0,24 mg L<sup>-1</sup> foi muito semelhante ao obtido com 0,48 mg L<sup>-1</sup> de ANA combinado com 2,5 g L<sup>-1</sup> de ágar. Macedo (2003) confirmou a inibição da formação de raízes nos explantes cultivados em meio de cultura na presença de BAP e que ao contrário, foi estimulada pela presença de ANA.

A variável comprimento médio do sistema radicular mostrou-se superior na ausência de ANA e ágar. A partir da concentração 0,24 mg L<sup>-1</sup> de ANA o número médio de raízes estabilizou-se, porém com comprimentos menores quando comparados com aqueles resultados obtidos em meio sem regulador de crescimento e na ausência de agente solidificante. Grattapaglia & Machado (1998) afirmam que o crescimento das raízes pode ser inibido pela presença de auxina. Provavelmente, o excesso de ANA endógeno não permitiu um alongamento satisfatório. Além disso, comparando-se o ocorrido com a parte aérea, a ausência de BAP também promoveu maior alongamento.

A atividade fisiológica das auxinas depende não apenas daquelas adicionadas ao meio, mas também do AIA no interior dos tecidos cultivados e da interação entre os dois (Pasqual *et al.*, 2001). Fatores que afetam os níveis naturais de AIA e atividade deste composto podem, desse modo, ser importantes para controlar o crescimento e a morfogênese na cultura de tecidos de plantas usadas para micropropagação.

Apenas a ausência de ágar mostrou resultados significativos, proporcionando o maior peso de massa fresca e seca da parte aérea (2,60 e 0,17 g, respectivamente) na ausência de ANA (Figura 4). Este resultado pode ser compreendido, visto que as auxinas são promotoras da formação do sistema radicular.

Como já foi mencionado anteriormente, o uso de meios líquidos viabilizam a absorção de nutrientes e minerais presentes no meio de cultura, favorecendo o acúmulo de matéria fresca e seca no explante.

A multiplicação *in vitro* do abacaxi ornamental é viável em meio MS líquido acrescido de BAP 1,5 mg L<sup>-1</sup> e o enraizamento também em meio MS líquido, na ausência de reguladores de crescimento.

A multiplicação *in vitro* do abacaxi ornamental é viável em meio MS líquido acrescido de BAP 1,5 mg L<sup>-1</sup> e o enraizamento também em meio MS líquido, na ausência de reguladores de crescimento.

## REFEFÊNCIAS

- ALMEIDA WAB; SANTANA GS; RODRIGUEZ APM; COSTA MAPC. 2002. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. *Revista Brasileira de Fruticultura* 24: 296-300.
- BORGES NSS; CORREIA D; ROSSETTI AG. 2003. Influência do meio bifásico na multiplicação de gemas e no alongamento de brotos *in vitro* de *Ananas comosus* var. *erectifolius* Miller. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental* 9: 37-44.
- CALDAS LS; HARIDASAN P; FERREIRA ME. 1998. Meios nutritivos. In: TORRES AC; CALDAS LS; BUSO JA. (eds). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa. p. 87-132.
- CALIXTO MC; SIQUEIRA DL. 1996. Efeito do BAP e ferimentos na micropropagação do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill) cv Smooth Cayenne. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 14. *Anais...* Londrina:IAPAR, 561p.

- CORREIA D; OLIVEIRA PMA; RIBEIRO KA; SILVEIRA MRS. 1999. *Avaliação da multiplicação in vitro do abacaxi ornamental (Ananas lucidus Miller)*. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 2p. (Pesquisa em andamento, 56).
- GALLO LA; CROCOMO OJ. 1995. A cultura de tecidos em fitopatologia. In: FILHO AB; KIMATI H; AMORIM L. (eds). *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*. São Paulo: Agronômica Ceres. p.495-505.
- GEORGE EF. 1993. The components of culture media. In: GEORGE EF; SHERRINGTON PD. (eds). *Plant propagation by tissue culture*. Great Britain: Exegetice Limited. p. 273-343.
- GEORGE EF. 1996. *Plant propagation by tissue culture, part 1 - the technology*. Ed. Edington: Exegetics Limited. 1574 p.
- GRATTAPAGLIA D; MACHADO MA. 1998. Micropropagação. In: TORRES AC; CALDAS LS; BUSO JA. (eds). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa p. 183-260.
- HU CY; WANG PJ. 1983. Meristem, shoot tip and bud cultures. In: EVANS DA; SHARP WR; AMMIRATO PV; YAMADA Y. (eds). *Handbook of plant cell culture - techniques for propagation and breeding*. New York: MacMillan Publishing Company. p. 177-277.
- KISS E; KISS J; GYULAI G; HESZKY LE. 1995. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. *HortScience* 30: 127-129.
- KRIKORIAN AD. 1991. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA WH; MROGINSKI LA. (eds.). *Cultivo de tejidos em la agricultura - Fundamentos y aplicaciones*. Cali: CIAT. p. 41-78.
- LEAL F; AMAYAL. 1991. The Curagua (*Ananas comosus* var. *erectifolius*, Bromeliaceae) Crop in Venezuela. *Economic Botany* 45: 216-224.
- LIU LJ; ROSA-MARQUES E; LIZARDE E. 1988. *In vitro* propagation of spineless Red Spanish pineapple. *Phytopathology* 77: 1711-1716.
- MACEDO CEC; SILVA MG; NOBREGA FS; MARTINS PM; BARROSO PAV; ALLOUFA MAI. 2003. 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* 25: 501-504.
- MARCIANI-BENDEZÚ J; PINTO JEBP; PASQUAL M. 1990. Efeito de 6-benzilaminopurina (BAP) sobre a proliferação de brotos de abacaxizeiro, a partir de plântulas produzidas *in vitro*. *Revista Brasileira de Fruticultura* 12: 35-39.
- MONETTE PL. 1986. Micropropagation of kiwifruit using non-axenic shoot tips. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 6: 73-82.
- MOREIRAMA. 2001. *Produção e aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro Ananas comosus (L) Merrill cv. Pérola*. Lavras: UFLA. 81p. (Tese doutorado).
- MURASHIGE T. 1974. Plant growth substances in commercial uses of tissue culture. In: SKOOG F. (ed). *Plant Growth Substances* p. 426-434.
- OLIVEIRA PD. 1994. *Propagação in vitro de crisântemo (Dendranthema grandiflora Tzelev.) cv. Orange Reagen*. Lavras: UFLA. 116 p. (Tese mestrado).
- PAIVA PDO. 1997. Propagação *in vitro* de gloxínia. *Revista brasileira de Horticultura Ornamental* 3: 29-41.
- PASQUAL M; HOFFMANN A; RAMOS JD. 2001. *Cultura de tecidos - tecnologia e aplicações. Introdução: Situação e Perspectivas*. Lavras: UFLA/FAEPE. 72 p.
- PASQUAL M; SILVA AB; MACIEL ALR; PEREIRA AB; ALVES JMC. 1998. Efeito da cianimida hidrogenada e benzilamino purina na proliferação *in vitro* de brotos de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. Princesa Isabel. *Revista da Universidade de Alfenas* 4: 115-119.
- PEIXOTO PHP; PASQUAL M. 1995. Micropropagação da videira: efeitos do pH e do ágar. *Revista Ceres* 42: 431-443.
- PIERIK RLM; STEEGMANS HHM; HENDRIKS J. 1984. The influence of naphthaleneacetic acid on the growth of *in vitro* cultivated seedling of Bromeliaceae. *Scientia Horticulturae* 24: 193-199.
- ROCCA WM; MROGINKI LA. 1991. *Cultivo de tejidos in la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical. 66 p.
- SINGHA S. 1982. Influence of agar concentration on *in vitro* shoot proliferation of *Malus* sp. 'Almey' and *Pyrus communis* 'Seckel'. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 107: 657-660.
- SINGHA S. 1984. Influence of two comercial agar on *in vitro* proliferation of 'Almey' crabapple and 'Seckel' pear. *HortScience* 19: 227-228.
- SMITH LB; DOWS RJ. 1979. *Bromelioideae (Bromeliaceae)* Flora Neotropica Monograph. p. 1493-2142.
- ZAER JB; MAPES MO. 1985. Action of growth regulators. In: BONGA JM; DURZAN DJ. (eds). *Tissue culture in floresty*. Martinus Nijhoff Publishers. p. 231-255.