

## SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae)

Janaína Medeiros Vasconcelos<sup>1</sup>; João Ricardo Avelino Leão<sup>1</sup>; Andrea Raposo<sup>2</sup>;  
Paulo Cesar Poeta Fermينو Junior<sup>3\*</sup>

SAP 9968      Data envio: 07/05/2014      Data do aceite: 02/07/2014  
Scientia Agraria Paranaensis – SAP; ISSN: 1983-1471  
Marechal Cândido Rondon, v. 14, n. 4, out./dez., p. 240-246, 2015

**RESUMO** - *Aechmea setigera* é uma bromélia endêmica da Amazônia com potencial ornamental. As bromélias têm sido propagadas por cultura de tecidos. A consistência do meio de cultura na multiplicação *in vitro* influencia nas taxas de propagação. Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar diferentes sistemas de cultivo com o uso de 6-benzilaminopurina na propagação *in vitro* e o efeito de diferentes substratos na aclimatização de mudas de *Aechmea setigera*. Plântulas germinadas *in vitro* foram inoculadas em meio de cultura MS nos sistemas semissólido, dupla-fase, e líquido estacionário, acrescidos de 6-benzilaminopurina (BAP) em diferentes concentrações (0; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,7 µM). O enraizamento *ex vitro* e a aclimatização foram realizados em substrato comercial Plantmax Florestal<sup>®</sup>, vermiculita e pó de serra de eucalipto. Após três subcultivos sucessivos, o sistema dupla-fase apresentou maior número de brotos regenerados em comparação ao sistema semissólido e líquido estacionário. A aclimatização com o uso da combinação de substrato comercial Plantmax Florestal<sup>®</sup> e vermiculita favoreceu o crescimento das plantas micropropagadas. A utilização de meio de cultura dupla-fase isento de regulador de crescimento e o enraizamento na aclimatização são viáveis para a micropropagação de *A. setigera*.

**Palavras-chave:** bromélia, meio de cultura, micropropagação, dupla-fase.

### *In vitro* culture systems and acclimatization of *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae)

**ABSTRACT** - *Aechmea setigera* is an endemic bromeliad from Amazon with ornamental potential. Bromeliads have been propagated by tissue culture. The consistency of the culture medium *in vitro* multiplication influences the rate of propagation. In this sense, the objective of this study was to evaluate different culture systems with the use of 6-benzylaminopurine (BAP) on *in vitro* propagation and the effect of different substrates in acclimatization of plantlets *Aechmea setigera*. *In vitro* germinated seedlings were inoculated in MS medium in liquid stationary, semisolid, double-phase systems, plus 6-benzylaminopurine (BAP) in different concentrations (0, 2.2, 4.4, 8.8 and 17.7 µM). The *ex vitro* rooting and acclimatization were performed on substrate Plantmax Forest<sup>®</sup>, vermiculite and sawdust eucalyptus. After three successive subcultures, the double-phase system showed a higher number of regenerated shoots in comparison to other systems. Acclimatization using the combination of commercial substrate Plantmax Forest<sup>®</sup> and vermiculite favored the growth of micropropagated plants. The use of a culture medium double-phase without growth regulator, and the rooting in acclimatization are feasible strategy for the micropropagation of *A. setigera*.

**Key words:** bromeliad, culture medium, micropropagation, double-phase.

<sup>1</sup>Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Universidade Federal do Acre, Rodovia BR-364, Km 04, CEP 69.920-900, Distrito Industrial, Rio Branco, AC

<sup>2</sup>Embrapa Acre, Rodovia BR 364, Km 14, CEP 69.900-970, Rio Branco, AC

<sup>3</sup>Universidade Federal de Santa Catarina, Campus de Curitibanos, Rodovia Ulysses Gaboardi, Km 03, Curitibanos, SC. \*Autor para correspondência: paulo.fermino@ufsc.br

## INTRODUÇÃO

Nas florestas tropicais, a diversidade de epífitas compreende aproximadamente um terço das plantas vasculares, as quais são representadas principalmente por Orchidaceae e Bromeliaceae (BENZING, 1990). De acordo com Martinelli e Moraes (2013), a família Bromeliaceae contém o maior número de espécies com interesse para a conservação dos recursos genéticos vegetais no Brasil.

A família Bromeliaceae compreende 58 gêneros em 3172 espécies e subespécies (GIVNISH et al., 2011). As espécies de bromélias na Amazônia em geral são pouco conhecidas (QUARESMA; JARDIM, 2012), e podem ser consideradas como ameaçadas de extinção como consequência do desmatamento. *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. possui hábito epífítico ou terrestre, com distribuição no Panamá, Colômbia, Venezuela, Guiana e Amazônia Ocidental do Brasil, entre 70 a 550 m de altitude (RIBEIRO et al., 1999), apresentam folhas grandes, verdes intensas e suculentas, com espinhos nas margens (FLORA BRASILIENSIS, 1982), e por sua beleza apresentam potencial ornamental.

A produção de bromélias em escala comercial é atividade viável e tem sido bastante explorada no Brasil, seguindo os passos de outros países, como os Estados Unidos, a Holanda e a Bélgica (AOYAMA et al., 2012). O mercado de plantas ornamentais é competitivo existindo necessidade do desenvolvimento de técnicas promissoras para o cultivo de bromélias (AMARAL et al., 2009). A cultura de tecidos compreende um conjunto de estratégias eficientes para a propagação de bromélias visando à comercialização e a conservação (GUERRA; DAL VESCO, 2010). Estudos de micropropagação de bromélias endêmicas da Amazônia visando à conservação e a produção ornamental ainda são incipientes.

Na fase de proliferação *in vitro* dos microbrotos as estratégias de aumentar o número de subcultivos e a concentração dos fitorreguladores não são vantajosas para aumentar a produtividade, pois é importante manter a estabilidade genética dos clones formados (SANTOS; RODRIGUES, 2004). Nesse sentido, diversos sistemas de cultivo *in vitro* para bromélias vêm sendo empregados com o uso de meio líquido em imersão temporária (SCHERER et al., 2013), ou combinado com meio semissólido no sistema dupla-fase utilizando a citocinina 6-benzilaminopurina (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012). As citocininas, em especial 6-benzilaminopurina (BAP) são utilizadas em diferentes concentrações e combinações no intuito de facilitar o desenvolvimento das técnicas de micropropagação de plantas por induzir a organogênese (MALÁ et al., 2013). A combinação entre os reguladores de crescimento e o tipo de explante é definida de acordo com as respostas morfológicas desejadas (AOYAMA et al., 2012), as quais são ativadas por complexas vias metabólicas.

O sistema de cultivo dupla-fase é altamente eficiente (OLIVEIRA et al., 2013) e consiste na adição de meio de cultura líquido sobre o meio semissólido após

período inicial de cultivo, reduzindo a necessidade da manipulação em subcultivos (subdivisão e individualização), custos de produção e contaminação microbiológica (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012). O uso do meio de cultura líquido aumenta a multiplicação por aumentar a superfície de contato dos explantes com o meio de cultura, ocasionando aumento na difusão, absorção e reposição de nutrientes *in vitro* (PULLMAN; SKRYABINA, 2007).

A micropropagação de espécies de Bromeliaceae tem sido realizada com sucesso a partir de plântulas germinadas *in vitro* e microbrotos como explantes em sistemas semissólidos, como em *Vriesea reitzii* (RECH FILHO et al., 2005), com *Tillandsia eizii* (PICKENS et al., 2003; PICKENS et al., 2006), *Orthophytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis* (BELLINTANI et al., 2007), e com *Aechmea blanchetiana* e *Aechmea distichantha* (SANTA-ROSA et al., 2013). A utilização de gemas axilares (ALMEIDA, 2002; SILVA et al., 2004) ou segmentos nodais (KISS et al., 1995; MENDES et al., 2007) também tem sido eficiente.

A maior limitação para a aplicação da propagação *in vitro* de plantas em larga escala consiste na mortalidade experimentada na transferência das condições de laboratório para o campo (HUANG et al., 2011). Plantas cultivadas *in vitro* estão submetidas a condições de alta umidade relativa do ar, baixa intensidade luminosa, e presença de açúcar como fonte de carbono (POSPISÍLOVÁ et al., 1999). O substrato é um fator de grande importância na fase de cultivo e aclimatização, pois deve permitir um bom crescimento da planta, sem elevar-lhe os custos de produção (LOPES DA SILVA et al., 2006).

Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* na propagação e os efeitos de diferentes substratos na aclimatização de mudas de *Aechmea setigera*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de propagação *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Acre). Os experimentos de aclimatização foram conduzidos no viveiro da área experimental da Embrapa Acre, Rio Branco/AC. A área experimental situa-se na região sudeste do Estado do Acre (10°01'28"S, 67°42'19"W), de clima equatorial (Am) pela classificação de Köppen, quente e úmido, com estação caracterizada por período de três meses de seca (junho a agosto) e auge do regime pluviométrico em fevereiro, apresentando temperatura média anual de 24,5 °C (INPE, 2014). Os experimentos foram conduzidos na estação chuvosa.

Os frutos em estágio de maturação fisiológica e as sementes de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. (Figura 1) foram coletados de plantas adultas em população natural na Estrada AC-90 km 10 (10°01'16,9" S, 67°55'26,6" W) em Rio Branco/AC nos meses de outubro e novembro.

Para a identificação da espécie, duplicatas de exsicatas foram enviadas para depósito no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (Herbário RB) sob número RB550638.

Sementes foram retiradas, limpas com detergente e água corrente para retirada da mucilagem. Em seguida, foram desinfetadas em solução comercial de hipoclorito de sódio 2,5% por 30 minutos, e posteriormente lavadas três vezes em água destilada e esterilizada. Em seguida, cinco sementes foram inoculadas em cada frasco contendo 30 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar-ágar (Vetec®), e vedados com filme PVC.

Plântulas germinadas *in vitro* após 30 dias (Figura 2) com aproximadamente 2,0 cm de comprimento foram excisadas e brotos foram transferidos para os diferentes sistemas de cultivo *in vitro*. Os brotos foram inoculados em frascos de vidro contendo 30 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementados com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) (0; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,7  $\mu$ M), 6 g L<sup>-1</sup> de agar-agar no sistema de cultivo semissólido, e ausência de agar-agar em meio líquido estacionário (sem agitação). Para o sistema dupla-fase, após 30 dias de cultivo em meio MS contendo 20 mL de meio semissólido com as mesmas concentrações de BAP descritas

anteriormente, 10 mL de meio MS líquido foi acrescido. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da esterilização por 15 min a 1,3 kgf cm<sup>-2</sup>. Os frascos foram selados com parafilme e as culturas foram mantidas em sala de crescimento com 25  $\pm$  2 °C, intensidade luminosa de 60 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> obtidas com lâmpadas fluorescentes Sylvania® branca fria, com 16 h de luz de fotoperíodo, com uma distância de 10-12 cm de altura das culturas. Os explantes passaram por três subcultivos sucessivos sendo avaliados a cada trinta dias pelo número de brotos regenerados e o comprimento dos mesmos.

Para avaliar o efeito de diferentes substratos na aclimatização, plântulas foram selecionadas uniformemente (4 cm) de comprimento da parte aérea, lavadas em água corrente para retirar o meio de cultura e no mesmo dia acondicionadas em tubetes plásticos (6,5 cm de diâmetro x 14 cm de altura) contendo substrato comercial Plantmax Florestal®, vermiculita expandida de textura média e pó de serra de eucalipto em diferentes proporções (Tabela 1) em viveiro de telado de malha preta de 50% de sombreamento, modelo arco pampeana. As plântulas foram distribuídas aleatoriamente, de forma que todas pudessem receber a mesma intensidade luminosa, com irrigação manual intermitente, com temperatura média de 30 °C, umidade relativa de 80%, controladas por um termômetro e higrômetro manual, respectivamente.



**FIGURA 1** - *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. **A.** Indivíduos em ambiente natural sobre forófito; **B.** Infrutescência; **C.** Frutos maduros e sementes individualizadas.

**TABELA 1.** Composição dos substratos utilizados no experimento de aclimatização de plântulas micropropagadas de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f.

Tratamentos	Substratos	Proporção
Substrato (S1)	Substrato comercial Plantmax Florestal®	1
Substrato (S2)	Vermiculita expandida de textura média	1
Substrato (S3)	Pó de serra de eucalipto	1
Substrato (S4)	Substrato comercial + vermiculita	1:1
Substrato (S5)	Substrato comercial + pó de serra	1:1
Substrato (S6)	Vermiculita + pó de serra	1:1
Substrato (S7)	Substrato comercial + vermiculita + pó de serra	1:1:1

As plantas no viveiro foram adubadas a cada 15 dias com o fertilizante foliar Yogen 2, composto de macronutrientes e micronutrientes (Composição: Mg= 0,5%; Mo= 0,02%; Cu= 0,05%; Zn= 0,1%; B= 0,02%; Mn= 0,1%; N= 30%; P= 10%; K= 10%), numa concentração de 3 g L<sup>-1</sup>. O fertilizante foi aplicado com o auxílio de um pulverizador costal. As avaliações foram realizadas após 30, 60 e 90 dias de cultivo onde foram avaliadas a porcentagem de sobrevivência, altura das plantas e número de folhas.

Os tratamentos para a multiplicação *in vitro* em diferentes sistemas de cultivo foram organizados em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 5 (sistemas de cultivo x concentrações de citocinina), com seis repetições, sendo cada repetição composta por dois frascos contendo dez explantes cada. No experimento de aclimatização, os tratamentos foram organizados em delineamento inteiramente casualizado, com dezesseis plantas em cada tipo de substrato. Para as contagens do número de brotos e de folhas os dados foram transformados para  $(x+0,5)^{0,5}$ . Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com a separação de médias pelo teste de Scott-Knott utilizando-se o programa computacional Assistat 7.7 beta (SILVA, 2013).

## RESULTADO E DISCUSSÕES

As análises estatísticas dos resultados indicam diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os diferentes sistemas de cultivo *in vitro* em *Aechmea setigera*. O sistema de cultivo dupla-fase proporcionou o maior número de brotações regeneradas (Figura 3) em relação aos sistemas de cultivo em meio semissólido e líquido estacionário (Tabela 2) na ausência de regulador e na presença de 17,7 mM de BAP. Resultados semelhantes com maior proliferação de brotos foram obtidos com o uso de BAP no sistema dupla-fase em abacaxizeiro (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012), e na orquídea *Vanilla planifolia* (OLIVEIRA et al., 2013), em comparação ao sistema semissólido. De acordo com Be e Debergh (2006), os cultivos em meio líquido tendem a apresentar maior proliferação quando comparados ao meio semissólido, pois existe maior facilidade de absorção de nutrientes e reguladores de crescimento. Entretanto, os sistemas de micropropagação com meio líquido necessitam de um suporte dos explantes como as pontes de papel. Nesse contexto, o sistema dupla-fase apresenta a fase semissólida como suporte constituída por meio de cultura facilmente disponível para os tecidos (SANDHYARANI et al., 2011), em decorrência da ausência de barreira física entre as fases sólida e líquida (DE LA VIÑA et al., 2001).

Houve interação significativa ( $p < 0,05$ ) entre as concentrações de BAP utilizadas e os sistemas de cultivo no número de brotações regeneradas. No sistema em meio semissólido, o maior número de brotações foi observado com o uso de 2,2 e 8,8  $\mu\text{M}$  de BAP. Com o uso do sistema de cultivo dupla-fase, as diferentes concentrações de BAP não promoveram diferenças significativas no número de brotos regenerados, inclusive na sua ausência (Tabela 2),

refletindo na redução de custos da produção. Tais resultados indicam níveis endógenos de citocininas favoráveis à multiplicação *in vitro* em *A. setigera*. Em meio líquido estacionário o maior número de brotos regenerados ocorreu com o uso de 4,4  $\mu\text{M}$  de BAP, não apresentando em nenhum dos tratamentos a morfologia de hiperidricidade nas brotações.

A análise estatística dos comprimentos dos brotos regenerados revelou a existência de diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes sistemas de cultivo. Os maiores comprimentos das brotações regeneradas foram observados com o uso do sistema semissólido em todas as concentrações de BAP, e os menores com o uso do sistema dupla-fase e meio líquido estacionário (Figura 4). Em *Aechmea setigera*, no sistema dupla-fase, induzido pelo uso da citocinina BAP proporcionou com mais eficácia o maior investimento metabólico na organização de novos centros meristemáticos (novos brotos) em detrimento do alongamento dos entrenós (comprimento dos brotos).

Houve interação significativa ( $p < 0,05$ ) entre as concentrações de BAP utilizadas e os sistemas de cultivo no comprimento das brotações regeneradas. As adições de quaisquer concentrações de BAP promoveram o menor crescimento da parte aérea dos brotos no sistema dupla-fase, enquanto que no sistema semissólido foi observado menor crescimento apenas nas concentrações de 2,2 e 4,4  $\mu\text{M}$ .

As plantas regeneradas por micropropagação foram transferidas e aclimatizadas em viveiro com percentual de sobrevivência de 90% em todos os tipos de substrato avaliados (Figuras 5-6). A formação de raízes adventícias *ex vitro* ocorreu em 100% dos indivíduos nos diferentes substratos. Na aclimatização de *Dyckia maritima* (Bromeliaceae), uma espécie epífita, a sobrevivência alcançou 90% das plantas em casa de vegetação em diferentes substratos (LOPES DA SILVA et al., 2008), entretanto, em *Neoglaziovia variegata* o percentual de sobrevivência variou de 70% a 100% sob diferentes substratos com fibra de coco e Plantmax® (SILVEIRA et al., 2009).

Após 90 dias de aclimatização, as maiores alturas de plantas foram observadas com o uso de substrato comercial + vermiculita (S5), e as menores plantas com o uso de vermiculita (S1), pó de serra (S2), pó de serra + vermiculita (S6) e pó de serra + substrato comercial + vermiculita (S7) (Tabela 3).

O número de folhas das plântulas micropropagadas após 30 dias, em diferentes tipos de substratos, não registraram diferenças estatisticamente significativas. Após 60 e 90 dias, o maior número de folhas desenvolvidas ocorreu com o uso de substrato comercial (S3) e substrato comercial + vermiculita (S5).

A aclimatização de *Neoglaziovia variegata* em substrato comercial + vermiculita também promoveram a maior altura das plantas e o maior número de folhas (SILVEIRA et al., 2009). A presença de substrato comercial Plantmax® favorece o maior crescimento das plantas por apresentar características adequadas para a

aclimatização de plantas micropropagadas sem enraizamento *in vitro* tais como boa capacidade de absorção e retenção de água, boa aeração e drenagem,

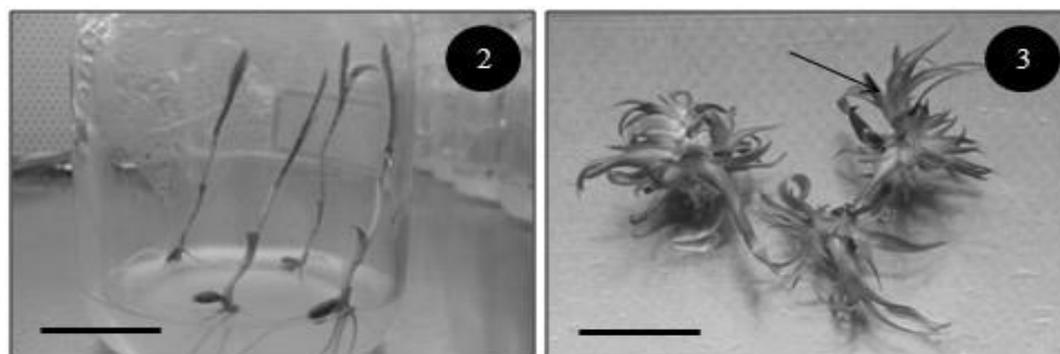
evitando acumulação de umidade na base da planta e raiz (SILVEIRA et al., 2009).

**TABELA 2.** Número de brotos regenerados de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. sob diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP) em sistemas de cultivo.

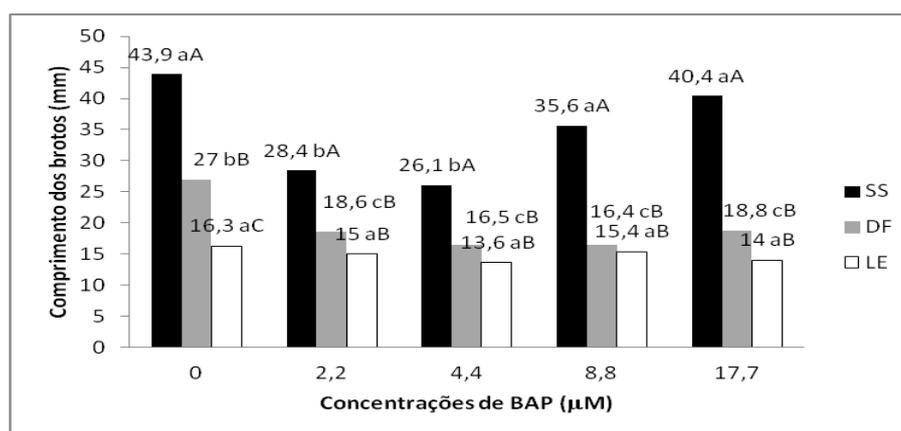
BAP ( $\mu\text{M}$ )	Número de brotos regenerados		
	SS	DF	LE
0	1,22 bB	2,06 aA	1,62 bB
2,2	1,75 aA	2,07 aA	1,57 bB
4,4	1,58 bA	1,86 aA	1,83 aA
8,8	1,72 aA	1,96 aA	1,64 bB
17,7	1,44 bB	1,81 aA	1,57 bB
Média	1,54 B	1,95 A	1,64 B
F	6,73*	0,71 ns	6,49*
CV (%)	18,7	11,2	17,8

Nota: Letras minúsculas comparadas na vertical e letras maiúsculas comparadas na horizontal diferentes denotam diferenças estatisticamente significativas a 5% pelo teste Scott-Knott.

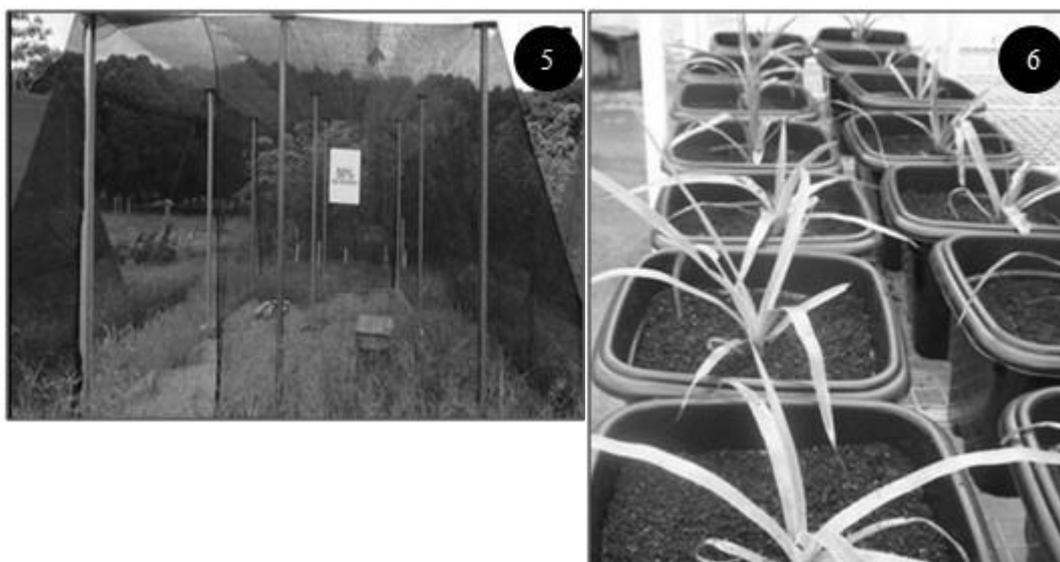
SS= sistema semissólido, DF= sistema dupla-fase, LE= sistema líquido estacionário. Rio Branco/AC.



**FIGURAS 2 e 3** - *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. **2.** Plântulas germinadas *in vitro* após 30 dias; **3.** Microbrotos (seta) regenerados em sistema de cultivo dupla-fase. Barras= 2 cm.



**FIGURA 4** - Comprimento dos brotos regenerados de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. sob efeito de 6-benzilaminopurina (BAP) em diferentes sistemas de cultivo *in vitro*. Legenda: SS= sistema semissólido; DF= sistema dupla-fase; LE= sistema líquido estacionário. Letras minúsculas diferentes comparadas entre as concentrações de cada sistema e letras maiúsculas diferentes comparadas entre os sistemas em cada concentração denotam diferenças estatisticamente significativas a 5% pelo teste de Scott-Knott.



**FIGURAS 5 e 6** - Aclimatização de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. **5.** Viveiro com tela de malha preta com 50% de sombreamento; **6.** Plantas em substrato comercial Plantmax Florestal® + vermiculita após 90 dias.

**TABELA 3.** Altura das plantas (cm) e número de folhas em diferentes substratos na aclimatização de plantas micropropagadas de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. Rio Branco, AC.

Substratos	Altura das plantas (cm)			Número de folhas		
	30 dias	60 dias	90 dias	30 dias	60 dias	90 dias
VER (S1)	8,15 b	8,21 c	8,32 d	7,43 a	7,48 b	7,49 c
PS (S2)	7,74 b	8,81 c	9,12 d	6,74 a	7,61 b	7,83 b
SC (S3)	9,92 a	14,13 a	17,72 b	7,22 a	9,39 a	9,41 a
PS+SC (S4)	10,18 a	10,82 b	11,42 c	7,00 a	7,57 b	8,00 b
SC+VER (S5)	9,03 b	16,07 a	21,54 a	7,00 a	10,48 a	10,61 a
PS+VER (S6)	8,5 b	8,66 c	8,69 d	6,65 a	7,04 b	7,10 c
PS+SC+VER (S7)	8,00 b	8,10 c	8,23 d	6,91 a	7,09 b	7,39 c
F	4,37*	34,71*	68,62*	0,73 ns	21,71 *	16,05 *
CV%	27,29	24,50	25,94	21,59	17,34	20,90

Nota: As médias seguidas pela mesma letra minúscula (comparadas na coluna) não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Substratos: VER (vermiculita); PS (pó de serra de eucalipto); SC (substrato comercial Plantmax Florestal®); PS+SC (pó de serra de eucalipto + substrato comercial); SC+VER (substrato comercial+vermiculita); PS+SC+VER (pó de serra+substrato comercial+vermiculita). \*significativo ao nível de 5% de probabilidade (p<0,05); ns - não significativo (p<0,05).

Segundo Gonçalves et al. (2000), substratos adequados para a propagação de mudas podem ser obtidos a partir da mistura com vermiculita, sendo este componente usado para elevar a macroporosidade. Deve-se ainda considerar outras vantagens deste componente sobre o desenvolvimento vegetal, como redução na densidade aparente e global, e aumento da porosidade do meio (GUERRINI; TRIGUEIRO, 2004). No presente estudo com *A. setigera*, o uso de vermiculita associado com substrato comercial foi favorável ao crescimento das plantas aclimatizadas, permitindo a absorção, retenção de água e a aeração adequadas. O enraizamento *ex vitro* no processo de aclimatização de *A. setigera* é viável, em virtude da elevada sobrevivência das plantas, reduzindo os custos de produção.

## CONCLUSÕES

O sistema dupla-fase é mais eficiente que o sistema semissólido e líquido estacionário para a propagação *in vitro* de *Aechmea setigera*.

Em sistema de cultivo dupla-fase a ausência de fitorreguladores adicionada ao meio de cultura é o melhor protocolo para a micropropagação de *A. setigera*.

O enraizamento na aclimatização é viável para a micropropagação de *A. setigera*.

A aclimatização com o uso de substrato comercial Plantmax Florestal® combinado com vermiculita favoreceu o maior crescimento das plantas micropropagadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A.B.W.; SANTANA, G.S.; PINHEIRO, M.R.; COSTA, M.A.P.C. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.2, p. 296-300, 2002.
- AMARAL, T. L.; JASMIM, J. M.; NAHOUM, P. I.; FREITAS, C. B.; SALES, C. S. Adubação nitrogenada e potássica de bromeliáceas cultivadas em fibra de coco e esterco bovino. **Horticultura Brasileira**, v.27, n.3, p. 286-289, 2009.
- AOYAMA, E.M.; GONTIJO, A.B.P.L.; FARIA, D.V. Propagação em bromeliáceas: Germinação de sementes e cultivo *in vitro*. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v.8, n.2, p. 1452-1471, 2012.
- BE, L.V.; DEBERGH, P.C. Potential low-cost micropropagation of pineapple (*Ananas comosus*). **South African Journal of Botany**, v.72, n.2, p. 191-194, 2006.
- BELLINTANI, M.C.; LIMA, C.C.; BRITO, A.L.; SANTANA, J.R.F.; DORNELLES, A.L.C. Estabelecimento *in vitro* de *Orthopytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.4, p.1101-1103, 2007.
- BENZING, D. H. **Vascular epiphytes**. Cambridge University Press, Cambridge, 1990. 370p.
- DE LA VINÁ, G.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; PLIEGO-ALFARO, F. Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* mill microcuttings. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 65, n.4, p. 229-237, 2001.
- FLORA BRASILIENSIS. vol. III, Part III, Fasc. 112 Coluna 327 - 328 Publicado em 15-Mai-1982. Disponível em: <http://florabrasiliensis.cria.org.br/search?taxon\_id=21355>. Acesso em: 02 jun. 2013.
- GONÇALVES, J. L. M.; SANTARELI, E. G.; MORAES NETO, S. P.; MANARA, M. P. Produção de mudas de espécies nativas: substrato, nutrição, sombreamento e fertilização. In: GONÇALVES, J. L. M.; BENEDETTI, V. (Eds.). **Nutrição e fertilização florestal**. Piracicaba: IPEF. 2000. p. 309-350.
- GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L. Strategies for the Micropropagation of Bromeliads. In: Jain, S. M. & Ochatt, S.J. (eds.). **Protocols for in vitro propagation of ornamental plants: Methods in Molecular Biology**. New York: Humana Press Springer, 2010. p.47-66.
- GUERRINI, I. A.; TRIGUEIRO, R. M. Atributos físicos e químicos de substratos compostos por biossólidos e casca de arroz carbonizada. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 28, n. 6, p.1069-1076, 2004.
- GIVNISH, T. J.; BARFUSS, M. H. J.; RIINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P. A.; JABAILY, R. S.; CRAYN, D. M.; SIMTH, J. A. C. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, v.98, n.5, p. 872-895, 2011.
- HUANG, P. L.; LIAO, L. J.; TSAI, C. C.; LIU, Z.H.. Micropropagation of bromeliad *Aechmea fasciata* via floral organ segments and effects of acclimatization on plantlet growth. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.105, n.1, p. 73-78, 2011.
- INPE. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Disponível em: <http://www.inpe.br>. Acesso em: 03 jul. 2014.
- KISS, E.; KISS, J.; GYULAI, G.; HESZKY, L.E. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. **HortScience**, v.30, n. 2, p. 127-129, 1995.
- LOPES DA SILVA, A.L.; FRANCO, E.T.H.; WALTER, J.M.; BISOGNIN, D.A.; CALGAROTO, N.S. Aclimatização de clones de *Dyckia maritima* em diferentes substratos – Bromeliaceae. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.12, n.4, p.495-498, 2006.
- MALÁ, J.; MÁCHOVÁ, P.; CVRČKOVÁ, H.; KARADY, M.; NOVÁK, O.; MIKULIK, J.; DOSTÁL, J.; STRNAD, M.; DOLEZAL, K. The role of cytokinins during micropropagation of wych elm. **Biologia Plantarum**, v.57, n.2, p. 174-178, 2013.
- MARTINELLI, G.; MORAES, M.A. **Livro Vermelho da Flora do Brasil**. 1ª edição. Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013. 1100p.
- MENDES, G.C.; SOARES, C.Q.G.; BRAGA, V.F.; PINTO, L.C.; SANTANA, R.; VICCINI, L.F.; PEIXOTO, P.H.P. Multiplicação *in vitro* de explantes de *Billbergia distachia* (Vellozo) MEZ (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.2, p. 972-974, 2007.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.4, p. 473-497, 1962.
- OLIVEIRA, S.O.D.; SAYD, R.M.; BALZON, T.A.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E.A new procedure for *in vitro* propagation of vanilla (*Vanilla planifolia*) using a double-phase culture system. **Scientia Horticulturae**, v.161, n.3, p. 204-209, 2013.
- PICKENS, K.A.; AFFOLTER, J.M.; WETZSTEIN, H.Y. Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii* *in vitro*. **HortScience**, v.38, n.3 p. 101-104, 2003.
- PICKENS, A.K.; WOLF, J.; AFFOLLTER, J.M.; WETZSTEIN, H.Y. Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eizii* *in vitro*. **Cellular & Developmental Biology Plant**, v.42, n.4, p. 348-353, 2006.
- POSPÍŠILOVÁ, J.; TICHÁ, I.; KADLECEK, P.; HAISEL, D.; PLZÁKOVÁ, S. Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. **Biologia Plantarum**, v.42, n.4, p.481-497, 1999.
- PULLMAN, G.S.; SKRYABINA, A. Liquid medium and liquid overlays improve embryogenic tissue initiation in conifers. **Plant Cell Reports**, v. 26, n. 3, p. 873-887, 2007.
- QUARESMA, A.C.; JARDIM, M.A. Diversidade de bromeliáceas epífitas na área de Proteção Ambiental Ilha do Combu, Belém, Pará, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.26, n. 4, p. 290-294, 2012.
- RECH FILHO, A.; DAL VESCO L.L. NODARI, R.O. LISCHKA, R.W. MÜLLER, C.V.; GUERRA, M.P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. **Biodiversity & Conservation**, v.14, n.2, p. 1799-1808, 2005.
- RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. **Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 1999.816p.
- SANDHYARANI, N., KISHOR, R., SHARMA, G.J., Clonal propagation of triploid *Acoruscalamus* Linn. using dual-phase culture system. **Journal of Crop Science & Biotechnology**, v.14, n.3, p.213-217, 2011.
- SANTA-ROSA, S.; SOUZA, F.V.D.; VIDAL, A.M.; LEDO, C.A. DAS. S.; SANTANA, J.R.F. DE. Micropropagation of the ornamental vulnerable bromeliads *Aechmea blanchetiana* and *Aechmea distichantha*. **Horticultura Brasileira**, v.31, n.2, p. 112-118, 2013.
- SANTOS, C.C.C.; RODRIGUES, P.H.V. Variação somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira, cultivar 'Pacovan'. **Bragantia**, v.63, n.2, p.201-205, 2004.
- SCHERER, R.F.; GARCIA, A.C.; FRAGA, H.P.F.; DAL VESCO, L.L.; STEINMACHER, D.; GUERRA, M.P. Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. comosus). **Scientia Horticulturae**, v.151, n.1, p. 38-45, 2013.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E.; LIMA, E.C.A.; SILVA, T.L.; MESQUITA, A.G.G.; MACIEL, S.A.; COSTA, F.H.S. Double-phase culture system for large scale production of pineapple. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.109, n.3, p. 263-269, 2012.
- SILVA, A.L.L. DA.; BISOGNIN, D.A.; DORNELLES, E.B.; WALTER, J.M.; FRANCO, E.T.H. Ensaios sobre o alongamento de brotos de *Dyckia maritima* Baker dispostos em agrupamentos – Bromeliaceae. **Caderno de pesquisa Ser. Bio**, v.13, n.1, p. 37-46, 2004.
- SILVA, F.A.S. **Programa Assistat versão 7.7 beta**. Universidade Federal de Campina Grande, PB. 2013.
- SILVEIRA, D.G.; SOUZA, F.V.D.; PELACANI, C.R.; SOUZA, A.S.; LEDO, C.A.S.; SANTANA, J.R.F. Micropropagation and *in vitro* Conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, a fiber producing bromeliad from Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, n.4, p.923-932, 2009.