

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E  
TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA-CITA**

**Micropropagação de *Aechmea setigera* (Bromeliaceae): uma espécie  
de bromélia nativa da Amazônia Sul-Occidental**

**João Ricardo Avelino Leão**

**RIO BRANCO  
2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-  
GRADUAÇÃO PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,  
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA**



**João Ricardo Avelino Leão**

**Micropropagação de *Aechmea setigera* (Bromeliaceae): uma espécie  
de bromélia nativa da Amazônia Sul-Occidental**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências e Inovação Tecnológica.

Orientador \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo Cesar Poeta Fermino Junior

Coorientadora \_\_\_\_\_  
Dra. Andrea Raposo

**Rio Branco - Acre**

**Agosto 2013**

©LEÃO, J. R. A., 2013.

LEÃO, João Ricardo Avelino. **Micropropagação de *Aechmea setigera* Mart. Ex Schuly. & Schult f. (bromeliaceae)**: uma espécie de bromélia nativa da Amazônia sul-ocidental. Rio Branco, 2013. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciência, Inovação e tecnologia para a Amazônia) – Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e tecnologia para a Amazônia. Universidade Federal do Acre, Rio Branco.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

---

L437m Leão, João Ricardo Avelino, 1988-

Micropropagação de *Aechmea setigera* Mart. Ex Schult & Schult. F. (Bromeliaceae): uma espécie de bromélia nativa da Amazônia sul-Occidental / João Ricardo Avelino Leão. – 2013.

52 f.: il.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia. Área de Concentração: Ciências e inovação e tecnologia. Rio Branco, 2013.

Inclui Referências bibliográficas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Poeta Fermino Júnior

Co-Orientadora: Profª Drª Andrea Raposo.

1. Bromélia – Propagação in vitro – Amazônia. 2. Genética vegetal. 3. Plantas – Reguladores. I. Título.

CDD: 584.22.09811

---

Bibliotecária: Vivyanne Ribeiro das Mercês Neves CRB-11/600

À minha mãe pelo apoio, amor,  
carinho, admiração e confiança  
Saudades.

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida e sabedoria durante a execução desta pesquisa.

Aos meus pais, Maria das Dores Avelino Gomes e Artur Lustosa Leão, que me apoiaram sempre.

Aos meus irmãos João Artur Avelino Leão e João Fernando Avelino de Araújo, pela força e camaradagem.

Ao meu orientador e professor Dr. Paulo Cesar Poeta Fermino Júnior pela amizade, excelente orientação e encorajamento.

À minha coorientadora, Dra. Andrea Raposo, pelos ensinamentos, orientação, apoio e carinho ao longo de todo processo do mestrado.

Aos meus amigos João Paulo da Cunha Lima, Stoney do Nascimento Pinto e Kétila Magalhães, por compartilharem comigo tantos momentos agradáveis.

Aos amigos de mestrado Janaína Vasconcelos, Vanessa e Hellen, que sempre estiveram torcendo por mim, pela amizade, dedicação e companheirismo.

À equipe técnica da Biofábrica Clones da Amazônia (Simone Maciel, Nadja, Denise, Thaísa, Ítalo, Roberta, Michele, Renata), pela presteza, auxílio e disposição em ajudar durante a elaboração deste trabalho.

À equipe do Laboratório LABMOL Tatiana de Campos (pesquisadora), Renata Beltrão (analista) e Simone Leite (bolsista), pela ajuda e cooperação.

À Universidade Federal do Acre e Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, pela concessão de bolsa.

Ao Jardim Botânico do Rio de Janeiro, pelo recebimento das duplicatas e confirmação do nome científico, em nome da professora Rafaela.

Aos professores Dr. Frederico Henrique da S. Costa e Dra. Cândida E. Manfio, pela ajuda com dicas em estatística e sugestões.

Ao engenheiro florestal Ernestino de S. G. Guarino, pelo auxílio na montagem das exsiccatas e sugestões.

A Embrapa Acre pela oportunidade de desenvolver as atividades de pesquisa em seu laboratório e utilizar de suas instalações.

Aos professores do mestrado, que acreditaram no meu potencial e capacidade.

Enfim, a todos que acompanharam e contribuíram direta ou indiretamente para a realização dessa pesquisa.

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão. Perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem mais se atreve. E a vida é muito para ser insignificante”.

**Charles Chaplin**

## RESUMO

A bromélia *Aechmea setigera* é uma espécie epífita nativa da Amazônia Sul-Occidental. Em geral, as atividades de desmatamento das florestas causam uma redução na biodiversidade das bromeliáceas da Amazônia. Sendo assim, a produção de mudas por micropropagação consiste numa importante estratégia de propagação e conservação desse recurso genético vegetal. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para a micropropagação dessa espécie. O estudo iniciou-se com o estabelecimento de sementes *in vitro* em meio de cultivo MS. Para a multiplicação de brotos foram utilizados meio de cultura MS líquido estacionário e meio de cultura MS semissólido, suplementado com diferentes concentrações da citocinina BAP (6-benzilaminopurina) (0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 mg.L<sup>-1</sup>) após 60 dias foi avaliado número de brotos, comprimento dos brotos, número de raízes e presença ou não de calos. O enraizamento *in vitro* foi induzido com meio MS, suplementado com diferentes concentrações de auxinas AIA (ácido indol acético), AIB (ácido indolbutírico) e ANA (ácido naftalenoacético) (0; 0,25 ;0,5; 1,0; 2,0 mg.L<sup>-1</sup>) após 60 dias foi avaliado porcentagem de enraizamento, número de raízes e comprimento de raiz. A aclimatização dos brotos ocorreu em casa de vegetação tecnológica após a fase de enraizamento *in vitro* em substrato comercial, vermiculita e pó de serra, isolados ou associados entre si. Os parâmetros avaliados foram altura das plântulas e número de folhas durante 30, 60 e 90 dias. A formação do maior número de brotos adventícios ocorreu com a concentração de BAP de 4,0 mg.L<sup>-1</sup> em meio líquido estacionário. Todas as concentrações de ANA proporcionaram a formação do maior número de raízes, independente das concentrações utilizadas. As plântulas aclimatizadas em casa de vegetação se desenvolveram melhor em substrato comercial ou quando associado a vermiculita. Com base nesses resultados, conclui-se que a propagação *in vitro* de *A. setigera* é uma biotecnologia viável para a produção de mudas.

**Palavras-chave:** propagação *in vitro*; bromélia; regulador de crescimento; Amazônia; *Aechmea setigera*.

## ABSTRACT

The bromeliad *Aechmea setigera* is an epiphytic species native to Southwestern Amazonia. In general, deforestation activities cause a reduction in the biodiversity of the Amazon bromeliads. Thus, seedling production through micropropagation is an important strategy for propagation and genetic resource conservation of this plant. For these reasons, this work aimed at establishing a protocol for micropropagation of this species. *In vitro* seeds were placed into MS medium. Liquid stationary MS medium and semi-solid MS medium supplemented with different concentrations of BAP (0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg.L<sup>-1</sup>) were used for shoot multiplication. The number and the length of the sprouts, and the number of roots with or without calluses were evaluated after 60 days. Rooting was induced *in vitro* with MS medium supplemented with different concentrations of IAA, IBA and NAA (0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg.L<sup>-1</sup>). Rooting percentage as well as the number and the length of the roots were also evaluated after 60 days. Sprouts acclimatization occurred in a technological greenhouse after *in vitro* rooting in commercial substrate, vermiculite and sawdust, isolated or combined. The evaluated parameters were plantlets height and leaves number during 30, 60 and 90 days. The formation of the higher number of adventitious shoots occurred with BAP concentration of 4.0 mg L<sup>-1</sup> in liquid stationary medium. The formation of a higher number of roots occurred with the use of NAA. Plantlets acclimatized in greenhouses are better developed in commercial substrate or when coupled with vermiculite. Based on these results, it is concluded that the *in vitro* propagation of *A. setigera* is a viable biotechnology for the production of seedlings.

**Keywords:** *in vitro* propagation, bromeliad, plant growth regulator; Amazon; *Aechmea setigera*

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>                                     | <b>11</b> |
| <b>2.1 Considerações sobre <i>Aechmea setigera</i> .....</b>             | <b>11</b> |
| <b>2.2 Micropropagação de bromélias .....</b>                            | <b>12</b> |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>  | <b>18</b> |
| <b>3.1 Identificação taxonômica da espécie .....</b>                     | <b>19</b> |
| <b>3.2 Assepsia das sementes e estabelecimento <i>in vitro</i> .....</b> | <b>20</b> |
| <b>3.3 Multiplicação <i>in vitro</i> de brotos .....</b>                 | <b>21</b> |
| <b>3.4 Enraizamento <i>in vitro</i> de brotos .....</b>                  | <b>22</b> |
| <b>3.5 Aclimatização de plântulas .....</b>                              | <b>23</b> |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                    | <b>25</b> |
| <b>4.1 Identificação taxonômica da espécie .....</b>                     | <b>25</b> |
| <b>4.2 Assepsia das sementes e estabelecimento <i>in vitro</i> .....</b> | <b>26</b> |
| <b>4.3 Multiplicação <i>in vitro</i> de brotos .....</b>                 | <b>26</b> |
| <b>4.4 Enraizamento <i>in vitro</i> de brotos .....</b>                  | <b>31</b> |
| <b>4.5 Aclimatização de plântulas .....</b>                              | <b>34</b> |
| <b>5 CONCLUSÃO .....</b>   | <b>39</b> |
| <b>6 PERSPECTIVAS .....</b>  | <b>40</b> |
| <b>7 REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>41</b> |
| <b>8 ANEXOS .....</b>  | <b>53</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A Amazônia é um bioma rico em biodiversidade que vem sofrendo diversos impactos ocasionados pela ação antrópica. A exploração madeireira é um dos principais fatores relevantes na causa de danos severos às florestas, propiciando grandes devastações (FEARNSIDE, 2006). Nas florestas neotropicais do mundo existe uma considerável diversidade biológica de epífitas vasculares, contribuindo com a manutenção desses ecossistemas, bem como com a biodiversidade (BENZING, 1990). Dentre as epífitas vasculares representadas por pteridófitas e angiospermas, destacam-se as Bromeliaceae (BENZING, 1990).

A família Bromeliaceae está distribuída pelos Neotrópicos, possuindo 58 gêneros em 3172 espécies e subespécies (LUTHER, 2008; GIVNISH et al., 2011). Desse total, 40 % das espécies são encontradas em território brasileiro (MOLLO et al., 2011). No Brasil, a maior riqueza de espécies dessa família ocorre na Floresta Atlântica, sendo que nas regiões Sul e Sudeste existem populações com elevado endemismo (REITZ, 1983; MARTINELLI, 2000). As bromeliáceas da Amazônia são em geral, pouco conhecidas (NARA; WEBBER, 2002) e mal representadas nas coleções de herbários. De acordo com Smith (2005), ocorrem 64 espécies em 14 gêneros para toda a região.

Na Amazônia brasileira, os representantes de Bromeliaceae são encontrados com maior frequência em locais de vegetação de baixios, campina, campinarana e igapó (SOUSA; WANDERLEY, 2007). Destaca-se para os estudos das Bromeliaceae da Amazônia o levantamento da Flora da Reserva Ducke, realizado por Ribeiro et al. (1999), onde foram registrados sete gêneros e 13 espécies. No Estado do Acre, a família Bromeliaceae está representada por 29 espécies em nove gêneros (DALY; SILVEIRA, 2008). Dentre esses gêneros, *Aechmea*, que é encontrada na Amazônia Sul-Occidental, apresenta 13 espécies. A espécie *Aechmea setigera* Mart. ex Schult.f. é encontrada na Amazônia Sul-Occidental (Acre), de acordo com as coletas realizadas por Daly e Silveira (2008).

As bromélias consistem em um subsistema ecológico complexo, que contribui para a manutenção da estabilidade dos ecossistemas florestais em função do seu alto grau de especialização e de sua adaptação às condições climáticas e oligotróficas extremas (BENZING, 2000; RECH FILHO et al., 2005; ARANDA-PERES;

RODRIGUES, 2006). A utilização das bromélias para fins ornamentais e comerciais, bem como as atividades de desmatamentos das florestas tropicais, causam uma redução na sua biodiversidade (RECH FILHO et al., 2005), o que pode levar à extinção de espécies. De acordo com Tamaki et al., (2007), o Diário Oficial do Estado de São Paulo de 22 de setembro de 2004 publicou uma lista de espécies vegetais na qual *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. está presumivelmente extinta. Portanto, estudos que visem a conservação e a propagação dessa espécie são de extrema importância.

As técnicas de cultura de tecidos vegetais possibilitam, através de um conjunto de estratégias, a propagação massal e conservação das espécies (REICH FILHO et al., 2005). A utilização de sementes como fonte inicial de explante consiste numa estratégia importante para a conservação da espécie, mantendo a variabilidade genética (RECH FILHO et al., 2005; SILVEIRA et al., 2009). Vários estudos neste sentido foram realizados com várias espécies, entre as quais *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* (ALVES; GUERRA, 2001), *Dyckia distachia* (POMPELLI; GUERRA, 2004), *Neoglaziovia variegata* (SILVEIRA et al., 2009); *V. inflata* (PEDROSO et al., 2010); *V. reitzii* (DAL VESCO; GUERRA, 2010); *Billbergia zebrina* (DAL VESCO, 2010; DAL VESCO et al., 2011). Estudos de micropropagação e conservação *in vitro* de bromélias da Amazônia ainda são incipientes. Estas técnicas podem ainda possibilitar a propagação massal de bromélias com importância e interesse ornamental, visando reduzir a pressão de coleta nos ambientes naturais. Neste caso, o emprego das técnicas de cultivo *in vitro* em bromélias aumenta a taxa de multiplicação das espécies de interesse (ARANDA-PERES; RODRIGUEZ, 2006, GUERRA; DAL VESCO, 2010), quando comparado ao sistema convencional de propagação por divisão natural de brotações.

Assim, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de micropropagação da bromélia *Aechmea setigera* Mart. ex Schultz. visando sua propagação em larga escala.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

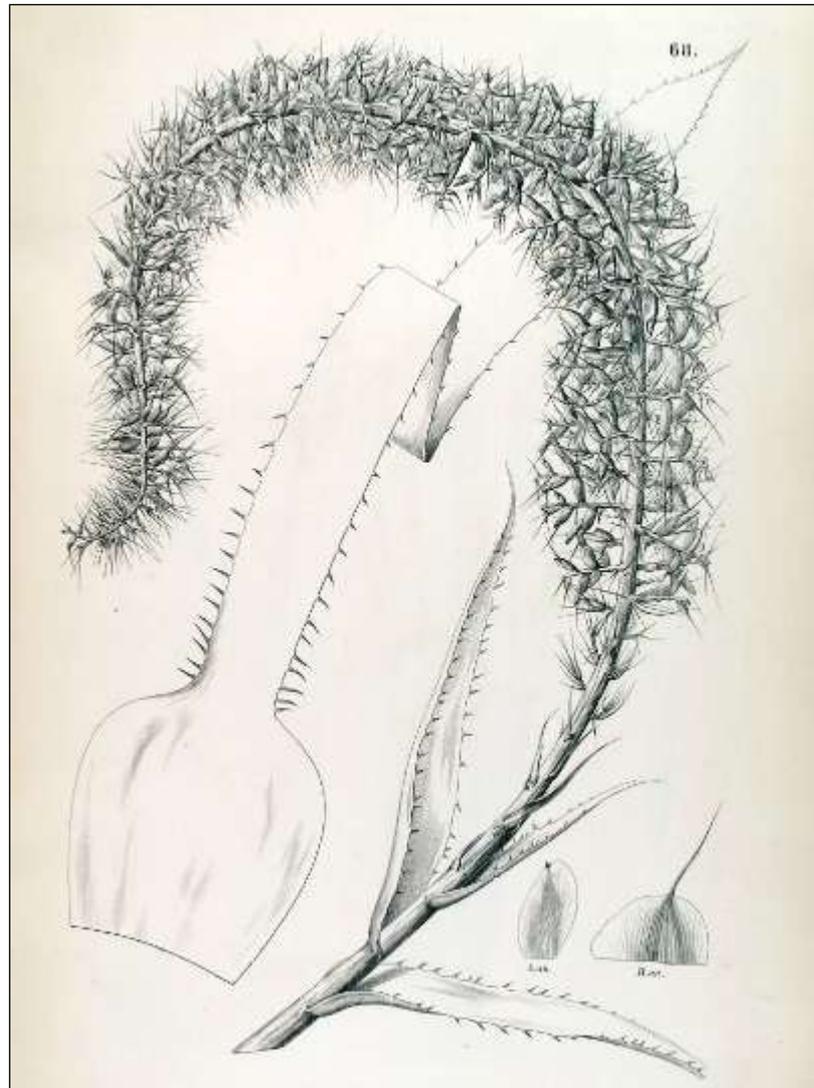
### 2.1 Considerações sobre *Aechmea setigera*

Segundo Luther (2004), o gênero *Aechmea* possui cerca de 240 espécies. É o maior gênero dentro da subfamília Bromelioideae e está distribuído por todo o Neotrópico, porém a maior concentração de espécies ocorre no Brasil (FARIA et al., 2004). De acordo com Benzing (1990), o gênero apresenta 120 espécies epifíticas nas florestas neotropicais.

A alta concentração de espécies de *Aechmea* e outros gêneros de Bromelioideae no Brasil, especialmente nas florestas chuvosas da Mata Atlântica, tem levado a sugerir que ali se encontra o centro de diversificação da subfamília (SMITH, 1934). O gênero apresenta dois importantes centros de diversidade na Floresta Atlântica. O primeiro em Pernambuco e Alagoas e outro entre a Bahia e o Rio de Janeiro (MARTINELLI et al., 2008). Das 254 espécies distribuídas no mundo, 54% estão no domínio da Floresta Atlântica, sendo que 47% são endêmicas (STEHMANN et al., 2009).

A maioria das bromélias desse gênero exibe rosetas vistosas e as inflorescências são compostas por brácteas coloridas, que mantêm a intensa coloração por várias semanas ou até meses, conferindo a essas espécies um elevado potencial ornamental (TERAO et al., 2005).

*Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. possui hábito de epífita ou terrestre, com distribuição em geral no Panamá, Colômbia, Venezuela, Guiana e Amazônia do Brasil, entre 70 a 550 m de altitude (RIBEIRO et al., 1999). Apresenta inflorescência simples, do tipo espiga ou capítulo, ou composta em racemo de espigas, neste caso, apresentando 2 a 20 espigas por inflorescência. Apresenta bráctea floral rígida, sépalas e pétalas conatas na base e pétalas formando ou não um tubo acima do hipanto. As pétalas apresentam na face interna um par de apêndices (SMITH; DOWNS, 1979). Possui folhas grandes muito suculentas em forma de “u” (Figura 1) em secção com padrão de cera na lâmina distinto. A base interna da folha é marrom em folhas maduras e branca em folhas jovens. Frequentemente encontrada em baixio e capoeira do Panamá até o Mato Grosso (RIBEIRO et al., 1999; FLORA BRASILIENSIS, 1982).



**Figura 1** - Representação ilustrativa das características morfológicas de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. Fonte: Flora brasiliensis, 1982.

## 2.2 Micropropagação de bromélias

As bromélias podem ser propagadas de forma sexuada ou assexuada. O processo sexual é uma forma de propagação demorada e depende da espécie. A maturação das sementes pode levar até um ano após a polinização (RAUH, 1979), bem como, a propagação pode não ocorrer ao longo de todo o ano. Em função disto, nas últimas décadas, a propagação assexuada por técnicas de cultura de tecidos tem sido muito utilizada, pois auxilia na germinação *in vitro* de sementes e na produção de

mudas em larga escala. Essa estratégia pode ser muito útil na conservação de espécies nativas (SANTOS, 2007), principalmente quando considera como explante de partida sementes germinadas *in vitro*, garantindo a variabilidade genética da espécie. Desse modo, para amenizar os riscos de extinção de algumas espécies de bromélias, incluindo as endêmicas, utiliza-se a micropropagação, aliada a um trabalho de conservação de germoplasma.

Na micropropagação ou propagação *in vitro* é realizado o cultivo de plantas, ou partes destas (explantes), em meio de cultura e ambiente asséptico, controlando temperatura, fotoperíodo, umidade e irradiância, em local apropriado (sala de crescimento) (GEORGE, 1996). Dentro dessa técnica existe a fase de multiplicação, cujo principal objetivo é produzir o maior número de plantas no menor espaço de tempo (ERIG et al., 2004).

A cultura de tecidos de plantas é uma alternativa para a produção de mudas em larga escala. A técnica permite produzir mudas em grande quantidade e com qualidade, aliado a redução no período para a obtenção das mesmas. Além disso, a técnica pode ser aplicada tanto para multiplicar mudas comerciais, como para auxiliar a reprodução e multiplicação de materiais em programas de melhoramento genético. Em certos casos obtêm-se uma única planta com as características desejáveis, que, através dos processos tradicionais, o melhorista poderia levar entre 10 e 12 anos para os testes de seleção até se obter uma cultivar (EMBRAPA, 2007).

Juntamente com a multiplicação *in vitro*, é de grande importância a conservação dos recursos genéticos vegetais, frente ao atual cenário de destruição ambiental e também das intempéries que ocorrem em materiais mantidos sob condições de campo (AMARAL, 2005). Desta forma, priorizar e desenvolver novas estratégias para a conservação dos genótipos em bancos de germoplasma, como a manutenção de coleções *in vitro*, mantém seguro os recursos genéticos do país. Além disso, dependendo da espécie a ser conservada, a manutenção *in vitro* pode facilitar a rápida multiplicação de cultivares de interesse (CAMILLO et al., 2009).

A multiplicação *in vitro* tem várias vantagens como alta taxa de multiplicação; rapidez na obtenção de mudas; controle das condições de cultivo; propagação continuada ao longo do ano com fidelidade genética; propágulos livres de doenças e pragas; custo baixo, uma vez estabelecido e otimizado o protocolo; necessidade de espaço reduzido e possibilidade de armazenamento de germoplasma em longo prazo (PORTELA, 2008).

Para bromélias, os protocolos de micropropagação utilizam vários tipos de explantes, como: plântulas (GALVANESE et al. 2007; SILVEIRA et al., 2009), eixo caulinar (CARVALHO et al., 2009), ápices caulinares (ALBUQUERQUE et al., 2000), folhas, caules (CARNEIRO et al., 1999; MENDES et al., 2007), brotos laterais (MATHEWS; RANGAN 1979).

Diferentes métodos têm sido utilizados para a cultura *in vitro* de espécies da família Bromeliaceae como: biorreatores (FRAGA et al., 2012; RECH FILHO, 2004; MERCIER, KERBAUY, 1997; ALVES; GUERRA, 2001), sistema dupla-fase (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012; DAL VESCO et al., 2001; RECH FILHO et al., 2005; DAL VESCO; GUERRA, 2010), culturas nodulares (SCHERER et al., 2011; ALVES et al., 2006), unidades encapsuláveis RECH FILHO, 2004 ).

Os explantes usados nos protocolos de micropropagação de bromélias são variados. Dentre eles existem: brotos *in vitro* usados como material inicial (MEKERS, 1977; KOH; DAVIES, 2001; POMPELLI; GUERRA, 2005; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012); folhas (MERCIER; KERBAUY, 1992; CARNEIRO et al., 1999; PEREIRA et al., 2001); meristemas intercalares (KOH; DAVIES, 1997; SCHERER et al., 2011); brotos estiolados (PEREIRA et al., 2001); gemas (PESCADOR; KOLLER, 1992) e sementes (BENCKE; DROSTE 2008).

A assepsia de material vegetal é de fundamental importância na micropropagação e, sendo efetuada com sucesso, evitará contaminação no meio de cultura por fungos e bactérias, que ocasionam perdas do material vegetativo e do meio de cultura, acarretando no insucesso da pesquisa (RODRIGUES et al., 2003).

O desenvolvimento de protocolos para micropropagação de algumas espécies de bromélias, inclusive nativas, já vem sendo relatado na literatura, com diferentes resultados entre as espécies e diferentes fontes de explantes (MAPES 1973; PEREIRA et al., 2000; POMPELLI et al., 2001; ARANDA-PERES, 2005; DAL VESCO; GUERRA, 2010).

Entretanto, existem diferenças nos protocolos de multiplicação estabelecidos que dependem de diferentes fatores, como o estágio fisiológico do material vegetal, condições de cultivo, genótipo e principalmente, do meio de cultura e reguladores de crescimento (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Apesar de não existir uma formulação padrão para bromélias, o meio básico MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com suas modificações e diluições, tem apresentado bons resultados na micropropagação de diversas espécies de bromélias (DROSTE et

al., 2005; GALVANESI, et al., 2007; MENDES et al., 2007; SOUZA et al., 2009; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012).

Com relação à composição de reguladores de crescimento, há também uma grande variação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; MELO et al., 1999). Nesse sentido, o meio básico MS suplementado com auxinas e citocininas, como ácido naftalenoacético (ANA), cinetina (CIN) e 6-benzilaminopurina (BAP), em diversas concentrações, são os mais utilizados para a micropropagação de bromélias (SOUZA et al., 2003; DROSTE et al. 2005; BELLINTANI, et al. 2007; ROSA, 2010).

Outros fatores podem influenciar as diferentes etapas para o estabelecimento de um protocolo eficiente de micropropagação de bromélias, como a consistência do meio de cultura e o sistema de cultivo (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012; SCHERER et al., 2011).

A rizogênese é uma das fases mais importantes da micropropagação, pois ela determina indiretamente a sobrevivência das plantas durante a aclimatização. Raízes mal formadas e pouco funcionais é uma característica de plantas micropropagadas. Durante a fase de aclimatização é necessário que haja emissão de novas raízes para que ocorra a absorção de água e sais minerais de forma mais eficiente, pois deficiência de água dificulta o enraizamento e atrasa o desenvolvimento das plantas (CUNHA, 2003).

Dentre os fatores determinantes na indução e na formação de raízes *in vitro*, destacam-se os níveis de auxina endógena; as condições inerentes à planta matriz, como juvenilidade e genótipo, o meio de cultura, a presença de reguladores de crescimento e carboidratos, a nutrição mineral, a presença de poliaminas e substâncias como carvão ativado e compostos fenólicos, além das condições ambientais de crescimento das plantas *in vitro* (ROCHA et al., 2008).

As auxinas como hormônios, suplementadas aos meios de cultura, atuam nos processos de expansão, alongamento e divisão celular, com reflexos no enraizamento (GEORGE et al., 2008). Entre elas, o ácido indolacético (AIA) parece ser a auxina mais eficaz para estimular o enraizamento *in vitro*, embora não a mais utilizada nos protocolos em geral (HU; WANG, 1983). Sendo que para a maioria das espécies, as auxinas exógenas são adicionadas ao meio de cultura na fase de indução das raízes, enquanto que na fase de diferenciação dos primórdios e crescimento destas, sua presença no meio de cultura costuma inibir o processo (HOPKINS, 1999).

Entretanto, diversos estudos relatam a formação de raízes somente na presença de ácido naftalenoacético (ANA) – uma auxina – aliado a uma citocinina, no caso com 6-benzilaminopurina (BAP), em diferentes concentrações que variam de 0,5-10,7  $\mu\text{M}$  e 0,4-9,0  $\mu\text{M}$ , respectivamente, para bromélias, por exemplo *Ananas comosus* (TENG, 1997; ARRABAL et al., 2002; PIERIK et al., 1984). Esta faixa de concentração também foi descrita como ótima por Macedo et al. (2003), os quais estudaram o efeito de diferentes fitorreguladores na micropropagação de Bromeliaceae do gênero *Ananas*.

A promoção do enraizamento pode ser realizada *in vitro* ou *ex vitro*. Há controvérsias se as raízes induzidas *in vitro* são ou não funcionais (POMPELLI; GUERRA, 2005).

A aclimatização é o processo de passagem da planta que está *in vitro* para o ambiente *ex vitro* e é definido como a adaptação climática de um organismo, especialmente uma planta, que é transferida para um novo ambiente (TOMBOLATO; COSTA, 1998). Esse termo não deve ser confundido com aclimatação, que é o processo no qual as plantas ou outros organismos se tornam ajustados a um novo clima ou situação, como resultado de um processo essencialmente natural (PREECE; SUTTER, 1990). Sendo assim, aclimatização e aclimatação são termos que apresentam conotações diferentes (TAVARES et al., 2008).

A técnica de aclimatização das plantas micropropagadas consiste em retirar a planta da condição *in vitro* e transferi-la para casa de vegetação, com o objetivo de superar as dificuldades que as plantas enfrentam quando ocorre a mudança de ambiente. O sucesso dessa técnica requer que as plantas que se desenvolveram heterotroficamente sob condições de alta umidade, posteriormente se desenvolvam autotroficamente em condições de moderada ou baixa umidade (ZIMMERMAN, 1988).

As plantas micropropagadas necessitam passar por um período de aclimatização antes de serem transferidas para condições de campo. Para muitas espécies, a aclimatização é considerada uma fase crítica da micropropagação, sendo um dos maiores obstáculos à aplicação prática da cultura de tecidos na propagação de plantas, devido à grande diferença entre as duas condições ambientais (READ; FELLMAN, 1985).

A perda de vigor e a subsequente morte devido ao dessecamento são dois sérios problemas que ocorrem com plantas transferidas das condições *in vitro* para casa de vegetação (SUTTER; HUTZELL, 1984). Existem diversos métodos que favorecem o crescimento das mudas após a aclimatização estão incluídas técnicas

como o enraizamento *ex vitro* ou *in vivo* (BIASI, 1996) e escolha do substrato adequado (NORMAH et al., 1995).

A escolha de um substrato adequado reduz a mortalidade de plantas durante a aclimatização. Dentre os mais utilizados na aclimatização de bromélias pode-se citar solo, casca de nozes, vermiculita, perlita, areia, turfa, casca de eucalipto ou de pinus curtida, casca de arroz e pó de carvão, cujas proporções variam conforme a espécie, podendo ser usados combinados ou individualmente (SILVA et al., 2006; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

Uma tendência geral para compor substratos para produção de mudas tem sido a adição de fontes de matéria orgânica, a qual contribui não só para o fornecimento de nutrientes, mas também para as características físicas do meio de cultivo (LIMA et al., 2006).

Segundo Carneiro (1995), o substrato é o meio em que as raízes se desenvolvem com a finalidade de fornecer suporte estrutural à parte aérea das mudas, e também água, oxigênio e nutrientes. Silva (2006) menciona que as espécies nativas, de um modo geral, apresentam crescimento lento, daí a importância de se definir um substrato de boa qualidade.

De acordo com Carvalho Filho et al. (2002), o substrato exerce influência na arquitetura do sistema radicular e no estado nutricional das plantas. A depender da estrutura do substrato, da qualidade de aeração, da capacidade de retenção de água e do seu grau de infestação por patógenos, haverá ou não desenvolvimento das plantas (POPINIGIS, 1985).

Para Gomes e Silva (2004), a escolha do substrato deve ser feita levando em consideração os aspectos econômicos, pois além de propiciar adequado crescimento à planta, o material utilizado na composição do substrato deve ser abundante na região e ter baixo custo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de cultivo *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular (LABMOL) e os de aclimatização na Casa de Vegetação Tecnológica da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Acre).

Os frutos em estágio de maturação fisiológica de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. (Figura 2) foram coletados de plantas adultas em população natural, na Estrada AC-90, Km 10 (Transacreana), sobre um forófito (Arecaceae) em uma área de pasto, ao lado esquerdo da rodovia, sentido Rio Branco, AC – Escola Técnica Florestal (S10<sup>0</sup> 01' 16,9", W 67<sup>0</sup> 55' 26,6").



**Figura 2** - *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. **A.** indivíduos sobre forófito (Arecaceae); **B.** detalhe da infrutescência; **C.** aspecto da bráctea. **D.** morfologia da inflorescência. **E.** folha sob vista frontal da face abaxial; **F.** espinhos presentes nas margens das folhas; **G.** frutos e sementes individualizados.

### 3.1 Material vegetal para identificação taxonômica

Para identificação do material vegetal taxonomicamente foram feitas coletas na área de estudo descrita no item anterior. Com auxílio de um facão um indivíduo completo foi destacado dos demais na touceira suspensa localizada na altura média de uma palmeira que servia de suporte (forófito). Por conta do comprimento da bromélia, a parte reprodutiva (Figura 3) foi destacada e exsiccada separadamente da parte não reprodutiva (folhas, raízes).

O material de campo foi levado para Empresa Brasileira de Agropecuária (Embrapa Acre) para montagem da exsicata com auxílio de faca, jornal e prensa. A inflorescência destacada foi secada separadamente. As folhas por causa do comprimento foram dobradas em três partes e prensadas em uma prensa de madeira.

As exsicatas foram secadas em estufa regulada em 65°C por 15 dias no laboratório de solos da Embrapa Acre. As duplicatas foram enviadas ao Jardim Botânico do Rio de Janeiro para identificação botânica por especialista da família Bromeliaceae.



**Figura 3** – Inflorescência de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f., Rio Branco, Acre.

### 3.2 Assepsia das sementes e estabelecimento *in vitro*

Sementes da *Aechmea setigera* coletadas de frutos maduros foram retiradas com auxílio de pinça histológica, 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 esterilizada e autoclavada. Após, as sementes foram inoculadas em frascos com capacidade de 250 mL contendo 30 mL de meio de cultura, vedados com filme plástico PVC transparente.

O meio de cultura básico utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da adição do ágar e da autoclavagem, realizada por 15 minutos, a 121 °C e 1,3 atm de pressão. A composição e concentração de macronutrientes, micronutrientes e vitaminas do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1** - Composição e concentração dos constituintes do meio de cultura formulado por Murashige & Skoog (1962).

| <b>Meio MS (1962)</b>                                 |                          |
|---|--------------------------|
| <b>Macronutrientes</b>                                | <b>mg L<sup>-1</sup></b> |
| <b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>                   | 1 650                    |
| <b>KNO<sub>3</sub></b>                                | 1 900                    |
| <b>CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O</b>              | 440                      |
| <b>MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O</b>              | 370                      |
| <b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>                   | 170                      |
| <b>Micronutrientes</b>                                | <b>mg L<sup>-1</sup></b> |
| <b>MnSO. 4H<sub>2</sub>O</b>                          | 22,3                     |
| <b>ZnSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O</b>              | 8,6                      |
| <b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>                    | 6,3                      |
| <b>KI</b>   | 0,83                     |
| <b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O</b> | 0,25                     |
| <b>CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O</b>              | 0,025                    |
| <b>CoCL<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O</b>              | 0,025                    |
| <b>FeSO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O</b>              | 37,3                     |
| <b>NaEDTA. 2H<sub>2</sub>O</b>                        | 27,8                     |
| <b>Vitaminas</b>                                      | <b>mg L<sup>-1</sup></b> |

|                         |     |
|-------------------------|-----|
| <b>Glicina</b>          | 2   |
| <b>Ácido nicotínico</b> | 0,5 |
| <b>Piridoxina. Hcl</b>  | 0,5 |
| <b>Tiamina. Hcl</b>     | 0,1 |
| <b>Mio- Inositol</b>    | 100 |

As sementes foram inoculadas em frascos de vidro com capacidade total de 250 mL sendo preenchidos com 30 mL de meio de cultura MS. Os recipientes foram mantidos em sala de crescimento à temperatura controlada de  $25 \pm 2$  °C, dispendo de lâmpadas fluorescentes brancas com intensidade luminosa de  $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , expostas a fotoperíodo de 16 horas de luz. Após 30 dias foram avaliados porcentagem de germinação e contaminação

### 2.3 Multiplicação *in vitro* de brotos

Na fase de multiplicação, plântulas germinadas *in vitro* após 30 dias foram retiradas dos frascos e suas raízes excisadas com auxílio de bisturi. Brotos com aproximadamente 2,0 cm foram utilizados no estudo da ação de diferentes concentrações do regulador de crescimento vegetal BAP (6-benzilaminopurina) em meio semissólido (MSS) e meio líquido estacionário (MLE) para avaliar a morfogênese *in vitro* de *A. setigera*.

Os tratamentos consistiram em diferentes concentrações de regulador BAP (0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0  $\text{mg.L}^{-1}$ ) (Tabela 2) adicionados aos meios de cultivo MS (MURASHIGE, SKOOG, 1962) em frascos de 250 mL contendo 30 mL de meio de cultura e vedados com filme plástico transparente. Para o meio líquido estacionário (MLE), o meio de cultura MS foi suplementado com  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose. Para o meio semissólido, o meio de cultura MS foi suplementado com  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e  $6 \text{ g.L}^{-1}$  de ágar. O pH do meio de cultura foi ajustado para  $5,8 \pm 0,1$  antes da adição do ágar e da autoclavagem, realizada por 15 minutos, a  $121$  °C e  $1,3$  atm de pressão.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura controlada de  $25 \pm 2$  °C, dispendo de lâmpadas fluorescentes brancas e intensidade luminosa de  $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , expostas a fotoperíodo de 16 horas de luz.

**Tabela 2** - Esquema dos tratamentos e das diferentes concentrações de BAP usados na multiplicação de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. em meio MS semissólido (MSS) e líquido estacionário (MLE).

| Concentrações              | MSS | MLE |
|----------------------------|-----|-----|
| 0 (controle) BAP           | T1  | T6  |
| 0,5 mg.L <sup>-1</sup> BAP | T2  | T7  |
| 1,0 mg.L <sup>-1</sup> BAP | T3  | T8  |
| 2,0 mg.L <sup>-1</sup> BAP | T4  | T9  |
| 4,0 mg.L <sup>-1</sup> BAP | T5  | T10 |

O experimento foi organizado em esquema fatorial 2 x 5 (consistência do meio de cultura x diferentes concentrações de regulador). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com 10 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por frasco contendo quatro explantes (brotos). As variáveis morfogênicas analisadas foram: número de brotos/explante, comprimento do maior broto, número total de brotações, número de raízes e presença de calo.

As avaliações foram realizadas após 60 dias de cultivo. Para o número de brotos os dados foram transformados em  $(x+0,5)^{0,5}$ . As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e análise de regressão, com a separação de médias pelo teste de Scott- Knott utilizando-se o programa computacional Assistat 7.6 beta.

#### 2.4 Enraizamento *in vitro* de brotos

Antes do início da fase de enraizamento *in vitro* os brotos de bromélia ficaram 30 dias em meio MS para eliminar o efeito residual do regulador de crescimento usado no experimento de multiplicação *in vitro*.

Após essa etapa brotos com aproximadamente 2,0 cm de altura oriundos do experimento de multiplicação *in vitro* foram removidos e inoculados em frascos de vidro (250 mL) com meio de cultura MS, suplementados com sacarose (15 g.L<sup>-1</sup>) e solidificado com ágar (6 g.L<sup>-1</sup>), com diferentes concentrações de ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftalenoacético (ANA) nas seguintes concentrações 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup> (Tabela 3), por um período de 60 dias. O pH do meio de cultura foi ajustado para  $5,8 \pm 0,1$  antes da adição do ágar e da autoclavagem, realizada por 15 minutos a 121 °C e 1,3 atm de pressão.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento à temperatura controlada de  $25\pm 2$  °C, dispendo de lâmpadas fluorescentes e intensidade luminosa de  $30 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , expostas a fotoperíodo de 16 horas de luz.

**Tabela 3** - Esquema dos tratamentos e das diferentes concentrações de AIA, AIB e ANA usados no enraizamento *in vitro* de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult.

| Concentrações ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) | AIA | AIB | ANA |
|--------------------------------------|-----|-----|-----|
| 0,0                                  | T1  | T6  | T11 |
| 0,5                                  | T2  | T7  | T12 |
| 1,0                                  | T3  | T8  | T13 |
| 2,0                                  | T4  | T9  | T14 |
| 4,0                                  | T5  | T10 | T15 |

Foram utilizadas seis repetições, com quatro brotos por frasco para cada um dos 15 tratamentos, organizadas em delineamento inteiramente casualizado (DIC) simples e em esquema fatorial  $3 \times 5$  (tipos de auxinas x concentrações). As avaliações foram realizadas após 60 dias. As variáveis analisadas foram: porcentagem de enraizamento, número de raiz, comprimento da raiz principal, número de folhas e comprimento da parte aérea.

Os dados percentuais foram transformados para arco seno  $(x/100)^{0,5}$ . Para o número de raízes os dados foram transformados em  $(x+0,5)^{0,5}$ . As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA), com a separação de médias pelo teste Scott-Knott, utilizando-se o programa computacional Assistat beta 7.6 beta.

## 2.5 Aclimatização de plântulas

Para iniciar esse experimento foram usadas somente as brotações enraizadas dos tratamentos que formaram com o uso do regulador de crescimento ANA (ácido naftalenoacético). Após 60 dias, as plântulas enraizadas *in vitro* foram retiradas dos frascos e lavadas em água corrente para eliminar o excesso do meio de cultura aderido às raízes. Em seguida, as plântulas com mais de 3,0 cm foram transferidas para a casa de vegetação tecnológica (Figura 4) e acondicionadas em tubetes plásticos (6,5 cm de diâmetro x 14 cm de altura) contendo substrato comercial, vermiculita e pó de serra em

diferentes proporções (Tabela 4). 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 e umidade relativa de 80%, controladas por um termômetro e higrômetro manual, respectivamente.



**Figura 4** - Casa de Vegetação Tecnológica. Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

**Tabela 4** - Composição dos substratos utilizados no experimento de aclimatização de plântulas micropropagadas de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f.

| <b>Tratamentos</b> | <b>Substratos</b>                               | <b>Proporção</b> |
|--------------------|---|------------------|
| Substrato (S1)     | Substrato comercial                             | 1                |
| Substrato (S2)     | Vermiculita                                     | 1                |
| Substrato (S3)     | Pó de serra                                     | 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            |

Foram utilizadas trinta repetições, constituídas por uma plântula enraizada *in vitro*, com cerca de 3,0 cm, por tubete. O experimento foi organizado em DIC simples, sendo as avaliações realizadas após 30, 60 e 90 dias. As variáveis analisadas foram: porcentagem de sobrevivência, altura das plântulas e número de folhas.

As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA), com a separação de médias pelo teste Scott-Knott, utilizando-se o programa computacional Assistat 7.6 beta.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de regressão para cada parâmetro avaliado nos experimentos com *Aechmea setigera* encontra-se em anexo.

### 4.1 Identificação taxonômica da espécie

A identificação da espécie e as duplicatas de exsicatas estão depositadas no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (Herbário RB) e foram identificadas pela especialista em Bromeliaceae Rafaela Campostrini Forzza (Figura 3), com voucher de número RB550638 e encontra-se disponível na página do herbário na internet com acesso livre.

|           |  |  |            |
|-----------|--|--|------------|
| RB 550638 | <b>BROMELIACEAE <i>Aechmea setigera</i> Martius ex Schultes &amp; Schultes f.</b><br>Det.: Rafaela Campostrini Forzza (em 11-IX-2012)<br>Procedencia: Brasil. Acre. Rio Branco. Estrada AC-90, Km 09,<br>Transacreana.,<br>Observações: Epífita sob forófito noa lenhoso (palmeira), flor com<br>pétalas amarela, inflorescência foi destocada da bromélia por conta do<br>tamanho, folhas com cerca de 1,10 centímetros de comprimento com<br>acúleos, folhas esverdeadas e com a base roxa escuro a marrom,<br>conservação nativa. | João Ricardo<br>Avelino Leão, 03<br>16-VIII-2012 | 12/09/2012 |
|-----------|--|--|------------|

**Figura 3** - Ficha de depósito e identificação de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f., disponível para consulta pública no site do Herbário RB do Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

## 4.2 Assepsia das sementes e estabelecimento *in vitro*

A germinação *in vitro* de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. ocorreu em meio de cultura MS semissólido a partir do oitavo dia com elevado percentual de emergência (90%). Não foi observada a formação de plântulas anormais durante o desenvolvimento e crescimento inicial *in vitro*.

## 4.3 Multiplicação de brotos

O número de brotos regenerados *in vitro* com o uso de diferentes concentrações de BAP e em diferentes meios de cultura apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Tabela 5). Em meio de cultura líquido estacionário (MLE), o número de brotos regenerados foi maior com o uso de 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e menor nos demais tratamentos. Entretanto, com o uso do meio de cultura semissólido não houve diferenças com relação ao número de brotos regenerados sob diferentes concentrações de BAP, inclusive na sua ausência.

**Tabela 5** - Multiplicação *in vitro* de brotos de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. em meio de cultura líquido estacionário (MLE) e meio de cultura MS semissólido (MSS). LABMOL – Embrapa Acre, Rio Branco - AC.

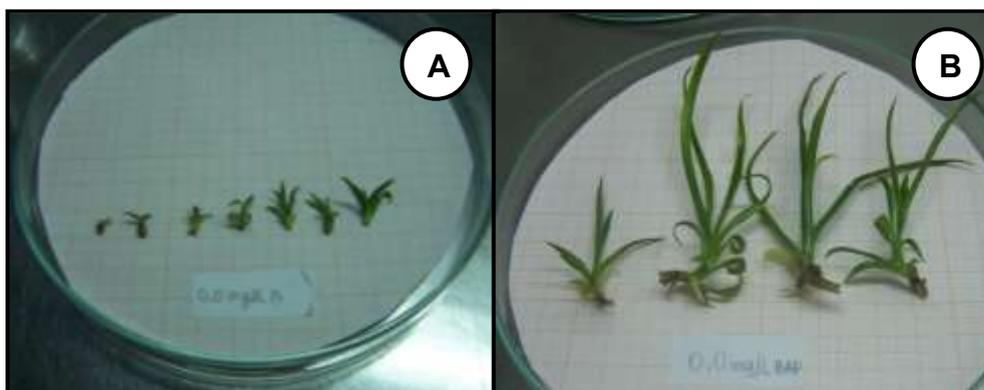
| Concentrações de BAP   | Número de brotos |         | Comprimento dos brotos |          | Número de raízes |         |
|------------------------|------------------|---------|------------------------|----------|------------------|---------|
|                        | MLE              | MSS     | MLE                    | MSS      | MLE              | MSS     |
| 0,0 mg.L <sup>-1</sup> | 0,27 aB          | 0,77 aA | 23,6 aA                | 10,72 bA | 1,71 aA          | 1,38 bA |
| 0,5 mg.L <sup>-1</sup> | 0,53 aB          | 0,88 aA | 24,62 aA               | 6,46 bA  | 0,88 aB          | 0,95 aB |
| 1,0 mg.L <sup>-1</sup> | 0,93 aB          | 1,15 aA | 13,52 aB               | 6,57 bA  | 0,71 aC          | 0,83 aC |
| 2,0 mg.L <sup>-1</sup> | 0,90 aB          | 1,11 aA | 15,28 aB               | 8,15 bA  | 0,91 aB          | 0,77 aC |
| 4,0 mg.L <sup>-1</sup> | 3,40 aA          | 1,17 bA | 15,42 aB               | 7,95 bA  | 0,75 aC          | 0,71 aC |
| <b>F</b>               | 2,91*            |         | 4,74 **                |          | 4,94**           |         |
| <b>CV (%)</b>          | 25,61            |         | 27,08                  |          | 13,18            |         |

Nota: As médias seguidas pela mesma letra minúscula (comparadas na linha) e pela mesma letra maiúscula (comparadas na coluna) não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0.01$ );

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $0.01 < p < 0.05$ ).

A multiplicação *in vitro* a partir de brotos ocorreu em todas as concentrações utilizadas do regulador de crescimento BAP, inclusive na sua ausência (Tabela 5), indicando, possivelmente, a existência de concentrações endógenas de citocininas suficientes para a formação de brotos (Figura 5). Nesta etapa não foi observada a presença de calos na base dos explantes.



**Figura 5** - Formação de brotos adventícios em *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. na ausência de regulador de crescimento (BAP) aos 60 dias. **A.** brotos multiplicados *in vitro* em meio MS semissólido. **B.** brotos multiplicados em meio MS líquido estacionário.

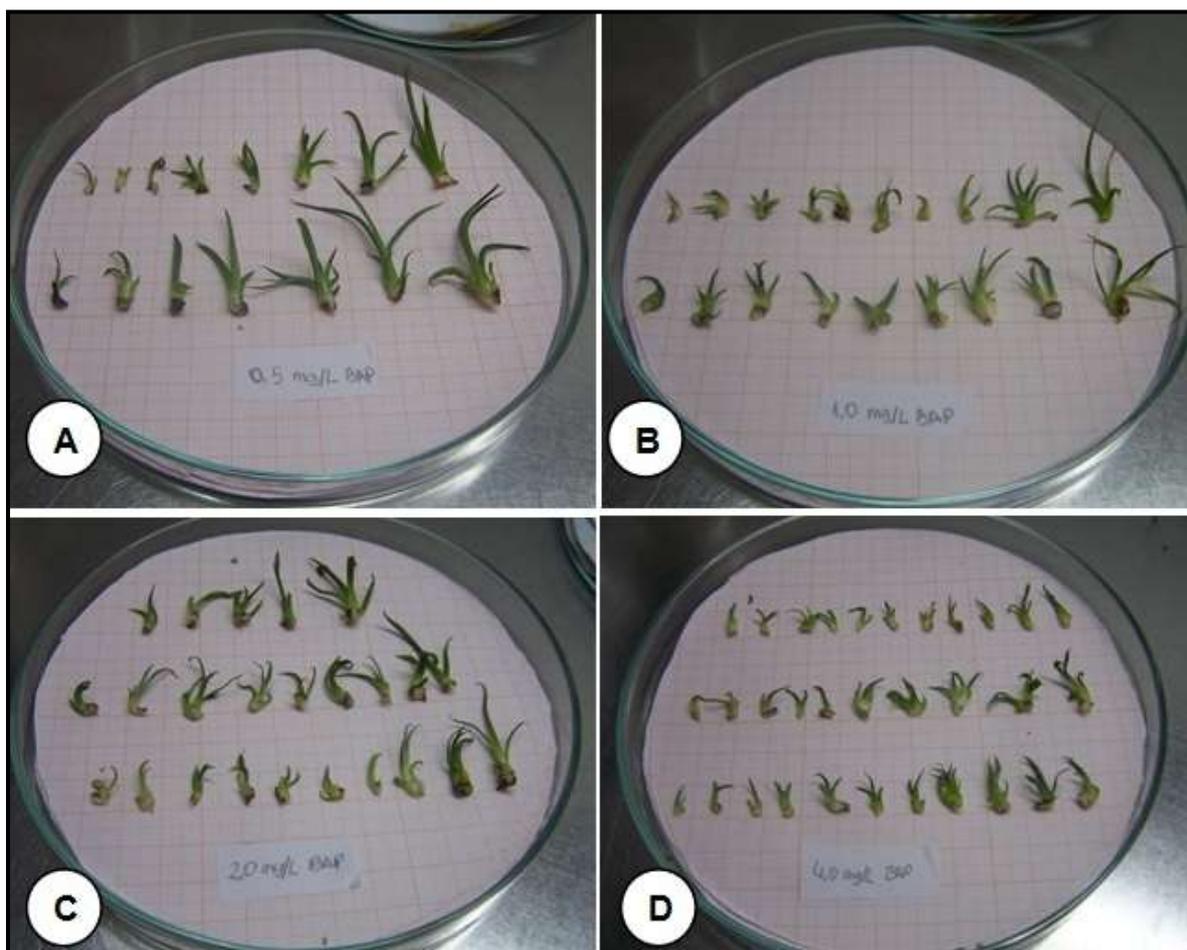
Na literatura encontram-se diversos trabalhos que sugerem como mais adequado à proliferação de bromélias o meio MS líquido estacionário (MLE) acrescido de reguladores vegetais, visando promover o maior número de brotos regenerados, como no caso das seguintes bromeliáceas: *Aechmea blanchetiana* (SILVA, 2010); *Orthophytum grossiorum* (MANFIO et al., 2010); *Neoregelia cruenta*, *Tillandsia stricta*, *Vriesea gigantea*, *V. guttata* e *V. incurvata* (MENGARDA et al., 2009); *Vriesea reitzii* (RECH FILHO et al., 2008); *Ananas lucidus* (OLIVEIRA et al., 2007); abacaxizeiro (FEUSER et al., 2001); *Ananas porteanus* (BORGES et al., 2001). Resultados semelhantes foram observados no presente trabalho para *A. setigera*, com maior eficiência sob os parâmetros fitotécnicos de número de brotos e comprimento dos brotos.

Mendes et al. (2007), em seu trabalho com multiplicação *in vitro* de *Billbergia distachya*, obtiveram aumento significativo no número de brotações quando na presença de BAP, no entanto, na ausência desta citocinina, as taxas de multiplicação foram significativamente reduzidas. Em estudos com *Dyckia maritima* (SILVA et al.,

2008), *Neoglaziovia variegata* (SILVEIRA et al., 2009) e *Vriesea scalaris* (SILVA et al., 2009), a adição de BAP mostrou-se eficiente para a multiplicação *in vitro*.

Segundo Galvanese et al. (2007), plântulas de *Aechmea blanchetiana* estabelecidas *in vitro* por meio de sementes apresentaram maior número de brotos no meio MS líquido suplementado com BAP. Outro autor observou o mesmo no estudo de *Vriesea gigantea* (BENCKE; DROSTE, 2008). Pasqual et al. (2008), trabalhando com micropropagação de abacaxizeiro (Bromeliaceae), concluíram que é viável a multiplicação *in vitro* dessa espécie em meio líquido acrescido de BAP acima de 1,5 mg.L<sup>-1</sup>.

Com relação à altura dos brotos regenerados em MLE (Figura 6), os maiores valores foram observados na ausência e na menor concentração de BAP (0,5 mg.L<sup>-1</sup>). Nas concentrações acima de 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP os brotos foram menores e sem diferenças estatisticamente significativas. Com o uso de meio de cultura semissólido (MSS), a altura das brotações adventícias não apresentou diferenças estatisticamente significativas. Os melhores resultados para a altura das brotações regeneradas foram registrados com o uso de meio líquido estacionário (MLE), em todas as concentrações avaliadas.



**Figura 6** - Altura de brotos de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. em meio MS líquido estacionário, em diferentes concentrações de BAP, aos 60 dias. **A.**  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP. **B.**  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP. **C.**  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP. **D.**  $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP.

O maior contato dos explantes com meio pode aumentar a absorção de água e nutrientes, favorecendo a taxa de assimilação de nutrientes, altura e multiplicação de brotos e acúmulo de massa seca (PEREIRA; FORTES, 2003; CHEN; ZIV, 2001). Isso acontece nos cultivos em meio líquido, quando comparado ao meio semissólido.

Segundo Debiasi et al. (2002), a média proliferativa (número de brotos) e o tamanho dos brotos (altura dos brotos) *in vitro* são parâmetros inversamente proporcionais, ou seja, quanto maior o número de brotos formados em um explante, menor será o seu tamanho, o que pode explicar os ótimos resultados obtidos para o meio MS líquido estacionário nesse trabalho, sendo que o mesmo não ocorreu para o meio MS semissólido (Figura 7).



**Figura 7** - Altura de brotos de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. em meio MS semissólido, em diferentes concentrações de BAP, aos 60 dias. **A.**  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP. **B.**  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP. **C.**  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP. **D.**  $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP.

O uso do regulador de crescimento BAP promoveu, em todas as concentrações avaliadas, em ambos os meios de cultura, efeito inibidor na formação de raízes adventícias dos propágulos (brotos) utilizados como fonte de explante. Portanto, *A. setigera* apresenta balanço hormonal endógeno de auxinas suficiente para a indução de rizogênese, uma vez que respondeu positivamente, emitindo raízes na ausência do regulador de crescimento, fato este também verificado em *Orthophytum grossiorum* (MANFIO et al., 2010).

Neste trabalho, não foram observados sinais de hiperidricidade nos brotos formados e cultivados no meio MS líquido estacionário, em nenhuma das concentrações avaliadas. Essa é uma característica importante a ser avaliada, pois segundo Chen e Ziv (2001), apesar das vantagens da utilização de meios de cultura líquidos sobre os semissólidos, o meio líquido pode não ser adequado a determinadas

espécies, uma vez que pode induzir a hiperidricidade das brotações, o que não ocorreu no caso da espécie *A. setigera*.

#### 4.4 Enraizamento de brotos

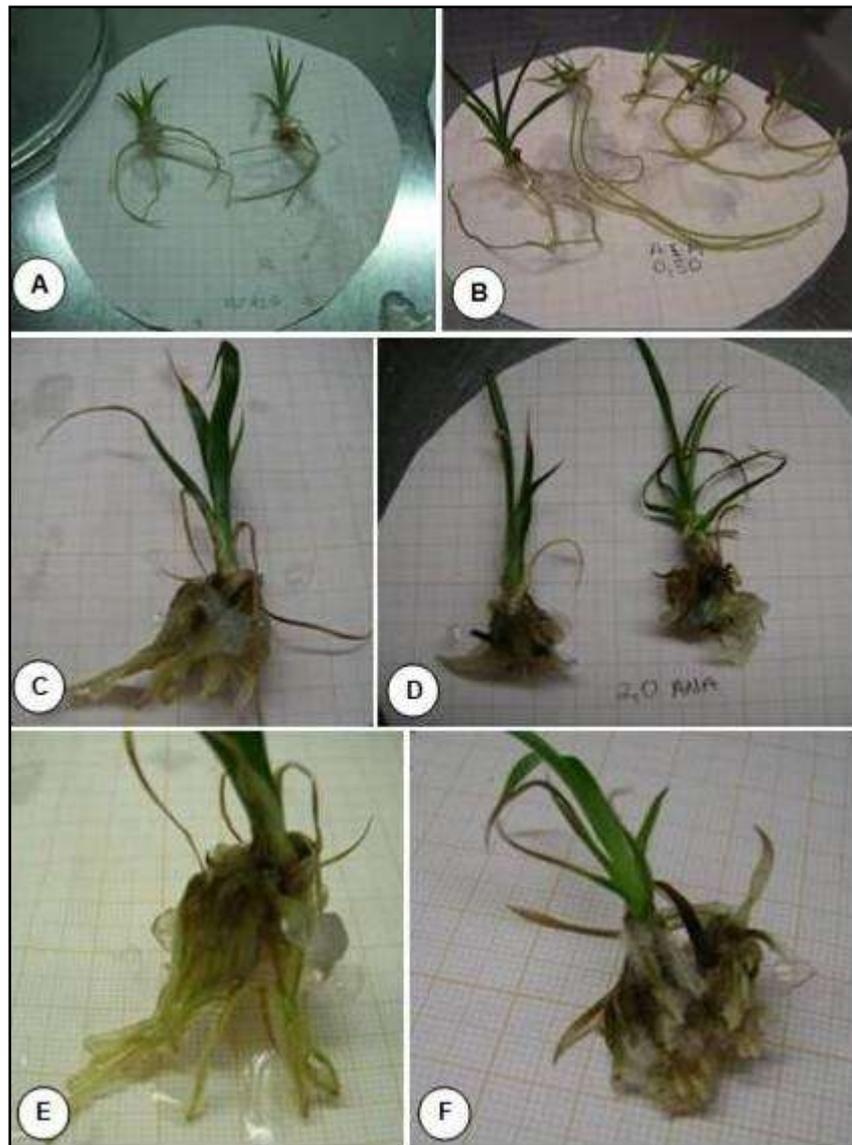
A formação de raízes adventícias *in vitro* ocorreu em todos os tratamentos com ou sem o uso das auxinas avaliadas (Tabela 6). Os percentuais de rizogênese foram elevados e independeram da concentração e do tipo de auxinas (AIA, AIB, ANA) utilizadas. Em todos os tratamentos não foi verificada a presença de calos (calogênese) na base do broto.

**Tabela 6** - Respostas fisiológicas do enraizamento *in vitro* de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. às diferentes concentrações e tipos de auxinas (AIA, AIB e ANA) adicionadas ao meio de cultura MS, após 60 dias. Embrapa Acre (2012).

| Conc. (mg.L <sup>-1</sup> ) | Percentual de enraizamento |     |     | Número de raízes |         |          | Comprimento da raiz |          |          |
|-----------------------------|----------------------------|-----|-----|------------------|---------|----------|---------------------|----------|----------|
|                             | AIA                        | AIB | ANA | AIA              | AIB     | ANA      | AIA                 | AIB      | ANA      |
| 0,00                        | 80                         | 90  | 100 | 3,75 aA          | 3,38 aB | 3,38 aB  | 13,78 aB            | 15,49 aB | 15,49 aA |
| 0,25                        | 90                         | 80  | 100 | 4,4 bA           | 2,35 bB | 7,35 aA  | 44,53 aA            | 53,48 aA | 25,99 bA |
| 0,50                        | 70                         | 90  | 100 | 2,66 bA          | 4,42 bA | 7,32 aA  | 45,32 aA            | 12,23 bB | 22,14 bA |
| 1,00                        | 60                         | 100 | 100 | 3,00 cA          | 5,90 bA | 8,85 aA  | 44,70 aA            | 54,64 aA | 14,07 bA |
| 2,00                        | 55                         | 90  | 100 | 2,97 cA          | 4,85 bA | 10,00 aA | 54,11 aA            | 54,65 aA | 13,45 bA |
| F                           | 0,92 ns                    |     |     | 4,24 **          |         |          | 5,66 **             |          |          |
| CV%                         | 21,6                       |     |     | 15,8             |         |          | 39,7                |          |          |

Nota: \*\*significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ); ns - não significativo ( $p \geq 0,05$ ). As médias seguidas pela mesma letra minúscula (comparadas na linha) e pela mesma letra maiúscula (comparadas na coluna) não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Auxinas: AIA - ácido indolacético; AIB - ácido indolbutírico; ANA - ácido naftalenoacético

O número de raízes formadas *in vitro* foi significativamente influenciado pelos tipos de reguladores de crescimento testados ( $p \leq 0,05$ ), bem como pela concentração. O uso de AIA em diferentes concentrações não influenciou no número de raízes regeneradas, inclusive na sua ausência. Com o uso de AIB, o maior número de raízes foi observado nas concentrações acima de 0,50 mg.L<sup>-1</sup>, e os menores na sua ausência e com 0,25 mg.L<sup>-1</sup>. A adição de ANA em diferentes concentrações não alterou o número de raízes regeneradas, entretanto, apresentou valores maiores do que na sua ausência (Figura 8).



**Figura 8** - Enraizamento *in vitro* de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. após 60 dias com o uso de diferentes auxinas **A.** 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de AIB **B.** 0,50 mg.L<sup>-1</sup> de AIA **C.** 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de ANA **D.** 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA. **E.** e **F.** Detalhe de brotos com raízes adventícias regeneradas em ANA.

Em todas as concentrações de AIA utilizadas, os valores do comprimento da raiz principal foram maiores e sem diferenças estatisticamente significativas entre si. O uso de ANA não alterou o comprimento das raízes regeneradas.

Durante o período observado na fase de enraizamento (60 dias), não foi verificada fitotoxicidade por parte de nenhuma das auxinas testadas. O uso de AIB tem sido amplamente empregado no enraizamento *in vitro* por não causar fitotoxicidade aos explantes e ser eficiente no enraizamento de muitas espécies (HARTMANN et al., 2002).

Lima (2009), ao estudar o efeito de concentrações de AIB em diferentes cultivares de abacaxi, verificou que para a porcentagem de enraizamento não foi observada interações significativas referentes ao enraizamento, corroborando os resultados deste trabalho.

Para as demais variáveis estudadas foram observadas interações significativas entre os fatores testados (auxinas x concentração), com exceção da variável porcentagem de enraizamento.

Os níveis de auxina são os fatores com maior influência no enraizamento quando se trabalha com espécies de plantas *in vitro*, embora outros componentes do meio de cultura sejam frequentemente alterados visando melhor promoção do enraizamento (KHAN et al., 2004). Porém, diversas espécies enraízam facilmente *in vitro* sob baixos níveis de auxina ou em meio básico sem reguladores de crescimento (ANDERSON, 1984).

Barboza et al. (2004), estudando explantes de abacaxizeiro observaram que os tratamentos sem reguladores de crescimento promoveram a rizogênese *in vitro* em 100% dos brotos produzidos em meio com ANA, corroboram os resultados obtidos neste trabalho para essa classe de auxina.

A partir deste estudo, pode-se inferir que o tamanho da parte aérea e a produção endógena de auxina pela planta são fatores que podem ter contribuído para o bom enraizamento *in vitro* das brotações. Contudo, os brotos cultivados em ANA apresentaram melhor desempenho na rizogênese *in vitro*, independentemente da presença ou ausência dessa auxina.

Para Grattapaglia e Machado (1998), a qualidade das partes aéreas provenientes da fase de multiplicação determina, em geral, o sucesso do enraizamento, pois as partes aéreas são as responsáveis pelas fontes de produção de auxina que, ao ser translocada para a base, estimula a rizogênese.

Neste trabalho não foi feito o uso de carvão ativado na fase de rizogênese, pois se sabe que para algumas espécies o seu uso reduz tanto a porcentagem de brotos enraizados como o número médio de raízes, como no enraizamento de brotos de abacaxizeiros (BORGES et al., 2001; NICOLOSO et al., 2001).

#### 4.5 Aclimatização de plântulas

As plantas regeneradas por micropropagação foram transferidas e aclimatizadas em casa de vegetação tecnológica (Figura 4), com taxa de sobrevivência de 90 % em todos os tipos de substrato avaliados. Na aclimatização de *Dyckia maritima* (Bromeliaceae), uma espécie epífita, a sobrevivência alcançou 90% das plântulas em casa de vegetação (SILVA et al., 2008). Valores elevados também foram encontrados para o presente estudo. Aranda-Franco e Rodriguez (2000), estudando a aclimatização de *Aechmea nudicaulis*, obtiveram 100% de sobrevivência para o substrato comercial (ARANDA-FRANCO, 2000).

Após 30 dias de aclimatização, a média da altura das plântulas foi maior nos tratamentos com o uso de substrato comercial (S3) e pó de serra + substrato comercial (S4), porém não ocorreu diferença estatística. Aos 60 dias de aclimatização, as plântulas com maior altura foram observadas com o uso de substrato comercial (S3) e com o uso de substrato comercial + vermiculita (S5), diferindo estatisticamente dos demais substratos testados. Após 90 dias de aclimatização, as maiores plântulas foram observadas com o uso de substrato comercial + vermiculita (S5), e as menores plântulas com o uso de vermiculita (S1), pó de serra (S2), pó de serra + vermiculita (S6) e pó de serra + substrato comercial + vermiculita (S7), apresentando diferença estatística (Tabela 6).

**Tabela 6:** Efeito de diferentes substratos na aclimatização de plântulas micropropagadas de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. cultivadas após 90 dias. Rio Branco, AC – EMBRAPA AC, 2012.

| Substratos                   | Altura das plântulas (cm) |         |         | Número de folhas |          |          |
|------------------------------|---------------------------|---------|---------|------------------|----------|----------|
|                              | 30 dias                   | 60 dias | 90 dias | 30 dias          | 60 dias  | 90 dias  |
| <b>Vermiculita (S1)</b>      | 8,15 ab                   | 8,21 c  | 8,32 d  | 7,43 a           | 7,48 b   | 7,49 cd  |
| <b>Pó de serra (S2)</b>      | 7,74 b                    | 8,81 bc | 9,12 cd | 6,74 a           | 7,61 b   | 7,83 bc  |
| <b>Subst. Comercial (S3)</b> | 9,92 a                    | 14,13 a | 17,72 b | 7,22 a           | 9,39 a   | 9,41 ab  |
| <b>PS+SC (S4)</b>            | 10,18 a                   | 10,82 b | 11,42 c | 7,00 a           | 7,57 b   | 8,00 bc  |
| <b>SC+VER (S5)</b>           | 9,03 ab                   | 16,07 a | 21,54 a | 7,00 a           | 10,48 a  | 10,61 a  |
| <b>PS+VER (S6)</b>           | 8,5 ab                    | 8,66 bc | 8,69 d  | 6,65 a           | 7,04 b   | 7,10 d   |
| <b>PS+SC+VER (S7)</b>        | 8,00 b                    | 8,10 c  | 8,23 d  | 6,91 a           | 7,09 b   | 7,39 cd  |
| <b>F</b>                     | 4,37**                    | 34,71** | 68,62** | 0,73 ns          | 21,71 ** | 16,05 ** |
| <b>CV%</b>                   | 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: ps+sc (pó de serra + 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).

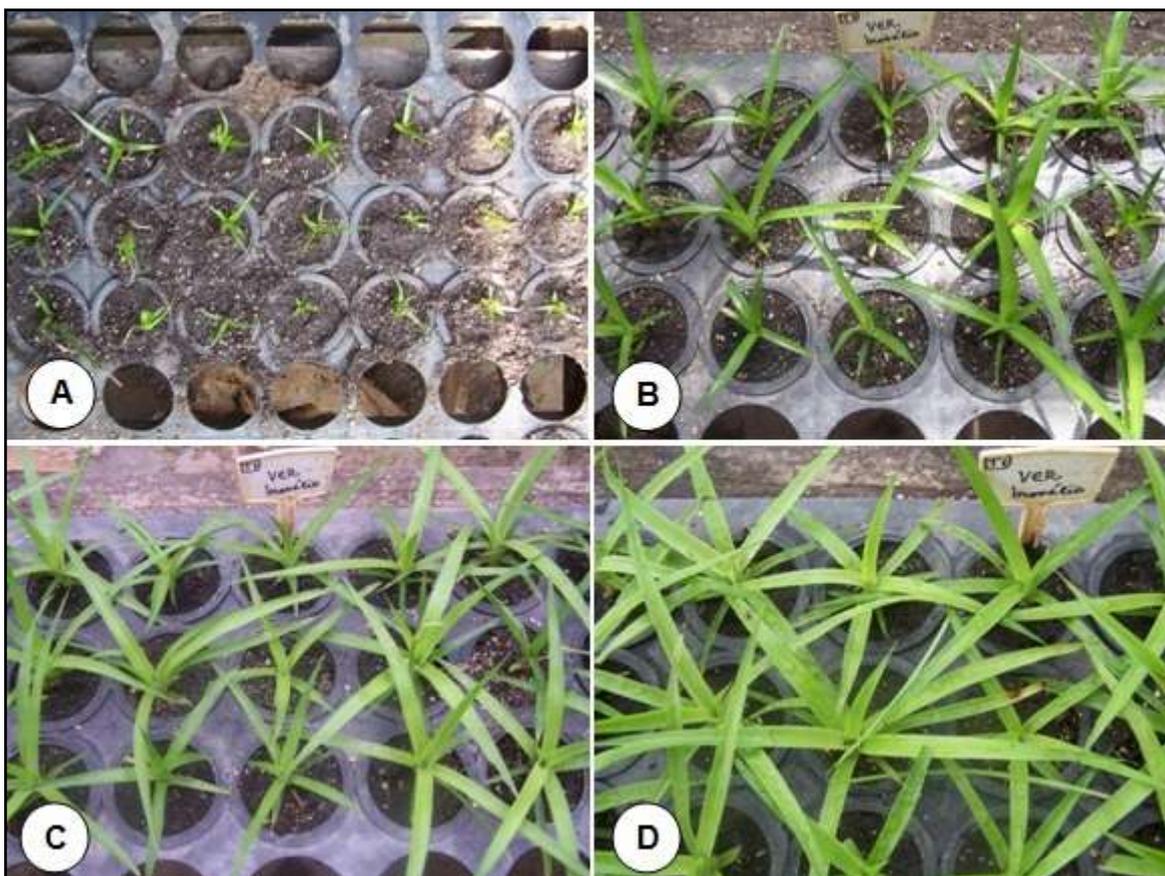
O número de folhas das plântulas micropropagadas após 30 dias, em diferentes tipos de substratos, não registraram diferenças estatisticamente significativas. Após 60 e 90 dias, o maior número de folhas desenvolvidas ocorreu com o uso de substrato comercial (S3) e substrato comercial + vermiculita (S5),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

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. No presente estudo com *A. setigera*, o uso de vermiculita associado com substrato comercial foi favorável ao crescimento das plântulas aclimatizadas.

De acordo com Cordell e Filler Jr. (1984), a vermiculita é um componente fundamental dos substratos, cuja finalidade básica é aumentar a capacidade de retenção de água. 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).

Moreira (2001) e Moreira et al. (2006), analisando o efeito do substrato em mudas micropropagadas, em fase de aclimatização, observaram que a adição de vermiculita ao substrato tem importância significativa no desenvolvimento das mudas.

A seleção do melhor substrato é baseada na recuperação do sistema radicular das plantas *ex vitro* para obter a retomada do crescimento das mudas (CALVETE et al., 2000). No trabalho de Lima (2009), a adição de vermiculita ao substrato promoveu 100% de sobrevivência das mudas de abacaxizeiro (bromeliaceae). Concordando com os dados obtidos nesse estudo, que mostram promissor, ao longo do tempo, a mistura com vermiculita para o desenvolvimento e qualidade das mudas de *A. setigera* (Figura 9).



**Figura 9** - Aclimatização de plântulas de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. cultivadas por 90 dias em diferentes substratos. **A.** início da instalação do experimento. **B.** 30 dias. **C.** 60 dias e **D.** 90 dias após a instalação do experimento. Rio Branco, AC – Embrapa Acre, 2012.

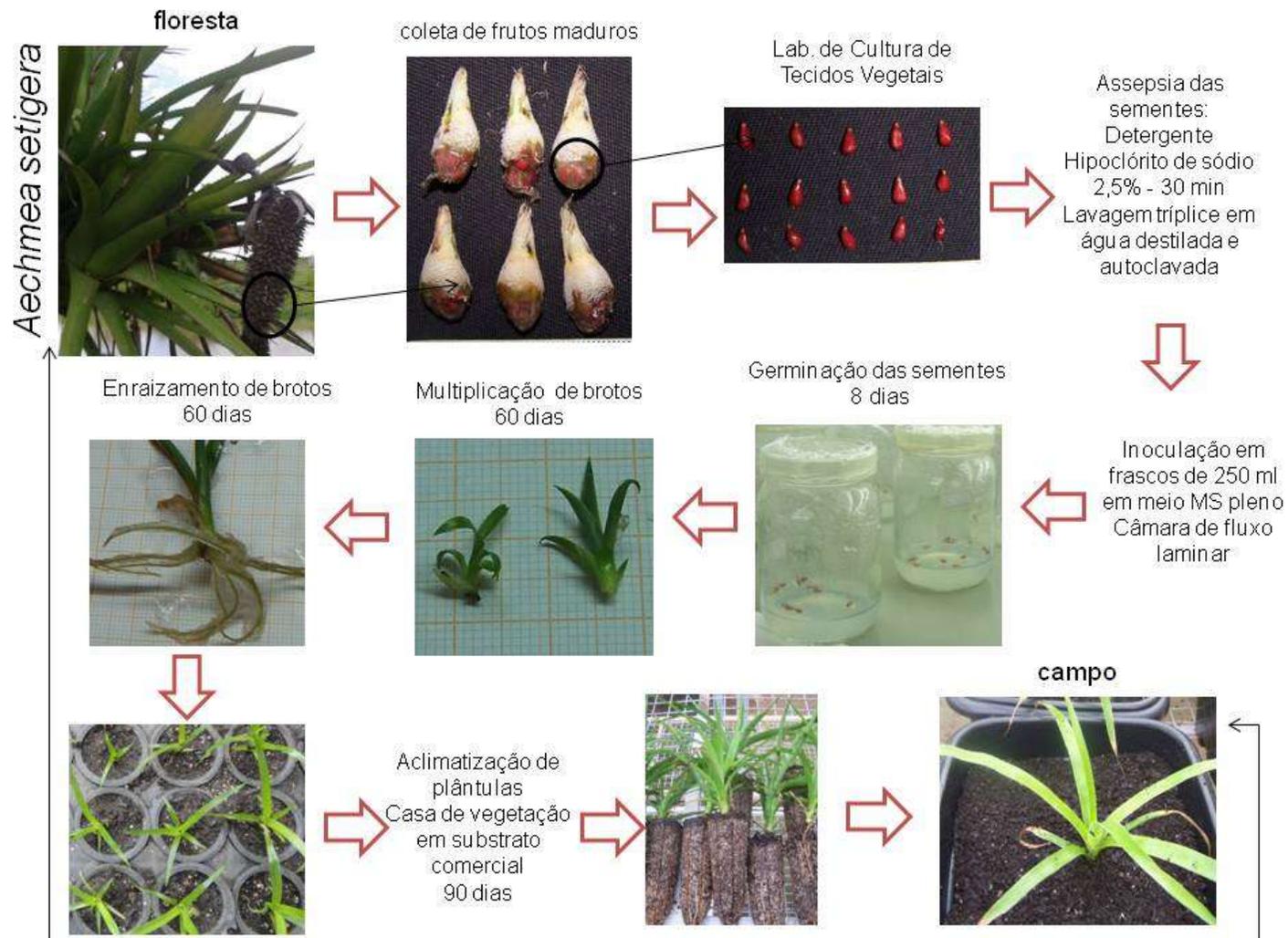
Vários trabalhos têm apontado o sucesso na fase de aclimatização de bromeliáceas com a utilização de diversos substratos, conforme metodologia utilizada nesse estudo, por exemplo, substrato comercial em *Dyckia maritima* (SILVA et. al., 2006); vermiculita em *Aechmea nudicaulis* (FRANCO e RODRIGUEZ, 2010).

As etapas de micropropagação estabelecidas nesse estudo indicam que a germinação *in vitro*, multiplicação de brotos, enraizamento *in vitro* e aclimatização de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. podem ser obtidas com sucesso. A aclimatização com elevado percentual de sobrevivência e crescimento das plântulas demonstra que a referida espécie tem rusticidade, podendo ser facilmente produzida em larga escala para fins de ornamentação, paisagismo e jardinagem (Figura 10).



**Figura 10** - Plântulas de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. após 90 dias transferidas para viveiro em substrato comercial. **A.** aspecto do torção das mudas tiradas do tubete. **B.** mudas em vasos de 3 litros. Rio Branco, AC – Embrapa Acre, 2012.

Os resultados obtidos nesse trabalho permitiram a elaboração de um protocolo de micropropagação (Figura 11). Inicialmente, os frutos são coletados e as sementes desinfetadas em solução comercial de hipoclorito de sódio (2,5%) por 30 min, seguida de tríplice lavagem com água destilada e autoclavada. Em câmara de fluxo laminar, as sementes são inoculadas em frascos de vidro contendo 30 mL de meio de cultura MS, os quais ficam expostos à luminosidade em sala de crescimento por 15 dias. Em seguida, brotos são individualizados e transferidos para meio de multiplicação (MS + 4,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP) por 60 dias. Após, os brotos multiplicados são individualizados e transferidos para meio de enraizamento (MS isento de regulador de crescimento) por 60 dias. Finalmente, as plântulas micropropagadas são retiradas dos frascos, lavadas em água corrente e transferidas para tubetes contendo substrato comercial e vermiculita na proporção de 1:1, e mantidas em casa de vegetação por 90 dias. Após, as plântulas podem ser colocadas em vasos e comercializadas.



**Figura 11** - Esquema de protocolo de micropropagação de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f., Rio Branco, Acre, 2013.

## 5 CONCLUSÃO

A germinação *in vitro* de sementes de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. em meio de cultura MS semissólido é elevada e ocorre a partir do oitavo dia na presença de luz.

Na multiplicação *in vitro* de brotos de *A. setigera* o meio de cultura líquido estacionário (MLE) apresenta melhores resultados do que o meio semissólido (MSS). A utilização de  $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP em MLE promove a formação do maior número de brotos.

O enraizamento *in vitro* de brotos de *A. setigera* é elevado e ocorre independente da utilização de reguladores de crescimento. O melhor tratamento para induzir a formação do maior número de raízes é o uso de  $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA. Os maiores comprimentos das raízes adventícias regeneradas ocorrem com o uso de AIA ( $0,25, 0,50, 1,0$  e  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e AIB ( $0,25, 1,0$  e  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

A aclimatização de plântulas de *A. setigera* pode ser obtida com facilidade e o substrato mais adequado é aquele composto por uma mistura de substrato comercial e vermiculita na proporção de 1:1.

A micropropagação de *A. setigera* para a produção de mudas pode ser obtida por meio de um rápido e eficiente protocolo.

## 6 PERSPECTIVAS

Estudos posteriores acerca da biologia reprodutiva, fenologia, morfologia e ecologia da espécie far-se-ão necessários para agregar ao conhecimento científico mais detalhes quanto ao uso e manejo desta espécie nativa de bromélia.

Trabalhos mais detalhados, utilizando outras técnicas de micropropagação, outros meios de cultura, redução de sais, dupla-fase, biorreatores e formação de culturas nodulares serão importantes e ao mesmo tempo desafiadores para que se possa entender o comportamento de *Aechmea setigera in vitro*. E também para a exploração do uso desse potencial recurso biológico da Amazônia.

## 7 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, C. C.; CAMARA, T. R.; MENEZES, M.; WILLADINO, L.; MEUNIER, I.; ULISSES, C. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de abacaxizeiro para limpeza clonal em relação à fusariose. *Scientia Agricola*, v.57, n.2, p.363-366, abr./jun. 2000.

ALVES, G. M.; VESCO, L. L. D.; GUERRA, M. P. Micropropagation of the Brazilian endemic bromeliad *Vriesea reitzii* through nodule clusters culture. *Scientia Horticulturae*, Mission, v. 110, p. 204-207, 2006.

ALVES, G. M., GUERRA, M. P. 2001. Micropropagation for mass propagation and conservation of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa* from microbuds. *Journal of the Bromeliad Society* 51(5): 202-212

AMARAL, L. Conservação *in vitro* de explantes de três cultivares híbridas de Amarílis. Dissertação apresentada ao Instituto agrônomo (IAC), na área de Melhoramento Genético Vegetal, como requisito parcial à obtenção do título de mestre. Campinas, 2005.

ANDERSON, W. C. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Alexandria, v. 109, p. 343-347, 1984.

ARANDA-FRANCO, A. N. Efeito de diferentes substratos na produção de mudas de gramas em bandejas. Piracicaba, 2000. 54 p. Dissertação. ESALQ, USP

ARANDA-FRANCO, A. N.; RODRIGUEZ, A. P. M. Aclimação da bromélia *Aechmea nudicaulis* em diferentes substratos. 200?. Disponível em: <<http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/Download/Biblioteca/flbt3001c.pdf>>. Acesso em 12 jun 2013.

ARANDA-PERES, A. N. Cultivo *in vitro* de bromélias da Mata Atlântica: micropropagação, avaliação nutricional e substrato para aclimação. 2005. 125f. (Tese Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2005.

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

ARANDA-PERES, A. N.; RODRIGUEZ, A. P. M. Bromeliads. In.: SILVA, J. A. T. da. (org.). *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*. 1ª Ed. London, UK: Global Science Books, v.4, pp. 644-655. 2006

BARBOZA, S. B. C.; CALDAS, L. S.; SOUZA, L. A. C. Micropropagação do híbrido PExSC-52 e da cultivar Smooth Cayenne de abacaxizeiro. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.39, n.8, p.725-733, 2004.

BELLINTANI, M. C.; LIMA, C. C.; BRITO, A. L.; SANTANA, J. R. F.; DORNELLES, A. L. C. Estabelecimento in vitro de *Orthophytum mucugense*, *Neoregelia mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina, Bahia - Brasil. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, p. 1101-1103, 2007.

BENCKE, M. DROSTE, A. Otimização da micropropagação de *Vriesea gigantea* Gaudich. (bromeliaceae), uma espécie ameaçada de extinção, nativa do rio grande do sul, brasil. pesquisas, botânica n° 59: 299-306 São Leopoldo: Instituto Anchieta de Pesquisas, 2008.

BENZING, D. H. Vascular epiphytes. Cambridge University Press, Cambridge. 370p. 1990.

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

BIASI, L. A. Avaliação do desenvolvimento inicial de porta- enxerto e de mudas de videira obtidos através de diferentes métodos de propagação. 1996. 177 f. Tese (Doutorado em Agronomia) Escola Superior de Agricultura de Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1996.

BORGES, N. S. S.; CORREIA, D.; LIMA, R. N. Multiplicação e enraizamento in vitro de brotos de abacaxi ornamental *Ananas porteanus* Hort Veirch ex c. Koch. Brasília: Embrapa, 2001. 5p. (Recomendação técnica, 25).

CALVETE, E. O.; KÄMPF, A. N.; DAUDT, R. Efeito do substrato na aclimatização ex vitro de morangueiro cv. campinas, fragaria x ananassa Duch. In: KÄMPF, A. N.; CHEN, J.; ZIV, M. The effect of ancymidol on hyperhydricity, regeneration, starch and antioxidant enzymatic activities in liquid-culture Narcissus. Plant Cell Reports, v. 20, n. 1, p. 22-27, 2000.

CAMILLO, J.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; VIEIRA, R. F.; PEIXOTO, J. R. Conservação in vitro de *Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrank) Pilger Cochlospermaceae sob regime de crescimento mínimo. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 11, p. 184-189, 2009.

CARNEIRO, L. A.; ARAÚJO, R. F. G.; BRITO, G. J. M.; FONSECA, M. H. P. B.; COSTA, A.; CROCOMO, O. J.; MANSUR, E. 1999. In vitro regeneration from leaf explants of *Neoregelia cruenta* (R. Graham) L.B. Smith, an endemic bromeliad from eastern Brazil. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, n. 55, p. 79-83.

CARNEIRO, J. G. de A. Produção e controle de qualidade de mudas florestais. Curitiba: Universidade Federal do Paraná (FUPEP); Campos: Universidade Estadual Fluminense, 1995. 451p.

CARVALHO, A. C. P. P.; PINHEIRO, M. V. M; DIAS, G. M. G; MORAIS, J. P. S. 2009. Multiplicação in vitro de abacaxi ornamental por estiolamento e regeneração de brotações. Horticultura Brasileira 27: 103-108. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/hb/v27n1/21.pdf>>. Acesso em: 02 de jul de 2013.

CARVALHO FILHO, J. L. S. et al. Produção de mudas de *Cassia grandis* L. em diferentes ambientes, recipientes e misturas de substratos. Revista Ceres, v.40, n.284, p.341-352, 2002.

CHEN, J.; ZIV, M. The effect of ancymidol on hyperhydricity, regeneration, starch and antioxidant enzymatic activities in liquid-culture Narcissus. Plant Cell Reports, v. 20, n. 1, p. 22-27, 2001.

CORDELL, C. E.; FILER JR, T. H. Integrated nursery pest management: Southern Pine Nursery Handbook. Atlanta: USDA/Forest Service/Southern Region. 1984.117 p.

CUNHA, G. A. P. Nova tecnologia para o controle da fusariose do abacaxizeiro. Cruz das Almas, BA: EMBRAPA, DEZ 2003.

DAL VESCO, L. Culturas nodulares e micropropagação de bromélias nativas da Mata Atlântica (*Billbergia zebrina* e *Vriesea reitzii*): Bases para a conservação e propagação massal. 100p. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2010.

DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. In vitro morphogenesis and adventitious shoot mass regeneration of *Vriesea reitzii* from nodular cultures. Scientia Horticulturae, v.125, pp. 748–755. 2010.

DAL VESCO, L. L.; STEFENON, V. M., WELTER, L. J.; SCHERER, R. F.; GUERRA, M. P. Induction and scale-up of *Billbergia zebrina* nodule cluster cultures: Implications for mass propagation, improvement and conservation. Scientia Horticulturae, v.128, pp. 515-522. 2011.

DALY, D.; SILVEIRA, M. Primeiro Catálogo da Flora do Acre, Brasil. Rio Branco, AC: EDUFAC, 555 p. 2008.

DAL VESCO, L. L.; PINTO, A. A.; ZAFFARI, G. R.; NODARI, R. O.; REIS, M. S.; GUERRA, M. P. 2001. Improving pineapple micropropagation protocol through explant size and medium composition manipulation. Fruits 56: 143-154.

DEBIASI, C. et al. Correlação entre a capacidade proliferativa in vitro e a dominância apical in vivo da bananeira cvs. grand naine e nanicão. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 24, n. 3, p. 597-600, 2002.

DROSTE, A.; SILVA MACHADO, A. da; MATOS, A. V.; ALMEIDA, J. W. In vitro culture of *Vriesea gigantea* and *Vriesea philippocoburgii*: two vulnerable Bromeliads native to southern Brazil. Brazilian Archives of Biology and Technology, Curitiba, v. 48, n. 5, p. 717-722, 2005.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Disponível em:<<http://www.embrapa.br>>. Acesso em: 15 jun. 2013.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W.; CHAVES, A. C. Enraizamento in vitro e aclimatização de mudas de marmeleiro cvs. MC e ADAMS, utilizadas como porta enxerto para pereira. Scientia Agraria, v.5, n.1-2, p.61-68, 2004.

FARIA, A. P. G. de; WENDT, T.; BROWN, G. K. 2004. Cladistic Relationships of *Aechmea* (Bromeliaceae, Bromelioideae) and allied genera. Ann. Missouri Bot. Gard. 91(2): 303-319.

FEARNSIDE, P. M. Desmatamento na Amazônia: dinâmica, impactos e controle. Acta Amazonica, 36 (3): 395-400, 2006.

FEUSER, S.; NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Eficiência comparativa dos sistemas de cultura estacionária e imersão temporária para a micropropagação do abacaxizeiro. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 23, n. 1, p. 6-10, 2001.

FLORA BRASILIENSIS. vol. III, part III, fasc. 112 coluna 327–328. Publicado em 15-Mai-1892. Acesso em 2 jun 2013. Disponível em: <[http://florabrasiliensis.cria.org.br/search?taxon\\_id=21355](http://florabrasiliensis.cria.org.br/search?taxon_id=21355)>

FRAGA, H. P. F.; SCHERER, R. F.; GARCIA, A. C.; VESCO L. L. D.; STEINMACHER, D. A. ; GUERRA, M. P. . Endogenous free polyamines levels of *Ananas comosus* var. *comosus* nodule cluster cultures using temporary immersion bioreactors.. In: 10th Internation Congress on Cell Biology, 2012, Rio de Janeiro. Anals of 10th Internation Congress on Cell Biology, 2012.

FRANCO, A. N. A.; RODRIGUEZ, A. P. M. Aclimatação da bromélia *Aechmea nudicaulis* em diferentes substratos. Piracicaba, SP. 2010.

GALVANESI, M. S.; TAVARES, A. R.; AGUIAR, F. F. A.; KANASHIRO, S.; CHU, E. P.; STANCATO, G. C.; HARDER, I. C. F. Efeito de ANA, 6-BA e ágar na propagação in vitro de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith, bromélia nativa da Mata Atlântica. Revista Ceres, Viçosa, v. 54, n. 311, p. 63-67. 2007.

GEORGE, E. F. Plant propagation by tissue culture. Part 2. Exegetic: Edington, 1993. 574p.

GEORGE, E. F. Plant propagation by tissue culture: In practice. 2 ed. Edington: Springer, 2008. 1361 p.

GIVNISH, T. J.; BARFUSS, M. H. J. Ee, B. V.; RIINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P. A.; JABAILY, R. S.; CRAYN, D. M.; SIMTH, J. A. C. et al (2011). Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *Am J Bot* 98 (5): 872-895

GOMES, J. M.; SILVA, A. R. Os substratos e sua influência na qualidade de mudas. In: BARBOSA, J. G.; MARTINEZ, H. E. P.; PEDROSA, M. W.; SEDIYAMA, M. A. N. Nutrição e adubação de plantas cultivadas em substratos. Viçosa: UFV, 2004, p. 190-225.

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. p. 309-350, 2000.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Ed.) Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: EMBRAPA-CNPQ/ ABCTP, 1990. p. 99-160.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA-CNPQ, 1998. v. 1, p. 183-260.

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, v.589, pp.47-66. 2010.

GUERRINI, I. A.; TRIGUEIRO, R. M. Atributos físicos e químicos de substratos compostos por biossólidos e casca de arroz carbonizada. *Revista Brasileira Ciências do Solo*, Viçosa, v. 28, n. 6, p.1069-1076, 2004.

HARTMANN, H. T. et al. Plant propagation: principles and practices. 7.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. 880p.

HOPKINS, W. G. Introduction to Plant Physiology. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1999. 512p.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip, and bud cultures. In: EVANS, D.A. (Eds.) Handbook of plant cell culture. New York: Macmillan, 1983, v.1, p.177-227.

KHAN, S.; NASIB, A.; SAEED, B. A. Employment of in vitro technology for large scale multiplication of pineapples (*Ananas comosus*). *Pakistan Journal of Botany*, v.36, n.3, p.611-615, 2004.

KOH, Y. C.; DAVIES, F. T. J. 2001. Mutagenesis and in vitro culture of *Tillandsia fasciculata* Swartz var. fasciculata (Bromeliaceae). *Scientia Horticulturae*, v. 87, p. 225-240.

KOH, Y. C.; DAVIES, F. T. J. 1997. Micropropagation of *Cryptanthus* with leaf explants with attached intercalary meristems excised from greenhouse stock plants. *Scientia Horticulture*, v. 70, p. 301-307.

LIMA, R. L. S. de; SEVERINO, L. S.; SILVA, M. I. de L.; JERÔNIMO, J. F.; VALE, L. S. do; BELTRÃO, N. E. de M. Substratos para produção de mudas de mamoneira compostos por misturas de cinco fontes de matéria orgânica. *Ciência agrotec*, Lavras, v. 30, n. 3, p. 474-479, maio/jun. 2006.

LIMA, E. da C. A. Propagação clonal in vitro de abacaxizeiros em sistema dupla-fase e conservação de germoplasma sob regime de crescimento mínimo. 2009. 82f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrônômica - Produção Vegetal) – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Acre, Rio Branco – Acre, 2009.

LUTHER, H. E. An alphabetic list of Bromeliad Binomials. The Marie Selby Botanical Gardens. 11<sup>a</sup> Ed. Sarasota, Florida: Bromeliad Society International, 114p. 2008.

LUTHER, H. E. 2004. An Alphabetical list of bromeliad binomes. The Bromeliad Society Inc. Oregon. 109pp.

MACÊDO, C. E. C. Concentrações de ANA e BAP na micropropagação de abacaxizeiro *L. Merrill* (*Ananas comosus*) e no cultivo hidropônico das plântulas obtidas in vitro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.25, n.3, p.501-504, 2003.

MANFIO, C. E.; MOTOIKE, S. Y.; PAULA, C. C.; MAGNO, S. V.; MELO, C. G. Early selection of elite clones of an ornamental bromeliad in vitro. *Ciência Rural*, v.40, n.7, jul, 2010. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/cr/v40n7/a660cr3117.pdf>>, acessado em: 25 jan 2013.

MAPES, O. M. Tissue culture of bromeliads. *International Plant Propagators Society Combined Proceedings*, v. 23, p. 47-55, 1973.

MARTINELLI, G. The Bromeliads of the Atlantic Forest. *Scientific American* 282: 86- 93. 2000.

MARTINELLI, G.; VIEIRA C. M; GONZALES M; LEITIMAN P; PIRATININGA A; COSTA, A. F, FORZZA; R. C. (2008) Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. *Rodriguésia* 59: 209-258.

MATHEWS, V. H.; RANGAN, T. S. Multiple plantlets in lateral bud and leaf explant in vitro culture of pineapple. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 11, n. 4, p. 519-528, 1979.

MENDES, G. C. et al. Multiplicação in vitro de explantes de *Billbergia distachia* (Vellozo) MEZ (Bromeliaceae). Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 972-974, 2007.

MENGARDA, L. H. G.; POVOAS, L.; DEBIASI, C.; PESCADOR, R. Estado físico do meio de cultura na propagação in vitro de Bromeliaceae. Scientia Agrária, v.10, n.6, p. 469-474, 2009.

MEKERS, O. 1977. In vitro propagation of some Tillandsioideae (Bromeliaceae). Acta Horticulturae, v. 78, p. 311-317.

MELO, N. F. DE ;OKASAKI, W. Y.; LEITE, C. B.; FÁRI, M. Estabelecimento do cultivo in vitro da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.). Ciênc. e Agrotec., Lavras, v.23, n.1,p-102-107, jan./mar;. 1999.

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, Porto Alegre, v. 5, p. 972-974, jul. 2007.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. 1997. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In: BAJAJ, Y. P. S. (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 40. Berlin: Springer Verlag, pp. 43-57.

MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. 1992. In vitro multiplication of *Vriesea fosteriana*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 30, p. 247-249.

MOLLO, L.; MARTINS, M. C. M.; OLIVEIRA, V. F.; NIEVOLA, C. C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C. Effects of low temperature on growth and non-structural carbohydrates of the imperial bromeliad *Alcantarea imperialis* cultured in vitro. Plant Cell Tissue and Organ Culture: published on line 1 July 2011.

MOREIRA, M. A. Produção e aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro: *Ananas comosus*(L) Merrill cv. Pérola. 2001. 81 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

MOREIRA, M. A.; CARVALHO, J. G.; PASQUAL, M.; FRÁGUAS, C. B.; SILVA, A. B. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 30, n. 5, p. 875-879, set./out. 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.

NARA, A. K.; WEBBER, A. C. Biologia floral e polinização de *Aechmea beeriana* (Bromeliaceae) em vegetação de baixo da Amazônia Central. Acta Amazonica 32 (4): 571-588. 2002.

NICOLOSO, F. T. et al. Micropropagação do Ginseng Brasileiro. *Pfaffia glomerada* (Spreng.) Pedersen. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, v.3, n.2, p.11-18, 2001.

NORMAH, M. N.; NOR-AZZA, A. B.; ALLIUDIN, R. Factors affecting in vitro shoot proliferation and ex vitro establishment of mangosteen. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Dordrecht, v. 43, n. 3, p. 291-294, Dec. 1995.

OLIVEIRA, M. K. T. et al. Propagação in vitro da cultura do abacaxizeiro ornamental (*Ananas lucidus* Miller). Caatinga, v. 20, n. 3, p. 167-171, 2007.

PASQUAL, M. et al. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. Horticultura Brasileira, Brasília, DF, v. 26, n. 1, p. 45-49, 2008.

PEDROSO, A. N. V.; LAZARINI, R. A. M.; TAMAKI, V.; NIEVOLA, C. C. *In vitro* culture at low temperature and *ex vitro* acclimatization of *Vriesea inflata* an ornamental bromeliad. Revista Brasileira de Botânica 33 (3): 407-414. 2010.

PEREIRA et al, 2000. Desenvolvimento de protocolos para micropropagação de espécies de bromeliaceae.

PEREIRA, F. D.; BRAGA, M. F.; SÁ, M. E. L.; ALCINO, O. A. G.; COLENGHI, I. C. 2001. Influência de BAP e NAA na multiplicação de abacaxi cv. Perolera a partir de brotos estiolados in vitro. BioScience Journal, v. 17, n. 2, p. 46-60.

PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 38, n. 9, p. 1035-1043, 2003.

PESCADOR, R.; KOLLER, O. C. 1992. Propagação "in vitro" do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill) cv. Pérola. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 14, n. 2, p. 1-4.

PIERIK, R. L. M. The influence of naphthaleneacetic acid on the growth of in vitro cultivated seedlings of Bromeliaceae. Scientia Horticulturae, New York, v.24, n.2, p.193-199, 1984.

POMPELLI, M. F.; GUERRA, M. P. 2005. Micropropagation enables the mass propagation and conservation of *Dyckia distachya* Hassler. Crop Breeding and Applied Biotechnology, v. 5, p. 117-124.

POMPELLI, M. F.; PINTO, T. H.; GUERRA, M. P. Micropropagação de *Dyckia distachya* L. B. Smith: uma bromélia ameaçada de extinção. In: VIII CONGRESSO

BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL. 8, Ilhéus. Resumos... 1 CD-ROM. Seção Artigos, 2001.

POMPELLI, M. F. GUERRA, M. P. *Ex situ* conservation of *Dyckia distachya*: an endangered bromeliad from South Brazil. Crop Breed. Applied Biotech., V.4, p.273-279, 2004.

POPINIGIS, F. Fisiologia da semente. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289 p.

PORTELA, I. P.; COSTA, L. C. ; NASCIMENTO, D. C.; VELEDA, F. B.; MOREIRA, R. M.; TONEL, F. R. Efeito de diferentes concentrações de benzilaminopurina (bap) na multiplicação in vitro de morangueiro (fragaria x ananassa Duch) cv. Oso grande. XVII Congresso de Iniciação Científica UFPEL 2008

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMANN, R. H. (Ed.). Micropropagation: technology and application. Dordrecht: Kluwer, 1990. p. 71-93.

RAUH, W. Bromeliads for home, gardens and greenhouses. London: Blandford, 1979.

READ, P. E.; FELLMAN, C. D. Accelerating acclimation of in vitro propagated woody ornamentals. Acta Horticulturae, Wageningen, n. 166, p. 15-20, 1985.

RECH FILHO, A. Biorreatores de imersão temporária e unidades encapsuláveis como ferramentas na consolidação de protocolos de micropropagação de bromélias. 2004. 87p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RECH FILHO, A.; DAL VESCO, L. L.; NODARI, R. O.; LISCHKA, R. W.; MULLER, C. V. GUERRA, M. P. 2005. 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 and Conservation 14: 1799–1808.

RECH FILHO, A.; DAL VESCO, L. L.; GUERRA, M. P. Adventitious shoots from nodule cluster cultures of *Vriesea reitzii*: an endemic and endangered bromeliad from Atlantic forest. Ciência Rural, v. 39, n. 3, p. 909-912, 2008.

REITZ, R. Bromeliáceas e a malária – bromélia endêmica. (Flora Ilustrada Catarinense série 983) Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 559 p. 1983.

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. 816pp. 1999.

ROCHA, M. A. C. da; COSTA, M. A. P. C.; SILVA, S. A.; LEDO, C. A. S.; MOREIRA, M. J. S.; LUCIMÁRIO PEREIRA BASTOS, L. P. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). Revista Brasileira de Fruticultura. 2008, vol.30, n.3, p. 769-774.

RODRIGUES, T. M.; PAIVA, P. D. O.; PAIVA, R.; PASQUAL, M. Assepsia de sementes de bromélia imperial para cultivo *in vitro*. In: Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 1., Lavras. Anais... Lavras: ABCTP, p. 251. 2003.

ROSA, S. S. Propagação e conservação *in vitro* de bromélias do gênero *Aechmea* de valor ornamental. 2010. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana, 2010. 86 f.

SANTOS, O. S. N.; SOUZA, F. V. D.; SOUZA, E. H. Germinação *in vitro* de sementes de *Aechmea* sp. In: Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 16 Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos de Plantas, 3 Simpósio de Plantas Ornamentais Nativa, 2007, Goiânia. Revista Brasileira de Horticultura, Goiânia, v. 13, p. 1585-1588, 2007.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E.; ARARUNA, E. C.; SILVA, T. L.; MESQUITA, A. G. G.; MACIEL, S. A.; COSTA, F. H. Double-phase culture system for large scale production of pineapple. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Print), v. 109, p. 263-269, 2012.

SILVA, E. E. Frutíferas nativas do nordeste: qualidade fisiológica, morfologia e citogenética. 2006. 110 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) pelo Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba: CCA/UFPB, Areia, PB, 2006.

SILVA, S. M. G. Reguladores vegetais no desenvolvimento *in vitro* de reguladores vegetais no desenvolvimento *in vitro* de reguladores vegetais no desenvolvimento *in vitro* de bromélia (*Aechmea blanchetiana*). dissertação de mestrado. UNESP. Botucatu, SP. 2010 p. 47.

SILVA, A. L. L.; FRANCO, E. T. H.; WALTER, J. M.; BISOGNIN, D. A.; CALGAROTO, N. S. Aclimatização de clones de *Dyckia maritima* em diferentes substratos – Bromeliaceae. R. Bras. Agrocência, Pelotas, v. 12, n. 4, p.495-498, outubro, 2006.

SILVA, A. L. L. da; FRANCO, E. T. H.; DORNELLES, E. B.; GESING, J. P. A. Micropropagação de *Dyckia maritima* Baker – Bromeliaceae. Heringia, Série Botânica, Porto Alegre, v. 63, n. 1, p. 135-138, 2008. Disponível em: <<http://www.fzb.rs.gov.br/publicacoes/iheringia-botanica/lh63-1-p135-138.pdf>>. Acesso em: 10 de jun 2013.

SILVA, A. L. L.; FRANCO, E. T. H.; DORNELLES, E. B.; REICHERT, C. L.; QUOIRIN, M. *In vitro* multiplication of *Vriesea scalaris* E. Morren (Bromeliaceae). Iheringia. Série Botânica, v. 64, p. 151-155, 2009.

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 52 (4): 923-932. 2009.

SMITH, L.B. 1934. Geographical evidences on the lines of evolution in the Bromeliaceae. Botanischer Jahrbuch 66: 446-468.

SMITH, L. B. The Bromeliaceae of Brazil. Smithsonian Miscellaneous Collection, 126 (1): 144-157. 2005.

SMITH, L. B.; DOWNS, R.J. 1979. *Bromelioideae (Bromeliaceae)*. Flora Neotropica Monograph 14 (3)., Hafner Press. p. 1493-2141.

SCHERER, R. F.; GARCIA, A. C.; STEINMACHER, D. A.; GUERRA, M. P. Morfogênese e histodiferenciação de culturas nodulares *in vitro* de abacaxizeiro em diferentes sistemas de cultivo. In: XVIII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2011, Buzios - RJ. Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, 2011.

SOUSA, G. M.; WANDERLEY, M. G. L. *Aechmea rodriguesiana* (L.B.Sm.) L.B.Sm. (Bromeliaceae) uma espécie endêmica da Amazônia brasileira. Acta Amazonica 37 (4): 517- 520. 2007.

SOUZA, B. M.; KRAUS, J. E.; ENDRES, L.; MERCIER, H. Relationships between endogenous hormonal level and axillary bud development of *Ananas comosus* nodal segments. Plant Physiology and Biochemistry, v. 41, p.733-739. 2003.

SOUZA, F. V. D.; SOUZA, A. da S.; SANTOS-SEREJO, J. A. S.; SOUZA, E. H.; JUNGHANS, T. G.; SILVA, M. J. Micropropagação de abacaxizeiro e outras bromélias. In: JUNGHANS, T. G; SOUZA, A. da S. (Eds.). Aspectos práticos da micropropagação de plantas. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. p. 177-205. 2009.

STEHMANN, J. R.; FORZZA, R.C.; SALINO, A.; SOBRAL, M.; COSTA, D. P.; KAMINO, L.H.Y. 2009. Floresta Atlântica: riqueza, endemismo e conservação. Diversidade taxonômica na Mata Atlântica. In: Stehmann, J.R.; Forzza, R.C.; Salino, A.; Sobral, M.; Costa, D.P. & Kamino, L.H.Y (eds.). Plantas da Floresta Atlântica. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Pp 3-12.

SUTTER, E. G.; HUTZELL, M. Use of humidity tents and antitranspirants in the acclimatization to tissue-cultured plants to the greenhouse. Scientia Horticulturae, Amsterdam, v. 23, n. 4, p. 303-312, 1984.

TAMAKI, V., MERCIER, H., NIEVOLA, C.C. 2007. Cultivo in vitro de clones de Ananas comosus (L.) Merrill cultivar Smooth Cayene em diferentes concentrações de macronutrientes. Hoehnea 34 (1): 67-73.

TAVARES, A. R.; GIAMPAOLI, P.; KANASHIRO, S., AGUIAR, F. F. A.; CHU, E. P. 2008. Efeito da adubação foliar com KNO<sub>3</sub> na aclimatização de bromélia cultivada in vitro. Horticultura Brasileira 26: 175-179

TERAO, D.; CARVALHO, A. C. P; BARROSO, T. C. S. F. Flores tropicais. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 225p.

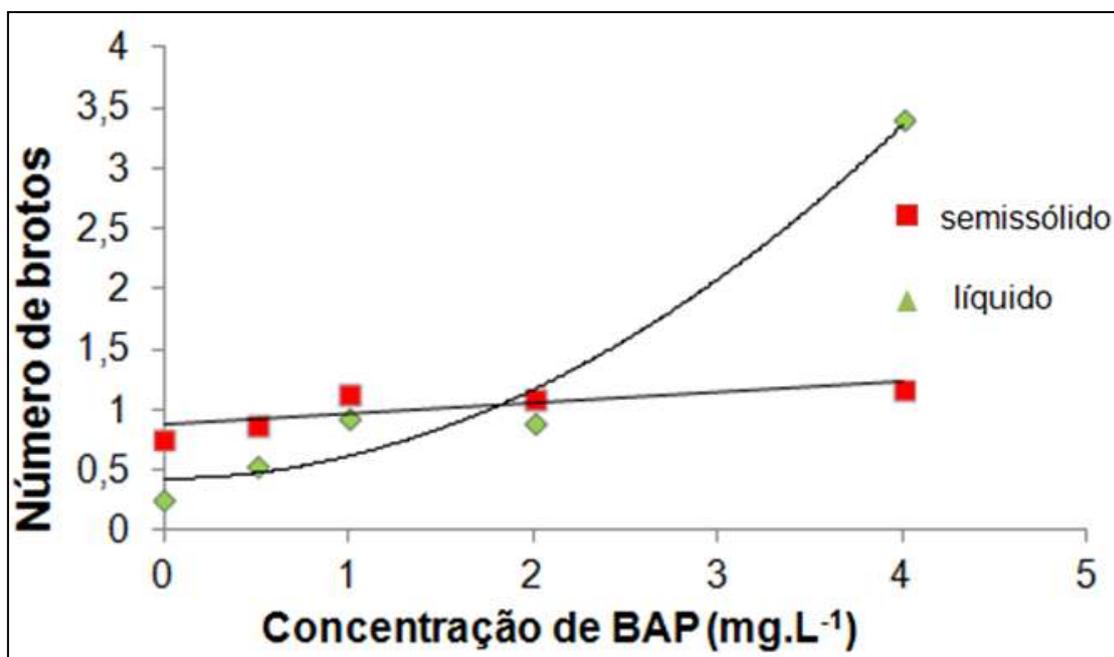
TENG, W. L. An alternative propagation method of Ananas through nodule culture. Plant Cell Reports, Heidelberg, v.16, p.454-457, 1997.

TOMBOLATO, A. F. C; COSTA, A. M. M. Micropropagação de plantas ornamentais. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. (Boletim Técnico 174).

ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation of woody plants: post tissue culture aspects. Acta Horticulturae, Wageningen, n. 227, p. 489-499, 1988.

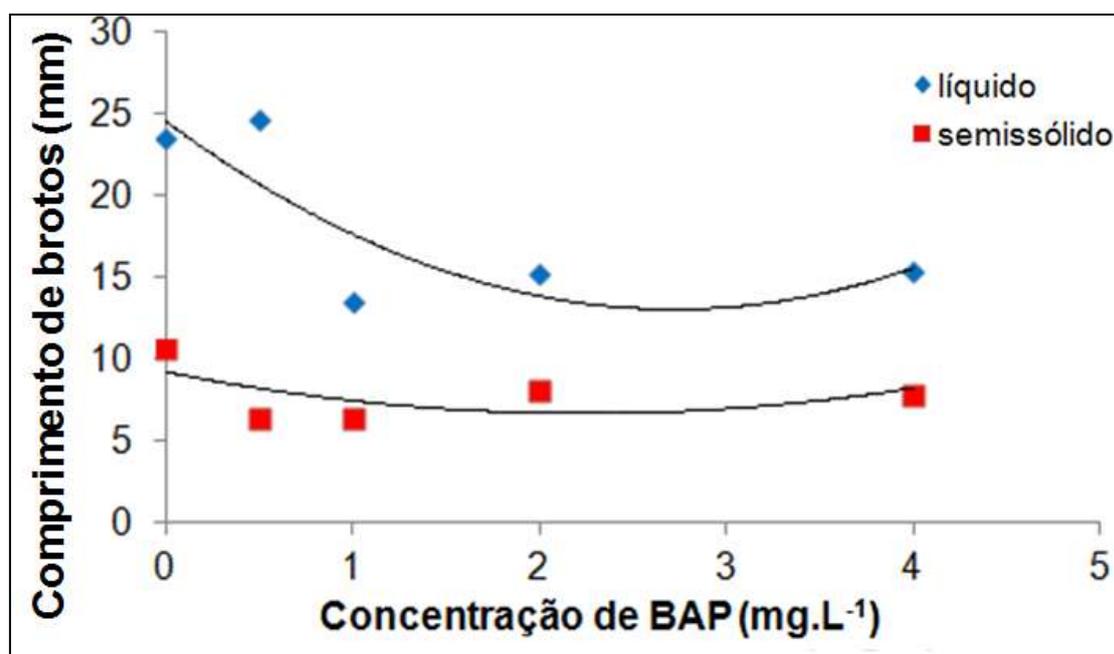
**8 ANEXO**

**Anexo A** - Número de brotos na multiplicação *in vitro* em meio de cultivo líquido e semissólido sob o efeito de benzilaminopurina



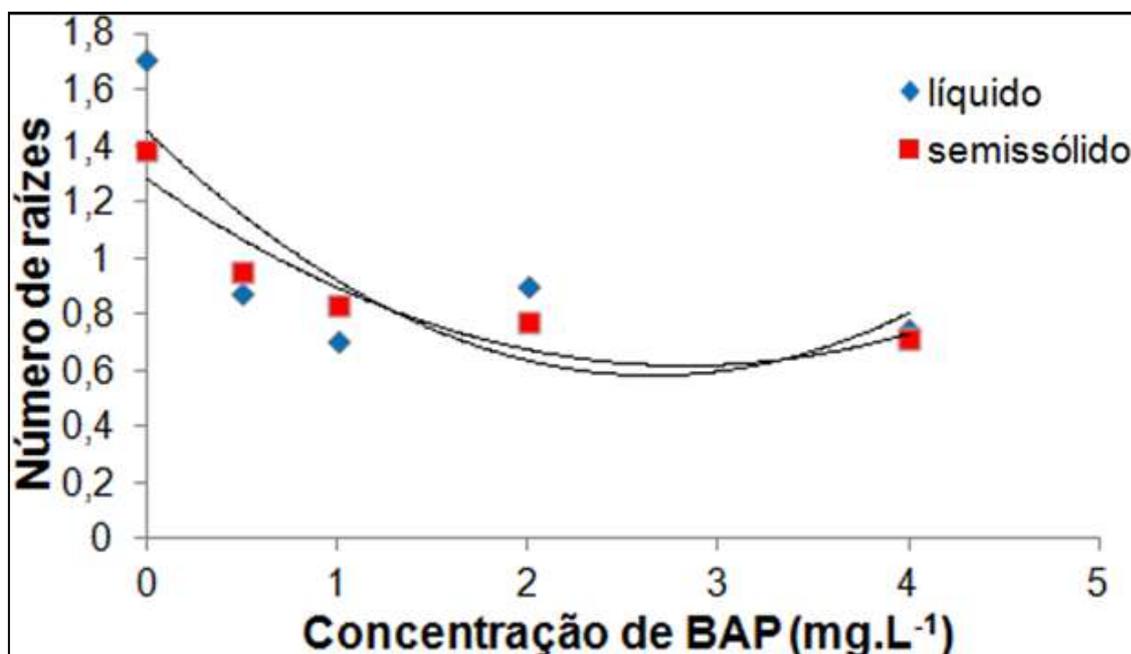
Meio líquido:  $y = 0,087x + 0,8855$  ( $R^2 = 0,5844$ ); Meio semissólido:  $y = 0,1819x^2 + 0,0045x + 0,426$  ( $R^2 = 0,9684$ )

**Anexo B** - Comprimento de brotos na multiplicação *in vitro* em meio de cultivo líquido e semissólido sob o efeito de benzilaminopurina



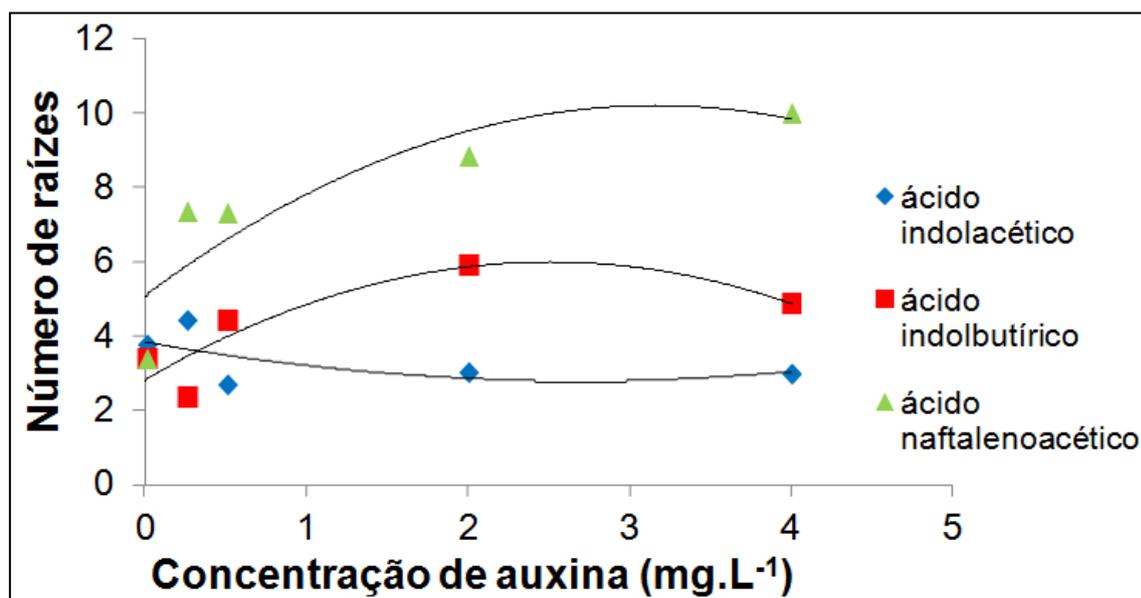
Meio líquido:  $y = 1,5546x^2 - 8,4719x + 24,589$  ( $R^2 = 0,6736$ ); Meio semissólido:  $y = 0,5048x^2 - 2,2697x + 9,2292$  ( $R^2 = 0,3008$ )

### Anexo C - Multiplicação de brotos *in vitro* em meio de cultivo líquido e semissólido sob o efeito de benzilaminopurina



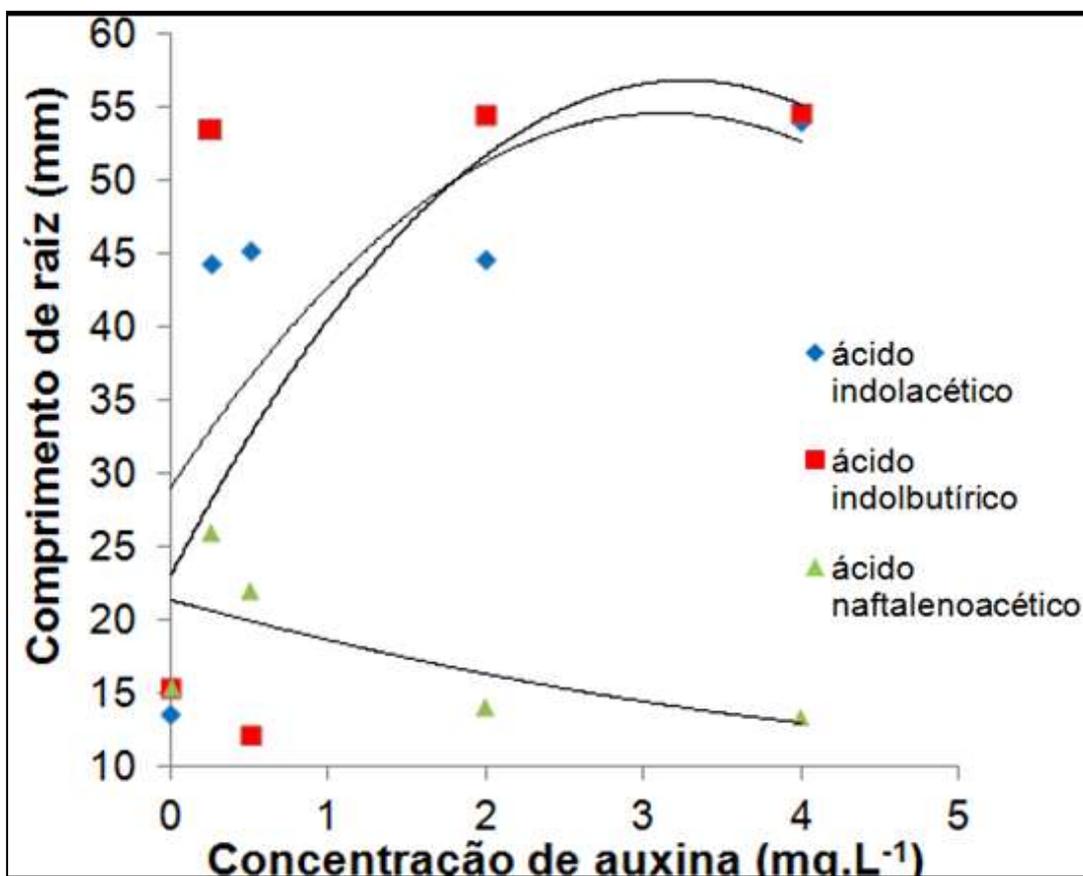
Meio líquido:  $y = 0,1234x^2 - 0,6559x + 1,4515$  ( $R^2 = 0,61$ ); Meio semissólido:  $y = 0,0831x^2 - 0,4704x + 1,2803$  ( $R^2 = 0,87$ )

### Anexo D - Efeito de diferentes auxinas na regeneração *in vitro* de raízes



Ácido naftalenoacético:  $y = -0,1031x^2 + 0,6329x + 2,3242$  ( $R^2 = 0,71$ ); Ácido indolacético:  $y = 0,1497x^2 - 0,8069x + 3,8372$  ( $R^2 = 0,37$ ); Ácido indolbutírico:  $y = -0,504x^2 + 2,5287x + 2,8138$  ( $R^2 = 0,78$ )

Anexo E - Efeito de diferentes auxinas no comprimento de raízes *in vitro*



Ácido naftalenoacético:  $y = 0,2127x^2 - 2,9501x + 21,347$  ( $R^2 = 0,4054$ ); Ácido indolacético:  $y = -3,1525x^2 + 20,641x + 23,04$  ( $R^2 = 0,4254$ ); Ácido indolbutírico:  $y = -2,602x^2 + 16,312x + 29,037$  ( $R^2 = 0,4887$ )