

**Establecimiento *in vitro* de la bromelia  
*Neoregelia carolinae* (Beer)L.B.Sm**

**Daniel Fernando Castañeda Ramírez**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras**

Noviembre, 2017

ZAMORANO  
CARRERA DE INGENIERIA AGRONÓMICA

**Establecimiento *in vitro* de la bromelia  
*Neoregelia carolinae* (Beer) L.B. Sm**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniero Agrónomo en el  
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Daniel Fernando Castañeda Ramírez**

**Zamorano, Honduras**  
Noviembre, 2017

## **Establecimiento *in vitro* de la bromelia *Neoregelia carolinae* (Beer) L.B. Sm.**

**Daniel Fernando Castañeda Ramírez**

**Resumen.** La bromelia *Neoregelia carolinae* (Beer) L.B. Sm es uno de los ornamentales que se encuentran con poca explotación e investigación, pero es de gran interés por la forma de las hojas y pigmentación llamativa que la hacen importante a nivel ornamental. Por estos atributos, su demanda en los últimos años ha incrementado y generado la búsqueda de formas de propagación masiva como la micropropagación. El objetivo de este estudio fue determinar el mejor medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de *N. carolinae* a partir de explantes foliares, yemas axilares y meristemas apicales. Se evaluaron medios de cultivo de Murashige y Skoog (MS) suplementados con fitohormonas (6-bencilaminopurina y ácido naftalenacético) en los explantes mencionados. Para la etapa de establecimiento el único explante que respondió a los tratamientos fue el meristemo apical. Los medios más adecuados para este explante fueron el medio suplementado con 1.86 mg/L de ANA y el medio suplementado con 1 mg/L de BAP, los cuales no presentaron diferencia estadística significativa para las variables altura y número de hojas. Para la etapa de multiplicación el medio suplementado con 1.8 mg/L de ANA + 2 mg/L de AIB + 2 mg/L de Kinetina presentó formación de un brote por explante a partir de los meristemas apicales establecidos. Los mejores medios a utilizar en el establecimiento *in vitro* de meristemas apicales de *N. carolinae* son los de MS suplementado con 1.86 mg/L de ANA y MS con 1 mg/L de BAP.

**Palabras clave:** Auxinas, citoquininas, meristemo apical, ornamental.

**Abstract.** The bromeliad *Neoregelia carolinae* (Beer) L.B. Sm is one of the ornamental ones that are with little exploitation and investigation, but it is of great interest by the form of the leaves and striking pigmentation that make it important at an ornamental level. For these attributes, its demand in recent years has increased and generated the search for forms of mass propagation such as micropropagation. The objective of this study was to determine the best culture medium for *in vitro* establishment of *N. carolinae* from leaf explants, axillary buds and apical meristems. Murashige and Skoog (MS) culture media supplemented with phytohormones (6-benzylaminopurine and naphthaleneacetic acid) were evaluated in the explants. For the establishment stage, the only explant that responded to the treatments was the apical meristem. The most suitable for this explant were the medium supplemented with 1.86 mg / L of ANA and the media supplemented with 1 mg / L of BAP, which did not present significant statistical difference for the variables. For the multiplication stage, the media supplemented with 1.8 mg / L of ANA + 2 mg / L of AIB + 2 mg / L of Kinetin showed one shoot per explant formation from established apical meristems. The best media to use in the *in vitro* establishment of apical meristems of *N. carolinae* are MS supplemented with 1.86 mg / L of ANA and MS with 1 mg / L of BAP.

**Key words:** Auxins, apical meristem, cytokinins, ornamental.

## CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros y Figuras .....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. METODOLOGÍA.....</b>	<b>3</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>8</b>
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>11</b>
<b>5. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>12</b>
<b>6. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>13</b>

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Medio de cultivo basal Murashige y Skoog modificado para establecimiento de explantes foliares, yemas axilares y meristemos apicales de <i>Neoregelia carolinae</i> .....	5
2. Fitohormonas usadas para establecer explante foliar de <i>Neoregelia carolinae</i> .....	6
3. Fitohormonas usadas para establecer yemas axilares de <i>Neoregelia carolinae</i> .....	6
4. Fitohormonas usadas para establecer meristemos apicales de <i>Neoregelia carolinae</i> ...	6
5. Altura y número de hojas promedio de <i>N. carolinae</i> establecida <i>in vitro</i> a partir de meristemos apicales.....	9

Figuras	Página
1. <i>Neoregelia carolinae</i> forma tricolor.....	3
2. Preparación de explantes de <i>Neoregelia carolinae</i> ; A. Explantes foliares extraídos; B. Preparación de los explantes foliares; C. Tallo para extracción de yemas axilares; D. Extracción de yema axilar con el estereoscopio; E. Brotes jóvenes para la extracción de meristemos apicales; F. Extracción de meristemo apical con el estereoscopio.....	4
3. Explantes foliares y yemas axilares de <i>N. carolinae</i> establecidos <i>in vitro</i> ; A. Explantes foliares a los 60 días de establecidos; B. Yemas axilares a los 60 días de establecidas. ....	8
4. Respuesta de explantes apicales a fitohormonas suplementadas; A. Meristemo apical luego de 7 días de establecido e incubado en oscuridad; B. Meristemo apical 28 días luego de establecido. ....	9
5. Respuesta de explantes apicales a fitohormonas suplementadas en multiplicación; A. Explante establecido con brote formado (parte aérea); B. Explante establecido con brote formado (parte basal).....	10

## 1. INTRODUCCIÓN

Dentro de la producción y el comercio de las flores de corte y ornamentales se han dado cambios rápidos en los últimos años, en un mercado tan cambiante y competitivo la introducción de nuevas plantas es fundamental (Carneiro et al. 2000). Un claro ejemplo de esto es Colombia el cual se ha desarrollado exponencialmente en este mercado, donde en el 2010 obtuvo ingresos de aproximadamente US\$ 1.240 billones solo por exportaciones de ornamentales (Asocolflores 2011). Por esta razón es de suma importancia la introducción de ornamentales exóticos, los cuales van a expandir y diversificar las opciones ornamentales dentro del mercado (Carneiro et al. 2000).

Existe una gran lista de bromelias ornamentales prometedoras, dentro de estas se encuentra la *Neoregelia carolinae* (Beer) L.B. Sm, la cual se encuentra con poca explotación e investigación y es de gran interés dentro de esta industria (Kumar et al. 2012). La *N. carolinae* es una planta herbácea, monocárpica y epífita, con hojas perennes y es nativa de las selvas subtropicales del sureste de Brasil (PR 2016). Se caracteriza por sus hojas en forma de espada y por que al momento de la floración presenta una pigmentación de color rojizo o violeta en el centro de la planta lo que la hace muy atractiva (JBM 2016). Es muy llamativa para el uso doméstico, sobre todo en donde se presentan condiciones humedad alta (Castillo 2012).

La *Neoregelia carolinae* no alcanza grandes dimensiones, normalmente de altura y largo no superan los 40 cm y de ancho puede llegar hasta los 60 cm (Elicriso 2016). Las braqueas en la planta generan una especie de copa que sirve para la recolección de agua lluvia, en la cual la planta de cierta manera se nutre al descomponer diferentes entes que son atrapados en estas aguas (Elicriso 2016). También su pigmentación depende mucho de que tan nutrida está en ese momento, una bromelia bien nutrida presenta una coloración verde intensa (Herndon 2015).

A este género pertenecen 70 variedades, pero una de las que posee mayor interés y valor comercial es la variedad tricolor la cual se caracteriza principalmente por poseer unas franjas blanquecinas en sus hojas y presentar una coloración rosa que con la floración se va enrojeciendo (PR 2016). Además posee en su parte céntrica un bulbo reproductor este es el que posee las inflorescencias de la planta, estas son cubiertas por brácteas que a medida que la planta está entrando en maduración se van estrechando y presentando un coloración cada vez más fuerte (Herndon 2015).

La *Neoregelia carolinae* se puede propagar convencionalmente por medio de semillas o retoños. La propagación por semillas es la menos deseada y usada, ya que para poder obtener una planta madura demora aproximadamente seis años y requiere una alta humedad que tiene que ser constante durante el desarrollo de la planta (Franco 2013).

La propagación por retoños es mucho más usada comercialmente por las ventajas que presenta, ya que este método de propagación es mucho más rápido en comparación con el de las semillas se puede obtener una planta madura aproximadamente en uno a tres años. A pesar de que esta opción es muy buena para su propagación es poco masiva y presenta problemas de sanidad principalmente en el retoño (Fránco 2013).

El cultivo de tejidos es una de las mejores opciones para poder suplir las demandas del mercado sin necesidad de dañar o alterar el hábitat natural de esta especie y produciendo plantas sanas masivamente (Carneiro et al. 2000).

Dentro del género *Neoregelia* se han reportado experimentos para su propagación *in vitro*, se han utilizado explantes foliares, yemas axilares y meristemos apicales. Para la producción de brotes a partir de estos explantes se ha tenido éxito como se puede evidenciar en estudios realizados por Carneiro et al (2000) y Rodrigues et al (2014), en los que se han probado diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas por la sinergia y efectividad que presentan estas para la formación de brotes.

El objetivo del estudio fue:

- Determinar el mejor medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de *N. carolinae* a partir de explantes foliares, yemas axilares y meristemos apicales.

## 2. METODOLOGÍA

El experimento se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.

### **Fuente del explante.**

Para los experimentos de establecimiento se utilizaron explantes foliares, yemas axilares y meristemas apicales. Los explantes fueron obtenidos de la plantación de *Neoregelia carolinae* forma tricolor, ubicada en la Unidad de Ornamentales de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano (Figura 1).



Figura 1. *Neoregelia carolinae* forma tricolor en la unidad de ornamentales de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras.

La recolección de los explantes se realizó separando todas las hojas de la base en donde está ubicada la inflorescencia. Luego se procedió a cortar hojas maduras y las hojas tiernas en fracciones de aproximadamente seis cm. Con ayuda del estereoscopio, se procedió a extraer las yemas axilares del tallo. Por último, los meristemas apicales fueron extraídos de los brotes jóvenes (Figura 2). Posterior a la recolección de explantes, estos fueron sometidos a desinfección.

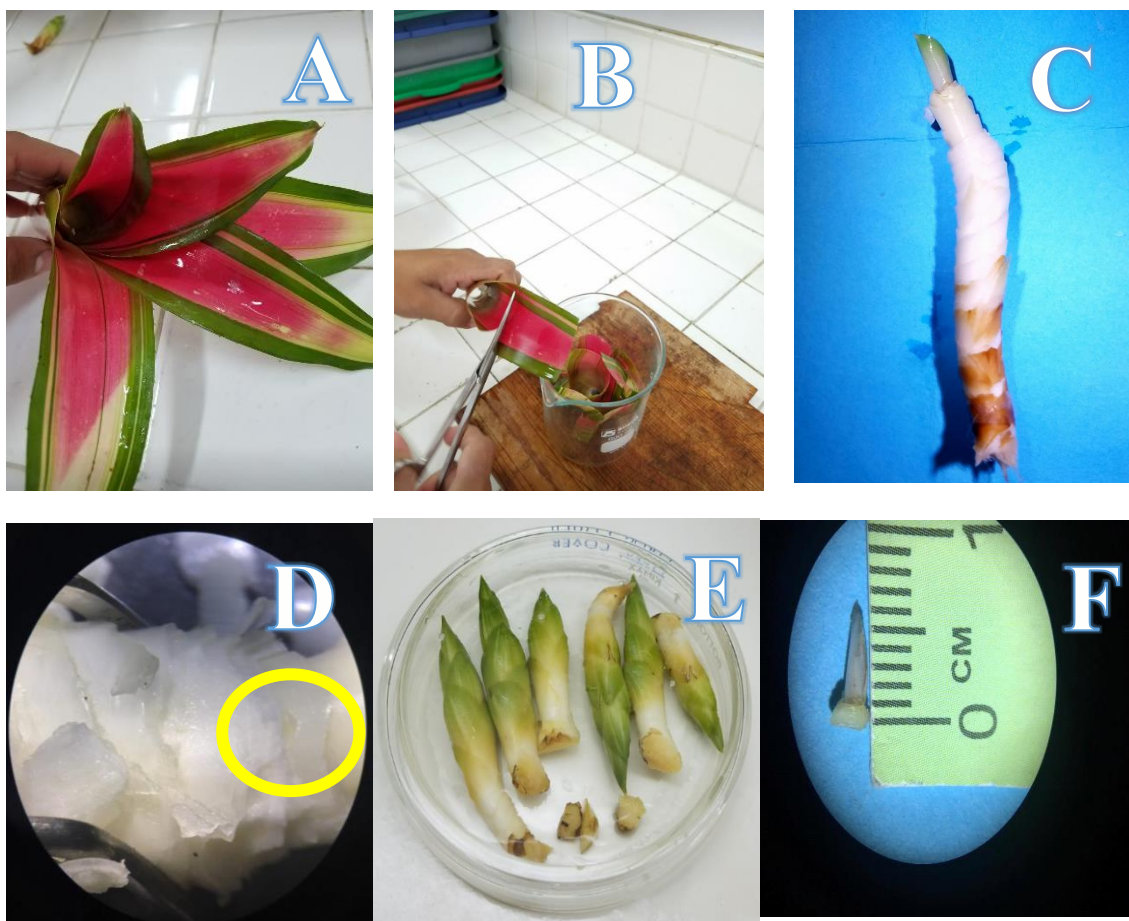


Figura 2. Preparación de explantes de *Neoregelia carolinae*. A. Explantes foliares extraídos; B. Preparación de los explantes foliares; C. Tallo para extracción de yemas axilares; D. Yema axilar vista con el estereoscopio; E. Brotes jóvenes para la extracción de meristemas apicales; F. Meristemo apical visto con el estereoscopio.

### Desinfección superficial del material vegetal.

**Desinfección superficial de explantes foliares.** Los explantes foliares se lavaron con agua y jabón después de separarlos del tallo, después del lavado se cortaron porciones de 6 cm de largo y ancho eliminando el borde que estaba pegado al tallo y se sumergieron en solución antioxidante estéril, luego en NaOCl al 20% volumen/volumen (v/v) (4.72% ingrediente activo) con dos gotas de Tween80 por cada 100mL, durante 10 minutos. Por último, se lavaron tres veces con agua destilada estéril.

**Desinfección superficial de yemas axilares y meristemas apicales.** Las yemas axilares y meristemas apicales se lavaron con agua y jabón antes de separarlos del tallo, después de que se han removido las hojas se extrajeron las yemas axilares y meristemas apicales con algo de tejido alrededor. Después de cortar los explantes se sumergieron en solución antioxidante estéril, luego en NaOCl al 10% (v/v) (4.72% ingrediente activo) con dos gotas de Tween® 80 por cada 100 mL, durante 10 minutos. Por último, se lavaron tres veces con agua destilada estéril.

### Medio de cultivo.

Los explantes se establecieron en el medio de Murashige y Skoog modificado (Cuadro 1) evaluando medios publicados para cada explante. A todos los medios se les adicionó 2 mL/L de “Plant Preservative Mixture<sup>®</sup>” y se ajustó el pH de todos los medios a 5.8. Los medios fueron solidificados con Phytigel<sup>®</sup> 1.8 g/L y esterilizados a 121 °C, 20 PSI por 20 minutos.

Cuadro 1. Medio de cultivo basal Murashige y Skoog modificado para establecimiento de explantes foliares, yemas axilares y meristemos apicales de *Neoregelia carolinae*.

Componentes	Fórmula	Nombre Común	mg/L
Macroelementos	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monobásico de potasio	170.000
	KNO <sub>3</sub>	Nitrato de potasio	1,900.000
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Nitrato de amonio	1,650.000
Microelementos	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Ácido bórico	6.200
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Molibdato de sodio bihidratao	0.250
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido Etilendiaminotetraacético	50.000
Vitaminas		Myo-inositol	100.000
		Tiamina	0.100
		Piridoxina	0.500
		Ácido Nicotínico	0.500
		Glicina	2.000
Carbohidrato		Sacarosa	30,000.00

Fuente: Kyte 1987

**Medios de cultivo para explante foliar.** Para las secciones de hoja se evaluaron dos tratamientos basados en el medio de Murashige y Skoog (MS) suplementado con auxinas y citocininas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Fitohormonas usadas para establecer explante foliar de *Neoregelia carolinae* en el laboratorio de tejidos vegetales de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras.

Fitohormona	Dosis mg/L	Autor
BAP	3.37	Rodrigues et al. 2014
BAP+ANA	5 + 0.50	Carneiro et al. 2000

BAP=6-Bencilaminopurina

ANA=Ácido 1-naftalenacético

**Medios de cultivo para yemas axilares y meristemos apicales.** Para las yemas axilares y meristemos apicales se evaluaron dos tratamientos basados en el medio de Murashige y Skoog (MS) suplementado con auxinas y citocininas (Cuadro 3 y Cuadro 4).

Cuadro 3. Fitohormonas usadas para establecer yemas axilares de *Neoregelia carolinae* en el laboratorio de tejidos vegetales de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras.

<b>Fitohormona</b>	<b>Dosis mg/L</b>	<b>Autor</b>
ANA	1.86	Kiss et al. 1995
BAP	1.00	Mhatre, 2007

BAP=6-Bencilaminopurina  
ANA=Ácido 1-naftalenacético

Cuadro 4. Fitohormonas usadas para establecer meristemos apicales de *Neoregelia carolinae* en el laboratorio de tejidos vegetales de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras.

<b>Fitohormona</b>	<b>Dosis mg/L</b>	<b>Autor</b>
ANA	1.86	Kiss et al. 1995
BAP	1.00	Mhatre, 2007

BAP=6-Bencilaminopurina  
ANA=Ácido 1-naftalenacético

### **Multiplicación.**

Pasados los 35 días de establecidos los meristemos apicales fueron transferidos a medio de cultivo para su multiplicación según recomendación de Mhatre (2007) el medio usado fue el de Murashige y Skoog (MS) suplementado con 1.8 mg/L de ANA + 2 mg/L de AIB + 2 mg/L de Kinetina.

### **Incubación.**

Después de la siembra de los explantes los contenedores se taparon y sellaron con cinta plástica. Se incubaron a 70% de humedad, un rango de temperatura de 24-26 °C y luz por 16 horas a 2 klux. El único tratamiento que fue incubado diferente fue el tratamiento meristemos y yemas con ANA. Este fue incubado la primera semana en oscuridad.

### **Variables evaluadas.**

Las variables evaluadas fueron mortalidad, altura, número de hojas y número de brotes del explante y porcentaje de explantes con brotes. La variable mortalidad fue evaluada día a día y determinada de manera visual si la plántula presentaba coloración café y apariencia seca. Por último, la variable formación brotes fue evaluada cada 7 días por 15 semanas.

**Diseño experimental.**

Para cada experimento se usó un Diseño Completamente al Azar. Cada experimento (explante) fue evaluado independientemente, por lo que se tuvieron tres experimentos. Cada experimento consistía de dos tratamientos con 20 repeticiones.

**Análisis estadístico.**

Los datos fueron evaluados con el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.4), se realizó la prueba t de Student para determinar diferencia estadística con un nivel de significancia  $P \leq 0.05$ .

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### **Establecimiento *in vitro* de explantes foliares y yemas axilares.**

Los explantes foliares y yemas axilares 60 días después de su establecimiento en su totalidad no presentaron respuesta alguna de crecimiento o cambio de coloración como respuesta a los tratamientos (Figura 3). Estos resultados contrastan con los obtenidos por Carneiro et al. 2000, Rodrigues et al. 2014, Mhatre, 2007 y Kiss et al. 1995, quienes obtuvieron formación de brotes exitosamente en *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L.B. Sm, *Neoregelia concéntrica* (Vellozo) L.B. Sm y *Ananas comosus* L respectivamente.

Una de las posibles razones por la que en los tratamientos probados en estos explantes de la *N. carolinae* no dieran resultado es debido a que, estos se realizaron en plantas de la misma familia y género, pero de diferente especie, lo cual posiblemente afectó en el resultado del experimento. Otra de las razones es la planta madre utilizada para los explantes, en los tratamientos de *N. carolinae* se utilizaron plantas madres sembradas y cultivadas convencionalmente, sin embargo, en los tratamientos de las otras especies se realizaron con plantas madres sembradas y cultivadas *in vitro*, lo cual pudo afectar en el desarrollo de los explantes por el tipo de tejido utilizado y la totipotencia que estos poseen.

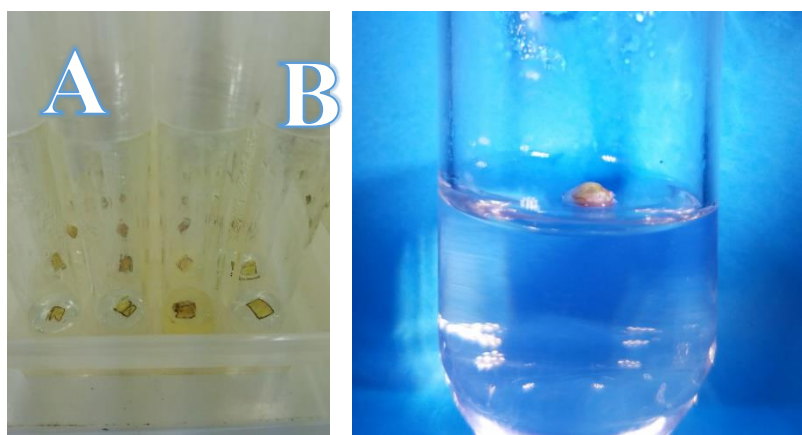


Figura 3. Explantes foliares y yemas axilares de *N. carolinae* establecidos *in vitro*. A. Explantes foliares a los 60 días de establecidos; B. Yemas axilares a los 60 días de establecidas.

### **Establecimiento *in vitro* de meristemos apicales.**

Los meristemos apicales al finalizar los 28 días del establecimiento presentaron una respuesta positiva (Figura 4) de crecimiento, pigmentación y desarrollo de hojas a las fitohormonas suplementadas.

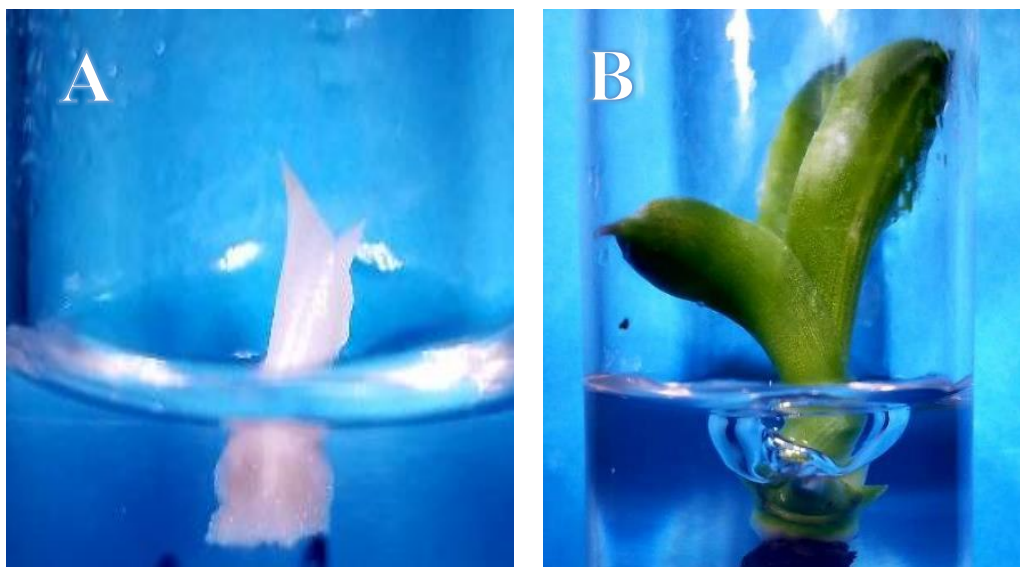


Figura 4. Respuesta de meristemos apicales a fitohormonas suplementadas en establecimiento; A. Meristemo apical luego de 7 días de establecido incubado en oscuridad; B. Meristemo apical 28 días luego de establecido.

Los meristemos apicales presentaron respuesta a los tratamientos aplicados. Se analizaron estadísticamente las variables de altura en cm y el número de hojas, no se observó diferencia significativa entre los tratamientos evaluados (Cuadro 5).

Cuadro 5. Altura y número de hojas promedio de *N. carolinae* establecida *in vitro* a partir de meristemos apicales.

<b>Tratamiento</b>	<b>Altura (cm)</b>	<b>Hojas</b>
ANA	0.95	3.00
BAP	0.81	2.50
Valor t	0.76	1.00
Grados de libertad	19.00	19.00
Probabilidad	ns	ns

BAP=6-Bencilaminopurina

ANA=Ácido 1-naftalenacético

### **Multiplicación.**

Los explantes establecidos fueron transferidos a los 35 días a medios de multiplicación. El 50% de los explantes presentaron formación de un brote por explante (Figura 5).

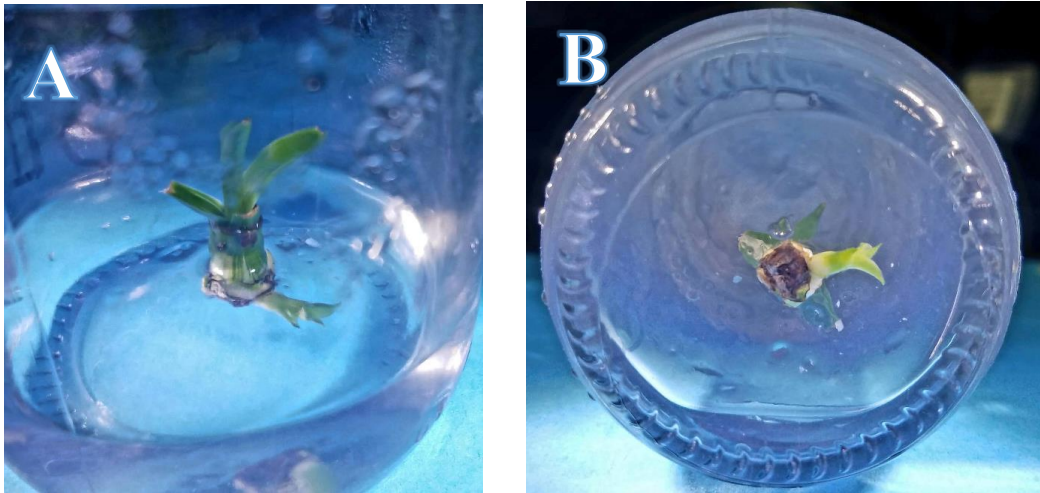


Figura 5. Respuesta de meristemas apicales a fitohormonas suplementadas en multiplicación; A. Explante establecido con brote formado (parte aérea); B. Explante establecido con brote formado (parte basal)

#### **4. CONCLUSIÓN**

Los mejores medios a utilizar en el establecimiento *in vitro* de meristemas apicales de *N. carolinae* son los de Murashige y Skoog suplementado con 1.86 mg/L de Ácido 1-naftalenacético y Murashige y Skoog con 1 mg/L de 6-Bencilaminopurina.

## **5. RECOMENDACIONES**

- Probar diferentes dosis de fitohormonas suministradas.
- Realizar prácticas para el saneamiento de plantas madres como termoterapia.
- En futuros experimentos establecer los meristemas apicales en frascos y no en tubos.

## 6. LITERATURA CITADA

- Asocolflores. 2011. El perfil competitivo local como factor determinante para el desarrollo de la floricultura en Madrid (Cundinamarca). Ascfl. Boletín de prensa No. 05.
- Carneiro LA, Araújo RF, Brito GJ, Fronseca MH, Costa A, Crocomo OJ, Mansur E. 2000. *In vitro* regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L.B. Smith, an endemic bromeliad from Eastern Brazil. Kluwer. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 55: 79–83.
- Castillo R. 2012. Bromelias. Argopecuaria dominicana. República Dominicana. Actualizado 29/04/2017. Consultado 5/6/2017. <http://agrord.blogspot.com/2012/12/bromelias.html>.
- Elicriso. 2016. *Neoregelia* - Bromeliaceae - Como curar y cultivar las plantas de *Neoregelia*. Italia. Elicriso. Consultado: 5/5/2017. [http://www.elicriso.it/es/como\\_cultivar/neoregelia/](http://www.elicriso.it/es/como_cultivar/neoregelia/).
- Franco J. 2013. El género *Neogerelia*. Gandía (Valencia), España. Ecoterrazas. 5/6/2017. <http://www.ecoterrazas.com/blog/el-genero-neogerelia/>.
- Herndon A. 2015. The *Neoregelia* compacta complex. In: Bromeliad Society International. Horticulture. Estados Unidos. Journal of the Bromeliad Society. P. 272-283
- JBM (Jardín Botánico de Missouri). 2016. *Neoregelia carolinae* f. tricolor. Edited by Jardín Botánico de Missouri. Estados Unidos de América. <http://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?taxonid=291611&isprofile=0&>.
- Kiss E, Kiss J, Gyulai, L.E. Heszky. 1995. A Novel Method for Rapid Micropropagation of Pineapple. VOL. 30, 1<sup>st</sup> ed. Hungary. Department of Genetics and Plant Breeding, Gödöllő University of Agriculture.
- Kumar S, Jawaharlal M, Ganga M, Surendranath R. 2012. Genetics of yield and quality traits in cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis L.). Agrotechnol 01 (S1). Vol 1. DOI: 10.4172/2168-9881.S1.004
- Kyte L. 1987. Plants from test tubes an introduction to micropropagation. Portland, Oregon, Timber Press. 160p.

- Mhatre M. 2007. Micropropagation of pineapple, *Ananas comosus* (L.) MERR. Nuclear Agriculture & Biotechnology Division. Bhabha Atomic Research Centre. Trombay, Mumbai 400 085, India. P 499-508.
- Plant Cell Technologies. 2017. PPM™ (Plant Preservative Mixture). Estados Unidos de America. <http://www.plantcelltechnology.com/about-ppm/>.
- PR (Plants Rescue). 2016. *Carolinae neoregelia*. Plants and flowers. Sidney, Estados Unidos de America. Plants rescue. <http://www.plantsrescue.com/tag/neoregelia-carolinae-tricolor/>.
- Rodrigues M, Romais E, Schmildt, Sobreira R, Castro E, Furtado T, Ferreira M, Pasqual M. 2014. Direct organogenesis and leaf anatomy modifications *in vitro* of *Neoregelia concentrica* (vellozo) L.B.Smith (*bromeliaceae*), Federal University of Espírito Santo, Agricultural and Biological Sciences Department, São Mateus, ES, Brazil. 9 P.
- SAS. 2017. SAS User guide. Statistical Analysis Institute Inc., Cary, N.C., United States of America.