

SUBSTRATOS ALTERNATIVOS PARA A ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS PROPAGADAS *IN VITRO* PARA A CONSERVAÇÃO DE *VRIESEA INCURVATA* GAUDICH. (BROMELIACEAE)

Márcio Hisayuki Sasamori¹Delio Endres Júnior²Annette Droste³

Recebido em 27.06.2016; Aceito 15.07.2016

Abstract

In vitro culture allows a high seed germination rate in bromeliads, as well as a fast growth and development of seedlings. However, the acclimatization phase is critical for seedlings, and substrates that maintain high humidity by the seedlings and allow the survival and the development of the individuals are needed. This study aimed to evaluate the survival and development of individuals of *Vriesea incurvata* Gaudich, obtained by *in vitro* propagation and acclimatized in different substrates: (FC+CAC) coconut fiber + carbonized rice hulls, (FC+V) coconut fiber + vermiculite, (FC+A) coconut fiber + sand, and (CAR) Carolina Soil®. For the characterization of the evaluated substrates, we determined apparent density, porosity, water retention capacity and pH. For each treatment, we planted 40 seedlings with a height of $3,0 \pm 0,4$ cm in plastic containers. After 150 days of acclimatization, we calculated the survival percentage, measured the length of the aerial part and of the longest root, counted the number of leaves, and calculated the fresh mass. The results of porosity, water retention capacity and density showed significant differences among substrates, but did not influence the development of *V. incurvata*. The survival percentages of acclimatized plants varied from 67.5 to 93.3%. The results indicated that the substrates CAR, FC+A, and FC+V provided better conditions for acclimatization and development of individuals of *V. incurvata*.

Key-words: Bromeliads. Conservation. *Ex vitro* culture. Substrate attributes.

Resumo

A cultura *in vitro* permite alta taxa de germinação de sementes de

¹Bolsista CAPES/FAPERGS, Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Universidade Feevale, ERS 239, 2755, CEP 93525-075, Novo Hamburgo, RS, Brasil. E-mail: marcio_sasamori@yahoo.com.br

²Bolsista CAPES/PROSUP, Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Universidade Feevale, ERS 239, 2755, CEP 93525-075, Novo Hamburgo, RS, Brasil. E-mail: deliojendres@hotmail.com

³Doutora e Professora Titular do Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale, ERS 239, 2755, CEP 93525-075, Novo Hamburgo, RS, Brasil. E-mail: annette@feevale.br

bromeliáceas, bem como rápido crescimento e desenvolvimento das plântulas. Contudo, a fase de aclimatização é crítica para as plântulas, sendo necessários substratos que mantenham maior umidade junto a elas e com características que permitam a sobrevivência e o desenvolvimento dos indivíduos. O estudo teve como objetivo avaliar a sobrevivência e o desenvolvimento de indivíduos de *Vriesea incurvata* Gaudich. obtidos a partir da propagação *in vitro* e aclimatizados em diferentes substratos: (FC+CAC) fibra de coco + casca de arroz carbonizada, (FC+V) fibra de coco + vermiculita, (FC+A) fibra de coco + areia e (CAR) Carolina Soil®. Para a caracterização dos substratos avaliados, foram determinadas a densidade aparente, a porosidade, a capacidade de retenção de água e o pH. Para cada tratamento, 40 plântulas com $3,0 \pm 0,4$ cm de altura foram plantadas em recipientes plásticos. Após 150 dias de aclimatização, foram calculadas as porcentagens de sobrevivência e mensurados o comprimento da parte aérea e da raiz maior, o número de folhas e a massa fresca. Os resultados de porosidade, capacidade de retenção de água e densidade apresentaram diferenças significativas entre os substratos, porém não influenciaram o desenvolvimento de *V. incurvata*. As porcentagens de sobrevivência das plântulas aclimatizadas variaram de 67,5 a 93,3%. Os resultados indicaram que os substratos CAR, FC+A e FC+V proporcionaram melhores condições para a aclimatização e o desenvolvimento dos indivíduos de *V. incurvata*.

Palavras-chave: Bromélias. Conservação. Cultura *ex vitro*. Atributos de substratos.

Introdução

A cultura *in vitro*, além de ser aplicada com sucesso para a propagação de espécies de interesse comercial (Benson, 1999), também pode ser utilizada com grande relevância para fins de conservação, por meio de reintrodução de indivíduos micropropagados em ambiente natural (Decruse *et al.*, 2003; Aggarwal *et al.*, 2012; Endres Júnior *et al.*, 2015). Por permitir elevada taxa de germinação de sementes, a micropropagação se torna interessante para a obtenção de plântulas que representam uma base genética mais ampla, importante para a conservação (Fay, 1992). Além do sucesso da germinação, esta técnica ainda leva ao maior desenvolvimento das plântulas em curto período de tempo e livres de patógenos (Oliveira *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2006).

Considerada a última etapa da micropropagação de plantas, a aclimatização consiste na transferência das plântulas da condição *in vitro* para o ambiente externo, também denominada de condição *ex vitro* (Grattapaglia & Machado, 1998). Esta etapa, em função das mudanças bruscas das condições abióticas como umidade, luminosidade e oferta de nutrientes, torna-se muitas vezes crítica para a sobrevivência e o desenvolvimento das plântulas (Lakso *et al.*, 1986; Assis *et al.*, 2009). Para o sucesso da aclimatização, é necessário manter maior umidade junto às plântulas, que pode ser proporcionada por substratos com características adequadas (Grattapaglia & Machado, 1998; Sorace *et al.*, 2009; Sasamori *et al.*, 2014), bem como expor gradualmente as plântulas ao ar atmosférico (Grattapaglia & Machado, 1998). Nesse sentido, estudos que visam à avaliação dos substratos para aclimatização são

necessários para que não se tenham perdas elevadas de indivíduos, inviabilizando a técnica de micropropagação de plantas e a oferta de indivíduos para fins comerciais ou para reintrodução.

Substratos alternativos podem diminuir o uso do xaxim, que é muito utilizado por colecionadores e cultivadores de orquídeas e bromélias (Demattê & Demattê, 1996; Paula & Silva, 2004; Anacleto *et al.*, 2008). Conseqüentemente, o menor uso deste substrato leva à diminuição da extração irregular da fibra de xaxim, que é obtida do caule da samambaia arborescente *Dicksonia sellowiana* Hook. Esta espécie figura na Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (MMA, 2015a) e seu extrativismo está proibido no Brasil pela Resolução CONAMA 278/2001 (MMA, 2015b).

Outros substratos comuns utilizados para a produção de plantas ornamentais são aqueles compostos por materiais à base de turfa, serapilheira, areia, casca de arroz carbonizada, argila expandida, vermiculita, esfagno, composto orgânico, solo mineral e vermicomposto (Kämpf, 2000). A fibra de coco, um resíduo oriundo da exploração comercial do fruto, também tem sido empregada efetivamente como substrato para produção de plantas (Jasmim *et al.*, 2006) e seu uso combinado com outros componentes tem apresentado resultados positivos (Sasamori *et al.*, 2014). Em geral, substratos devem apresentar características indispensáveis como boa aeração, permeabilidade, capacidade de retenção de nutrientes, capacidade de reidratação, resistência à decomposição e consistência para suporte (Silva & Silva, 1997; Kämpf, 2000; Silva, 2000; Souza, 2003). No entanto, para atingir estas características desejáveis de cultivo, é necessário o uso simultâneo de diversos substratos, tais como casca de arroz carbonizada (boa disponibilidade de minerais), fibra de coco (boa aeração), areia (baixa retenção de água), vermiculita (baixa densidade) e turfa (alto teor de matéria orgânica) (Kämpf, 2000). Além das características dos substratos, devem-se ainda considerar outros atributos importantes para o sucesso da aclimatização e cultivo de plantas, como a facilidade de manuseio, a disponibilidade do substrato, além da facilidade e do custo de aquisição (Salvador *et al.*, 2001; Nomura *et al.*, 2008).

As bromélias epifíticas “tanque” apresentam características de acumular água da chuva no receptáculo (Benzing, 2000), absorvendo os nutrientes por meio de tricomas nas bases de suas folhas, os quais são lixiviados e transportados junto à água da chuva (Moreira & Isaias, 2008; Benzing *et al.*, 1982). Para tanto, o cultivo eficaz de bromélias epifíticas deve consistir em substratos que apresentam boa aeração, alta permeabilidade, baixa densidade, presença de matéria orgânica e pH levemente ácido (Bunt, 1976; Dimmitt, 1992; Kämpf, 1992), características que permitem o desenvolvimento das raízes das plântulas, cuja morfoanatomia está adaptada ao epifitismo (Bicalho, 1969).

Vriesea incurvata Gaudich. é uma bromeliácea herbácea e de hábito epifítico (Figura 1), considerada endêmica da Floresta Atlântica (Forzza *et al.*, 2015). A planta tem pequeno porte, com até 50 cm de altura, e folhas dispostas em roseta formando um receptáculo para acúmulo de água (Reitz, 1983). Esta espécie figura na lista de espécies da flora ameaçadas de extinção do Rio Grande do Sul, na categoria de dados insuficientes para avaliação de seu risco

(Rio Grande do Sul, 2014) e está, para o estado do Paraná, entre as bromeliáceas com maior extrativismo (Negrelle *et al.*, 2005; Negrelle & Anacleto, 2012).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a sobrevivência e o desenvolvimento de plântulas de *Vriesea incurvata* providas da micropropagação e aclimatizadas em diferentes substratos, visando a obtenção de indivíduos para iniciativas de conservação da espécie.

Material e Métodos

Plântulas de *Vriesea incurvata* foram obtidas a partir da sementeira *in vitro* e mantidas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 3 g L^{-1} de sacarose, 5 g L^{-1} de carvão ativado, solidificado com 4 g L^{-1} de PhytigelTM, e pH ajustado em 6,4 antes da esterilização em autoclave. Indivíduos com $3,0 \pm 0,4$ cm de altura da parte aérea (Figura 1), medidos com auxílio de um paquímetro de precisão, foram selecionados e plantados individualmente em recipientes plásticos (volume 120 mL) contendo combinações de diferentes materiais para compor os substratos: (FC+CAC) fibra de coco + casca de arroz carbonizada (1:1 v/v), (FC+V) fibra de coco + vermiculita (1:1 v/v), (FC+A) fibra de coco + areia (1:1 v/v) e (CAR) Carolina Soil[®] à base de turfa, vermiculita e casca de arroz carbonizada. A fibra de coco utilizada foi do tipo fibroso Padrão 80 – Amafibra[®]. A areia utilizada foi do tipo areia grossa peneirada (malha de 5 mm^2), lavada anteriormente em água corrente e secada em ambiente natural com incidência solar direta.

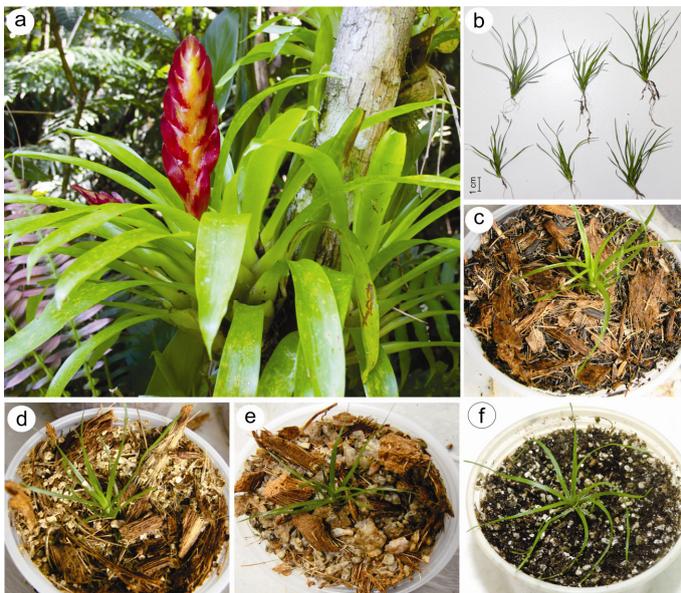


Figura 1. a- *Vriesea incurvata* em ambiente natural; b- plântulas micropropagadas, antes da transferência para os substratos; aclimatização em: c- fibra de coco e casca de arroz carbonizada; d- fibra de coco e vermiculita; e- fibra de coco e areia; f- Carolina Soil[®]

Para a caracterização dos substratos avaliados, as propriedades físicas foram determinadas de acordo com a metodologia descrita por Guerrini & Trigueiro (2004). Para cada combinação de substratos, foram mensuradas a densidade aparente, a macroporosidade, a microporosidade, a porosidade total e a capacidade máxima de retenção de água. Nos recipientes (volume 120 mL), foram feitos furos na base, de um tamanho que permitisse a entrada e a saída de água, mas que evitasse a perda de material durante a determinação das propriedades físicas. Os recipientes foram preenchidos manualmente com os substratos descritos acima (FC+CAC, FC+V, FC+A e CAR) e posteriormente, dentro de uma caixa plástica, os substratos foram encharcados com o nível da água até a borda superior do recipiente. Durante uma hora, os substratos permaneceram submersos na água e, em seguida, foram drenados por 30 minutos. Após a drenagem, os recipientes foram preenchidos com os respectivos substratos em função da acomodação dos mesmos e mantidos submersos na água por uma hora adicional.

A pesagem encharcada (PE) dos substratos foi realizada com os furos da base fechados e com a adição de água até o limite da borda do recipiente. A pesagem dos substratos drenados (PD) foi realizada após 12 horas de drenagem livre e posteriormente os substratos foram colocados na estufa a 105°C por 24 horas para a secagem dos mesmos, os quais foram pesados após o resfriamento (PS).

Para a determinação dos parâmetros físicos dos substratos, foram utilizadas as seguintes fórmulas, conforme Guerrini & Trigueiro (2004): macroporosidade (%) = $\{[(PE - PR) - (PD - PR)] / Re\} \times 100$; microporosidade (%) = $\{[(PD - PR) - (PS - PR)] / Re\} \times 100$; porosidade total (%) = macroporosidade + microporosidade; capacidade de retenção ($ml / 120\text{ cm}^3$) = $[(PD - PR) - (PS - PR)]$; densidade = $(PS-PR)/Re$, onde o valor de “PE” corresponde ao peso do substrato encharcado, o valor de “PD” corresponde ao valor do substrato drenado, o valor de “Re” corresponde ao volume do recipiente, o valor de “PS” corresponde ao peso do substrato seco, e “PR” corresponde ao peso do recipiente vazio.

A mensuração do potencial hidrogeniônico (pH) de cada substrato foi realizada conforme metodologia adaptada de Silva *et al.* (2009). Amostras de cada substrato foram secadas em estufa à temperatura de 40°C e posteriormente foi realizado o destorroamento. Três amostras de cada substrato foram separadas, colocadas em frascos de vidro e adicionada água destilada (com pH ajustado a 7,0) na proporção 1:2,5 (v:v). A solução substrato/água permaneceu imersa em suspensão por uma hora e posteriormente foi realizada a mensuração por meio de um eletrodo conectado a um potenciômetro.

Durante o período de aclimatização, as 40 plântulas de cada tratamento foram mantidas em bandejas plásticas transparentes com tampa (24 cm x 18 cm, 15 cm de altura), com o propósito de manter maior umidade junto às plântulas. A partir do 30º dia, as tampas foram abertas gradualmente para a exposição dos indivíduos ao ar atmosférico (Sasamori *et al.*, 2014). A aclimatização das plântulas foi realizada no laboratório, em 26±1°C, sob luz natural e com retenção de 70% da luminosidade por meio de tela de polipropileno. Adubações foliares

foram realizadas com o fertilizante comercial Peters® Profissional na concentração de 1 g L^{-1} com periodicidade quinzenal. Durante o período de aclimatização, também foi realizada a irrigação manual das plântulas, mantendo o substrato sempre úmido.

Após 150 dias de aclimatização, as plântulas foram avaliadas quanto à sobrevivência e quanto aos parâmetros: comprimento da parte aérea, número de folhas, comprimento da raiz maior e massa fresca. A mensuração dos parâmetros foi realizada com o auxílio de um paquímetro de precisão e de uma balança analítica de precisão.

Os dados dos parâmetros das plântulas e dos parâmetros físicos e químico dos substratos foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk. Médias foram comparadas pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para os testes estatísticos, foi utilizado o programa SPSS versão 22.

Resultados e Discussão

A avaliação das características físicas, de modo geral, mostrou-se diferente entre os substratos. Para a macroporosidade, foram observadas médias entre 13 e 52% de macroporos nos substratos testados (Tabela 1), embora nenhum tratamento tenha apresentado valores entre 20 a 30% de macroporosidade recomendados por Kämpf (2000) para o cultivo de orquídeas e bromélias. Para a microporosidade dos substratos, os valores observados foram de 20 a 88%, diferindo significativamente entre os tratamentos (Tabela 1). Apesar de ter apresentado grande amplitude no experimento e ser responsável pelo armazenamento de água (Reinert & Reichert, 2006), este parâmetro não se mostrou determinante para o desenvolvimento das plântulas de *Vriesea incurvata* (Tabela 2). Em relação à porosidade total dos substratos testados, FC+CAC, FC+V e CAR apresentaram médias consideradas adequadas para o cultivo de plântulas (Tabela 1), sendo recomendados valores de porosidade total acima de 85% (Kämpf, 2000). O substrato FC+A apresentou significativamente a menor média de porosidade total e abaixo do recomendado, embora não tenha prejudicado o desenvolvimento dos indivíduos (Tabela 2).

A capacidade de retenção de água apresentou médias de 19,6 a 88,1%, que foram significativamente diferentes entre os substratos testados (Tabela 1), embora este parâmetro não tenha mostrado influência sobre o desenvolvimento das plântulas de *Vriesea incurvata* (Tabela 2). Um substrato considerado adequado para o cultivo apresenta valores entre 65 a 75% de água retida (Kämpf, 2000). Esta diferença de disponibilidade de água do substrato às plântulas foi suprida pela irrigação manual realizada diariamente e individual, contribuindo para redução do estresse hídrico das plantas aclimatizadas ou o encharcamento excessivo do substrato, que pode provocar o apodrecimento das plantas.

Para a densidade dos substratos testados, apenas FC+A foi significativamente superior aos demais tratamentos, que apresentou média de 2,5 vezes superior à densidade máxima recomendada (Tabela 1), que varia entre 100 a 300 g L^{-1} para recipientes pequenos como os do presente estudo

(Kämpf, 2000). No entanto, mesmo a densidade sendo mais elevada, isto não foi prejudicial para o desenvolvimento das raízes das plântulas do presente estudo (Tabela 2), apesar de que, de modo geral, pode prejudicar o desenvolvimento do sistema radicular das plantas, dificultando a penetração das raízes e redução da porosidade total (Gauland, 1997).

Em relação ao pH dos substratos testados, não foi observada importante diferença entre os tratamentos, que variaram de 5,6 a 6,0, embora FC+A tenha apresentado significativamente o maior valor (Tabela 1). Do mesmo modo, não se verificou influência deste parâmetro sobre o desenvolvimento das plântulas de *Vriesea incurvata* aclimatizadas por 150 dias (Tabela 2). O valor do pH do substrato é muito importante uma vez que esta variável pode influenciar na disponibilidade de nutrientes (Ferraz *et al.*, 2005). Desta forma, valores de pH na faixa de 5,5 e 6,5 são considerados ideais para substratos destinados ao cultivo de plantas ornamentais, proporcionando disponibilidade adequada de nutrientes às plântulas (Waldemar, 2000).

Os parâmetros avaliados nas plântulas, de modo geral, demonstraram que os substratos proporcionaram condições adequadas para a sobrevivência e o desenvolvimento dos indivíduos. A sobrevivência das plântulas de *Vriesea incurvata* variou de 67,5 a 93,3% após 150 dias nos diferentes substratos, sendo que as maiores porcentagens de sobrevivência foram registradas nos substratos CAR e FC+V (Figura 2). A elevada sobrevivência observada no presente estudo está associada à manutenção da alta umidade junto às plântulas por meio do uso de bandejas plásticas transparentes com tampa, que, reduziu o estresse hídrico das plântulas. Durante a aclimatização, o estresse hídrico é decisivo para a sobrevivência das plântulas, sendo fator principal na formação de necrose (Grattapaglia & Machado, 1998). Adicionalmente, a exposição das plântulas ao ar atmosférico, realizada por meio da abertura gradual das tampas após algumas semanas, também contribuiu para a adaptação das folhas na aclimatização (Sasamori *et al.*, 2014), resultando na alta porcentagem de sobrevivência de *V. incurvata*. As plantas cultivadas *in vitro* estão expostas a alta umidade do ar, baixa irradiância luminosa e limitação de troca de gases, além da disponibilidade de nutrientes e fonte de carbono (Ziv, 1994). Tais condições abióticas sofrem alterações de forma oposta durante a fase de aclimatização, sendo fatores limitantes para sobrevivência das plântulas (Lakso *et al.*, 1986). É importante ressaltar também que as características físicas dos diferentes substratos testados não foram determinantes para a sobrevivência das plântulas de *V. incurvata*, sugerindo a importância da manutenção da umidade do ar junto aos indivíduos.

Tabela 1. Valores (média \pm desvio padrão) dos parâmetros físicos e químico dos substratos avaliados.

Substrato ¹	Macroporos (%)	Microporos (%)	Porosidade total (%)	Capacidade de retenção (%)	Densidade (g L ⁻¹)	pH
FC+CAC	40 \pm 3 b ²	55 \pm 4 b	95 \pm 1 b	55,4 \pm 3,9 b	152 \pm 4 a	5,7 \pm 0,1 b
FC+V	52 \pm 2 a	42 \pm 1 c	93 \pm 1 b	41,6 \pm 1,5 c	138 \pm 3 a	5,6 \pm 0,1 b
FC+A	49 \pm 2 a	20 \pm 4 d	69 \pm 3 c	19,6 \pm 4,4 d	1098 \pm 143 b	6,0 \pm 0,1 a

CAR	13 ± 4 c	88 ± 2 a	100 ± 2 a	88,1 ± 1,9 a	230 ± 36 a	5,7 ± 0,2 b
F	113,929	240,106	139,106	240,106	118,380	29,503
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

¹FC – fibra de coco; CAC – casca de arroz carbonizada; V – vermiculita; A – areia; CAR – Carolina Soil® (turfa, vermiculita e casca de arroz carbonizada)

²Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

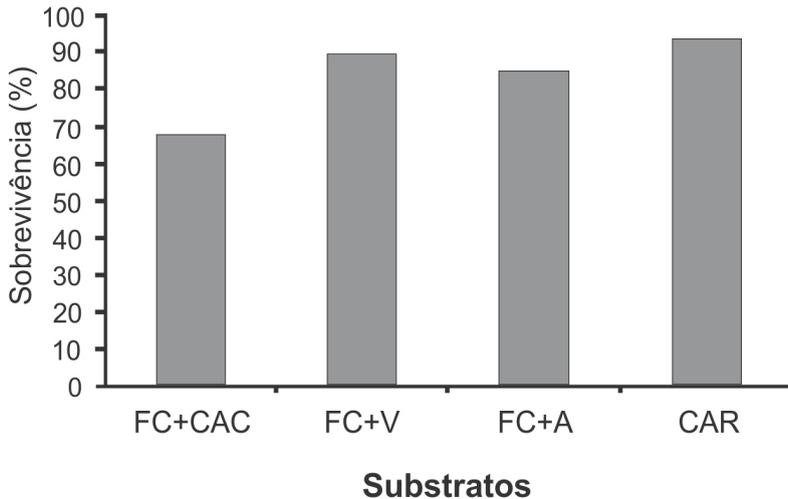


Figura 2. Porcentagens de plântulas de *Vriesea incurvata* sobreviventes após 150 dias de aclimatização em diferentes substratos. FC - fibra de coco; CAC - casca de arroz carbonizada; V - vermiculita; A - areia; CAR - Carolina Soil® (turfa, vermiculita e casca de arroz carbonizada)

Porcentagens de sobrevivência semelhantes ao presente estudo foram relatadas por Silva *et al.* (2006). Plântulas de *Dyckia maritima* Baker foram aclimatados por 120 dias em diferentes substratos com misturas de solo, areia, vermiculita, esfagnum e casca de nozes, proporcionando 63 a 92% de sobrevivência das plântulas. O cultivo das plântulas por 60 dias em bandejas plásticas, as quais foram mantidas na sala com as mesmas condições do cultivo *in vitro*, foi relatado como decisivo para a sobrevivência e a adaptação das plântulas de *D. maritima* (Silva *et al.*, 2006). Apesar dos métodos iniciais de adaptação *ex vitro* das plântulas de *D. maritima* e de *Vriesea incurvata* terem sido diferentes, ambos os estudos revelaram que a exposição gradual das plântulas ao ambiente externo foi determinante para a maior sobrevivência das plântulas.

Nos substratos CAR, FC+A e FC+V, as plântulas aclimatizadas apresentaram significativamente as maiores médias do comprimento da parte aérea (entre 4,9 e 5,0 cm), o que representou uma taxa relativa média de 83% de crescimento em 150 dias. As plântulas providas destes substratos ainda apresentaram em média as maiores massas frescas (entre 155 a 199 mg), com o substrato FC+V tendo proporcionado a maior média de massa fresca das

plântulas aclimatizadas, que diferiu significativamente da massa registrada para as plântulas em FC+CAC (Tabela 2; Figura 1).

Apesar da fibra de coco e sua combinação com outros componentes ser benéfica como substrato para orquídeas, o mesmo não ocorreu para as plântulas de *Vriesea incurvata* quando aclimatizadas no substrato FC+CAC. Este substrato, mesmo com suas características consideradas ideais para o cultivo de bromélias epifíticas (Kämpf, 2000), não apresentou resultados positivos para a sobrevivência e o desenvolvimento das plântulas aclimatizadas de *V. incurvata* (Tabela 2).

O número de folhas das plântulas não diferiu significativamente entre os tratamentos nos quais, em média, cada indivíduo apresentou 15 folhas (Tabela 2). Em função da mudança das condições abióticas durante a aclimatização, as folhas que se desenvolveram *in vitro* podem persistir e se desenvolver ou podem sofrer senescência (Fabbri *et al.*, 1986). No presente estudo, observou-se que as folhas persistiram e se desenvolveram, podendo ainda ter contribuído para a formação de novas folhas. Isto pode ser um indicativo de que os tecidos foliares aparentemente possuíam um aparato fotossintético eficiente (Grout & Millam, 1985). Na etapa de aclimatização, as plântulas são estimuladas a desenvolver a função metabólica natural, uma vez que a atividade metabólica desenvolvida durante o cultivo *in vitro* é incompleta (Ferreira *et al.*, 2007). Nesse sentido, a presença dos tecidos foliares irá permitir o aumento gradual e significativo da atividade metabólica das plântulas na fase de aclimatização, e conseqüentemente, os nutrientes contidos no substrato serão absorvidos pelas raízes (Ferreira *et al.*, 2007). Além disso, até a estabilização do metabolismo, as folhas também podem atuar nesta fase como tecidos de reserva de energia, por meio do carboidrato acumulado, o qual foi anteriormente absorvido do meio de cultura (Calvete *et al.*, 2000). Contudo, se por um lado se conhece a importância da fonte de carboidrato para o desenvolvimento dos indivíduos de diferentes espécies (Cappelades *et al.*, 1991; Calvete *et al.*, 2000; Skrebsky *et al.*, 2004), por outro, ainda há carência de conhecimento acerca do efeito de sua concentração sobre a sobrevivência e o desenvolvimento de plântulas de bromeliáceas *in vitro* e durante a aclimatização *ex vitro*, indicando a necessidade de estudos acerca da família.

Em relação ao sistema radicular, o comprimento das raízes das plântulas de *Vriesea incurvata* foi, em média, de 3,0 a 4,1 cm (Tabela 2). O substrato comercial à base de turfa, vermiculita e casca de arroz carbonizada proporcionou a maior média do comprimento de raízes das plântulas aclimatizadas, enquanto que a combinação FC+A proporcionou valores intermediários para o mesmo parâmetro. O menor comprimento da raiz foi registrado no tratamento composto por fibra de coco e vermiculita (Tabela 2). A presença de matéria orgânica como a turfa, que possui em torno de 70% de matéria orgânica (Kämpf 2000), pode melhorar as propriedades do substrato destinado ao cultivo de bromeliáceas (Kämpf, 1992) e ter contribuído para o maior crescimento da raiz das plântulas aclimatizadas. Por outro lado, FC+V apresentou numericamente a menor densidade do substrato, que associada à maior porcentagem de macroporosidade pode ter sido prejudicial para o desenvolvimento das raízes

(Tabela 2). Densidades baixas podem conferir contato reduzido das raízes com o substrato, dificultando a fixação e o desenvolvimento radicular das plântulas aclimatizadas (Gauland, 1997). A vermiculita, ao longo do tempo, também pode proporcionar o adensamento com a irrigação em função da baixa durabilidade (Kämpf, 2000), que pode ter apresentado efeito negativo sobre o desenvolvimento do sistema radicular das plântulas de *Vriesea incurvata*.

Tabela 2. Valores (média \pm desvio padrão) do comprimento da parte aérea, número de folhas, comprimento da raiz maior e massa fresca de plântulas de *Vriesea incurvata* após 150 dias de aclimatização em diferentes substratos.

Substrato ¹	Comprimento da parte aérea (cm)	Número de folhas	Comprimento da raiz maior (cm)	Massa fresca (mg)
FC+CAC	3,7 \pm 1,0 b ²	14,5 \pm 3,5 a	3,3 \pm 0,9 bc	140 \pm 80 b
FC+V	4,9 \pm 1,4 a	15,4 \pm 3,5 a	3,0 \pm 1,0 c	199 \pm 100 a
FC+A	5,0 \pm 1,4 a	15,3 \pm 2,6 a	3,7 \pm 1,1 ab	182 \pm 70 ab
CAR	5,0 \pm 1,4 a	15,4 \pm 3,0 a	4,1 \pm 1,0 a	155 \pm 75 ab
F	6,327	0,510	7,177	3,236
p	0,001	0,676	<0,001	0,025

¹FC – fibra de coco; CAC – casca de arroz carbonizada; V – vermiculita; A – areia; CAR – Carolina Soil® (turfa, vermiculita e casca de arroz carbonizada)

²Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos no presente estudo indicaram que os substratos CAR, FC+A e FC+V proporcionaram condições benéficas para a aclimatização *ex vitro* de *Vriesea incurvata*, pois permitiram maior sobrevivência e desenvolvimento das plântulas. Embora todos os parâmetros físicos e químico avaliados tenham apresentado diferenças significativas entre os substratos, de modo geral, estes não parecem estar relacionados com o desenvolvimento de *V. incurvata* durante a aclimatização em ambiente *ex vitro*, principalmente nas raízes das plântulas, que estão em contato direto com o substrato (Tabelas 1 e 2). Os resultados apontaram que bromélias providas da micropropagação podem ser aclimatizadas obtendo-se resultados positivos, sendo assim permitida a realização de estratégias de conservação por meio da obtenção de plântulas com ferramentas biotecnológicas e, em seguida, a disponibilização dos indivíduos para programas de reintrodução de espécies em ambiente natural.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Feevale pela infraestrutura e pelo apoio financeiro, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pela concessão de bolsa de Mestrado (CAPES/FAPERGS) para o primeiro autor e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela Bolsa de Mestrado (CAPES/PROSUP) para o segundo autor.

Referências Bibliográficas

- ANACLETO, A.; NEGRELLE, R.R.B. & KOEHLER, H.S. 2008. Germinação de *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb. (Bromeliaceae) em diferentes substratos alternativos ao pó de xaxim. *Acta Scientiarum, Agronomy* 30(1): 73-79.
- ASSIS, A.M.; FARIA, R.T.; UNEMOTO, L.K.; COLOMBO, L.A. & LONE, A.B. 2009. Aclimatização de bastão-do-imperador (*Etilingera elatior*) em substratos à base de coco. *Acta Scientiarum, Agronomy* 31: 43-47.
- AGGARWAL, S.; NIRMALA, C.; BERI, S.; RASTOGI, S. & ADHOLEYA, A. 2012. *In vitro* symbiotic seed germination and molecular characterization of associated endophytic fungi in a commercially important and endangered Indian orchid *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. *European Journal of Environmental Science* 2: 33-42.
- BENSON, E.E. 1999. *Plant conservation biotechnology*. London, Taylor & Francis.
- BENZING, D.H.; OTT, D.W. & FRIEDMAN, W.E. 1982. Roots of *Sobralia macrantha* (Orchidaceae): structure and function of the velamen-exodermis complex. *American Journal of Botany* 69: 608-614.
- BENZING, D.H. 2000. *Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation*. Cambridge: Cambridge University Press. 690p.
- BICALHO, H.D. 1969. *Subsídios à orquidocultura paulista*. São Paulo, Instituto de Botânica. (Boletim Técnico, 6).
- BUNT, A.C. 1976. *Modern potting composts: a manual on the preparation and use of growing media for pot plants*. London: George Allen & Unwin. 277p.
- CALVETE, E.O.; KÄMPF, A.N.; BERGAMASCHI, H. & DAUDT, R.H.S. 2000. Avaliação do crescimento de plantas de morangueiro durante a aclimatização *ex vitro*. *Horticultura Brasileira* 18(3): 188-192.
- CAPPELLADES, M.; LEMEURE, R. & DEBERGH P. 1991. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 25(1): 21-26.
- DECRUSE, S.W.; GANGAPRASAD, A.; SEENI, S. & MENON, V.S. 2003. Micropropagation and ecorestoration of *Vanda spathulata*, an exquisite orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72: 199-202.
- DEMATTE, J.B.I. & DEMATTÊ, M.E.S.P. 1996. Estudos hídricos com substratos vegetais para cultivo de orquídeas epífitas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 31: 803-813.
- DIMMITT, M.A. 1992. *Bromeliads: a cultural manual*. Oregon: The Bromeliad Society. 42p.
- ENDRES JÚNIOR, D.; SASAMORI, M.H.; SILVEIRA, T.; SCHMITT, J.L. & DROSTE, A. 2015. Reintrodução de *Cattleya intermedia* Graham (Orchidaceae) em borda e interior de um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual no sul do Brasil. *Revista Brasileira de Biociências* 13(1): 33-40.
- FABBRI, A.; SUTTER, E.G & DUNSTON, S.K. 1986. Anatomical changes in persistent leaves of tissue cultured strawberry plants after removal from culture. *Scientia Horticulture* 28: 331-337.
- FAY, M.F. 1992. Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 28(1): 1-4.
- FERRAZ, M.V.; CENTURION, J.F. & BEUTLER, A.N. 2005. Caracterização física e química de alguns substratos comerciais. *Acta Scientiarum, Agronomy* 27(2): 209-214.
- FERREIRA, C.A.; PAIVA, P.D.O.; RODRIGUES, T.M.; RAMOS, D.P.; CARVALHO, J.G. & PAIVA, R. 2007. Desenvolvimento de mudas de bromélia (*Neoregelia cruenta* (R. Graham) L. B. Smith) cultivadas em diferentes substratos e adubação foliar. *Ciência & Agrotecnologia* 31(3): 666-671.

- FORZZA, R.C.; COSTA, A.; SIQUEIRA FILHO, J.A.; MARTINELLI, G.; MONTEIRO, R.F.; SANTOS-SILVA, F.; SARAIVA, D.P.; PAIXÃO-SOUZA, B.; LOUZADA, R.B. & VERSIEUX, L. 2015. *Bromeliaceae*. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB66>>. Acesso em: 09 Mai. 2015.
- GAULAND, D.C.S.P. 1997. *Relações hídricas em substratos à base de turfas sob o uso dos condicionadores casca de arroz carbonizado ou queimado*. Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 118p.
- GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. 1998. Micropropagação. In: TORRES A.C.; CALDAS, L.S. & BUSO, J.A. (eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. 2nd ed. Brasília, Embrapa, p. 183-260.
- GROUT, B.W.W. & MILLAM. 1985. Photosynthetic development of micropropagated Strawberry plantlets following transplanting. *Annals of Botany* 55(1): 129-131.
- GUERRINI, I.A. & TRIGUEIRO, R.M. 2004. Atributos físicos e químicos de substratos compostos por biossólidos e casca de arroz carbonizada. *Revista Brasileira Ciência do Solo* 28: 1069-1076.
- JASMIM, J.M.; TOLEDO, R.R.V.; CARNEIRO, L.A. & MANSUR, E. 2006. Fibra de coco e adubação foliar no crescimento e nutrição de *Cryptanthus sinuosus*. *Horticultura Brasileira* 24: 309-314.
- KÄMPF, A.N. 1992. Bromélias. In: CASTRO, C.E.F.; ANGELIS, B.L.D.; MOURA, L.P.P.; SILVEIRA, R.B.A.; ANGELIS NETO, G. & SATO, N.T. 1992. *Manual de floricultura*. Maringá, UEM: 201-211.
- KÄMPF, A.N. 2000. *Produção comercial de plantas ornamentais*. Porto Alegre: Agropecuária. 254p.
- LAKSO, A.N.; REISH, B.I.; MONTENSEN, J. & ROBERTS, M.H. 1986 Carbon dioxide enrichment for stimulation of growth of *in vitro*-propagated grapevines after transfer from culture. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 111: 634-638.
- MAYER, J.L.S.; RIBAS, L.L.F.; BONA, C. & QUOIRIN, M. 2008. Anatomia comparada das folhas e raízes de *Cymbidium* Hort. (Orchidaceae) cultivadas *ex vitro* e *in vitro*. *Acta Botanica Brasílica* 22(2): 323-332.
- MMA. 2015a. Ministério do Meio Ambiente. Lista das espécies ameaçadas da flora do Brasil - Instrução Normativa MMA nº 06, de 23 de setembro de 2008. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/ascom_boletins/_arquivos/83_19092008034949.pdf>. Acessado em 23 dez. 2015.
- MMA. 2015b. Ministério do Meio Ambiente. Resolução Conama nº 278, de 24 de maio de 2001. Dispõe contra corte e exploração de espécies ameaçadas de extinção da flora da Mata Atlântica. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=276>>. Acessado em 23 dez. 2015.
- MOREIRA, A.S.F.P. & ISAIAS, R.M. 2008. Comparative anatomy of the absorption roots of terrestrial and epiphytic orchids. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 51: 83-93.
- MURASHIGE T & SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- NEGRELLE, R.R.B.; ANACLETO, A. & MITCHEL, D. 2005. Local production and global markets: lessons from southern Brazil. In: "A Future beneath the Trees" *International Symposium Proceedings*, Victoria (BC, Canada).
- NEGRELLE, R.R.B. & ANACLETO, A. 2012. Extrativismo de bromélias no estado do Paraná. *Ciência Rural* 42(6): 981-986.
- NOMURA, E.S.; LIMA, J.D.; GARCIA, V.A. & RODRIGUES, D.S. 2008. Crescimento de mudas micropropagadas da bananeira cv. Nanicão, em diferentes substratos e fontes de fertilizante. *Acta Scientiarum. Agronomy* 30(3): 359-363.

- OLIVEIRA, R.P.; SILVEIRA, D.G. & SILVA, S.O. 2001. Concentração de BAP e a eficiência da micropropagação de bananeira tetraplóide (grupo AAAB). *Scientia Agricola* 58(1): 73-78.
- PAULA, C.C. & SILVA, H.M.P. 2004. *Cultivo prático de bromélias*. Viçosa: UFV. 106p.
- REINERT, D.J. & REICHERT, R.M. 2006. *Propriedades físicas do solo*. Santa Maria: UFSM. 18p.
- REITZ, R. 1983. Bromeliáceas e a malária-bromélia endêmica. In: Reitz, R, (Ed.). *Flora ilustrada catarinense*. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. 518p.
- RIO GRANDE DO SUL. Decreto nº 52.109, de 01 de dezembro de 2014. Declara as espécies da flora nativa ameaçadas de extinção no Estado do Rio Grande do Sul. *Lex-Diário Oficial do Rio Grande do Sul*, ano LXXII, nº 233, 2-11. 2014.
- SALVADOR, E.D.; PAQUAL, M. & SPERA, M.R.N. 2001. Efeito de diferentes substratos no crescimento de samambaia-matogrossense (*Polypodium aureum* L.). *Ciência e Agrotecnologia* 25(4): 1006-1111.
- SANTOS, A.F.; VENTURA, G.M.; DIAS, J.M.M.; GOULART, M.S.; NOVAIS, R.F.; CECON, P.R.; TEIXEIRA, S.L. & MOURA, E. 2006. Otimização da propagação de *Sophranitis coccinea* (Orchidaceae) considerando meios de cultivo com adição de carvão ativado. *Horta* 46: 8-12.
- SASAMORI, M.H.; ENDRES JÚNIOR, D. & DROSTE, A. 2014. Sobrevivência e desenvolvimento de plântulas de *Cattleya intermedia* Graham (Orchidaceae) micropropagadas e aclimatadas em substrato com fibra de coco. *Revista Pesquisas, Botânica* 65: 293-303.
- SILVA, G.J. 1994. Saibro peneirado uma nova opção de substrato. *Revista da Sociedade Brasileira de Bromélias* 1: 1-40.
- SILVA, F.S.C. & SILVA, S.P.C. 1997. O substrato na cultura das orquídeas, sua importância, seu envelhecimento. *Revista Oficial da Orquidário, Rio de Janeiro*, 11(1): 3-10.
- SILVA, F.S.C. 2000. Haverá algum substituto para o xaxim? *Boletim da Coordenadoria das Associações Orquidófilas do Brasil* (CAOB), Rio de Janeiro, 44: 68-76.
- SILVA, A.L.L.; FRANCO, E.T.H.; WALTER, J.M.; BISOGNIN, D.A. & CALGAROTO, N.S. 2006. Aclimatização de clones de *Dyckia maritima* em diferentes substratos – Bromeliaceae. *Revista Brasileira de Agrociência* 12(4): 495-498.
- SILVA, F.C.; ABREU, M.F.; PÉREZ, D.V.; EIRA, P.A.; ABREU, C.A.; RAIJ, B.V.; GIANELLO, A.M.; COELHO, C.; QUAGGIO, J.A.; TEDESCO, M.J.; SILVA, C.A.; CANTARELLA, H. & BARRETTO, W.O. 2009. Métodos de análises químicas para avaliação da fertilidade do solo. In: Silva, F.C. (Ed.). 2009. *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes*. 2nd. Brasília, Embrapa: 108-189.
- SKREBSKY, E.C.; NICOLOSO, F.T. & FERRÃO, G.E. 2004. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). *Ciência Rural* 35(5): 1471-1477.
- SORACE, M.; FARIA, R.T.; FONSECA, I.C.B.; YAMAMOTO, L.Y. & SORACE, M.A.F. 2009. Substratos alternativos ao xaxim no cultivo do híbrido *Cattleya intermedia* X *Hadrolaelia purpurata* (Orchidaceae). *Semina: Ciências Agrárias* 30(4): 771-778.
- SOUZA, M. 2003. Muito além do xaxim. *Natureza* 2: 32-37.
- WALDEMAR, C.C. 2000. A experiência do DMLU como fornecedor de resíduos úteis na composição de substratos para plantas. In: KÄMPF, A.N. & FERMINO, M.H. (Ed.) 2000. *Substrato para plantas: a base da produção vegetal em recipientes*. Porto Alegre: Gênese, p. 171-176.
- ZIV, M. 1994. *In vitro* Acclimatization. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T. & SMITH, M.A.L. (Ed.). 1994. *Automation and environmental control in plant tissue culture*. Kluwer Academic Publisher. 493p.