

Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Sm. cultivada *in vitro*

Shoey Kanashiro^{1,4}, Roberval de Cássia Salvador Ribeiro², Antonio Natal Gonçalves², Carlos Tadeu dos Santos Dias² e Teresa Jocys³

Recebido: 11.10.2005; aceito: 29.11.2006

ABSTRACT - (Effects of nitrogen concentrations on the growth of *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Sm. cultured *in vitro*). This work aimed to study the influence of different nitrogen concentrations (7.5; 15; 30; 60 and 120 mM) on the growth of *Aechmea blanchetiana* plantlets cultivated *in vitro*. The results showed that 7.5 mM of nitrogen in a modified liquid culture Murashige & Skoog (MS) medium was the best concentration for increasing fresh and dry mass production. **Key words:** *Aechmea blanchetiana*, Bromeliaceae, *in vitro* culture, nitrogen

RESUMO - (Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Sm. cultivada *in vitro*). O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos nutricionais de diferentes concentrações de nitrogênio (7,5; 15; 30; 60 e 120 mM) no crescimento de plântulas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro*. Concluiu-se que 7,5 mM de nitrogênio no meio líquido de Murashige & Skoog (MS) modificado foi a concentração ótima para a maior produção de massa fresca e seca.

Palavras-chave: *Aechmea blanchetiana*, Bromeliaceae, cultivo *in vitro*, nitrogênio

Introdução

Aechmea blanchetiana (Baker) L.B. Smith é uma bromélia terrestre nativa do Brasil comum nas restingas, onde formam grandes touceiras com folhagem de coloração amarelada, podendo invadir a Mata Atlântica (Floresta Ombrófila Densa), quando vive como epífita e perde a coloração amarelo-ouro, tornando-se verde (Leme & Marigo 1993). Lorenzi & Souza (1999) e Lorenzi & Mello Filho (2001) afirmaram que *A. blanchetiana* é cultivada isoladamente ou em grupos formando maciços densos, a pleno sol ou a meia-sombra, em canteiros ricos em matéria orgânica, podendo eventualmente ser cultivada em vasos e são plantas herbáceas perenes, rizomatosas, robustas, de 60 a 90 cm de comprimento, com folhagem e inflorescência decorativas.

A utilização comercial da micropropagação é uma realidade em diversos países do mundo com destaque para a Europa Ocidental e os Estados Unidos, onde é importante principalmente para a limpeza clonal e multiplicação de espécies ornamentais herbáceas e

arbustivas. Entre as inúmeras vantagens da técnica, destacam-se a manutenção do genótipo e do fenótipo de híbridos, estudos de mutações ou variedades genéticas selecionadas e o excelente estado fitossanitário das plantas obtidas (Giacometti 1990). Além disso, o cultivo *in vitro* de sementes pode ser considerado de grande importância na conservação de germoplasmas de bromélias ameaçadas de extinção, assegurando a variabilidade natural dessas espécies (Mercier & Kerbauy 1997).

O suprimento de macro e micronutrientes no meio de cultura é parte essencial no sistema de cultivo *in vitro*. Atualmente, os meios utilizados são baseados nas modificações empíricas de algumas formulações básicas e nas exigências nutricionais de plantas inteiras. As necessidades consideradas ideais variam amplamente entre os genótipos das plantas e sistemas de cultura (Williams 1993).

Gribble *et al.* (2002) mostraram que apesar da importância da nutrição mineral no crescimento de plântulas *in vitro*, poucos estudos abordaram a absorção ou a otimização dos meios utilizados. Como

1. Instituto de Botânica, Caixa Postal 3005, 01061-970 São Paulo, SP, Brasil

2. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Caixa Postal 9, 13418-900 Piracicaba, SP, Brasil

3. Instituto Biológico, Av. Conselheiro Rodrigues Alves 1252, 04014-002 São Paulo, SP, Brasil

4. Autor para correspondência: skanashi@uol.com.br

as plântulas *in vitro* crescem em condições especiais de fornecimento de nutrientes e podem não ter raízes, os mecanismos de absorção mineral podem ser diferentes daqueles utilizados pelas plantas em condições *in vivo*.

O uso mais freqüente de ferramentas da genética molecular para o entendimento da inter-relação entre os genes durante o desenvolvimento das plantas está contribuindo com o avanço rápido do conhecimento desses processos (Ramage & Williams 2002).

Dessa forma, considerando-se os aspectos mencionados, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de plântulas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro*.

Material e métodos

Plântulas de *Aechmea blanchetiana* obtidas através de sementeira *in vitro*, com dois meses após a germinação (apresentando em média altura de 31,67 mm; diâmetro de 26,27 mm; 5,11 folhas; folha com maior largura de 3,24 mm; 3,03 raízes; comprimento da maior raiz de 10,26 mm; diâmetro do caule de 1,27 mm; massa fresca de 0,065 g e massa seca de 0,0022 g) foram transferidas para frascos com volume de 360 mL, contendo 50 mL de meio de cultura Murashige & Skoog (MS) (1962) modificado com diferentes concentrações de nitrogênio. Os meios foram renovados a cada 30 dias. O pH foi ajustado para 5,8 e o meio de cultura foi utilizado na forma líquida. A composição e o balanço iônico dos meios de cultura encontram-se descritas na Tabela 1, sendo que no meio MS padrão a concentração de nitrogênio é de 60 mM.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, conforme Nogueira (1994), para todas as variáveis consideradas. O experimento constou de cinco tratamentos e quatro repetições, totalizando vinte parcelas. Cada parcela foi composta

de seis frascos contendo dez explantes, totalizando um mil de duzentas plântulas.

Para que o modelo de análise de variância da regressão tenha validade, satisfazendo as pressuposições de homogeneidade de variâncias, independência de erros e erros com distribuição normal, fez-se análise exploratória dos dados, utilizando o programa SAS (SAS Institute 1996) e para a análise de variância da regressão, o programa SANEST (Zonta 1991).

A altura da plântula foi mensurada com régua graduada em centímetros, considerando-se a medida compreendida entre a base do caule e a extremidade da folha com maior tamanho. A dimensão da folha com maior largura foi determinada utilizando-se paquímetro, com escala em centímetros, considerando-se visualmente a maior dimensão em largura. O diâmetro do caule foi medido com a utilização de paquímetro, na sua maior dimensão. O número de folhas foi avaliado pela contagem das folhas de plantas individualmente, desconsiderando-se as folhas senescentes da parte basal. O número de raízes foi avaliado pela contagem das raízes individualmente, desconsiderando-se aquelas menores que 1 mm. O comprimento da maior raiz foi mensurado, considerando-se a medida compreendida entre a inserção no caule e o ápice da raiz com maior tamanho.

Para a análise da massa fresca, as plântulas foram retiradas do frasco de meio de cultura, mergulhadas por três vezes em água destilada. Após o enxágüe foram centrifugadas em centrífuga manual a 500 rpm durante 15 segundos para a eliminação da água aderida à superfície e pesadas individualmente em balança analítica. Posteriormente, as folhas foram destacadas do caule na linha de inserção da bainha e sua massa determinada, constituindo-se a massa fresca das folhas.

Para a análise da massa seca, as plântulas foram separadas em folhas, caule e raízes, e acondicionada individualmente em sacos de papel "Kraft" e secas

Tabela 1. Concentrações dos íons e suas respectivas fontes utilizados nos meios de cultura Murashige & Skoog (MS) modificados em função das diferentes concentrações de nitrogênio (7,5; 15; 30; 60 e 120 mM) no crescimento de *Aechmea blanchetiana in vitro*.

Íons	Fonte	Concentração de nitrogênio (mM)				
		7,5	15	30	60	120
NO ₃ ⁻	KNO ₃	3,7461	3,7461	3,7461	3,7461	3,7461
NO ₃ ⁻	NH ₄ NO ₃	1,8770	5,6270	13,1270	28,1403	58,1270
NH ₄ ⁺	NH ₄ NO ₃	1,8770	5,6270	13,1270	28,1403	58,1270

em estufas dotadas de sistema com circulação forçada e renovação de ar, na temperatura de 70 °C, até atingir massa constante.

Resultados e Discussão

Análise biométrica - Os dados das variáveis biométricas foram submetidos à análise exploratória e posteriormente à análise da variância da regressão, sendo que as médias e as significâncias dos efeitos da regressão estão dispostas na Tabela 2.

A análise dos resultados mostrou que no intervalo experimental considerado (concentrações de nitrogênio de 7,5 a 120 mM), a altura da plântula de *A. blanchetiana* decresceu linearmente com o aumento da concentração de nitrogênio, sendo que para cada mM de nitrogênio acrescido ao meio, houve um decréscimo de 0,0127 cm na altura da plântula e a melhor concentração de nitrogênio foi 7,5 mM (Figura 1A). A mesma tendência foi encontrada por Grossi (2000) em que as concentrações de nitrogênio variaram entre 1,78 a 30 mM na bromélia *Aechmea nudicaulis* (Linnaeus) Griesebach que apresentou melhor crescimento na concentração 7,5 mM, sendo que na concentração 1,78 mM apresentou a menor média de altura da plântula e prejudicou o crescimento na maior concentração (30 mM). Avila *et al.* (1998), trabalhando com *Solanum tuberosum*, variedade 'Spunta', mostraram que 30 mM de nitrogênio promoveu maior comprimento de broto, tanto no meio líquido como no sólido, quando comparado à concentração de 60 mM. Da mesma forma, Evans

(1993) cultivando *Solanum* spp. em meio MS observou uma diminuição do comprimento dos brotos com o aumento da concentração de nitrogênio (concentrações entre 20 e 60 mM). Russowski & Nicoloso (2003) trabalhando com *Pfaffia glomerata* verificaram que o crescimento em altura das brotações das plântulas foi maior na concentração usual do meio MS, decrescendo nas maiores concentrações, segundo regressão quadrática. Gomes & Shepherd (2000) notaram que em *Sinningia allagophylla* cultivada no meio MS com diferentes concentrações de NO₃⁻, o comprimento do eixo principal não mostrou diferença, indicando que a espécie é eficiente em utilizar o nitrogênio. Porém, o comportamento de algumas difere do observado em *A. blanchetiana*, como verificado por Sarmiento *et al.* (1994), os quais mostraram que plântulas de oliveira cv. 'Manzanilla', com o aumento da concentração de NH₄NO₃ (concentração entre 0 e 20 mM) no meio, apresentaram crescimento proporcional em altura, atingindo os maiores valores nas concentrações 10 e 20 mM de nitrogênio.

Em *A. blanchetiana*, com o aumento da concentração de nitrogênio no meio MS modificado, a variável folha com maior largura atingiu o seu valor máximo em 50 mM de nitrogênio e decresceu segundo modelo quadrático até alcançar o seu menor valor em 120 mM (Figura 1B). Evans (1993), diferente dos resultados obtidos nesse trabalho, mostrou em *Solanum* spp., que a redução da concentração de nitrogênio no meio (concentrações entre 20 e 60 mM) produziu plântulas com folhas mais largas.

Tabela 2. Médias das variáveis biométricas da espécie *Aechmea blanchetiana* em função de diferentes concentrações de nitrogênio no meio de cultura Murashige & Skoog (MS) no crescimento de *Aechmea blanchetiana* e significância dos efeitos de regressão.

N (Mm)	Altura da plântula (cm)	Folha com maior largura (mm)	Diâmetro do caule (mm)	Número de folhas (unidade)	Comprimento da maior raiz (cm)		Número de raízes (cm)
					do	log	
7,5	10,96	5,70	2,74	8,23	9,62	0,9832	9,15
15	10,99	6,11	2,79	8,25	8,70	0,9397	9,20
30	11,13	5,85	2,71	8,77	8,62	0,9356	9,11
60	10,89	5,99	2,71	8,94	7,17	0,8557	8,45
120	9,81	5,50	2,69	9,12	5,71	0,7563	8,34
cv (%)	6,037	2,958	3,518	3,367	—	3,066	4,315
teste F	ns	***	ns	***	—	***	**
linear	***	***	ns	***	—	***	***
quadrática	ns	***	ns	**	—	ns	ns
cúbica	ns	ns	ns	ns	—	ns	ns

do = dados originais; ns = não significativos ($\alpha > 0,05$); * = significativo a 5% ($\alpha \leq 0,05$); ** = significativo a 1% ($\alpha \leq 0,01$); *** = significativo a 0,1% ($\alpha \leq 0,001$).

A análise de variância da regressão não mostrou nenhuma tendência significativa na variável diâmetro de caule, indicando que não houve diferença significativa entre os tratamentos com o aumento da concentração de nitrogênio. Assim, a média geral do diâmetro de caule foi ajustada pela regressão em 2,76 mm (Figura 1C). Os carboidratos são armazenados no caule em *Ananas comosus* (L.) Meer, segundo Simão (1998). Assim, provavelmente, em *A. blanchetiana* não houve início de armazenamento de carboidratos no caule nos primeiros 120 dias de cultivo *in vitro*, alocando-os para o crescimento e desenvolvimento de outros órgãos da plântula.

Com o aumento da concentração de nitrogênio no meio MS, o número de folhas aumentou, segundo a regressão quadrática (Figura 1D). Da mesma forma, Grossi (2000) encontrou em *A. nudicaulis* comportamento semelhante, com maior número de folhas nas maiores concentrações de nitrogênio (concentração entre 1,78 e 30 mM). Provavelmente, nas duas espécies de bromeliáceas estudadas, as maiores concentrações de nitrogênio proporcionaram a manutenção das folhas mais velhas por maior tempo nas plântulas, diferentemente daquelas cultivadas nas concentrações menores com menor número de folhas, que retiraram nitrogênio das folhas mais velhas, causando senescência, e transportando para as folhas mais novas (Epstein & Bloom 2006). Resultados semelhantes também foram encontrados por Russowski & Nicoloso (2003) em *Pfaffia glomerata*. Porém, Gomes & Shepherd (2000) encontraram resultados diferentes em *Sinningia allagophylla* no meio MS quando cultivada em meios com diferentes concentrações de NO_3^- , cujo número de folhas não mostrou diferença significativa nas concentrações utilizadas.

O comprimento da maior raiz de *A. blanchetiana* apresentou decréscimo linear, com o aumento da concentração de nitrogênio (Figura 1E). O mesmo comportamento foi encontrado no trabalho de Grossi (2000) com *A. nudicaulis*, onde o aumento da concentração de nitrogênio (concentração entre 1,78 e 30 mM) diminuiu o tamanho do sistema radicular. De forma semelhante, Sweby *et al.* (1994) cultivando brotos de *Nicotiana tabacum* em meio MS modificado verificaram que essa variável não se alterou significativamente com o aumento da concentração de nitrogênio até 60 mM, mas o crescimento foi inibido na concentração 120 mM de nitrogênio. Por outro lado, Gomes & Shepherd (2000) mostraram que o

comprimento da maior raiz de *S. allagophylla* não apresentou diferença significativa com o aumento da concentração de nitrogênio no meio MS.

A análise dos resultados mostrou que o número de raízes de *A. blanchetiana* decresceu linearmente com o aumento da concentração de nitrogênio no meio MS modificado (Figura 1F). Grossi (2000) encontrou, em *A. nudicaulis*, a mesma tendência na variável número de raízes, encontrando maior quantidade de raízes na menor concentração de nitrogênio (1,78 mM). Da mesma forma, Gomes & Shepherd (2000) estudando o cultivo *in vitro* de *S. allagophylla* no meio MS, mostraram que em meios com diferentes concentrações de nitrogênio, o número de raízes não mostrou diferença significativa, bem como Russowski & Nicoloso (2003), trabalhando com *P. glomerata*, constataram maior número de raízes na concentração 50% de nitrato de amônio contido no meio MS e tendendo ao decréscimo nas maiores concentrações. Análise de biomassa - Os dados de massa fresca e seca foram submetidos à análise exploratória e posteriormente à análise de variância da regressão, sendo que as médias e as significâncias dos efeitos da regressão estão dispostas na Tabela 3.

No intervalo considerado (concentração de nitrogênio entre 7,5 e 120 mM), a análise dos resultados mostrou que a massa fresca das folhas decresceu linearmente com o aumento da concentração de nitrogênio no meio MS modificado, sendo que para cada mM de nitrogênio acrescido, houve um decréscimo de 0,0008 g na biomassa (Figura 2A).

A massa fresca total diminuiu linearmente à medida que se aumentou a concentração de nitrogênio, sendo que para cada mM de nitrogênio acrescido ao meio, houve um decréscimo de 0,0018 g na massa fresca (Figura 2B). Comportamento semelhante foi observado por Grossi (2000), onde a menor concentração promoveu maior produção de massa fresca. Provavelmente, o cultivo em concentrações maiores de nitrogênio tenderia a diminuir a produção de massa fresca, como foi observado no presente experimento. Estudando três espécies diferentes de orquídea, Dijik & Eck (1995a, b) observaram comportamentos diferentes conforme a espécie estudada, sendo que a produção de biomassa diminuiu em *Dactylorhiza incarnata*, aumentou em *D. praetermissa* e se manteve estável em *D. majalis*, com o aumento da concentração de nitrogênio no meio (entre 0 e 12 mM). Evans (1993) estudando nove cultivares de *Solanum* spp.

cultivados em meio MS com diferentes concentrações de nitrogênio (entre 20 e 60 mM), concluiu que não houve efeito significativo no crescimento de massa fresca dos brotos com o aumento da concentração de nitrogênio.

A massa seca da folha não variou significativamente, conforme o aumento da concentração de nitrogênio em relação ao meio MS modificado (Figura 2C), enquanto que a massa seca do caule de *A. blanchetiana* diminuiu linearmente (Figura 2D).

Comportamento diferente foi observado por Sweby *et al.* (1994) ao conduzir experimento com brotos de *Nicotiana tabacum* na concentração de 30 mM de nitrogênio que resultou num aumento significativo da massa seca do caule, quando comparada com a ausência de nitrogênio no meio, sendo que esse parâmetro não se alterou significativamente com o aumento da concentração de nitrogênio até 60 mM, porém inibiu o crescimento na concentração 120 mM.

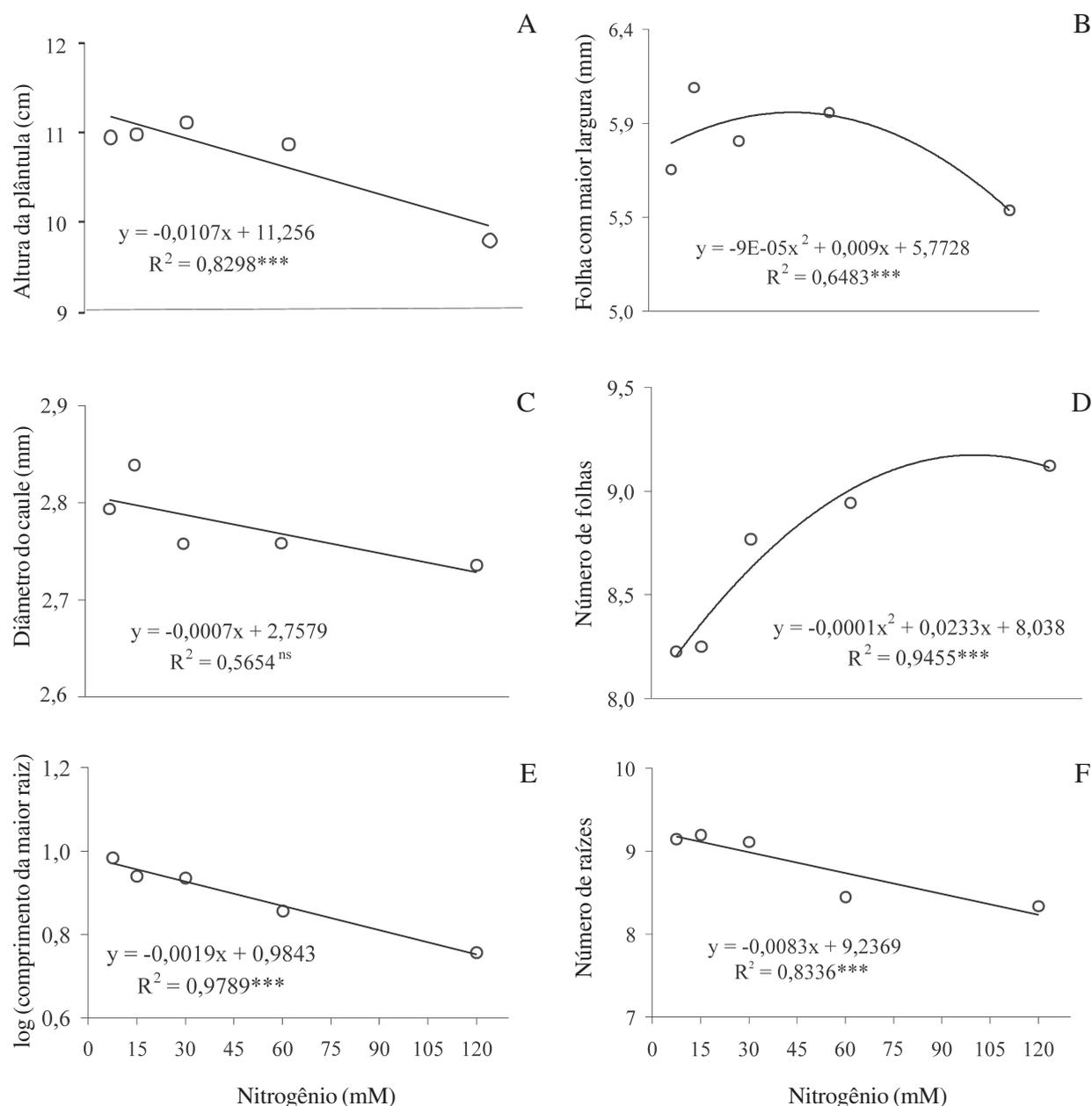


Figura 1. Médias observadas e funções ajustadas para as variáveis altura da plântula (A), folha com maior largura (B), diâmetro do caule (C), número de folhas (D), comprimento da maior raiz (E) e número das raízes (F) da plântula de *Aechmea blanchetiana* cultivada *in vitro* durante 120 dias em função das diferentes concentrações de nitrogênio.

Tabela 3. Médias das variáveis de massa da espécie *Aechmea blanchetiana* em função de diferentes concentrações de nitrogênio no meio de cultura Murashige & Skoog (MS) no crescimento de *Aechmea blanchetiana* e significância dos efeitos de regressão.

N (mM)	Massa fresca (g)		Massa seca (mg)				
	Folha	Total	Folha	Caulé	Raízes	Total	Parte aérea
7,5	0,68	0,96	33,5955	11,0825	4,08667	48,7648	44,6781
15	0,71	0,99	33,0620	10,5335	3,7596	47,3551	43,5954
30	0,68	0,92	34,6506	10,4541	3,6416	48,7463	45,1047
60	0,66	0,89	34,2077	9,1702	3,0864	46,4643	43,3779
120	0,60	0,77	32,0695	7,1694	2,8320	42,0709	39,2389
cv (%)	8,381	7,881	6,552	9,676	12,091	7,060	6,862
teste F	ns	**	ns	***	**	ns	ns
linear	**	***	ns	***	***	***	**
quadrática	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
cúbica	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns = não significativo ($\alpha > 0,05$); * = significativo a 5% ($\alpha \leq 0,05$); ** = significativo a 1% ($\alpha \leq 0,01$); *** = significativo a 0,1% ($\alpha \leq 0,001$)

Em plântulas de *A. blanchetiana*, a massa seca da parte aérea decresceu linearmente, conforme o aumento da concentração de nitrogênio no meio MS modificado (Figura 2E). Russowski & Nicoloso (2003) trabalhando com *Pfaffia glomerata*, encontraram que o aumento da massa seca da parte aérea foi maior na concentração 80% de nitrato de amônio contido no meio MS e após alcançar o ponto de máxima produção de massa seca, a curva decresceu nas maiores concentrações de acordo com a equação do segundo grau. Na variação da concentração de nitrogênio no meio em cultivo de *Laelia cinnabarina*, a omissão de nitrogênio reduziu drasticamente o crescimento das plântulas, causando diminuição do acúmulo de massa seca (Stancato & Faria 1996).

A análise da regressão mostrou que com o aumento da concentração de nitrogênio, a massa seca das raízes diminuiu linearmente, sendo que a cada mM de nitrogênio acrescido ao meio houve um decréscimo de 0,0105 mg (Figura 2F). Comportamento semelhante foi constatado por Russowski & Nicoloso (2003) no cultivo *in vitro* de *P. glomerata*, conforme o aumento da concentração de nitrogênio no meio MS, que observaram máxima produção de matéria seca de raízes na concentração 80% de nitrato de amônio contido no meio MS, segundo uma regressão quadrática.

A análise dos resultados mostrou que a massa seca total de *A. blanchetiana* decresceu linearmente, com o aumento da concentração de nitrogênio, sendo

que a cada mM de nitrogênio acrescido ao meio, a massa seca total diminuiu 0,0571 mg (Figura 2G). No entanto, Grossi (2000) não encontrou diferenças significativas na massa seca total de *A. nudicaulis*, com o aumento da concentração de nitrogênio. Russowski & Nicoloso (2003) trabalhando com *Pfaffia glomerata*, encontraram a máxima produção de biomassa na concentração 60% de nitrato de amônio contido no meio MS e tendência ao decréscimo nas maiores concentrações de nitrogênio, segundo uma regressão quadrática.

Dessa forma, sendo *A. blanchetiana* uma Bromeliaceae com hábito de crescimento terrestre, a pleno sol, em solo pobre das restingas e, ocasionalmente, como epífita na Mata Atlântica (Leme & Marigo 1993), é uma espécie plenamente adaptada às condições de escassez de nutrientes. Os resultados obtidos no presente experimento permitem a conclusão de que a menor concentração de nitrogênio (7,5 mM) no meio MS modificado foi o nível que proporcionou a maior produtividade de massa fresca e seca, adequando e otimizando a utilização desse nutriente em meio de cultura no crescimento das plântulas de *A. blanchetiana in vitro*, o que corrobora a hipótese de crescimento lento observado em bromeliáceas no seu ambiente natural.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq pela bolsa de estudo concedida ao primeiro autor.

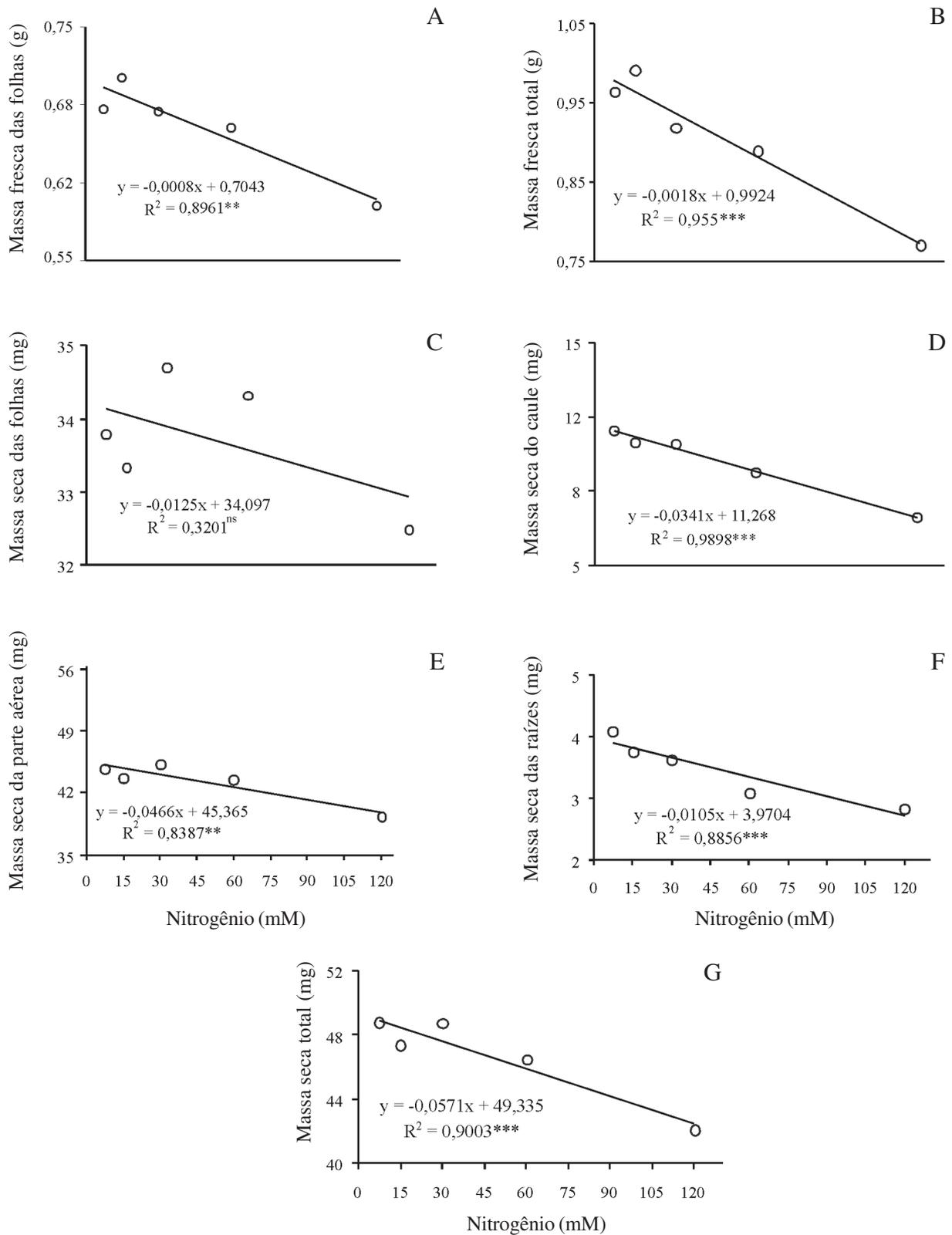


Figura 2. Médias observadas e funções ajustadas para as variáveis de massa fresca das folhas (A), massa fresca total (B), massa seca das folhas (C), massa seca do caule (D), massa seca da parte aérea (E), massa seca das raízes (F) e massa seca total (G) da plântula de *Aechmea blanchetiana* cultivada *in vitro* durante 120 dias em função das diferentes concentrações de nitrogênio.

Literatura citada

- Avila, A.L., Pereyra, S.M. & Arguello, J.A.** 1998. Nitrogen concentration and proportion of NH_4^+ -N affect potato cultivar response in solid and liquid media. *HortScience* 33: 336-338.
- Dijk, E. & Eck, N.** 1995a. Axenic *in vitro* nitrogen and phosphorus responses of some Dutch marsh orchids. *New Phytologist* 131: 353-359.
- Dijk, E. & Eck, N.** 1995b. Ammonium toxicity and nitrate response of axenically grown *Dactylorhiza incarnata* seedlings. *New Phytologist* 131: 361-367.
- Epstein, E. & Bloom, A.J.** 2006. Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. 2 ed. Planta, Londrina.
- Evans, N.E.** 1993. A preliminary study on the effects of nitrogen supply on the growth *in vitro* of nine potato genotypes (*Solanum* spp.). *Journal of Experimental Botany* 44: 837-841.
- Giacometti, D.C.** 1990. Impacto atual da Cultura de Tecidos de Plantas. In: A.C. Torres & L.S. Caldas (eds.). Técnicas e aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas. ABCTP/ EMBRAPA, Brasília, pp. 19-28.
- Gomes, M.A.N. & Shepherd, S.L.K.** 2000. Estudo de nutrição mineral *in vitro* relacionado à adaptação de *Sinningia allagophylla* (Martius) Wiehler (Gesneriaceae) às condições de cerrado. *Revista Brasileira de Botânica* 23: 153-159.
- Gribble, K., Conroy, J.P., Holford, P. & Milham, P.J.** 2002. *In vitro* uptake of minerals by *Gypsophila paniculata* and hybrid eucalypts, and relevance to media mineral formulation. *Australian Journal of Botany* 50: 713-723.
- Grossi, F.** 2000. Aspectos da nutrição nitrogenada *in vitro* e atividade da redutase de nitrato em uma espécie de bromélia. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Leme, E.M.C. & Marigo, L.C.** 1993. Bromélias na natureza. Marigo Comunicação Visual, Rio de Janeiro.
- Lorenzi, H. & Mello Filho, L.E.** 2001. As plantas tropicais de R. Burle Max. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa.
- Lorenzi, H. & Souza, H.M.** 1999. Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 2 ed. Plantarum, Nova Odessa.
- Mercier, H. & Kerbauy, G.B.** 1997. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In: Y.P.S. Bajaj, (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry: High Tech and Micropropagation VI. Springer-Verlag, Berlin, pp. 43-57.
- Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nogueira, M.C.S.** 1994. Estatística experimental aplicada à experimentação agrícola. ESALQ, Piracicaba.
- Ramage, C.M. & Williams, R.R.** 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In vitro Cellular and Development Biology* 38: 115-124.
- Russowski, D. & Nicoloso, F.T.** 2003. Nitrogênio e fósforo no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. *Ciência Rural* 33: 57-63.
- SAS Institute** 1996. The SAS-system for windows: release 6.11 (software). Cary.
- Sarmiento, R., Garcia, J.L., Mazuelos, C., Linan, J. & Troncoso, A.** 1994. Effect of the form and concentration of N on the growth and mineral composition of olive seedlings. *Acta Horticulturae* 356: 156-161.
- Simão, S.** 1998. Tratado de Fruticultura. 1 ed. FEALQ, Piracicaba.
- Stancato, G.C. & Faria, R.T.** 1996. *In vitro* growth and mineral nutrition of the lithophytic orchid *Laelia cinnabarina* Batem. (Orchidaceae) I: Effects of macro and microelements. *Lindleyana* 11: 41-43.
- Sweby, D.L., Hockett, B.I. & Watt, M.P.** 1994. Effects of nitrogen nutrition on salt-stressed *Nicotiana tabacum* var. Samsun *in vitro* plantlets. *Journal of Experimental Botany* 45: 995-1008.
- Williams, R.R.** 1993. Factors determining mineral uptake *in vitro*. *Acta Horticulture* 289: 165-169.
- Zonta, E.P. & Machado, A.A.** 1991. Manual do Sanest: sistema de análise estatística para microcomputadores. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.