

## Micropropagação de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f.: uma bromélia endêmica da Amazônia Ocidental

João Ricardo Avelino Leão<sup>1</sup>, Janaina de Medeiros Vasconcelos<sup>1</sup>, Renata Teixeira Beltrão<sup>2</sup>, Andrea Raposo<sup>2</sup> e Paulo Cesar Poeta Fermino Junior<sup>3\*</sup>

1. Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Universidade Federal do Acre, Campus Universitário, BR-364, Km 04, Distrito Industrial, CEP: 69.920-900. Rio Branco, AC, Brasil. E-mail: ricardo.rivanello@gmail.com, janamv\_88@hotmail.com

2. Embrapa Acre, Rodovia BR-364, Km 14, CEP: 69.908-970. Rio Branco, AC, Brasil. E-mail: renata.beltrao@embrapa.br, andrea.raposo@embrapa.br

3. Universidade Federal do Acre, Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Campus Universitário, BR-364, Km 04, Distrito Industrial, CEP: 69.920-900. Rio Branco, AC, Brasil. Autor para correspondência, E-mail: paulofermino@ufac.br

**RESUMO:** As bromélias da Amazônia são em geral pouco conhecidas. *Aechmea setigera* é uma bromélia endêmica da Amazônia com potencial ornamental. O objetivo do trabalho foi avaliar as respostas fisiológicas sob efeito de reguladores de crescimento nas etapas da micropropagação, bem como, estabelecer um protocolo como subsídio para a conservação. Plântulas germinadas e desenvolvidas *in vitro* foram inoculadas em meio de cultura MS líquidas estacionário acrescidas de 6-benzilaminopurina (BAP) em diferentes concentrações (0; 2,2; 4,4; 8,8 e 17,6  $\mu\text{M}$ ). Para o enraizamento, microbrotos foram transferidos para meio de cultura MS com 0; 2,4; 4,9; 9,8  $\mu\text{M}$  de ácido indolacético (AIA) e ácido indolbutírico (AIB). Após cinco subcultivos, o uso de 17,6  $\mu\text{M}$  de BAP apresentou o maior número e o menor comprimento de brotações adventícias. Os teores de amido foram menores nos brotos induzidos com as menores concentrações de BAP. O uso de ácido indolbutírico nas concentrações de 4,9 e 9,8  $\mu\text{M}$  promoveram o maior número de raízes adventícias regeneradas. Plantas jovens regeneradas foram aclimatizadas (99 %) utilizando substrato comercial em ambiente com 50 % de sombreamento. A micropropagação de *A. setigera* é uma estratégia viável para a produção de mudas e a conservação da espécie.

**Palavras-chave:** Bromeliaceae, propagação *in vitro*, teores de amido, Amazônia Ocidental.

### Micropropagation of *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f.: a endemic bromeliad from Western Amazon

**ABSTRACT:** Bromeliads in the Amazon are generally unfamiliar. *Aechmea setigera* is endemic bromeliad from Amazon with ornamental potential. The objective of this work was to evaluate the physiological responses under the effect of growth regulators on the steps of micropropagation as well as establish a protocol as support for conservation. Seedlings germinated and grown *in vitro* were inoculated in MS liquid stationary culture, plus 6-benzylaminopurine (BAP) in different concentrations (0, 2.2, 4.4, 8.8 and 17.6  $\mu\text{M}$ ). For rooting, microshoots were transferred to MS medium with 0, 2.4, 4.9, 9.8  $\mu\text{M}$  indole acetic acid (IAA) and indole butyric acid (IBA). After five subcultures, the use of 17.6  $\mu\text{M}$  BAP showed the highest number and shorter length of adventitious shoots. The starch content was lower in shoots induced with lower concentrations of BAP. The use of indole butyric acid at concentrations 4.9 and 9.8  $\mu\text{M}$  promotes the highest number of regenerated adventitious roots. Regenerated plantlets were acclimatized (99 %) using commercial substrate in environment with 50% shading. *A. setigera* micropropagation is a viable strategy for plantlets production and species conservation.

**Keywords:** Bromeliaceae, *in vitro* propagation, starch contents, Western Amazon.

### 1. Introdução

A Floresta Amazônica está entre os biomas brasileiros com a maior biodiversidade (FEARNSIDE, 2006), apresentando cerca de 30.000 espécies de plantas ou 30% de todas as espécies de plantas da América do Sul (CONDÉ; TONINI, 2013). Nas florestas tropicais, a diversidade de epífitas compreende aproximadamente um terço das plantas vasculares, as quais são representadas principalmente por Orchidaceae e Bromeliaceae (BENZING, 1990). De acordo com Martinelli e Moraes (2013), a família Bromeliaceae contém o maior número de espécies com interesse para a conservação.

A família Bromeliaceae compreende 58 gêneros em 3172 espécies e subespécies (GIVNISH et al., 2011). As espécies de bromélias na Amazônia em geral são pouco

conhecidas e podem ser consideradas como ameaçadas de extinção como consequência do desmatamento (QUARESMA; JARDIM, 2012). De acordo com Smith (1955) existem 64 espécies em 14 gêneros em toda a região amazônica. *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. possui hábito epifítico ou terrestre, com distribuição em geral no Panamá, Colômbia, Venezuela, Guiana e Amazônia Ocidental do Brasil, entre 70 a 550 m de altitude (RIBEIRO et al., 1999). Apresentam folhas grandes, verdes intensas e suculentas, com espinhos nas margens (FLORA BRASILIENSIS, 1982), e por sua beleza apresentam potencial ornamental. O gênero *Aechmea* Ruiz & Pav. está entre os quinze gêneros de plantas de maior interesse para estudos de conservação (MARTINELLI; MORAES, 2013).

As atividades humanas realizadas nos ambientes

naturais tem resultado em impactos e riscos para as espécies de plantas, incluindo as espécies de Bromeliaceae (HARDING et al., 2013). A propagação sexuada de bromélias geralmente apresenta limitações devido ao longo período de maturação ou mesmo a baixa taxa de germinação em algumas espécies (FRÁGUAS et al., 2002). A germinação e a multiplicação *in vitro* de bromélias a partir de técnicas de cultura de tecidos vegetais são em geral muito superiores aos métodos convencionais de propagação (MERCIER; KERBAUY, 1995).

As técnicas *in vitro* têm sido amplamente utilizadas para a propagação e alternativa para minimizar a extração de um grande número de bromélias, as quais são raras ou ameaçadas de extinção (HUANG et al., 2011). Estudos com micropropagação e conservação *in vitro* de bromélias endêmicas da Amazônia são incipientes. O uso de sementes como fonte inicial de explante tem sido amplamente utilizado para a conservação e manutenção da variabilidade genética das espécies (RECH FILHO et al., 2005), principalmente em espécies onde o sistema de cultivo ainda não está estabelecido (SILVEIRA et al., 2009).

Os segmentos nodais obtidos de plantas *in vitro* constituem uma importante fonte de explante para a produção de clones (SANTOS et al., 2010). Nesse sentido, a possibilidade de usar explantes de plantas cultivadas *in vitro* reduz os problemas de contaminação no estabelecimento da cultura de tecidos (ALMEIDA et al., 2002). As citocininas, em especial 6-benzilaminopurina (BAP) são utilizadas em diferentes concentrações e combinações no intuito de facilitar o desenvolvimento das técnicas de micropropagação de plantas por induzir a organogênese (MALÁ et al., 2013). A combinação entre os reguladores de crescimento e o tipo de explante é definida de acordo com as respostas morfogênicas desejadas (AOYAMA; GONTIJO; FARIA et al., 2012), as quais são ativadas por complexas vias metabólicas. Os açúcares solúveis são os produtos primários do metabolismo da fotossíntese em plantas superiores e atuam na construção de macromoléculas fundamentais no desenvolvimento e crescimento do vegetal (BORIBOONKASET et al., 2013). O armazenamento de amido está relacionado aos mecanismos reprodutivos (BORIBOONKASET et al., 2013), os quais demandam grandes gastos energéticos, como a propagação *in vitro* uma estratégia assexuada.

A micropropagação de espécies de Bromeliaceae tem sido realizada com sucesso a partir de plântulas germinadas *in vitro* e microbrotos como explantes, como em *Vriesea reitzii* (RECH FILHO et al., 2005), com *Tillandsia eizii* (PICKENS; AFFOLTER; WETZSTEIN, 2003; PICKENS et al., 2006), *Orthophytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis* (BELLINTANI et al., 2007), e com *Aechmea blanchetiana* e *Aechmea distichantha* (SANTAROSA et al., 2013). A utilização de gemas axilares

(ALMEIDA, 2002; SILVA et al., 2004) ou segmentos nodais (KISS et al., 1995; MENDES et al., 2007) também tem sido eficiente.

O objetivo do trabalho foi avaliar as respostas fisiológicas sob efeito de reguladores de crescimento nas etapas da micropropagação, bem como, estabelecer um protocolo como subsídio para a conservação.

## 2. Material e Métodos

Frutos em estágio de maturação fisiológica de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. (Figura 1) foram coletados de plantas adultas em população natural na Estrada AC-90 km 10 a 10° 01' 16,9"S, e 67° 55' 26,6"W em Rio Branco/AC. Para a identificação da espécie, duplicatas de exsicatas foram enviadas para depósito no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (Herbário RB) sob número Rb550638.

As sementes foram removidas manualmente e desinfetadas durante 2 min em álcool 70 %, seguido de imersão por 25 min em solução de água sanitária comercial (2,0-2,5 % de cloro ativo) e adicionada uma gota de Tween 20 em cada 100 mL de solução. Em seguida, as sementes foram lavadas três vezes em água destilada e esterilizada, e inoculadas em frascos de vidro tipo conserva (340 mL), contendo 30 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com vitaminas de Morel (MOREL; WETMORE, 1951), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e geleificado com 6 g L<sup>-1</sup> de agar agar. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da esterilização por 15 min a 1,3 kgf cm<sup>-2</sup>.



**Figura 1.** *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. **A-** Indivíduos adultos em seu habitat natural sobre forófito (Arecaceae); **B-** Infrutescência madura; **C-** Frutos e sementes.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com 25 ± 2° C, intensidade luminosa de 60 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> obtidas com lâmpadas fluorescentes Sylvania® branca fria, com 16 h de fotoperíodo, com uma distância de 10-12 cm de altura das culturas. Após a germinação *in vitro*, as plântulas foram mantidas no escuro por dez dias para o estiolamento e individualização dos nós caulinares. Para a multiplicação de microbrotos, segmentos nodais apicais caulinares de aproximadamente 1,0 cm foram excisados e inoculados em frascos de vidro (340 mL) contendo meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) líquido estacionário, com vitaminas de Morel (MOREL; WETMORE, 1951), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, e suplementado com 0,0; 2,2; 4,4; 8,8

e 17,6  $\mu\text{M}$  de 6-benzilaminopurina (BAP). Foram realizados cinco subcultivos de 30 dias cada, e avaliados o número e comprimento de brotos (mm) regenerados.

Os teores de amido de folhas foram obtidos pelo método de extração de McCreedy et al. (1950). Os precipitados das amostras utilizadas para a extração de açúcares totais foram macerados em 1 mL de álcool etílico 80% aquecido a 50-60° C, para eliminação do conteúdo de açúcares solúveis totais ainda presentes nas amostras. Após centrifugação por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e a extração do amido foi iniciada a partir do precipitado. O precipitado foi macerado com 1 mL de ácido perclórico 30% e centrifugado a 10000 rpm, por 15 minutos. Alíquotas de 1 mL das amostras foram adicionadas em 2 mL de antrona 0,2%. Em seguida, as soluções foram agitadas e aquecidas em água fervente, por três minutos. Após resfriamento, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro, a 620 nm com três repetições. Como padrão foi utilizado glicose (Sigma® G-8270) diluída em ácido perclórico 30%. Os valores encontrados nas amostras foram multiplicados pelo fator 0,9 para a conversão em amido.

Brotos com aproximadamente 2,0 cm de comprimento, oriundos do experimento de multiplicação *in vitro* foram removidos e inoculados em meio de enraizamento, organizado em esquema fatorial 4 x 2 (concentrações x tipos de auxinas). Os brotos foram inoculados em frascos de vidro (250 mL) com meio de cultura MS, suplementados com sacarose (15 g L<sup>-1</sup>), solidificado com agar agar (6 g L<sup>-1</sup>), e com diferentes concentrações (0, 2,4; 4,9; 9,8  $\mu\text{M}$ ) de ácido indolbutírico (AIB) e ácido indolacético (AIA). As análises após 30 dias consistiram no número de raízes regeneradas, comprimento das raízes, e comprimento dos brotos (parte aérea).

Os experimentos foram organizados em delineamento completamente casualizado com seis repetições, sendo cada repetição composta por dois frascos contendo dez explantes cada. Para o número de brotos e número de raízes os dados foram transformados para  $(x+0,5)^{0,5}$ . Os dados dos experimentos foram submetidos à análise de variância e regressão polinomial ( $p \leq 0,05$ ) e as médias comparadas pelo teste Tukey ( $p = 0,05$ ) utilizando-se o programa computacional Assisat 7.7 beta (SILVA, 2013).

Para a aclimatização as plantas jovens regeneradas (com mais de 4,0 cm) foram retiradas dos frascos de vidro e transferidas para vasos plásticos (9 cm<sup>3</sup>) contendo substrato comercial Plantmax® Florestal em viveiro situado no campo experimental da Embrapa Acre. Os vasos estavam protegidos com coberturas de tela tipo Sombrite® modelo arco Pampeana com 50 % de sombreamento.

### 3. Resultados e Discussão

A regeneração de brotos de *A. setigera* a partir de gemas ocorreu em todas as concentrações de BAP, inclusive na sua ausência. Ao longo dos cinco subcultivos a média de número de brotos regenerados manteve-se sem diferenças estatisticamente significativas (Tabela 1), demonstrando estabilidade no potencial de propagação *in vitro*. Na literatura diversos trabalhos sugerem o meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) líquido estacionário (MLE) acrescido de reguladores de crescimento vegetal como adequado à proliferação *in vitro* de bromélias (RECH FILHO et al., 2005). O uso do meio de cultura líquido aumenta a multiplicação em relação ao meio semissólido por aumentar a superfície de contato dos explantes com o meio de cultura, ocasionando aumento na difusão, absorção e reposição de nutrientes *in vitro* (PULLMAN; SKRYABINA, 2007).

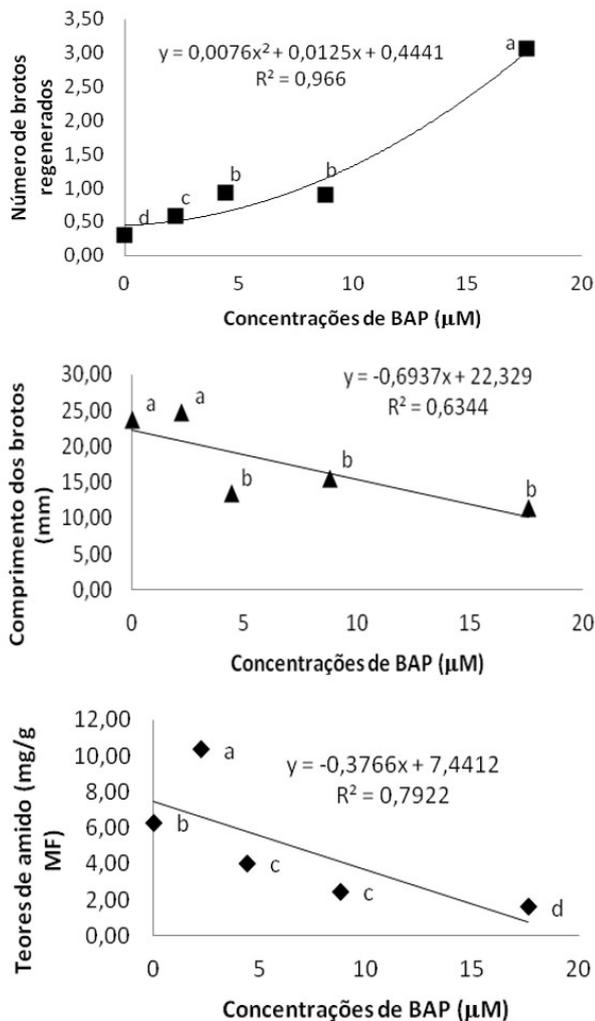
**Tabela 1.** Multiplicação *in vitro* de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. sob efeito de 6-benzilaminopurina (BAP) a partir de gemas ao longo de cinco subcultivos.

Concentrações de BAP ( $\mu\text{M}$ )	Número de brotos regenerados/subcultivo					F	Média
	1°	2°	3°	4°	5°		
0	0,27	0,28	0,32	0,29	0,31	0,70 <sup>ns</sup>	0,29
2,2	0,53	0,56	0,62	0,58	0,60	0,68 <sup>ns</sup>	0,58
4,4	0,93	0,90	0,92	0,96	0,91	0,71 <sup>ns</sup>	0,92
8,8	0,90	0,88	0,92	0,90	0,91	0,69 <sup>ns</sup>	0,90
17,6	3,40	3,10	3,00	2,90	2,88	0,72 <sup>ns</sup>	3,06

Nota: <sup>ns</sup> não significativo ( $P \leq 0,05$ ).

O uso exógeno de BAP aumentou a regeneração de brotos, sendo que o tratamento com o maior número de brotos regenerados foi observado com 17,6  $\mu\text{M}$  (Figura 2). O ajuste da equação quadrática da análise de regressão polinomial para o número de brotos regenerados indica que existe aumento do número de brotos regenerados devido ao aumento da concentração de BAP. 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, corroborando com os resultados do presente estudo. Em estudos com *Dyckia maritima* (SILVA et al., 2004), *Neoglaziovia variegata* (SILVEIRA et al., 2009) e *Vriesea scalaris* (SILVA et al., 2009), a adição de BAP também mostrou-se eficiente para a multiplicação *in vitro*.



**Figura 2.** Respostas fisiológicas do número de brotos regenerados, do comprimento dos brotos e dos teores de amido em folhas de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. sob efeito 6-benzilaminopurina (BAP). Letras minúsculas representam diferenças entre as concentrações de BAP, de acordo com o teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

As citocininas são hormônios vegetais relacionados com diversos processos no ciclo de vida, tais como a proliferação e crescimento de brotações (MÜLLER; SHEEN, 2007). De acordo com Sakakibara (2006), as citocininas apresentam receptores celulares que podem variar entre as espécies vegetais, o que conferem especificidades na interação citocinina-receptor. Ainda conforme o mesmo autor, o reconhecimento molecular das citocininas envolve as modificações das cadeias laterais ligadas à adenina. Nesse sentido, o uso exógeno da citocinina BAP em *A. setigera* possibilita a interação citocinina-receptor, e na medida em que as concentrações se elevam, as respostas morfogênicas de proliferação de brotos se intensificam.

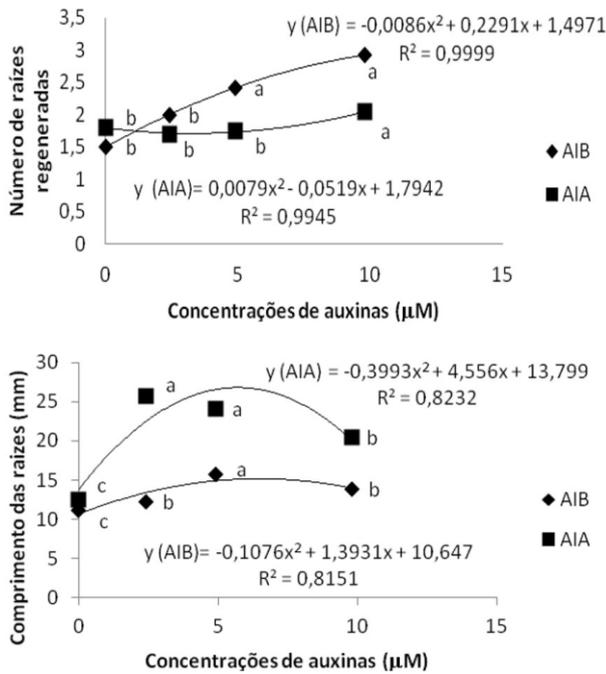
Em *A. setigera* não foram observadas características de hiperidricidade nos brotos formados e cultivado no meio MS líquido estacionário, em nenhuma das concentrações avaliadas. Essa é uma característica importante a ser avaliada, pois segundo Chen e Ziv (2001), apesar das vantagens da utilização de 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 ajuste da equação linear de análise de regressão polinomial para o comprimento dos brotos (Figura 2) indicou que os comprimentos dos brotos diminuem devido ao aumento das concentrações de BAP. Segundo Debiasi et al. (2002), a média proliferativa (número de brotos) e o tamanho dos brotos (comprimento 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. Tais resultados estão relacionados à estratégia de balanço energético da espécie *A. setigera*, uma vez que em maiores concentrações de fitorregulador o investimento metabólico está na formação do maior número de brotos em detrimento do comprimento dos mesmos.

A análise dos teores de amido em folhas de microbrotos regenerados *in vitro* revelou que os maiores teores ( $10,35 \pm 2,5$  mg/g MF) foram registrados com o uso de  $2,2 \mu\text{M}$  de BAP e os menores teores ( $2,46 \pm 0,2$  e  $1,61 \pm 0,4$  mg/g MF, respectivamente) de amido com o uso de  $8,8$  e  $17,6 \mu\text{M}$  de BAP (Figura 2). O armazenamento de amido está relacionado aos mecanismos reprodutivos (BORIBOONKASET et al., 2013) sexuados ou assexuados, os quais demandam grandes gastos energéticos. A propagação *in vitro* de brotos de *A. setigera* com o uso de diferentes concentrações de BAP evidenciou que os menores teores de amido relacionam-se com as maiores taxas de multiplicação nas concentrações acima de  $4,4 \mu\text{M}$  de BAP. De acordo com Li et al. (2013), os níveis de carboidratos solúveis totais e de amido refletem o balanço entre o ganho de carbono (fotossíntese) e a perda (crescimento e manutenção da respiração) no corpo do vegetal. Nesse sentido, em *A. setigera* com o uso de concentrações acima de  $4,4 \mu\text{M}$  de BAP, os microbrotos regenerados exibem intensa atividade de crescimento e desenvolvimento, evidenciados por menores teores de armazenamento de amido.

No enraizamento *in vitro* de microbrotos de *A. setigera*, a formação de raízes adventícias ocorreu em todos os tratamentos, inclusive na ausência de reguladores de crescimento exógeno (Figura 3). A adição de AIA na concentração de  $4,9 \mu\text{M}$  promoveu a formação do maior número de raízes, e com a adição de AIB os maiores números foram registrados com  $4,9$  e  $9,8 \mu\text{M}$ . O ajuste da equação quadrática de análise de regressão polinomial para o número de raízes (Figura 3) indicou que o número de raízes aumenta devido ao aumento das concentrações de auxinas AIB e AIA. Para *Vriesea scalaris*, a ausência de regulador exógeno também induz rizogênese, porém o uso de AIB não promoveu o aumento do número de raízes regeneradas (SILVA et al., 2009). No enraizamento *in vitro* de abacaxizeiros multiplicados *in vitro* sob sistema dupla-fase de cultivo, o uso de AIB é desnecessário para aumentar o número de raízes (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012).



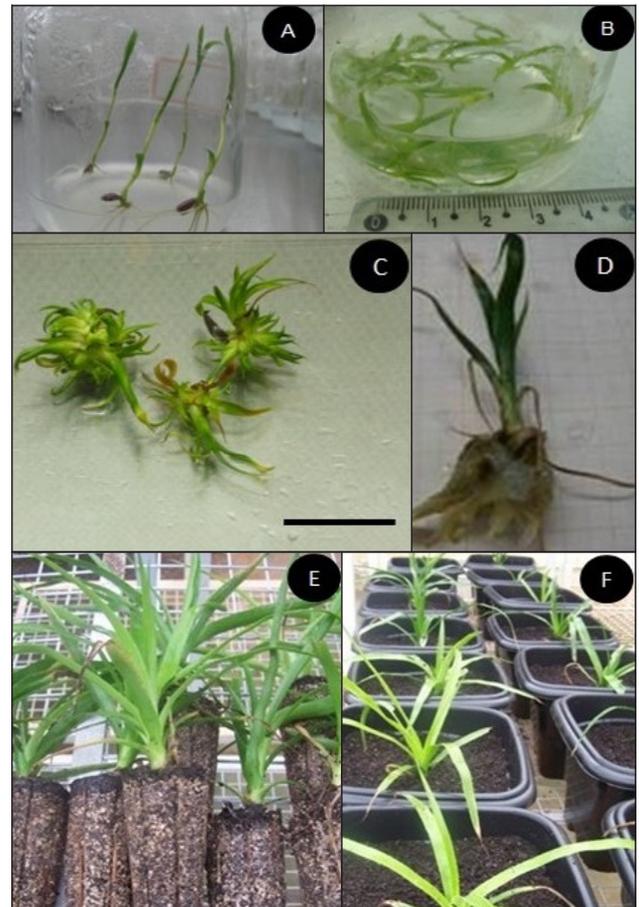
**Figura 3.** Respostas fisiológicas do número e comprimento de raízes de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. sob efeito das auxinas ácido indolacético (AIA) e ácido indolbutírico (AIB). Letras minúsculas representam diferenças entre as concentrações de cada tipo de auxina, de acordo com o teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

O comprimento das raízes adventícias foi maior com o uso de 2,4 e 4,9 µM de AIA e com 4,9 µM de AIB (Figura 3). O ajuste da equação quadrática de análise de regressão polinomial para o comprimento das raízes (Figura 3) indicou que o comprimento das raízes aumenta devido ao aumento das concentrações de auxinas AIB e AIA até 4,9 µM, sendo as concentrações acima deste valor inibitórias. Lima et al. (2012) verificaram que o AIB nas concentrações até 2,2 µM não favoreceram a rizogênese *in vitro* da bromélia *Orthophytum mucugensis*, e o aumento da sua concentração teve efeito negativo sobre o comprimento das raízes, reduzindo-as significativamente de tamanho, semelhante aos obtidos no presente estudo.

As plantas jovens regeneradas de *A. setigera* foram aclimatizadas e após 90 dias (Figura 4E e F) o percentual de sobrevivência foi de 99%. As plantas regeneradas *in vitro* não apresentaram características de má formação da parte aérea e radicular. O elevado percentual de sobrevivência na aclimatização de *A. setigera* demonstra viabilidade da micropropagação. Nos estudos de micropropagação de *Cryptanthus sinuosus*, a aclimatização possibilitou a sobrevivência de 98%, também com tela de 50% de corte de luz (ARRABAL et al., 2002), semelhante aos resultados obtidos no presente estudo. Na aclimatização de *Dyckia distachya* o percentual de sobrevivência foi de 93% em casa de vegetação (POMPELLI; GUERRA, 2005).

Os protocolos de micropropagação devem ser ajustados para cada espécie, conforme Mercier e Kerbauy (1997), uma vez que cada espécie apresenta um balanço endógeno hormonal, bem como, cada espécie apresenta diferentes especificidades na

interação regulador e receptor. De acordo com Silveira et al. (2009), a eficiência de um protocolo de micropropagação de uma espécie ou variedade depende das respostas fisiológicas em todas as etapas do processo.



**Figura 4.** Micropropagação de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. **A.** Plântulas germinadas *in vitro*; **B.** Segmentos nodais em meio de cultura líquido estacionário; **C.** Brotações múltiplas induzidas com BAP; **D.** Microbroto enraizado *in vitro*; **E-F.** Plantas jovens micropropagadas e aclimatizadas em viveiro com tela de sombrite a 50% de luminosidade. Barra = 2 cm.

#### 4. Conclusão

As maiores taxas de multiplicação *in vitro* foram observadas com o uso de meio MS suplementado com 17,6 µM de BAP. Os menores teores de amido foram quantificados nas maiores concentrações de BAP. No enraizamento *in vitro*, o uso de AIB na concentração de 4,9 µM é mais adequado por promover o maior número de raízes adventícias regeneradas. A aclimatização ocorre com elevada sobrevivência em casa de vegetação utilizando-se substrato comercial Plantmax® Florestal, em sombrite com 50% de sombreamento. A micropropagação de *A. setigera* consiste numa estratégia biotecnológica viável para a conservação desse recurso genético.

#### 5. Agradecimentos

À Capes pela concessão de bolsas de mestrado. Ao CNPq pelo auxílio financeiro. À Embrapa Acre pela realização dos experimentos.

## 6. Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, A.B.W.; SANTANA, G.S.; PINHEIRO, M.R.; COSTA, M.A.P.C. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.24, p. 296-300, 2002.
- AOYAMA, E.M.; GONTIJO, A.B.P.L.; FARIA, D.V. Propagação em bromeliaceae: Germinação de sementes e cultivo *in vitro*. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer*, v.8, p. 1452-1471, 2012.
- ARRABAL, R.; AMANCIO, F.; CARNEIRO, L. A.; NEVES, L. J.; MANSUR, E. Micropropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (L. B. Smith) for *in vitro* preservation. *Biodiversity and Conservation*, v.11, p.1081-1089, 2002.
- BELLINTANI, M.C.; LIMA, C.C.; BRITO, A.L.; SANTANA, J.R.F.; DORNELLES, A.L.C. Estabelecimento *in vitro* de *Orthopytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina. *Revista Brasileira de Biociências*, v.5, p.1101-1103, 2007.
- BENZING, D. H. *Vascular epiphytes*. Cambridge University Press, Cambridge, 370p.1990.
- BORIBOONKASET, T.; THEERAWITAYA, C.; YAMADA, N.; PICHAKUM, A.; SUPAIBULWATANA, K.; CHA-UM, S.; TAKABE, T.; KIRDMANEE, C. Regulation of some carbohydrate metabolism-related genes, starch and soluble sugar contents, photosynthetic activities and yield attributes of two contrasting rice genotypes subjected to salt stress. *Protoplasma*, v.250, p.1157-1167, 2013.
- 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.
- CONDÉ, T.M.; TONINI, H. Fitossociologia de uma Floresta Ombrofila Densa na Amazônia Setentrional, Roraima, Brasil. *Acta Amazonica*, v.43, p. 247-260, 2013.
- DEBIASI, C.; ZAFFARI, G.R.; SALERNO, A.R.; GUERRA, M.P. Correlação entre a capacidade proliferativa *in vitro* e a dominância apical *in vivo* da bananeira cvs. Grand naina e nanicão. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.24, n.3, p.597-600, 2002.
- FEARNSIDE, P. M. Desmatamento na Amazônia: dinâmica, impactos e controle. *Acta Amazonica*, v.36, p. 395-400, 2006.
- FLORA BRASILIENSIS. vol. III, Part III, Fasc. 112 Coluna 327 - 328 Publicado em 15-Mai-1982. Disponível em: <[http://florabrasiliensis.cria.org.br/search?taxon\\_id=21355](http://florabrasiliensis.cria.org.br/search?taxon_id=21355)>. Acesso em: 02 jun. 2013. 1982.
- FRÁGUAS, C.B.; PASQUAL, M.; DUTRA, L. F.; CHAGAS, E. A. Desenvolvimento '*in vitro*' de plântulas de bromélia: sacarose e concentrações do meio MS. *Revista Científica Rural*, v.7, n.2, 55-63, 2002.
- GIVNISH, T. J.; BARFUSS, M. H. J.; RIINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P. A.; JABAILY, R. S.; CRAYN, D. M.; SIMTH, J. A. C. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany*, v.98, p. 872-895, 2011.
- HARDING, K.; BENSON, E.E.; NUNES, E.C.; PILATTI, F.K.; VIANA, A.M. Can Biospecimen Science Expedite the *Ex Situ* Conservation of Plants in Megadiverse Countries? A Focus on the Flora of Brazil. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.32, p. 411-444, 2013.
- HUANG, P. L.; LIAO, L. J.; TSAI, C. C.; LIU, Z.H.. Micropropagation of bromeliad *Aechmea fasciata* via floral organ segments and effects of acclimatization on plantlet growth. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.105, p. 73-78, 2011.
- KISS, E.; KISS, J.; GYULAI, G.; HESZKY, L.E. A novel method for rapid micropropagation of pineapple. *HortScience*, v.30, p. 127-129, 1995.
- LI, M.; CHERUBINI, P.; DOBBERTIN, M.; AREND, M.; XIAO, W.; RIGLING, A. Responses of leaf nitrogen and mobile carbohydrates in different *Quercus* species/provenances to moderate climate changes. *Plant Biology*, v.15, p.177-184, 2013.
- LIMA, C.O. DE. C.; MARCHI, M.N.G.; LIMA-BRITO, A.; CARNEIRO, C.E.; BELLINTANI, M.C.; SANTANA, J.R.F. DE. Organogênese direta de *Orthopytum mucugense*. *Ciência Rural*, v.42, p. 249-254, 2012.
- MALÁ, J.; MÁCHOVÁ, P.; CVRCKOVÁ, H.; KARADY, M.; NOVÁK, O.; MIKULIK, J.; DOSTÁL, J.; STRNAD, M.; DOLEZAL, K. The role of cytokinins during micropropagation of wych elm. *Biologia Plantarum*, v.57, p. 174-178, 2013.
- MARTINELLI, G.; MORAES, M.A. *Livro vermelho da Flora do Brasil*. 1ª edição. Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro; 2013.
- MENDES, G.C.; SOARES, C.Q.G.; BRAGA, V.F.; PINTO, L.C.; SANTANA, R.; VICCINI, L.F.; PEIXOTO, P.H.P. Multiplicação *in vitro* de explantes de *Billbergia distachia* (Vellozo) MEZ (Bromeliaceae). *Revista Brasileira de Biociências*, v.5, p. 972-974, 2007.
- MCCREADY, R. M.; GUGGOLZ, J.; SILVIERA, J. V.; OWENS, H. S. Determination of Starch and Amylose in Vegetables. *Analytical Chemistry*, v. 22, n. 9, p. 1156-1158, 1950.
- MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. Importance of tissue culture technique for conservation of endangered Brazilian bromeliads from Atlantic rain forest canopy. *Selbyana*, v.16, n.2, 147-149, 1995.
- MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In- *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, ed. Bajaj Y.P.S. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 40, pp. 43-57. 1997.
- MOREL, G.M.; WETMORE, R.H. Tissue culture of monocotyledons. *American Journal of Botany*, v.38, p.138-140, 1951.
- MÜLLER, B.; SHEEN, J. Advances in cytokinin signaling. *Science*, v.318, p.68-69, 2007.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p. 473-497, 1962.
- PICKENS, K.A.; AFFOLTER, J.M.; WETZSTEIN, H.Y. Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii* *in vitro*. *HortScience*, v.38, p. 101-104, 2003.
- PICKENS, A.K.; WOLF, J.; AFFOLTER, J.M.; WETZSTEIN, H.Y. Adventitious bud development and regeneration in *Tillandsia eizii* *in vitro*. *Cellular & Developmental Biology Plant*, v.42, p. 348-353, 2006.
- POMPELLI, M.F.; GUERRA, M.P. Enraizamento *in vitro* e *ex vitro* de *Dyckia distachya* Hassler sob diferentes concentrações de ALB. *Floresta & Ambiente*, v.12, p. 42-49, 2005.
- PULLMAN, G.S.; SKRYABINA, A. Liquid medium and liquid overlays improve embryogenic tissue initiation in conifers. *Plant Cell Reports*, v. 26, p. 873-887. 2007.
- QUARESMA, A.C.; JARDIM, M.A. Diversidade de bromeliáceas epífitas na área de Proteção Ambiental Ilha do Combu, Belém, Pará, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v.26, p. 290-294, 2012.
- RECH FILHO, A.; DAL VESCO L.L. NODARI, R.O. LISCHKA, R.W. MÜLLER, C.V.; GUERRA, M.P. Tissue culture for the conservation and mass propagation of *Vriesea reitzii* Leme and Costa, a bromeliad threatened of extinction from the Brazilian Atlantic Forest. *Biodiversity & Conservation*, v.14, p. 1799-1808, 2005.
- RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S., BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P., LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L., PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. *Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 1999.
- SAKAKIBARA, H. Cytokinins: activity, biosynthesis and translocation. *Annual Review of Plant Biology*, v. 57, p.431-449, 2006.

- SANTA-ROSA, S.; SOUZA, F.V.D.; VIDAL, A.M.; LEDO, C.A. DAS. S.; SANTANA, J.R.F. DE. Micropropagation of the ornamental vulnerable bromeliads *Aechmea blanchetiana* and *Aechmea distichantha*. **Horticultura Brasileira**, v.31, p. 112-118, 2013.
- SANTOS, D.S.; TAMAKI, V.; NIEVOLA, C.C. In vitro propagation of ornamental bromeliad *Acanthostachys strobilacea* (Schult. f.) Klotszsch via nodal segments. **In vitro Cellular and Development Biology-Plant**, v.46, p.524-529, 2010.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E.; LIMA, E.C.A.; SILVA, T.L.; MESQUITA, A.G.G.; MACIEL, S.A.; COSTA, F.H.S. Double-phase culture system for large scale production of pineapple. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.109, p. 263-269, 2012.
- SILVA, A.L.L. DA.; BISOGNIN, D.A.; DORNELLES, E.B.; WALTER, J.M.; FRANCO, E.T.H. Ensaios sobre o alongamento de brotos de *Dyckia maritima* Baker dispostos em agrupamentos – Bromeliaceae. **Caderno de pesquisa Ser. Bio**, v.13, p. 37-46, 2004.
- SILVA, A.L.L.; FRANCO, E.T.H.; DORNELLES, E.B.; BORTOLI, C.L.R.; QUOIRIN, M. *In vitro* multiplication of *Vriesea scalaris* E. Morren (Bromeliaceae). **Iheringia**, v.64, p. 151-156, 2009.
- SILVA, F.A.S. **Programa Assistat versão 7.7 beta**. Universidade Federal de Campina Grande, PB. 2013.
- SMITH, L. B. The Bromeliaceae of Brazil. **Smithsonian Misceleneaus Collection**, v.126, p. 144-157, 1955.
- SILVEIRA, D. G.; SOUZA, F. V. D.; PELACANI, C. R.; SOUZA, A. S.; LEDO, C. A. DA. S.; SANTANA, J. R. F. Micropropagation and *in vitro* Conservation of *Neoglaziovia variegata* (Arr. Cam.) Mez, a fiber producing bromeliad from Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, p. 923-932, 2009.