



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC

CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL – PPGPV

TESE DE DOUTORADO

**AVANÇOS NO SISTEMA DE
MICROPROPAGAÇÃO DE CULTIVAR
ITALIANA DE MORANGUEIRO
'PIRCINQUE'.**

SAMILA SILVA CAMARGO

LAGES, 2018

SAMILA SILVA CAMARGO

AVANÇOS NO SISTEMA DE MICROPROPAGAÇÃO DE CULTIVAR ITALIANA DE MORANGUEIRO 'PIRCINQUE'.

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Leo Rufato

**LAGES, SANTA CATARINA
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC

Silva Camargo, Samila

Avanços no sistema de micropropagação de cultivar
italiana de morangueiro 'Pircinque'. / Samila Silva
Camargo. - Lages , 2018.

151 p.

Orientador: Leo Rufato

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages,
2018.

1. Fragaria x ananassa Duch.. 2. Propagação in
vitro. 3. Meio de cultivo. 4. Biorreatores. 5.
Aclimatização. I. Rufato, Leo. II. Universidade do
Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação.
III. Título.

SAMILA SILVA CAMARGO

AVANÇOS NO SISTEMA DE MICROPROPAGAÇÃO DE CULTIVAR ITALIANA DE MORANGUEIRO 'PIRCINQUE'.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutorado em Produção Vegetal.

Banca Examinadora:

Orientador: _____



Dr. Leo Rufato
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membros:



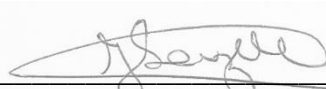
Drª Mayra Júlina Gonçalves
Universidade do Estado de Santa Catarina



Drª Francine Regianini Nerbass
Universidade do Estado de Santa Catarina



Drª Joyce Dória Rodrigues Souza
Universidade Federal de Lavras



Drª Joseane de Souza Hipólito

Lages, 21 de fevereiro de 2018.

Aos meus amores, Claudia, Estefânia e André.
Obrigada pela confiança depositada e por todo o
carinho e incentivo ao longo dessa caminhada.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À minha pequena e grande família, Claudia e Estefânia, que sempre foram muito mais que mãe e irmã, foram grandes amigas, incansáveis ao me transmitir os melhores caminhos para serem seguidos, com muito apoio, carinho, dedicação e amor. Vocês me ensinaram o verdadeiro significado da palavra cumplicidade.

Ao meu noivo e melhor amigo André, que independente da distância ou de qualquer dificuldade, nunca mediu esforços para me ajudar, me incentivar e me tornar uma pessoa melhor e mais forte, tanto pessoalmente, quanto profissionalmente. As coisas ficam muito mais fáceis ao teu lado e tu és a minha maior inspiração.

Ao professor Leo, pela oportunidade de realização do doutorado, pelos inúmeros desafios gerados e pela confiança no meu trabalho durante os últimos três anos.

Ao grupo da Fruticultura CAV/UDESC e as gurias do Laboratório de Micropropagação Vegetal, pelo convívio e amizade durante esses anos. Em especial ao meu amigo e parceiro, Maicon, que sempre esteve disposto para me ajudar. Sentirei saudades do convívio diário com vocês.

À minha amiga e comadre, Aline, um grande presente que o CAV me deu, minha melhor parceira e companheira de trabalho e que, além de tudo, me consagrou com uma das maiores alegrias que eu poderia receber, a chegada do meu afilhado Gael.

Aos amigos Mariana e Antonio e à pequena Luli, parceiros e companheiros de viagem mesmo de longe. Obrigada pela atenção e apoio durante minha estadia na Itália.

Aos funcionários do CREA-FRF (*Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura* – Forlì/Itália) e amigos que adquiri no Grupo Fragola durante meu doutorado sanduíche. Em especial, ao Gianluca pela amizade, por todos os conhecimentos passados e pela confiança em ser meu orientador por os seis meses. À Luigia, minha '*mamma*' italiana, que desde a minha chegada, me recebeu como uma filha e não mediu esforços para me ajudar, principalmente no

início, onde todos os dias surgiam novos desafios. E à Nives, uma amiga e professora excepcional, presente também nos momentos de descontração, e que com toda sua experiência e paixão pela micropropagação, me passou grandes ensinamentos. Sempre me lembrarei de todos vocês com muito carinho.

Ao pesquisador Maurizio Lambardi pela possibilidade de realização de trabalhos no CNR (*Consiglio Nazionale delle Ricerche* – Firenze/Itália) e às meninas, Aylin (Turquia) e Lara (Brasil) no auxílio nas inúmeras atividades.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de doutorado.

A todos que torceram e me incentivaram durante a obtenção dessa conquista.

MUITO OBRIGADA!

GRAZIE MILLE!

“Não corra atrás das borboletas; plante uma flor em seu jardim e todas as borboletas virão até ela.”

D. Elhers

RESUMO

CAMARGO, Samila Silva. **Avanços no sistema de micropropagação de cultivar italiana de morangueiro 'Pircinque'**. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, CAV-UDESC. 151p, Lages, SC, 2018.

A demanda por mudas de qualidade genética e sanitária está cada vez maior e por isso, a utilização de plantas matrizes oriundas da técnica de micropropagação é recomendada na produção de mudas de morangueiro. Diante disso, buscam-se estudos que possibilitem o aperfeiçoamento da técnica de cultivo *in vitro* e acelerem o processo de obtenção das mudas desta espécie. Sendo assim, o objetivo do estudo foi determinar o potencial da cultivar italiana de morangueiro 'Pircinque', quanto a sua propagação *in vitro* e em sistema automatizado – biorreatores de imersão temporária – visando produção massal de mudas, assim como, verificar a eficiência da técnica de crioconservação para a mesma cultivar. Em condições *ex vitro*, verificar a influência dos ambientes de cultivo de mudas de 'Pircinque' na extração de meristemas e, além disso, observar o crescimento da cultivar, com uso de adubo de liberação lenta (Osmocote®). O primeiro capítulo trata do estudo de diferentes meios de cultivo e seus componentes no estabelecimento e multiplicação *in vitro* de explantes de morangueiro 'Pircinque', onde se verificou que, exceto no estabelecimento, o meio de cultura MS é o mais indicado para o crescimento quando comparado ao KNOP, sendo em ambos, adicionados componentes que favorecem o crescimento da parte aérea e do sistema radicular. No segundo capítulo verificou-se a indução de calos a partir de explantes já cultivados *in vitro*, onde a calogênese foi favorecida quando as folhas foram cortadas transversalmente e cultivadas em meio de cultura com ANA (8 mg L⁻¹). No capítulo três, explantes foram propagados em sistema automatizado (biorreatores de imersão temporária) e verificou-se que é uma técnica eficiente para a multiplicação e enraizamento de morangueiro 'Pircinque', com a imersão de meio líquido MS, cinco vezes ao dia, quando comparada ao método convencional de micropropagação com uso de meio de cultura sólido. No quarto capítulo foi estudada a eficiência da crioconservação de explantes de morangueiro 'Pircinque' a partir de dois métodos distintos, *cryoplate* e *droplet*. Concluiu-se que para essa cultivar altas taxas de oxidação foram observadas quando armazenados em nitrogênio líquido e que, independente do tempo de contato da solução crioprotetora (PVS₂) com os explantes, essas taxas foram superiores a 76%. Além disso, o contato com PVS₂ nos tempos 60, 90 e 120 minutos favoreceu a sobrevivência dos explantes após a crioconservação, independente do método usado. E no último capítulo, verificou-se que o cultivo em estufa de plantas de morangueiro 'Pircinque', favorece o crescimento e desenvolvimento das mudas, assim como, a posterior extração de meristemas para uso na técnica de micropropagação. Além disso, concluiu-se que a adição de fertilizante de liberação lenta não é necessária para o crescimento e desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular de mudas micropropagadas de morangueiro 'Pircinque'.

Palavras-chave: *Fragaria x ananassa* Duch. Propagação *in vitro*. Meio de cultivo. Biorreatores. Aclimatização.

ABSTRACT

CAMARGO, Samila Silva. **Advances in the micropropagation system of Italian 'Pircinque' strawberry cultivar.** Thesis (Doctorate in Plant Production). Center of Agroveterinaries Sciences. University of Santa Catarina State. CAV-UDESC. 151p, Lages, SC, 2018.

The demand of genetic and sanitary quality for seedlings is increasing and the use of matrix plants from the micropropagation technique is recommended in the production of strawberry seedlings. Therefore, we are looking for studies that allow the improvement of the *in vitro* culture technique and accelerate the process of obtaining the seedlings of this species. The aim of the study was to determine the potential of the 'Pircinque' strawberry cultivar *in vitro* and in the automated system - temporary immersion bioreactors - for mass production of seedlings, as well as to verify the efficiency of cryopreservation technique for the same cultivar. Under *ex vitro* conditions, check the influence of 'Pircinque' seedlings on meristem extraction and, in addition, observe the growth with the use of slow release fertilizer (Osmocote®). The first chapter deals with the study of different culture media and their components in the *in vitro* establishment and multiplication of 'Pircinque' strawberry explants, where it was verified that, except in the establishment, the MS culture medium is the most suitable for growth when compared to KNOP, being in both, added components that favor the aerial and root system growth. In the second chapter the callus induction was verified from explants already cultivated *in vitro*, where calogenesis was favored when the leaves were cut crosswise and cultured in medium with ANA (8 mg L⁻¹). In chapter three, explants were propagated in an automated system (temporary immersion bioreactors) and found to be an efficient technique for the multiplication and rooting of 'Pircinque' strawberry, with the immersion of MS liquid medium, five times a day, when compared to the conventional method of micropropagation using solid culture medium. In the fourth chapter the cryopreservation efficiency of 'Pircinque' strawberry explants was studied from two different methods, cryoplate and droplet. It was concluded that this cultivar presented high oxidation rates when stored in liquid nitrogen and that, regardless of the contact time of the cryoprotectant solution (PVS₂) with the explants, these rates were higher than 76%. In addition, contact with PVS₂ at 60, 90 and 120 minutes favored the survival of the explants after cryopreservation, regardless of the method used. And in the last chapter, it was verified that the greenhouse cultivation of 'Pircinque' strawberry plants favors the growth and development of the seedlings, as well as the subsequent extraction of meristems for use in the micropropagation technique. In addition, it was concluded that the addition of slow release fertilizer is not necessary for the growth and development of the plant shoots and root system of micropropagated 'Pircinque' strawberry seedlings.

Keywords: *Fragaria x ananassa* Duch.. *In vitro* propagation. Culture méd Bioreactors. Acclimatization.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01 – Escala e intensidade de calos em explantes de morangueiro ‘Pircinque’ durante a etapa de multiplicação *in vitro*. Lages, UDESC, 2018.....61
- Figura 02 – Comprimento do explante e comprimento médio de brotações (cm), número de folhas e intensidade de calos em morangueiro ‘Pircinque’ *in vitro*, em função do meio de cultivo e concentração de sacarose. Lages/SC, 2018.....65
- Figura 03 – Comprimento da maior raiz e médio de raízes (cm) e número de raízes de morangueiro ‘Pircinque’ *in vitro*, em função do meio de cultivo e concentração de sacarose. Lages/SC, 2018.....66
- Figura 04 – Comprimento do explante e de brotações (cm) e número de brotações morangueiro ‘Pircinque’ *in vitro*, em função do meio de cultivo e combinação de sacarose e sorbitol. Lages/SC, 2018.....67
- Figura 05 – Comprimento médio e da maior raiz (cm), número de raízes e intensidade de calos em morangueiro ‘Pircinque’, em função do meio de cultivo e combinação de sacarose e sorbitol. Lages/SC, 2018.....69
- Figura 06 – Comprimento médio de brotações (cm), número de brotações e intensidade de calos *in vitro* em morangueiro ‘Pircinque’ em dois diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e concentrações de BAP (0, 1, 2 e 3 mg L⁻¹). Lages/SC, 2018.....78
- Figura 07 – Comprimento médio de raízes e maior raiz (cm) e número de raízes *in vitro* em morangueiro ‘Pircinque’ em diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e concentrações de BAP (0, 1, 2 e 3 mg L⁻¹). Lages/SC, 2018.79
- Figura 08 – Comprimento da maior raiz (cm) e número de raízes *in vitro* de explantes de morangueiro ‘Pircinque’ em dois diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e concentrações de GA₃ (0, 0,125, 0,250 e 0,375 mg L⁻¹). Lages/SC, 2018.....81
- Figura 09 – Comprimento do explante e médio de brotações (cm) e número de brotações e folhas de explantes de morangueiro ‘Pircinque’ em dois diferentes meios líquidos de cultivo (KNOP e MS) e combinações de citocinina e carvão ativado. Lages/SC, 2018.....82
- Figura 10 – Comprimento da maior raiz e médio de raízes (cm), número médio de raízes e intensidade de calos de explantes de morangueiro ‘Pircinque’ em dois diferentes meios líquidos de cultivo (KNOP e MS) e combinações de citocinina e carvão ativado. Lages/SC, 2018.....84

Figura 11 – Escala e intensidade de calos em explantes oriundos de folhas <i>in vitro</i> de morangueiro ‘Pircinque’ em função do tipo de corte e reguladores de crescimento em distintas concentrações. Lages/SC, 2018.....	89
Figura 12 – Tamanho dos calos (cm ²) em explantes oriundos de folhas <i>in vitro</i> de morangueiro ‘Pircinque’ em função do tipo de corte, reguladores de crescimento em distintas concentrações. Lages/SC, 2018.....	90
Figura 13 – Intensidade de calos em explantes oriundos de folhas <i>in vitro</i> de morangueiro ‘Pircinque’ em função do tipo de corte, reguladores de crescimento em distintas concentrações. Lages/SC, 2018.....	92
Figura 14 – Tamanho dos calos (cm ²) e intensidade de calos em explantes oriundos de folhas <i>in vitro</i> de morangueiro ‘Pircinque’ em função do tipo de corte e reguladores de crescimento. Lages/SC, 2018.....	93
Figura 15 – Sistema de biorreatores de imersão temporária em frascos duplos para multiplicação e enraizamento de explantes de morangueiro ‘Pircinque’. Lages/SC, 2018.....	98
Figura 16 – Número de folhas em explantes de morangueiro ‘Pircinque’ multiplicados em biorreatores de imersão temporária. Lages/SC, 2018.....	100
Figura 17 – Comprimento do explante e médio de brotações (cm) em explantes de morangueiro ‘Pircinque’ multiplicados em biorreatores de imersão temporária. Lages/SC, 2018.....	101
Figura 18 – Comprimento do explante e de brotações (cm) e intensidade de calos em explantes de morangueiro ‘Pircinque’ durante fase de enraizamento em biorreatores de imersão temporária. Lages/SC, 2018.....	103
Figura 19 – Número médio de folhas e raízes em explantes de morangueiro ‘Pircinque’ durante fase de enraizamento em biorreatores de imersão temporária. Lages/SC, 2018.....	104
Figura 20 – Número de explantes de morangueiro ‘Pircinque’ oxidados após técnicas de crioconservação (<i>cryoplate</i> e <i>droplet</i>), em armazenamento ou não em nitrogênio líquido (testemunha e nitrogênio líquido). Lages/SC, 2018.....	111
Figura 21 – Número de explantes de morangueiro ‘Pircinque’ oxidados após diferentes tempos de PVS ₂ (0, 30, 60, 90 e 120 minutos) e armazenamento ou não em nitrogênio líquido (testemunha e nitrogênio líquido). Lages/SC, 2018.....	112

- Figura 22 – Número de explantes sobreviventes de morangueiro ‘Pircinque’ após técnicas de crioconservação (*cryoplate* e *droplet*), em diferentes tempos de PVS₂ (0, 30, 60, 90 e 120 minutos) e armazenamento ou não em nitrogênio líquido (Test - testemunha e NL - nitrogênio líquido). Lages/SC, 2018.....113
- Figura 23 – Massa fresca (g), índice de clorofila (unidades SPAD) e número de folhas de morangueiro ‘Pircinque’ plantadas em substrato com diferentes doses de Osmocote® (g planta⁻¹). Lages/SC, 2018.....123
- Figura 24 – Número de raízes, comprimento da maior raiz (cm) e comprimento médio de raízes (cm) de mudas de morangueiro ‘Pircinque’ plantas em substrato com diferentes doses de Osmocote® (g planta⁻¹). Lages/SC, 2018.....125

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01 – Porcentagem de sobrevivência, oxidação e contaminação fúngica e bacteriana de meristemas de morangueiro ‘Pircinque’ em diferentes meios de cultivo (KNOP e MS), presença do biocida PPM® e cloreto de ferro. Lages/SC, 2018.....63
- Tabela 02 – Comprimento da maior raiz e médio de raízes (cm) de explantes de morangueiro ‘Pircinque’ em diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e concentrações do agente solidificante (5, 6 e 7 g L⁻¹). Lages/SC, 2018.....70
- Tabela 03 – Comprimento do explante e de brotações (cm) e número de brotações e folhas de morangueiro ‘Pircinque’ cultivados *in vitro* em meios de cultivo KNOP e MS e concentrações do agente solidificante (5, 6 e 7 g L⁻¹). Lages/SC, 2018.....70
- Tabela 04 – Número de raízes e intensidade de calos *in vitro* de morangueiro ‘Pircinque’ em diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e concentrações do agente solidificante (5, 6 e 7 g L⁻¹). Lages/SC, 2018.....71
- Tabela 05 – Comprimento do explante e médio de raízes (cm), número de raízes e intensidade de calo *in vitro* de morangueiro ‘Pircinque’ em dois diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e concentrações de carvão ativado (0, 2 e 4 g L⁻¹). Lages/SC, 2018.....72
- Tabela 06 – Comprimento médio de brotações e da maior raiz (cm) e número de brotações e folhas em morangueiro ‘Pircinque’ *in vitro*, em função do meio de cultivo (KNOP e MS) e concentração de carvão ativado (0, 2 e 4 g L⁻¹). Lages/SC, 2018.....73
- Tabela 07 – Variáveis da parte aérea na multiplicação *in vitro* de explantes de morangueiro ‘Pircinque’ em diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e distintas fontes de ferro nos mesmos (Fe EDTA e Fe EDDHA). Lages/SC, 2018.....74
- Tabela 08 – Variáveis sistema radicular na multiplicação *in vitro* de explantes de morangueiro ‘Pircinque’ em diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e distintas fontes de ferro nos mesmos (Fe EDTA e Fe EDDHA). Lages/SC, 2018.....75
- Tabela 09 – Comprimento das brotações e médio de raízes (cm), número de brotações, folhas e raízes e intensidade de calos em morangueiro ‘Pircinque’ *in vitro* em diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e número de folhas (0, 2 e 4). Lages/SC, 2018.....76
- Tabela 10 – Comprimento do explante e da maior raiz (cm) em morangueiro ‘Pircinque’ *in vitro* em diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e número de folhas (0, 2 e 4). Lages/SC, 2018.....76

Tabela 11 – Comprimento do explante (cm) e número de folhas <i>in vitro</i> em morangueiro ‘Pircinque’ em dois diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e concentrações de BAP (0, 1, 2 e 3 mg L ⁻¹). Lages/SC, 2018.....	77
Tabela 12 – Multiplicação <i>in vitro</i> de explantes de morangueiro ‘Pircinque’ em dois diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e concentrações de GA ₃ (0, 0,125, 0,250 e 0,375 mg L ⁻¹). Lages/SC, 2018.....	80
Tabela 13 – Meio de cultivo e componentes a serem adicionados aos mesmos nas etapas de cultivo <i>in vitro</i> de explantes de morangueiro ‘Pircinque’.....	85
Tabela 14 – Número de brotações e escala de intensidade de calos (0 a 2) em explantes de morangueiro ‘Pircinque’ multiplicados em biorreatores de imersão temporária. Lages/SC, 2018.....	99
Tabela 15 – Número de brotações, comprimento da maior e médio de raízes (cm) e intensidade de calos em explantes de morangueiro ‘Pircinque’ durante enraizamento em biorreatores de imersão temporária. Lages/SC, 2018.....	102
Tabela 16 – Número de flores, folhas e estolões e comprimento final (cm) de mudas micropropagadas de morangueiro ‘Pircinque’ em diferentes ambientes (campo, telado, estufa, B.O.D. e sala de crescimento). Lages/SC, 2018.....	120
Tabela 17 – Porcentagem de meristemas com contaminação bacteriana, oxidados e sobreviventes de morangueiro ‘Pircinque’ extraídos de plantas cultivadas em diferentes ambientes (campo, telado, estufa, B.O.D. e sala de crescimento). Lages/SC, 2018.....	121

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Certificado de registro da cultivar de morangueiro ‘Pircinque’, a partir de cadastro ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Lages/SC, 2018.....	152
---	-----

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Comparação dos nutrientes dos meios de cultivo KNOP (KNOP, 1865) modificado e MS (Murashige e Skoog, 1962). Lages/SC, 2018.....	154
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Micromol por metro quadrado por segundo
2iP	2-isopenteniladenina
AIB	Ácido indol-3-butírico
ANA	Ácido α -naftaleno-1-acético
atm	Atmosfera
BAP	6-Benzilaminopurina
cm	Centímetros
cm^2	Centímetros quadrados
cv.	Cultivar
EDDHA	Ácido etilenodiamino [o-hidrofenilacético]
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
Fe	Ferro
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de ferro
g L^{-1}	Gramas por litro
GA_3	Ácido giberélico
KNOP	Meio de cultura Knop (KNOP, 1865)
M	Concentração molar
mg L^{-1}	Miligramas por litro
min	Minutos
mL L^{-1}	Mililitros por litro
mm	Milímetros
MS	Meio de cultura Murashige e Skoog (1962)
NaClO	Hipoclorito de sódio
NL	Nitrogênio líquido
PPM	<i>Plant Preservative Mixture</i>
PVS_2	<i>Plant Vitrification Solution</i> nº 2
x/dia	Vezeas ao dia

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	39
1.1 OBJETIVOS.....	41
1.1.1 Objetivo Geral	41
1.1.2 Objetivos Específicos	42
1.2 HIPÓTESES.....	42
1.3 JUSTIFICATIVA	43
2 REVISÃO DA LITERATURA	45
2.1 A CULTURA DO MORANGUEIRO	45
2.2 PRODUÇÃO DE MUDAS DE MORANGUEIRO	46
2.2.1 Propagação através de estolões	47
2.2.2 Propagação através do cultivo <i>in vitro</i>	49
2.2.3 Propagação através de sistema automatizado (biorreatores)	52
2.3 CONSERVAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EXPLANTES.....	53
3 MÚLTIPLOS FATORES <i>IN VITRO</i> PROPORCIONAM ESTABELECIMENTO E MULTIPLICAÇÃO DA CULTIVAR ITALIANA DE MORANGUEIRO PIRCINQUE. .	57
RESUMO	57
3.1 INTRODUÇÃO	58
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	59
3.2.1 Estabelecimento <i>in vitro</i>	59
3.2.2 Multiplicação <i>in vitro</i>	61
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
3.4 CONCLUSÕES	85
4 CALOGÊNESE A PARTIR DE FOLHAS DE EXPLANTES DE CULTIVAR ITALIANA DE MORANGUEIRO ‘PIRCINQUE’.	87
RESUMO	87
4.1 INTRODUÇÃO	87
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	88
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
4.4 CONCLUSÕES	94
5 MULTIPLICAÇÃO E ENRAIZAMENTO DE CULTIVAR ITALIANA DE MORANGUEIRO ‘PIRCINQUE’ EM BIORREACTORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA.	95
RESUMO	95

5.1 INTRODUÇÃO	95
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	97
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
5.4 CONCLUSÕES	105
6 CRIOCONSERVAÇÃO DE EXPLANTES DE MORANGUEIRO ‘PIRCINQUE’ A PARTIR DAS TÉCNICAS CRYOPLATE E DROPLET¹	107
¹ Capítulo desenvolvido durante o período de doutorado sanduíche no <i>Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura - Unità di Ricerca per la Frutticoltura</i> , CREA-FRF (Forlì - Itália), realizado de janeiro a julho de 2017.	107
RESUMO	107
6.1 INTRODUÇÃO	107
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	109
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	111
6.4 CONCLUSÕES	114
7 DIFERENTES AMBIENTES PARA EMISSÃO DE ESTOLÕES E FERTILIZANTE DE LIBERAÇÃO LENTA NO DESENVOLVIMENTO EX VITRO DE ‘PIRCINQUE’.	115
RESUMO	115
7.1 INTRODUÇÃO	115
7.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	117
7.2.1 Experimento 1 – Ambientes de cultivo de mudas de morangueiro ‘Pircinque’ visando à extração de meristemas para cultivo <i>in vitro</i>.	117
7.2.2 Experimento 2 – Fertilizante de liberação lenta no crescimento <i>ex vitro</i> de mudas micropropagadas de morangueiro ‘Pircinque’.	119
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	120
7.3.1 Experimento 1	120
7.3.2 Experimento 2	122
7.4 CONCLUSÕES	126
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	127
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
10 ANEXOS	149
11 APÊNDICES	151

1 INTRODUÇÃO GERAL

O grupo conhecido como “pequenas frutas” compreende as culturas da amora, framboesa, mirtilo, morango, physalis, e também as nativas, como pitanga, araçá, butiá, uvaia, goiaba serrana, entre outras e dentro deste grupo, o morango é o mais popular, com maior área cultivada, maior tradição de cultivo no Brasil (PAGOT e HOFFMANN, 2003) e de maior expressão econômica dentro da cadeia produtiva das pequenas frutas.

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) é produzido e apreciado nas mais variadas regiões do mundo, sendo o Brasil o segundo maior produtor da América Latina (CARVALHO et al., 2013; ROSA et al., 2013). Dessa forma, representa uma cultura de considerável expressão econômica para produtores brasileiros, tendo grande destaque em estados como Minas Gerais, Rio Grande do Sul, São Paulo e Espírito Santo (PEREIRA et al., 2013). O destaque na produção da espécie baseia-se não somente no retorno econômico que esse pequeno fruto proporciona, mas também, por ser rico em fibras, vitamina C e do complexo B, cálcio, magnésio, fósforo e ferro e, além disso, apresentar baixas calorias (TACO, 2011; DONNO, 2013). Com isso, por seu sabor agradável e cor atraente, constitui um grande mercado nas principais economias do mundo, podendo ser consumido *in natura* ou industrializado (MADAIL et al., 2007).

Mesmo sendo uma espécie perene, o morangueiro é cultivado como uma planta anual e, por esse motivo, a etapa de produção de mudas é crucial já que a renovação das plantas acarreta investimento de recursos que representam até 45% do custo de produção (OLIVEIRA et al., 2010).

Atualmente, 90% das mudas plantadas no Brasil são de origem chilena ou argentina, entretanto, nos últimos anos aumentou a procura por materiais nacionais devido a introdução de novas cultivares que não são produzidas pelos países citados anteriormente, o que justifica a retomada de propagação no país visando a potencialização do sistema de produção de morangos. Segundo Passos (1997), nas duas últimas décadas foi intensa a introdução de novas cultivares de morangueiro oriundas de outros países, porém sem estudos prévios, o que é inadequado, já que a escolha da cultivar é a questão-chave para o sucesso na produção de frutos em diferentes sistemas de cultivo (RUAN et al., 2013).

Historicamente, as cultivares introduzidas no Brasil foram originárias dos programas de melhoramento genético dos EUA (Universidades da Flórida e Califórnia) e da Espanha (ANTUNES e PERES, 2013). Contudo, recentemente o Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC), juntamente com o *Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e L'analisi Dell'economia Agraria - Unità di Ricerca per la Frutticoltura* - Forlì, CREA-FRF (Itália) conduziram o projeto “Criação e adaptação de genótipos de morangueiro por meio da cooperação científica com o CREA-FRF – Itália” a fim de introduzir e difundir novos materiais genéticos no Brasil. O mesmo foi caracterizado por três áreas temáticas fundamentais para a cadeia produtiva do morango: *i*) adaptabilidade de cultivares e seleções de morangueiros; *ii*) melhoramento genético e *iii*) micropropagação de morangueiro.

Atualmente o CREA-FRF coordena oito programas de melhoramento genético localizados nas principais regiões produtoras de morango da Itália (BARUZZI et al., 2017) e a partir destes, a cultivar Pircinque foi criada pelos pesquisadores doutores Walther Faedi e Gianluca Baruzzi (FAEDI et al., 2014). Na primeira geração de plantas obtidas pelo cruzamento, no ano de 2006, na cidade de Scanzano Jonico, o genótipo PIR 04.228.05 foi selecionado no campo genético de ‘*seedlings*’ em virtude do hábito de crescimento e rusticidade da planta, da presença de frutos grandes, uniformes, de formato cônico e com elevados valores de sólidos solúveis e firmeza de polpa, além da sensibilidade da planta ao fotoperíodo de dia curto (BARUZZI et al., 2017; FAEDI et al., 2014).

As características da nova cultivar, já protegida e registrada no Brasil (Anexo A), já estão sendo estudadas nas condições do Brasil. Fagherazzi et al. (2017), comparou seis cultivares de morangueiro (Camarosa, Oso Grande, Strawberry Festival, Albion, Jonica e Pircinque) no Planalto Sul Catarinense e foi observado na cultivar Pircinque as maiores relações entre as variáveis ‘firmeza de polpa x produção total’, ‘sólidos solúveis x produção total’ e entre ‘sólidos solúveis x firmeza de polpa’. E através desta pesquisa, os mesmos autores concluíram que o morango italiano ‘Pircinque’ é uma cultivar promissora junto aos produtores brasileiros da espécie.

No método tradicional de produção de mudas de morangueiro, o plantio das matrizes é realizado no solo. Entretanto a taxa de propagação é baixa, as mudas obtidas são desuniformes e a contaminação por doenças é elevada, principalmente pela antracnose (*Colletotrichum* spp.) (SANTOS e MEDEIROS, 2003).

No Brasil, na produção de mudas de morangueiro, o produtor adquire plantas matrizes oriundas de cultura de tecidos de laboratórios credenciados, e faz o plantio a campo aberto e as plantas obtidas desta matriz são diretamente utilizadas pelos produtores (ANTUNES e REISSER JÚNIOR, 2007). A busca por mudas produzidas por essa técnica ocorre devido à necessidade de alta qualidade de produto para a comercialização, exigência do mercado consumidor e ainda, que propiciem quantidade suficiente para atender a demanda (DIAS et al., 2014).

De acordo com Oliveira et al. (2005), as cultivares de morangueiro são bastante responsivas *in vitro*, com taxas de multiplicação superiores às de outras espécies. Dessa forma, o emprego da técnica de cultura de tecidos possibilita a produção do maior número de plantas possível no menor espaço de tempo, por meio de vários ciclos de multiplicação *in vitro* (FONSECA et al., 2013). Sendo assim, a utilização dessa técnica com o objetivo de melhorar a rentabilidade das culturas, tem-se apresentado como instrumento importante que pode ser explorado pelos pesquisadores, produzindo plantas com elevada qualidade sanitária (SOUZA et al., 2006).

Entretanto, essa técnica apresenta como principal desvantagem o elevado custo de produção de produção das mudas, em virtude dos equipamentos e reagentes utilizados e, devido a elevada exigência de mão de obra especializada. Além disso, Lemos (2013) destaca também, a diminuição da taxa de multiplicação e biomassa devido à baixa taxa de absorção dos nutrientes pelos explantes.

Nesse sentido, como alternativa e aumento da eficiência do cultivo *in vitro*, visando atender a demanda de mudas, Teixeira (2011) afirma que o uso de biorreatores é a tecnologia mais recente e a alternativa mais promissora nesse campo, sendo uma técnica econômica e simples, resultando em plantas muito melhores que as produzidas no sistema convencional.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Otimizar a técnica de produção de mudas de morangueiro da cultivar Pircinque por meio de propagação *in vitro* e em sistema automatizado, visando produção massal de mudas, assim como, verificar a eficiência da técnica de crioconservação, além de

estudar as condições *ex vitro* dessa cultivar em diferentes ambientes de cultivo e uso de adubo de liberação lenta.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Otimizar o protocolo de micropropagação da cultivar Pircinque, a fim de obter mudas em escala comercial e em um menor período de tempo, para atender a demanda crescente de material propagativo para viveiros comerciais.

- Estudar e comparar os meios de cultura utilizados no Brasil e na Itália, para determinar qual é o mais indicado para o crescimento *in vitro* da cultivar Pircinque.

- Identificar diferentes componentes a serem adicionados ao meio de cultura, que favoreçam a multiplicação e enraizamento de explantes do morangueiro 'Pircinque'.

- Verificar o crescimento de seus explantes em sistema automatizado, com uso de meio de cultura líquido, através de biorreatores de imersão temporária, durante as etapas de multiplicação e enraizamento.

- Determinar a capacidade de sobrevivência e índices de oxidação de explantes de morangueiro 'Pircinque' em condições de crioconservação.

- Definir o ambiente mais adequado para manutenção de mudas matrizes com objetivo de produção de estolões e conseqüentemente, extração de meristemas para estabelecimento *in vitro*.

- Pesquisar a influência do fertilizante de liberação lenta, Osmocote®, no crescimento de mudas micropropagadas de morangueiro 'Pircinque'.

1.2 HIPÓTESES

- O protocolo brasileiro, com uso do meio de cultivo MS, é mais eficiente para a produção de mudas *in vitro* de morangueiro 'Pircinque' do que o utilizado na Itália (KNOP).

- A utilização de biorreatores com meio de cultura líquido em imersão temporária é uma técnica que possibilita a produção de um maior número de mudas de morangueiro, em um menor período de tempo, quando comparado ao cultivo em meio de cultura sólido.

- A técnica de crioconservação *in vitro* de morangueiros cv. Pircinque é eficiente e proporciona a sobrevivência e manutenção dos explantes.

- O ambiente de manutenção de mudas de morangueiro 'Pircinque' influencia diretamente o crescimento e desenvolvimento das mesmas, assim como, a sobrevivência de meristemas, após o estabelecimento *in vitro*.

- A utilização do fertilizante de liberação lenta (Osmocote®) favorece o crescimento de mudas de cv. italiana de morangueiro 'Pircinque'.

1.3 JUSTIFICATIVA

Diante do exposto, busca-se explorar diferentes metodologias, sendo estas aplicáveis a cultura do morangueiro, com intuito de otimizar a propagação *in vitro* desta espécie, especificamente para a cultivar italiana 'Pircinque' e utilizar um sistema com automação, a partir do uso de biorreatores de imersão temporária. Dessa forma, a tese foi estruturada em cinco capítulos distintos, descritos a seguir.

- I. Múltiplos fatores *in vitro* proporcionam estabelecimento e multiplicação da cultivar italiana de morangueiro Pircinque.
- II. Calogênese a partir de folhas de explantes de cultivar italiana de morangueiro 'Pircinque'.
- III. Multiplicação e enraizamento de cultivar italiana de morangueiro 'Pircinque' em biorreatores de imersão temporária.
- IV. Crioconservação de explantes de morangueiro 'Pircinque' a partir das técnicas *cryoplate* e *droplet*.
- V. Diferentes ambientes para emissão de estolões e fertilizante de liberação lenta no desenvolvimento *ex vitro* de 'Pircinque'.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A CULTURA DO MORANGUEIRO

O morangueiro pertence à família Rosaceae e ao gênero *Fragaria*, possui número de cromossomos igual a sete e compreende 17 espécies silvestres classificadas quanto ao nível de ploidia (RIOS, 2007). As espécies octoplóides *F. chiloensis* e *F. virginiana*, quando cruzadas, resultaram o híbrido *Fragaria x ananassa* Duch. (ocorrida casualmente, nas proximidades de Brest na França, possivelmente por volta de 1750), originando às cultivares comerciais hoje cultivadas (SILVA et al., 2007).

É uma planta herbácea perene, porém cultivada como anual, que forma uma espessa roseta, podendo ser rasteira ou atingir de 15 a 30 cm de altura, com caule curto, denominado coroa. É típica de climas frios, sendo as altas temperaturas o principal fator limitante da cultura, sendo sensível à variação fotoperiódica, onde plantas de dias curtos têm o desenvolvimento vegetativo favorecido, estímulo da emissão de estolões e inibição do florescimento durante o verão (FILGUEIRA, 2007).

A cultura gera alta rentabilidade aos agricultores, por sua vez, os consumidores também possuem ampla exigência sobre esta fruta, em parte pelas suas diferentes formas de processamento e utilização, seja *in natura* ou na forma de compotas, geleias, sorvetes, polpas e sucos (FACCHINELO et al., 2011). Sendo assim, assume importante papel socioeconômico em âmbito nacional e regional e por ser uma fruta muito saborosa e rica em vitaminas, caracteriza-se por ocupar pequenas áreas e exigir acentuada mão de obra durante a implantação e o manejo do cultivo (GOMES et al., 2013).

Possui ampla distribuição geográfica em virtude de sua alta capacidade de adaptação às condições de cultivo e de clima (MORALES et al., 2012), sendo que a produção mundial de morango no ano de 2016 foi de 9,1 milhões de toneladas com uma área plantada de 401.864 hectares de acordo com a *Food and Agriculture Organization* – FAO (FAOSTAT, 2018).

A produção de morangos no Brasil tem crescido nos últimos anos, estimando-se uma produção anual de 100 mil toneladas em 3.500 ha (ANTUNES et al., 2010; COSTA et al., 2011), sendo o maior produtor brasileiro o Estado de Minas Gerais, com

95% da sua produção concentrada na Região Sul, devido as características edafoclimáticas que favorecem o cultivo (SILVEIRA e GUIMARÃES, 2014). Este estado, segundo o Instituto Brasileiro de Frutos (IBRAF), produz cerca de 40 mil toneladas por ano, o equivalente a 40% da produção nacional, seguido de São Paulo (20 mil toneladas por ano) e do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Espírito Santo e Rio de Janeiro, respectivamente (ANTUNES et al., 2010). Dessa forma, os três principais estados produtores, destacam-se em produção, com mais de 80% do total nacional (REICHERT e MADAIL, 2003; IEA, 2008). Entretanto, também se observa um crescimento da produção em regiões com diferentes condições edafoclimáticas, como Santa Catarina, Paraná, Espírito Santo, Goiás e Distrito Federal (ANTUNES e REISSER JÚNIOR, 2007).

Sendo assim, o morangueiro tornou-se uma importante cultura no Brasil devido a sua alta rentabilidade econômica, amplo conhecimento pelos consumidores e grande diversidade na comercialização (FACHINELLO et al., 2011), além do importante papel social, pois é produzido em pequenas propriedades e com grande utilização de mão de obra familiar (ALMEIDA et al., 2014).

2.2 PRODUÇÃO DE MUDAS DE MORANGUEIRO

O vigor e a sanidade da muda configuram-se como pré-requisitos essenciais para a obtenção de elevada produtividade de frutos (VERDIAL et al., 2009; ANTUNES e COCCO, 2012), já que esta é uma das necessidades mais relevantes no sistema de produção do morangueiro, sendo a base para a obtenção de melhores respostas às tecnologias empregadas no processo produtivo, pois está diretamente relacionada com a produtividade e a qualidade da fruta (OLIVEIRA e SCIVITTARO, 2009).

O Brasil necessita anualmente em torno de 175 milhões de mudas de morangueiro (ANTUNES e PERES, 2013), em contrapartida, o processo de obtenção de mudas é uma das etapas críticas para o sucesso do cultivo, porque envolve decisões gerenciais relevantes, como a qualidade do material propagativo, o preço unitário, a disponibilidade e a escolha das cultivares (HENZ, 2010).

Um dos aspectos atualmente limitantes à produtividade do morangueiro no Brasil é a escassez de mudas de elevadas qualidades fisiológica e sanitária (OLIVEIRA et al., 2010). A qualidade das mudas está entre os fatores que tem maior

influência às tecnologias empregadas no processo produtivo na cultura, que renovada anualmente, pode evitar acúmulo de doenças e pragas de um ano de cultivo para outro (OLIVEIRA et al., 2005), além de estar diretamente relacionada com a produtividade e a qualidade do fruto (OLIVEIRA e SCIVITTARO, 2009; HENZ, 2010).

De acordo com Oliveira et al. (2005), o setor produtivo apresenta quatro situações distintas em relação a origem das mudas: importação principalmente do Chile e da Argentina; aquisição em viveiros registrados existentes no país; produção em suas propriedades após compra de matrizes de laboratórios e produção a partir de material direto da lavoura.

Das 175 milhões de mudas necessárias para atender a demanda do Brasil, cerca de 50 milhões são importadas do Chile ou Argentina (ANTUNES e COCCO, 2012) e a justificativa para utilização destas ocorre porque estes materiais propagativos apresentam boa qualidade fisiológica e fitossanitária, o que é fundamental para o alcance de elevadas produtividades (PORTELA et al., 2012). Entretanto, os produtores relatam altos custos gerados da compra dessas mudas importadas, e que as mesmas chegam após o período ideal de plantio, o que, conseqüentemente atrasa o ciclo de produção obrigando-os a manter a muda por dois anos no campo para garantir produção rentável no segundo ano e assim, recuperar o valor investido.

2.2.1 Propagação através de estolões

No Brasil, a propagação comercial do morangueiro ocorre de forma assexuada, por meio de estolões emitidos pela planta que são enraizados no solo ou em substratos, podendo ser comercializados como muda de raiz nua ou em torrão (GIMÉNEZ et al., 2009; VERDIAL et al., 2009; BEYENE et al., 2012). Estes estolões são originados a partir de gemas basais da folha e crescem sobre a superfície do solo com capacidade de emitir raízes e dar origem a novas plantas, sendo eles a principal forma de propágulo da espécie (HOFFMANN e BERNARDI, 2006). Por outro lado, utiliza-se também a propagação sexuada, a partir de sementes, portanto, é utilizada apenas no melhoramento genético para obter variabilidade genética nos materiais em estudo (OLIVEIRA e BONOW, 2012).

No método tradicional de produção de mudas de morangueiro, o plantio das matrizes é realizado no solo, através de mudas de raízes nuas, nos quais se formam estolões oriundos da planta mãe formando novas mudas, que enraízam em torno da matriz e posteriormente são arrancadas e comercializadas com raízes nuas (COCCO et al., 2010; BARBOSA et al., 2013), sendo que a produção destas é realizada por viveiristas registrados e sujeitos a fiscalização (GUIMARÃES et al., 2015).

Muitos produtores produzem suas próprias mudas utilizando os estolões das plantas que produziram frutos no ano anterior, no entanto, estas serão menos produtivas, devido à possível ocorrência de viroses e doenças radiculares, sendo necessária a substituição anual das lavouras por mudas compradas junto à viveiristas especializados (FILGUEIRA, 2000; GUIMARÃES et al., 2015). A cultura do morangueiro é muito suscetível a doenças viróticas e a microrganismos patogênicos, como fungos e bactérias e, através da propagação por via vegetativa, utilizando estolões de plantas infectadas, pode ocorrer a disseminação de doenças (CALVETE et al., 2002).

A forma mais comum de comercialização de mudas por essa técnica é através de raiz nua, produzidas através do plantio de mudas matrizes no solo desinfestado, para que os estolões emitidos enraízem durante a primavera e o verão, e em seguida, as mudas sejam arrancadas do solo e comercializadas (GUIMARÃES et al., 2015). Entretanto, uma segunda forma de produção de estolões vem sendo muito utilizada por viveiristas em diversos países da Europa e América do Norte, denominada de *plug plants* (plantas em torrão), que consiste em plantar as mudas matrizes fora do solo e assim, as pontas dos estolões emitidas no verão são retiradas antes de enraizarem e colocadas para enraizar em bandejas com substrato, originando uma muda que é comercializada como torrão (DURNER et al., 2002; SANTOS e MEDEIROS, 2003; SCHMITT et al., 2012).

Dentre as vantagens do uso dessas mudas em torrão, destaca-se o fato de evitar o uso de produtos fumigantes para a desinfestação do solo, obtenção de plantas homogêneas com elevada taxa de sobrevivência após o plantio, atingindo maior precocidade e produtividade de frutas em comparação com as mudas de raízes nuas (DURNER et al., 2002; TAKEDA e HOKANSON, 2003; HOCHMUTH et al., 2006; GIMENEZ et al., 2009). Entretanto, de acordo com Guimarães et al. (2015), exige produção elevada de pontas de estolões em um curto espaço de tempo, a fim de produzir as mudas comerciais destinadas à renovação anual das lavouras no início do

outono e além disso, os estolões emitidos fora do período destinado à produção de mudas, são retirados das plantas matrizes e descartados, gerando desperdício e necessidade extra de mão de obra.

Aliado a essa forma de propagação, vale ressaltar que os fatores ambientais, principalmente temperatura, fotoperíodo e suas interações, exercem importante papel no crescimento, desenvolvimento e produção do morangueiro (SILVA et al., 2007), sendo que na fase vegetativa, o desenvolvimento dos estolões necessita temperaturas elevadas e fotoperíodos longos (RIOS, 2007).

Em suma, a produção de mudas por meio de estolões é uma técnica muito utilizada pelos viveiristas e produtores, devido a facilidade de execução, entretanto, Biswas et al. (2008) enfatizam as limitações deste tipo de propagação vegetativa convencional de plantas, especialmente no morangueiro, principalmente quanto a presença de patógenos no material a ser propagado, cuja infecção é mantida nos diferentes ciclos de cultivo, tendendo a acentuar e degenerar gradualmente a performance das cultivares.

2.2.2 Propagação através do cultivo *in vitro*

De acordo com Schuch e Erig (2005), a aplicação da micropropagação é importante devido à elevada qualidade fitossanitária e homogeneidade das plantas produzidas e, além disso, a técnica é uma alternativa quando se tem um limitado número de plantas matrizes ou quando se necessita grande número de plantas com uniformidade e qualidade (ALBERT et al., 2009). Aliado a isso, esta técnica permite a produção massal de mudas com alta qualidade genética e fitossanitária, atendendo as exigências e padrões necessários para a produção de matrizes de morangueiro (DIAS et al., 2014).

Todavia, o custo final desta muda é elevado, já que o material vegetal utilizado para a propagação *in vitro* fica submetido às condições controladas de luz, fotoperíodo e temperatura, interagindo com substâncias orgânicas, como os hormônios, que desempenham importante função na regulação do crescimento (SCHUCH e ERIG, 2005). Apesar dessa limitação, a técnica torna-se bastante vantajosa, pois as plantas matrizes produzidas *in vitro*, podem assegurar a qualidade fisiológica e sanitária das mudas (GIMÉNEZ et al., 2008).

Para a produção em larga escala de plantas de morangueiro, a propagação *in vitro* é uma forma prática e eficaz, em função de permanecerem em um ambiente controlado e livre de doenças e por serem utilizadas plantas matrizes isentas de vírus, são utilizadas na produção comercial de mudas (BARBOSA et al., 2013; CALVETE et al., 2009). Além disso, a utilização de mudas sadias consiste no ponto de partida para a obtenção de um melhor nível de resposta a qualquer tecnologia empregada no processo produtivo do morangueiro (BRAHM e OLIVEIRA, 2004).

Na produção de mudas dessa espécie é recomendado que sejam adquiridas plantas matrizes oriundas da cultura de tecidos (ANTUNES e FILHO, 2005) devido à necessidade de alta qualidade de produto para a comercialização, exigência do mercado consumidor e que apresentem alto padrão e em quantidade suficiente para atender a demanda (DIAS et al., 2014).

A utilização de processos biotecnológicos na produção de mudas de morangueiro passou a ser feita no Brasil no final da década de 70 na Embrapa Clima Temperado, em Pelotas/RS (FORTES, 2003). Através da cultura de meristemas e propagação rápida *in vitro*, passaram a ser produzidas, em larga escala, plantas livres de vírus para uso em pesquisas e fornecimento a multiplicadores. Madail (1982) observou que em lavouras implantadas com mudas sadias da cv. Konvoy Cascata, nas quais eram aplicadas práticas culturais adequadas, produziram até três vezes mais do que lavouras comuns e constataram que, excluídos outros fatores, plantas livres de vírus da mesma cultivar tiveram produtividade 50% superiores àquelas naturalmente infectadas por complexo de viroses.

Aliado a isso, atualmente novos patamares de produtividade do morangueiro têm sido atingidos como resultado da limpeza viral por meio de cultura de tecidos, onde o emprego da cultura de meristemas e propagação rápida *in vitro* possibilita a produção, em larga escala, de plantas livres de vírus para uso em pesquisas e para fornecimento a viveiristas e a produtores de morango (BRAGA et al., 2009).

Para possível limpeza de viroses *in vitro*, os propágulos devem ser oriundos da cultura meristemas, multiplicados pela técnica de micropropagação, que compreende: coleta do material vegetal, desinfestação e inoculação dos explantes em meio próprio para a regeneração das partes aéreas, com posterior multiplicação, enraizamento e aclimatização (AUGUSTIN et al., 2002). Isso ocorre porque essa técnica é capaz de reproduzir fielmente as características genéticas da planta mãe, possibilitar a obtenção de material com baixíssimo índice de perdas por contaminação, permitir a

eliminação de outros patógenos como vírus e bactérias, devido à ausência de vascularização dos tecidos, reduzir as chances de haver variação somaclonal, além da economia de tempo quando comparada com outras técnicas convencionais (BIASI et al., 1998; DUTRA et al. 2011). Dessa forma, as mudas de morangueiro, em geral, são produzidas a partir de matrizes provenientes de cultura de meristemas, obtidas em laboratórios de micropropagação (SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO, 1998).

A fase de multiplicação caracteriza-se pela proliferação de brotos axilares ou adventícios em número variável, conforme o genótipo utilizado, determinando a capacidade deste em formar folhas e novos meristemas e durante essa etapa, vários cuidados são necessários para manter a homogeneidade do cultivo, devendo ser levados em conta o número e os intervalos dos subcultivos, a taxa de multiplicação e a estabilidade genética do material, evitando a variação somaclonal (CALVETE et al., 2009).

Larkin e Scowcroft (1981) definiram o termo variação somaclonal como a ocorrência da alteração genética derivada de procedimentos *in vitro*, sendo indesejável em mudas comerciais (AMOO et al., 2011). Estudos determinam que sais minerais (DONNELLY et al., 1984), níveis de benzilaminopurina e o número de subcultivos (RANCILLAC e NOURISSEAU, 1989; AMOO et al., 2011) são alguns fatores que podem afetar a estabilidade do material obtido *in vitro*.

Estudos realizados por Schwartz et al. (1981) não verificaram variações para a maioria das características agronômicas micropropagando três cultivares de morangueiro em até seis subcultivos, obtendo redução apenas do peso médio dos frutos por planta. Por outro lado, Arruda et al. (2006) identificaram variação somaclonal a nível molecular mesmo a baixas concentrações de BAP, em um único subcultivo. Em contrapartida, com 12 ciclos de subcultivos *in vitro* de plantas de morangueiro, das cultivares 'Aromas', 'Camarosa' e 'Camino Real', Fonseca et al. (2013) obtiveram mudas em larga escala, sem que ocorressem alterações fenotípicas nos clones submetidos a esse processo. No mesmo sentido, Calvete et al. (2009) não evidenciaram variações somaclonais mesmo com dez subcultivos durante o processo de micropropagação, aclimatização e período de produção de frutos em ambiente protegido, com a adição de 1,0 mg L⁻¹ de BAP no meio de cultivo.

De acordo com Preece (2008), sabe-se que diferentes genótipos muitas vezes não respondem da mesma forma, mesmo quando cultivados no mesmo meio e

embora a metodologia de micropropagação de cultivares de morangueiro seja bastante conhecida, pouco se conhece sobre o potencial de multiplicação *in vitro* de algumas cultivares (OLIVEIRA et al., 2007), o que é importante para o planejamento da produção de matrizes em laboratório (BRAHM e OLIVEIRA, 2004), por isso, estudos específicos que favoreçam o cultivo *in vitro* desta espécie são necessários, a fim de otimizar seu protocolo de micropropagação.

2.2.3 Propagação através de sistema automatizado (biorreatores)

O desenvolvimento de novas tecnologias para produção de mudas micropropagadas em larga escala, é uma das alternativas para tornar a técnica da cultura de tecidos mais acessível comercialmente, principalmente, com o desenvolvimento de equipamentos como os biorreatores, que permitem reduzir a mão de obra e o custo de produção, estabelecendo um sistema prático para propagação massal de plantas *in vitro* (TAKAYAMA e AKITA, 2006), aumentando assim, a produtividade de uma biofábrica, a partir do uso de meio de cultivo líquido e com automação (RODRIGUES et al., 2006).

No sistema tradicional de micropropagação da cultura do morangueiro, o uso de agente geleificante à base de ágar no meio de cultura proporciona aumento no custo de produção, maior necessidade de tempo para confecção do meio de cultivo e baixa taxa de absorção de nutrientes dos explantes, com isso há uma diminuição na taxa de multiplicação e produção de biomassa, além de encarecer o preço final das mudas micropropagadas.

Nesse sentido, a utilização de meios de cultura líquidos e biorreatores de imersão temporária e permanente, podem ser usados como alternativa ao método tradicional de produção de mudas, sendo essas condições indicadas quando há a necessidade do cultivo em larga escala, como para biofábricas, com maior taxa de crescimento e desenvolvimento, redução de custos com agentes solidificantes, repicagens sucessivas, mão de obra e também, automatização do cultivo. Esta técnica é utilizada para micropropagação massal de plantas, cujo objetivo é a imersão temporária ou permanente de cultura de células ou tecido vegetal ao meio de cultivo líquido, com propósito fundamental de facilitar o trabalho rotineiro e melhorar as

condições assépticas, promovendo condições ótimas de crescimento através da regulação de fatores químicos e/ou físicos.

A propagação em larga escala por meio de biorreatores tem sido relatada com sucesso em várias espécies como bananeira (ALVARD et al., 1993), cana-de-açúcar (LORENZO et al., 1998), orquídea (PAEK et al., 2001), abacaxizeiro (ESCALONA et al., 1999), pupunha (STEINMACHER et al., 2011), eucalipto (OLIVEIRA et al., 2011), morangueiro (HANHINEVA et al., 2005), cedro-cheiroso (PEÑA-RODRIGUÉZ et al., 2010) e capim-limão (QIALA et al., 2006), apresentando taxa de multiplicação superior quando comparada com a micropropagação convencional, a partir destes sistemas de imersão temporária (FEUSER et al., 2003; RECH FILHO et al., 2009; STEINMACHER et al., 2011).

O emprego de biorreatores em cultivo líquido permite a micropropagação em larga escala, a prevenção de distúrbios fisiológicos dos brotos e a hiperidricidade e ainda permite o uso de computadores no controle de sistemas de biorreatores, apresentando, dessa forma, vantagens sobre a micropropagação convencional, em termos de automação e redução de trabalho (SILVA et al., 2007).

De acordo com Barros et al. (2011), o emprego da técnica de biorreatores de imersão temporária (BIT), onde usa-se meio de cultivo líquido em sistema automatizado, é possível reduzir significativamente o custo com mão de obra, chegando até a 30% do gasto total. Porém, os mesmos autores enfatizam que, apesar do grande sucesso em relação ao sistema tradicional, esses equipamentos ainda são pouco difundidos na maioria dos laboratórios de cultura de tecidos de plantas.

Diante disso, o cultivo *in vitro* de explantes em meio líquido pode auxiliar na automação do processo de micropropagação e, conseqüentemente, a redução dos custos relativos à mão de obra (SILVA et al., 2007) e assim, há alguns anos, várias pesquisas têm sido relatadas (ESCALONA et al., 1999; ZIV, 1999; PAEK et al., 2001).

2.3 CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE EXPLANTES

A conservação *in vitro* é uma técnica que vem sendo utilizada e aperfeiçoada na manutenção dos bancos ativos de germoplasma a partir da cultura de tecidos (PEIXOTO, FARIA e MORAIS, 2011), constituindo uma ferramenta auxiliar na

conservação de recursos genéticos, especialmente para espécies propagadas vegetativamente (SANTOS et al., 2012).

No desenvolvimento desse método, dois procedimentos têm sido adotados: o crescimento lento – que envolve a depressão do metabolismo das plantas –, e o da supressão completa do crescimento por armazenamento em temperaturas ultra-baixas, a chamada crioconservação (KARTHA, 1987; PRIMROSE, 1987; LEMOS et al., 2002; SÁ et al., 2015).

O método de conservação por crescimento lento consiste na redução do metabolismo da planta através da manipulação do ambiente e das condições de cultivo, e o armazenamento do material ocorre somente a curtos ou médios prazos (ENGELMANN, 2011).

A criopreservação é uma tecnologia para a preservação em longo prazo, em que muitos explantes podem ser utilizados, incluindo pólen, sementes, embriões, calos, suspensões celulares e ápices caulinares, e para cada tipo, é necessária a aplicação de técnicas específicas (SANT et al., 2008; SALAJ, 2011). É uma técnica na qual o material biológico vivo é armazenado em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ em sua fase líquida, ou a $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, em sua fase de vapor e sob estas temperaturas, o metabolismo celular é praticamente paralisado, diminuindo significativamente a degradação do material (REED, 2008), e é considerada viável para uma série de espécies que apresentam dificuldades de armazenamento pelos métodos tradicionais (ENGELMANN, 2011). Além disso, estudos comprovam que o armazenamento em nitrogênio líquido é um método seguro e economicamente viável (SANT et al., 2008) e permite a conservação *in vitro* a longo prazo (CASTILLO et al., 2010; CEJAS et al., 2012; REED et al., 2011).

Existem dois tipos principais de técnicas de criopreservação, incluindo protocolos baseados em vitrificação (SALMA et al., 2014). Uma delas, a técnica de vitrificação com gotículas (*droplet*), desenvolvida em 2005 (PANIS et al., 2005), consiste em tratar os explantes com uma solução concentrada, colocada em pequenas gotículas em folhas de alumínio e imersas em nitrogênio líquido (SALMA et al., 2014). A outra técnica é chamada *cryoplate*/crio-placa e é uma adequação da *droplet* (YAMAMOTO et al., 2011; NIINO et al., 2013), onde os explantes são colocados nos poços de *cryo*-placas de alumínio, encapsulando-as em pequenas gotas de alginato de cálcio (SALMA et al., 2014).

Panis et al. (2011), destacam que, dependendo da espécie em estudo, o desenvolvimento de um protocolo adequado envolvendo a técnica pode levar um tempo longo, uma vez que depende de informações prévias disponíveis na literatura e de características do comportamento de cada uma delas. Por isso, alguns autores já demonstram o sucesso do uso da crioconservação como forma de conservação de germoplasma de uma variedade de espécies vegetais, como observado para crisântemo (LEE et al., 2011), lírio (CHEN et al., 2011), mamão (KAITY et al., 2008), banana (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005), entre outras.

Além disso, as percentagens de sobrevivência e regeneração podem variar também, de acordo com as diferentes cultivares de uma mesma espécie, mesmo quando utilizado um idêntico método de criopreservação (PANIS; PIETTE; SWENNEN, 2005; CHEN et al., 2011), já que, a criopreservação bem-sucedida, depende da capacidade do tecido em sobreviver à desidratação e de um processo eficiente de descongelamento (PADRO, 2012). Sendo assim, a redução de água dos eixos embrionários em um nível possível de submetê-lo à temperatura do nitrogênio líquido e/ou evitar a formação de cristais de gelo, é um dos passos mais críticos na obtenção de um protocolo viável de criopreservação (LOPES et al., 2013).

Dessa forma, entre as formas de conservação da biodiversidade, a criopreservação tem se mostrado um método eficiente e prático, pois os materiais armazenados apresentam-se em volumes pequenos e exigem pouca manutenção (PENNY, 2011), entretanto, exigem estudos específicos para as diferentes espécies e cultivares, visando à obtenção de resultados favoráveis para a manutenção *in vitro* dos materiais vegetais.

3 MÚLTIPLOS FATORES *IN VITRO* PROPORCIONAM ESTABELECIMENTO E MULTIPLICAÇÃO DA CULTIVAR ITALIANA DE MORANGUEIRO PIRCINQUE.

RESUMO

Embora a eficiência da técnica de cultivo *in vitro* já seja bastante conhecida há alguns anos, pouco se conhece sobre o potencial de multiplicação de algumas cultivares de morangueiro, principalmente daquelas recentemente introduzidas no Brasil. Baseado nessa problemática, buscou-se com esse estudo verificar dois distintos meios de cultura (KNOP – protocolo italiano e MS – protocolo brasileiro), no estabelecimento e multiplicação *in vitro* da cultivar italiana de morangueiro ‘Pircinque’, aliados a outros componentes adicionados aos meios a fim de otimizar o protocolo de micropropagação para esta cultivar. Dentre esses componentes adicionados aos dois distintos meios de cultura foram estudadas as concentrações do PPM® (*Plant Preservative Mixture*) durante a etapa de estabelecimento *in vitro* de meristemas e durante a multiplicação dos explantes, níveis de sacarose, ágar, carvão ativado, Fe EDDHa, BAP e GA₃. Além disso, como uma última etapa do período de produção de novas mudas, foi avaliada a influência da “dupla-fase” (adição de meio líquido após o cultivo já em meio sólido) no crescimento dos explantes, a partir da combinação do meio de cultivo, carvão ativado e da citocinina BAP. Baseado em distintos experimentos, concluiu-se que na etapa de estabelecimento *in vitro* dos meristemas, o KNOP + 2 mL L⁻¹ de PPM possibilita uma maior sobrevivência dos explantes, enquanto o meio de cultura MS favorece a multiplicação dos mesmos, durante essa fase. Nessa segunda etapa, a adição dos seguintes componentes é indicada para a maior eficiência da técnica de micropropagação para a cultivar de morangueiro italiano Pircinque: 30 g L⁻¹ de sacarose; 6 g L⁻¹ de ágar; 4 g L⁻¹ de carvão ativado; 0,1 g L⁻¹ de Fe EDDHA; 1 mg L⁻¹ de BAP e 0,250 mg L⁻¹ de GA₃. Além disso, como resultados positivos obtidos, após o cultivo em meio de cultivo MS sólido, indica-se o uso da técnica de “dupla-fase”, com adição de MS líquido com a combinação de 0,5 mg L⁻¹ de BAP e de 4 g L⁻¹ de carvão ativado.

3.1 INTRODUÇÃO

Os métodos mais empregados para a produção de mudas de morangueiro são a vegetativa via estolões e a micropropagação. A produção por meio de estolões é muito utilizada por viveristas devido a facilidade de execução, entretanto, Biswas (2008) enfatizam as limitações desta técnica quanto a presença de patógenos, cuja infecção é mantida nos diferentes ciclos de cultivo.

A propagação *in vitro*, também denominada de micropropagação, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e conseqüentemente, a de maior impacto (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Sendo assim, técnicas de micropropagação têm se mostrado alternativas viáveis para a produção massal de plantas, sendo o morangueiro, uma das principais espécies trabalhadas no Brasil e no exterior (OLIVEIRA e SCIVITTARO, 2009).

A composição do meio de cultura tem importante função nas respostas de crescimento de células e tecidos, já que plantas ou explantes cultivados *in vitro* têm exigências nutricionais específicas e requerem meios nutritivos compostos por minerais, vitaminas e fontes de energia (BRAGA et al., 2009). Diante disso, no Brasil, o protocolo para a cultura do morangueiro que vem sendo adotado pelos laboratórios e biofábricas é com o uso do meio de cultivo MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), indicado por Dutra et al. (2012), entretanto, para seleções e cultivares oriundas da Itália, o crescimento dos explantes ocorre em meio de cultura KNOP (KNOP, 1865), onde são caracterizados por altas concentrações iônicas e baixo teor de sais, respectivamente (SOBROSA e CORDER, 2003).

Diversos fatores podem favorecer o crescimento e desenvolvimento de explantes *in vitro* de morangueiro, além das formulações básicas dos meios de cultura, responsável pela sustentação do explante e fornecimento de nutrientes necessários para sua sobrevivência, o emprego de reguladores de crescimento, vitaminas e fontes de carboidratos são imprescindíveis para o sucesso na propagação de culturas *in vitro* (SCHUCH e ERIG, 2005; CARVALHO, 2006).

Tendo em vista esses aspectos e o fato de este ser o primeiro relato no Brasil incluindo múltiplos fatores para estabelecimento e multiplicação da cultivar italiana de morangueiro 'Pircinque', o objetivo foi verificar dois distintos meios de cultura (KNOP e MS), no cultivo *in vitro*, aliados a outros componentes adicionados a esses, a fim de otimizar o seu protocolo de micropropagação.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram divididos em duas etapas: estabelecimento e multiplicação *in vitro* da cultivar italiana de morangueiro Pircinque e todos foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação Vegetal (LMV), pertencente ao Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC).

Independente da fase e experimento em estudo, os frascos com os explantes foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e intensidade luminosa de $27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Os dados foram submetidos à análise de variância com aplicação do teste F e as médias, quando significativas estatisticamente, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro e para os fatores quantitativos, foi realizada análise de regressão polinomial. Os valores provenientes de contagem foram transformados na raiz quadrada de $x+0,5$ [$\sqrt{(x+0,5)}$], os de porcentagem em arco seno da raiz quadrada de $x/100$, onde x é a média obtida de cada variável e a escala referente a intensidade de calos em $\log(x+K)$, onde x , é a média obtida de cada variável e K igual a 1.

3.2.1 Estabelecimento *in vitro*

Na primeira etapa do cultivo *in vitro* foram realizados três experimentos: comparação de dois meios de cultivo (KNOP modificado e MS – Apêndice A), utilização do biocida PPM® (*Plant Preservative Mixture*® - metilisotiazolinona, cloreto de magnésio, nitrato magnésio, benzoato de sódio e sorbato de potássio) e adição de cloreto de ferro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ao meio de cultura, componente este, que faz parte do protocolo italiano, com o uso de KNOP. O delineamento experimental utilizado para os diferentes experimentos foi inteiramente ao acaso, com quatro repetições de quinze tubos de ensaio cada, com 10 mL de cada meio de cultura estudado.

Para o estabelecimento *in vitro* dos meristemas, antes da inoculação ao meio de cultura, a assepsia dos estolões foi realizada em câmara de fluxo laminar, através da imersão em álcool 70%, sob agitação por um minuto, e posteriormente em hipoclorito de sódio, na concentração de 2,5% de cloro ativo, adicionado de duas gotas de detergente comercial *Tween 20*®, durante 15 minutos. Na sequência, foi realizada

lavagem do material, três vezes, com água destilada e autoclavada e os meristemas foram assepticamente extraídos, em câmara de fluxo laminar, sob lupa estereoscópica binocular e permaneceram sob a ausência de luz por 7 dias, a fim de reduzir a oxidação fenólica dos mesmos.

No primeiro experimento avaliou-se apenas o fator meio de cultura, compreendendo dois tratamentos, estabelecimento *in vitro* dos meristemas extraídos dos estolões em meio de cultivo KNOP e MS. Além dos sais e vitaminas de cada um deles, foram adicionados 0,1 mg L⁻¹ de BAP, 0,01 mg L⁻¹ de AIB, 0,1 mg L⁻¹ de GA₃, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose e 5,0 g L⁻¹ de ágar, onde antes da inclusão deste, ajustou-se o pH das soluções em 5,8 ± 0,1.

Estudou-se em um segundo momento, a influência do biocida PPM® no estabelecimento *in vitro* de meristemas de morangueiro, com o uso de duas concentrações distintas, 0 (testemunha) e 2 mL L⁻¹. Em função dos melhores resultados apresentados, como sequência do estudo anterior, o meio de cultivo utilizado foi o KNOP, com 100% da concentração dos sais, acrescido de 0,1 mg L⁻¹ de BAP, 0,01 mg L⁻¹ de AIB, 0,1 mg L⁻¹ de GA₃, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose e 5,0 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,8 ± 0,1 antes da adição do ágar.

No terceiro estudo durante a etapa de estabelecimento *in vitro*, os tratamentos diferiram quanto a adição de cloreto de ferro, sendo a ausência e presença de cloreto de ferro (FeCl₃.6H₂O) na concentração utilizada no protocolo italiano do meio de cultivo KNOP (125 mg L⁻¹), compreendendo dois tratamentos. Assim como no experimento anterior, o meio de cultivo utilizado para o estabelecimento dos meristemas foi o KNOP com 0,1 mg L⁻¹ de BAP, 0,01 mg L⁻¹ de AIB, 0,1 mg L⁻¹ de GA₃, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose e 5,0 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado em 5,8 ± 0,1. As variáveis analisadas foram: número de explantes com contaminações fúngica e bacteriana, oxidação e sobrevivência dos mesmos.

3.2.2 Multiplicação *in vitro*

Em relação a segunda etapa do cultivo *in vitro*, multiplicação dos explantes, foram realizados nove experimentos independentes, a fim de verificar o meio de cultivo mais adequado para o desenvolvimento do morangueiro 'Pircinque', comparando o KNOP modificado, sendo este utilizado no protocolo italiano e o MS, utilizado nas condições brasileiras. Além desta variável, outras foram estudadas e apresentadas a seguir, com objetivo de acelerar e otimizar o crescimento e desenvolvimento de mudas desta cultivar propagada *in vitro*.

Em ambos meios de cultivo utilizados, além dos sais e vitaminas característicos de cada um, adicionou-se $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de mio-inositol, 30 g L^{-1} de sacarose e $6,0 \text{ g L}^{-1}$ de ágar (após o ajuste de $5,8 \pm 0,1$ de pH), com algumas exceções nos experimentos onde a presença destes foi considerada um fator de estudo. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições de três explantes cada, com $1,5 \pm 0,5 \text{ cm}$ e quatro folhas iniciais, totalizando quinze explantes por tratamento.

As variáveis analisadas após 45 dias da instalação dos experimentos foram: comprimento do explante, das brotações, da maior raiz e médio de raízes, número de brotações, folhas e raízes e intensidade de calos (escala de 0 a 3 – Figura 1).

Figura 01 – Escala e intensidade de calos em explantes de morangueiro 'Pircinque' durante a etapa de multiplicação *in vitro*. Lages, UDESC, 2018.



Fonte: próprio autor, 2018.

A descrição dos distintos experimentos segue abaixo.

Experimento 1 – Compreendeu um fatorial 2×4 , sendo dois meios de cultura (KNOP e MS) e quatro concentrações de sacarose (0 ; 15 ; 30 e 45 g L^{-1}), totalizando oito tratamentos.

Experimento 2 – Verificou-se a influência de dois meios de cultura, KNOP e MS, além do uso de combinações de sacarose e/ou sorbitol, no crescimento e desenvolvimento de explantes de ‘Pircinque’ *in vitro*, dessa forma, representado por oito tratamentos, sendo os dois meios de cultivo e quatro combinações da fonte de carboidrato: 30 g L⁻¹ de sacarose; 20 g L⁻¹ de sacarose + 10 g L⁻¹ de sorbitol; 10 g L⁻¹ de sacarose + 20 g L⁻¹ de sorbitol e 30 g L⁻¹ de sorbitol.

Experimento 3 – Além do efeito do fator meio de cultura, foi estudado também, concentrações de ágar na multiplicação *in vitro* de morangueiro ‘Pircinque’, compreendendo um fatorial 2 x 3, sendo dois meios de cultivo (KNOP e MS) e três concentrações de ágar (5; 6 e 7 g L⁻¹).

Experimento 4 – Em sequência, a partir de um fatorial 2 x 3, estudou-se dois meios de cultivo (KNOP e MS) e três concentrações de carvão ativado em pó (0; 2 e 4 g L⁻¹), totalizando seis tratamentos.

Experimento 5 – A fim de constatar a influência de diferentes fontes de ferro no crescimento dos explantes, foi estudado um fatorial 2 x 2, sendo dois meios de cultivo (KNOP e MS) e duas formulações de solução estoque, Fe EDDHA e Fe EDTA, ambos na concentração 0,1 g L⁻¹.

Experimento 6 – Representa o estudo de dois fatores distintos, meio de cultivo (KNOP e MS) e a ausência e presença de folhas (0, 2 e 4 folhas) na multiplicação *in vitro* de ‘Pircinque’, totalizando seis tratamentos, a partir de um fatorial 2 x 3.

Experimento 7 – Caracterizado por oito tratamentos, foram estudados também dois fatores: meio de cultura – KNOP e MS – e quatro concentrações da citocinina BAP: 0; 1; 2 e 3 mg L⁻¹.

Experimento 8 – Foi representado por um fatorial duplo (2 x 4), com dois meios de cultivo (KNOP e MS) e quatro concentrações de ácido giberélico (GA₃ – 0; 0,125; 0,250 e 0,375 mg L⁻¹).

Experimento 9 – Combinações de meio de cultivo, carvão ativado e da citocinina BAP foram avaliadas nesse estudo, a partir do sistema dupla-fase. Os explantes foram cultivados durante 10 dias em meio de cultivo MS sólido e após esse período, foi adicionado aos frascos, meio de cultura líquido, com as 11 seguintes combinações: sem adição (testemunha); MS sem regulador de crescimento; MS + 0,5 mg⁻¹ BAP; MS + 0,5 mg BAP + 4 g L⁻¹ de carvão ativado; MS + 1 mg⁻¹ BAP; MS + 1 mg BAP + 4 g L⁻¹ de carvão ativado; KNOP sem regulador de crescimento; KNOP +

0,5 mg L⁻¹ BAP; KNOP + 0,5 mg L⁻¹ BAP + 4 g L⁻¹ de carvão ativado; KNOP + 1 mg L⁻¹ BAP e KNOP + 1 mg L⁻¹ BAP + 4 g L⁻¹ de carvão ativado.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verifica-se na tabela 1, que para o estabelecimento de meristemas de morangueiro 'Pircinque' os meios de cultura (KNOP e MS) ou a presença e ausência do biocida PPM® e cloreto de ferro ao meio de cultura influenciaram a sobrevivência, oxidação e contaminações fúngica e bacteriana dos explantes.

Tabela 01 – Porcentagem de sobrevivência, oxidação e contaminação fúngica e bacteriana de meristemas de morangueiro 'Pircinque' em diferentes meios de cultivo (KNOP e MS), presença do biocida PPM® e cloreto de ferro. Lages/SC, 2018.

Fatores	Sobrevivência		Oxidação		Contaminação			
					Fungo		Bactéria	
KNOP	50,0	a*	32,0	b	12,0	ns	16,0	ns
MS	26,0	b	70,0	a	10,0		10,0	
Sem PPM®	18,4	b	11,0	ns	11,0	ns	24,0	a
Com PPM®	26,0	a	10,0		11,0		19,0	b
Sem FeCl ₃ .H ₂ O	44,0	a	19,6	b	16,0	ns	19,0	ns
Com FeCl ₃ .H ₂ O	26,3	b	28,6	a	15,0		18,2	

Fonte: próprio autor, 2018. * Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

^{ns} Não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Tanto para a variável sobrevivência, quanto para a oxidação dos explantes, o melhor meio de cultivo para o estabelecimento dos meristemas foi o KNOP. A maior oxidação dos explantes e conseqüentemente, menor sobrevivência dos mesmos pode ser justificada pela concentração de sais presentes em ambos os meios de cultivo, onde o MS caracteriza-se por altas concentrações iônicas, quando comparado ao KNOP, com um teor de sais mais baixo (SOBROSA e CORDER, 2003).

Em relação ao uso do biocida PPM®, o mesmo propiciou uma maior sobrevivência dos meristemas estabelecidos em meio de cultivo KNOP, assim como, menor ocorrência de contaminações bacterianas. Em contrapartida, para as variáveis oxidação e presença de fungos não ocorreu diferença significativa para os tratamentos com e sem utilização do biocida.

A menor taxa contaminante e conseqüente, maior sobrevivência dos explantes é decorrente dos ingredientes ativos presentes no composto PPM® (5-cloro-2-metil-3-2H-isotiazolona e 2-metil-3-2H-isotiazolona), com funções conservantes de amplo espectro e biocida, que mata as bactérias e células de fungos, impedindo a germinação de esporos comuns na cultura *in vitro* (NIEDZ, 1998; JIMÉNEZ et al., 2006).

Resultados que corroboram aos encontrados nesse estudo foram relatados por Niedz (1998), onde a utilização do biocida PPM® em meio de cultura foi eficiente no controle de microrganismos contaminantes nas culturas de *Poncirus trifoliata* e *Citrus jambhiri*. Diferentemente, para *Protium heptaphyllum*, Lima (2012), verificou que o PPM® a 1 e 2 % não foi eficaz para o controle de microrganismos, pois a taxa de contaminação foi em torno de 85%.

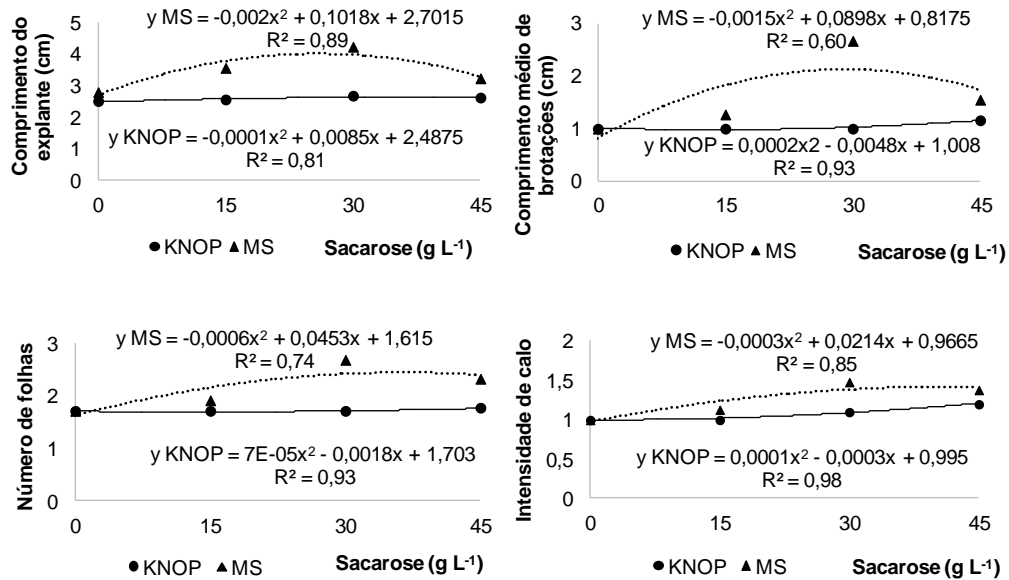
Foi verificado também, a ausência e presença da solução de cloreto de ferro no estabelecimento *in vitro* de morangueiro 'Pircinque', sendo este, um componente do protocolo do meio de cultivo KNOP. Constatou-se que a presença do nutriente $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ proporcionou maior ocorrência de explantes oxidados e assim, com menor índice de sobrevivência, sem influenciar o desenvolvimento de agentes contaminantes, bactéria e fungo.

De acordo com Assis et al. (2018), os micronutrientes ferro, cobre e zinco influenciam na oxidação de explantes, sendo os dois primeiros, constituintes de enzimas as quais são liberadas quando os tecidos são lesados. Isso se torna um problema frequentemente encontrado no cultivo *in vitro*, onde há o escurecimento explante causado pela oxidação de compostos polifenólicos, o que prejudica o crescimento dos explantes, além de ser um fator de redução da taxa de multiplicação (GEORGE e SHERRINGTON, 1984).

Assim como a presença do cloreto de ferro ao meio de cultura KNOP nesse estudo, Utino et al. (2001) verificaram que as concentrações utilizadas de ferro influenciaram significativamente o crescimento de explantes de bananeira-prata em altura, em massa da matéria fresca e sobre o grau de oxidação, não sendo satisfatório para o desenvolvimento *in vitro*.

Na figura 2, verifica-se a análise de regressão polinomial para as variáveis comprimento do explante, comprimento médio de brotações, número de folhas e intensidade de calos, em função dos diferentes meios de cultura e concentrações de sacarose nos mesmos.

Figura 02 – Comprimento do explante e comprimento médio de brotações (cm), número de folhas e intensidade de calos em morangueiro ‘Pircinque’ *in vitro*, em função do meio de cultivo e concentração de sacarose. Lages/SC, 2018.



Fonte: próprio autor, 2018.

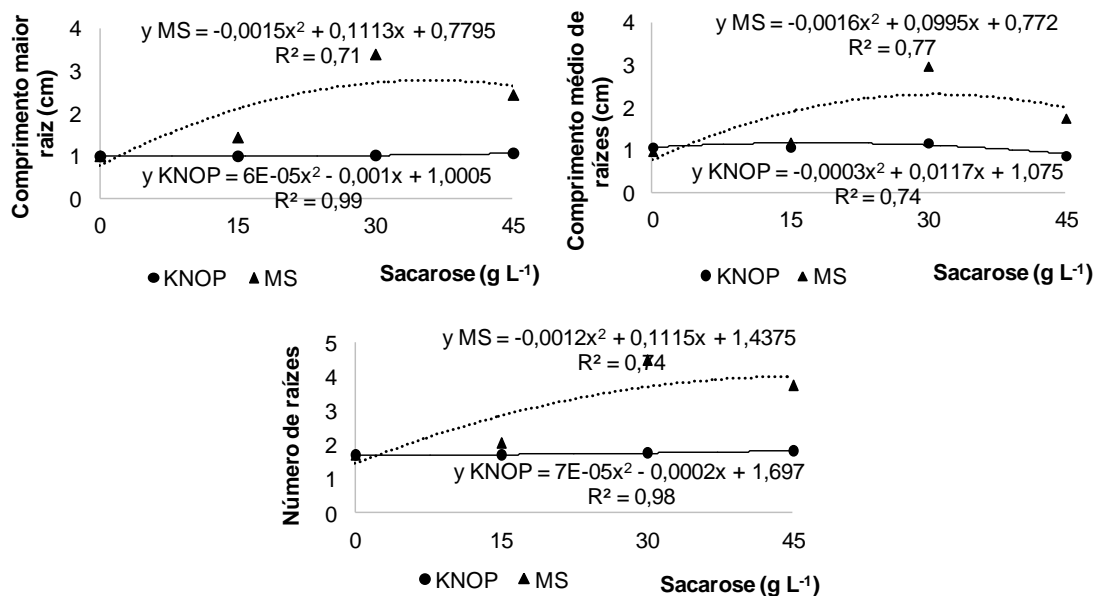
Para as quatro variáveis demonstradas na figura 2, foi constatado um comportamento de curva de regressão similar, onde o meio de cultivo MS, acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, foi mais favorável para o crescimento do explante e brotações e essa concentração gerou uma maior intensidade de calos na base dos explantes, entretanto, não atuando negativamente no desenvolvimento dos mesmos. Estes resultados corroboram os de Maldaner et al. (2007), onde concluíram que a concentração de sacarose e nutrientes no meio de cultura influenciam os processos metabólicos do crescimento e diferenciação de plântulas *in vitro*.

A melhor concentração de sacarose (30 g L⁻¹) no MS, reafirma o indicado por Dutra et al. (2012), no protocolo de micropropagação de morangueiro, utilizado pela Embrapa, diferentemente da metodologia adotada na Itália, com KNOP, onde indica-se a adição de 25 g L⁻¹ da fonte de açúcar. Este melhor desenvolvimento inicial das plantas ocorre, pois, as altas concentrações de sacarose aumentam as reservas de carboidratos nas folhas, causando um aumento na energia disponível, que posteriormente, irá favorecer na aclimatização, elevando a porcentagem de sobrevivência e a matéria seca das mudas obtidas *in vitro* (SKREBSKY et al., 2004).

Na figura 3, são demonstradas as regressões para as variáveis do sistema radicular dos explantes do morangueiro ‘Pircinque’, comprimento médio e da maior

raiz e número de raízes. Assim como na parte aérea, os melhores resultados obtidos foram em meio de cultivo MS, com o uso de 30 g L⁻¹ de sacarose, sendo o MS, mais uma vez superior ao meio KNOP.

Figura 03 – Comprimento da maior raiz e médio de raízes (cm) e número de raízes de morangueiro 'Pircinque' *in vitro*, em função do meio de cultivo e concentração de sacarose. Lages/SC, 2018.



Fonte: próprio autor, 2018.

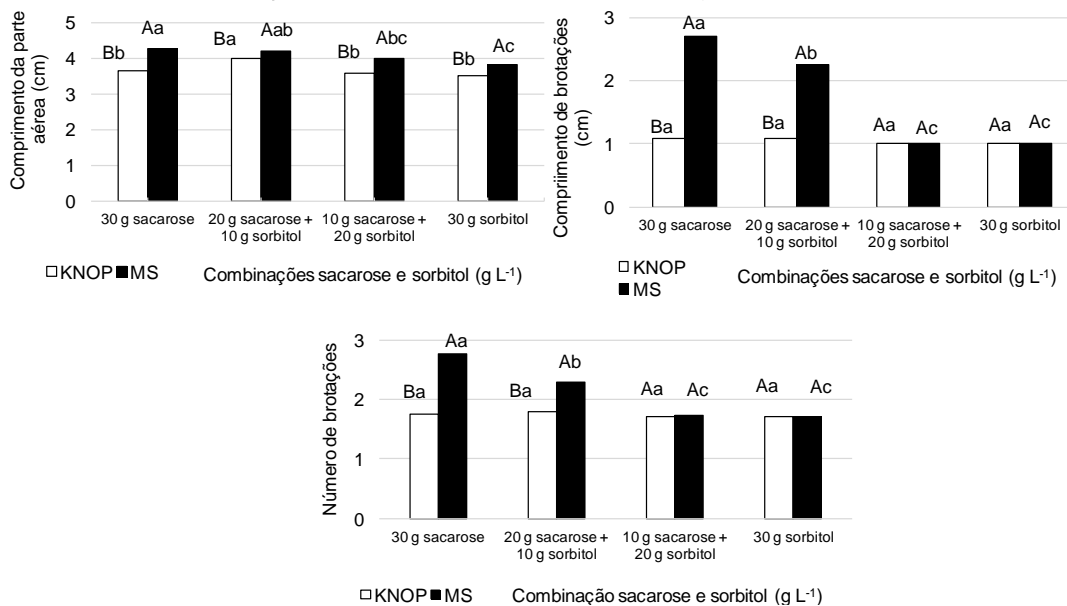
Calvete et al. (2002) concluíram que a sacarose no meio de enraizamento influenciou também a aclimatização de explantes de morangueiro e diferentemente do obtido neste estudo, com essa cultivar italiana, indicaram que a concentração de 45 g L⁻¹ foi mais eficiente, estimulando o desenvolvimento do sistema radicular. Na figura 3, constata-se ao contrário, quando foi usada uma concentração maior que 30 g L⁻¹ de sacarose, houve uma tendência de queda da curva, acarretando em um menor desenvolvimento radicular, tanto em comprimento, quanto em número de raízes. Nesse sentido, Besson et al. (2010) afirmam que a concentração de sacarose pode interferir na formação das raízes, uma vez que o aumento da concentração de açúcares no meio de cultivo ocasiona a diminuição da absorção de sais e água, e isso pode interferir no crescimento da planta.

A utilização dos diferentes meios de cultivo combinados com a adição de sacarose e/ou sorbitol resultou em uma interação estatística para estes fatores para todas as variáveis estudadas (Figuras 4 e 5). Em relação ao uso das diferentes fontes de carboidrato, Alves et al. (2010) e Flores et al. (2013), também verificaram que

concentrações distintas de sacarose e sorbitol influenciaram significativamente o crescimento das plantas *in vitro*.

Para os dados referentes a parte aérea dos explantes, verifica-se na figura 4, que tanto para comprimento do explante e comprimento e número médio de brotações, o meio de cultivo MS se destacou ao protocolo italiano, com uso de KNOP, sendo influenciadas ainda, pela combinação entre sacarose e/ou sorbitol. O comprimento principal dos explantes foi superior em MS + 30 g sacarose, porém, não diferindo do tratamento MS + 20 g sacarose + 10 g sorbitol. Mais uma vez, para o comprimento médio das brotações e número de brotações, a adição isolada de sacarose (30 g) possibilitou resultados mais satisfatórios, entretanto, sem diferir significativamente dos tratamentos: KNOP + 10 g sacarose + 20 g sorbitol ou somente de 30 g de sorbitol.

Figura 04 – Comprimento do explante e de brotações (cm) e número de brotações morangueiro ‘Pircinque’ *in vitro*, em função do meio de cultivo e combinação de sacarose e sorbitol. Lages/SC, 2018.



Fonte: próprio autor, 2018. *Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro; letras maiúsculas são usadas para comparar os meios de cultura e minúsculas, as combinações entre sacarose e sorbitol.

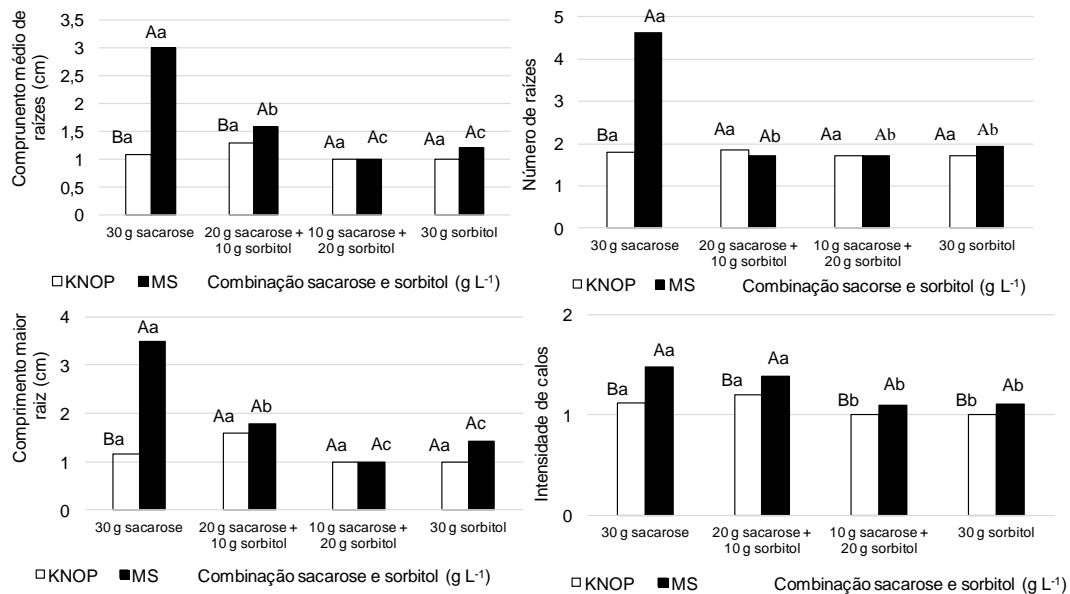
Em estudos com *Passiflora giberti*, Faria et al. (2006) também constataram que a sacarose promoveu maior desenvolvimento das microplantas, quando comparada com combinações com sorbitol, ou ainda, desta última acrescentada de forma isolada ao meio de cultivo. No mesmo sentido, Flores et al. (2010), concluíram que os explantes cultivados em meio contendo somente sorbitol como fonte de carboidrato,

apresentaram as menores taxas de crescimento ao longo do período de avaliação. Isso ocorre devido a redução do potencial osmótico e consequente dificuldade de absorção de água e nutrientes por parte dos explantes.

A necessidade de adição desses componentes é explicada em função da baixa capacidade fotossintética das plantas *in vitro*, para isso, as diferentes fontes de carboidratos são usadas para suprir as exigências metabólicas e essa fonte é geralmente a sacarose (HAZARIKA, 2003). Alam et al. (2010) também explicam que devido as condições herméticas ou semi-herméticas dos frascos, há o impedimento de trocas gasosas entre o ambiente interno e externo, o que não favorece a atividade fotossintética das plantas *in vitro* e neste caso, faz-se necessário adicionar ao meio de cultivo uma fonte de carbono, sendo a sacarose o açúcar mais utilizado na micropropagação.

Da mesma forma, o sistema radicular dos explantes de 'Pircinque' em condições *in vitro*, foi influenciado pela interação dos fatores de meio de cultivo e combinações de sacarose e sorbitol (Figura 5). O número de raízes e o comprimento da maior raiz (cm) foram superiores nos tratamentos MS (30 g sacarose) e KNOP (20 g sacarose + 10 g sorbitol; 10 g sacarose + 20 g sorbitol ou somente, 30 g sorbitol). Já o comprimento médio de raízes, foi superior em meio de cultivo MS com a presença apenas de sacarose, porém, sem diferir estatisticamente do meio de cultura KNOP, com o sorbitol isoladamente, ou de 10 g de sacarose + 20 g de sorbitol. Similarmente, Faria et al. (2006) também concluíram que a rizogênese de *Passiflora giberti* é afetada pelo açúcar sorbitol e pela ausência de sacarose no meio de cultura. Em consequência disso, a intensidade de calos foi maior neste tratamento, onde a presença e tamanho dos mesmos foram favorecidos em detrimento do maior crescimento radicular e também, desenvolvimento da parte aérea.

Figura 05 – Comprimento médio e da maior raiz (cm), número de raízes e intensidade de calos em morangueiro ‘Pircinque’, em função do meio de cultivo e combinação de sacarose e sorbitol. Lages/SC, 2018.



Fonte: próprio autor, 2018. *Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro; letras maiúsculas são usadas para comparar os meios de cultura e minúsculas, as combinações entre sacarose e sorbitol.

As duas únicas variáveis em que não ocorreu influência da interação do meio de cultivo com a concentração de ágar utilizada foram o comprimento da maior raiz e comprimento médio de raízes (Tabela 2), sendo que os dois meios (KNOP e MS) não acarretaram diferenças significativas para estas duas variáveis. Entretanto, a maior concentração de ágar utilizada (7 g L⁻¹) propiciou explantes com raízes de menor comprimento, diferentemente das concentrações 5 e 6 g L⁻¹ que facilitaram o alongamento destas. Esse fato pode ser explicado já que as concentrações mais elevadas de ágar dificultam o contato entre o explante e o meio, limitando a absorção de compostos (PIERIK, 1987) e conseqüentemente, reduzindo o crescimento médio de raízes.

Tabela 02 – Comprimento da maior raiz e médio de raízes (cm) de explantes de morangueiro 'Pircinque' em diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e concentrações do agente solidificante (5, 6 e 7 g L⁻¹). Lages/SC, 2018.

Fatores		Comprimento maior raiz (cm)		Comprimento médio raízes (cm)	
Meio cultura	KNOP	2,22	ns	1,69	ns
	MS	2,39		1,83	
Ágar	5	2,17	ab*	1,73	ab
	6	2,77	a	2,00	A
	7	1,99	b	1,56	B
Média		2,30		1,76	
CV (%)		19,16		32,36	

Fonte: próprio autor, 2018. *Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; ns Não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

De acordo com a Tabela 3, verifica-se que houve interação entre os fatores estudados para todas as variáveis relacionadas ao crescimento da parte aérea dos explantes.

Tabela 03 – Comprimento do explante e de brotações (cm) e número de brotações e folhas de morangueiro 'Pircinque' cultivados *in vitro* em meios de cultivo KNOP e MS e concentrações do agente solidificante (5, 6 e 7 g L⁻¹). Lages/SC, 2018.

Fatores	Comprimento do explante		Comprimento brotações		Número de brotações		Número de folhas		
	KNOP	MS	KNOP	MS	KNOP	MS	KNOP	MS	
Ágar	5	3,54 Aa*	3,62 Ab	1,25 Aa	1,25 Ab	1,83 Aa	1,84 Ab	3,93 Bab	4,46 Ac
	6	3,62 Ba	4,21 Aa	1,17 Ba	2,25 Aa	1,79 Ba	2,31 Aa	4,04 Ba	5,55 Aa
	7	3,54 Ba	4,04 Aa	1,08 Ba	2,08 Aa	1,75 Ba	2,31 Aa	3,74 Bb	5,16 Ab
Média		3,76		1,51		1,97		4,48	
CV (%)		5,70		16,03		9,80		6,69	

Fonte: próprio autor, 2018. * Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro.

Para as variáveis comprimento do explante e das brotações e, além disso, número de brotações, o meio de cultura KNOP com 5 g L⁻¹ de ágar e o MS com 6 ou 7 g L⁻¹ de ágar favoreceram o crescimento da parte aérea das plantas de morangueiro cv. Pircinque *in vitro*. Já para a avaliação do número de folhas, o tratamento mais satisfatório foi com o meio MS com 6 g L⁻¹ de ágar, gerando uma média de 5,55 folhas por explante.

O mesmo ocorreu para as variáveis número de raízes e intensidade de calos nos explantes, como demonstrado na Tabela 4, onde mais uma vez, o KNOP com 5 g L⁻¹ de ágar e o MS com 6 ou 7 g L⁻¹ de ágar favorecem a emissão de um maior número de raízes e em consequência disso, estes mesmos tratamentos acarretaram uma elevada calogênese na base dos explantes.

Tabela 04 – Número de raízes e intensidade de calos *in vitro* de morangueiro ‘Pircinque’ em diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e concentrações do agente solidificante (5, 6 e 7 g L⁻¹). Lages/SC, 2018.

Fatores	Número de raízes		Intensidade de calo		
	KNOP	MS	KNOP	MS	
Ágar	5	2,22 Aa*	2,56 Ab	1,36 Aa	1,33 Ab
	6	2,66 Ba	3,43 Aa	1,26 Bab	1,39 Aab
	7	2,35 Ba	3,79 Aa	1,20 Bb	1,48 Aa
	Média	2,83		1,22	
	CV (%)	19,27		8,84	

Fonte: próprio autor, 2018. *Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro.

Em geral, para as diferentes variáveis, a concentração de ágar mais adequada foi a de 6 g L⁻¹, sendo esta a mais usualmente utilizada no meio MS para inúmeras culturas, podendo variar de 5 a 8 g L⁻¹ para um crescimento adequado (REZENDE et al., 2008). Os mesmos autores destacam que o aumento da concentração de ágar promove a elevação do potencial osmótico do meio de cultivo, o que possivelmente dificulta a difusão dos nutrientes para os explantes e, conseqüentemente, reduz seu desenvolvimento.

Com a análise de variância verifica-se que não houve interação entre os fatores: meio de cultivo e concentrações de carvão ativado na multiplicação *in vitro* de explantes de morangueiro ‘Pircinque’, dessa forma, ambos foram analisados isoladamente (Tabela 5). Para os meios de cultura não foram observadas diferenças estatísticas para as variáveis comprimento médio de raízes e intensidade calos, sendo esta última citada, não influenciada também, pela utilização de carvão ativado. Similarmente, Villa et al. (2007), também verificaram que a adição de carvão ativado ao meio de cultura não promoveu a formação de calos na base dos explantes de amoreira-preta ‘Ébano’ e porta-enxerto de videira ‘P1103’.

Tabela 05 – Comprimento do explante e médio de raízes (cm), número de raízes e intensidade de calo *in vitro* de morangueiro ‘Pircinque’ em dois diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e concentrações de carvão ativado (0, 2 e 4 g L⁻¹). Lages/SC, 2018.

Fatores		Comprimento explante (cm)		Comprimento médio raízes (cm)		Número raízes		Intensidade de calo	
Meio cultura	KNOP	4,48	b*	3,35	ns	3,06	b	1,11	ns
	MS	5,05	a	3,33		3,84	a	1,17	
Carvão ativado	0	3,19	b*	1,33	c*	2,32	b	1,08	ns
	2	5,41	a	4,00	b	4,02	a	1,17	
	4	5,69	a	4,69	a	4,03	a	1,17	
Média		4,77		3,34		3,45		1,14	
CV (%)		16,72		23,98		18,24		12,45	

Fonte: próprio autor, 2018. *Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; ns Não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Para o fator meio de cultivo, o MS, promoveu explantes de maior comprimento e número de raízes. Simões et al., (2014), observaram em explantes de *Dioscorea rotundata*, que o meio MS sem carvão ativado, foi mais favorável para o desenvolvimento das raízes, onde as plantas produziram a média de dez raízes, corroborando com o uso do meio de cultivo, entretanto, diferindo quanto ao uso do carvão ativado.

Em relação a utilização de carvão ativado, independente do meio de cultura, a adição de 4 g L⁻¹ resultou em um maior desenvolvimento de morangueiro *in vitro* ‘Pircinque’, porém, a concentração 2 g L⁻¹ não diferiu estatisticamente para as variáveis comprimento do explante e número de raízes, entretanto, estudos contrários mostram que adição *in vitro* de carvão ativado pode reduzir a biomassa de explantes de frutíferas de clima temperado (VILLA et al., 2007). Por outro lado, Adak et al. (2009) analisaram o efeito da auxina AIB e do uso de carvão ativado na fase de enraizamento durante a micropropagação de morangueiro cv. Camarosa e relataram um aumento do número e do tamanho das raízes nos tratamentos com o componente.

De acordo com Thomaz (2008), o crescimento e desenvolvimento das plantas podem ser favorecidos com o uso de carvão ativado ao meio de cultura, pois este possui características físicas que permitem a maior adsorção de algumas substâncias, fazendo efeito de antioxidante através da adsorção irreversível de compostos tóxicos e diminuindo o acúmulo de exsudatos, assim como, aumentando a disponibilidade de

vitaminas e melhorando o efeito de alguns fitorreguladores ao longo do tempo de cultivo.

No presente estudo, as concentrações de carvão ativado apresentaram interação com os dois meios de cultivo trabalhados para as variáveis comprimento médio de brotações e da maior raiz e número de brotações e folhas (Tabela 6).

Tabela 06 – Comprimento médio de brotações e da maior raiz (cm) e número de brotações e folhas em morangueiro ‘Pircinque’ *in vitro*, em função do meio de cultivo (KNOP e MS) e concentração de carvão ativado (0, 2 e 4 g L⁻¹). Lages/SC, 2018.

Fatores	Comprimento brotações		Comprimento maior raiz		Número de brotações		Número de folhas	
	KNOP	MS	KNOP	MS	KNOP	MS	KNOP	MS
0	1,00 Ba*	2,22 Ab	1,00 Ab	2,05 Ab	1,71 Ba	2,57 Aa	3,41 Bb	4,20 Ab
2	1,00 Ba	2,11 Ab	8,44 Aa	7,00 Aa	1,71 Ba	2,26 Ab	3,87 Ba	4,26 Ab
4	1,00 Ba	2,78 Aa	8,94 Aa	6,44 Ba	1,71 Ba	2,77 Aa	3,98 Ba	5,86 Aa
Média	1,68		5,65		2,12		4,26	
CV (%)	10,49		21,65		10,66		5,72	

Fonte: próprio autor, 2018. * Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro.

Verifica-se que o meio MS + 4 g L⁻¹; KNOP + 2 ou 4 g L⁻¹ ou MS + 2 g L⁻¹; MS + 0 ou 4 g L⁻¹ e MS + 4 g L⁻¹ proporcionaram brotações de maior comprimento; raiz principal mais longa; maior número de brotações e de folhas, respectivamente. Todavia, o meio de cultura MS, em geral para as quatro distintas variáveis foi superior quanto comparado ao KNOP, mostrando-se mais uma vez, adequado para utilização no protocolo de multiplicação desta cultivar italiana de morangueiro. Villa et al. (2014), em comparação a outro meio de cultura, identificaram que as concentrações de vitaminas e mineiras do meio MS influenciaram de maneira positiva o crescimento das raízes, até o ponto de máxima.

Resultados antagônicos aos obtidos nesse estudo foram encontrados por Villa et al. (2007), George (2008) e Guson et al. (2012), onde verificaram que concentrações acima de 0,1375 g L⁻¹ de carvão ativado passaram a inibir a formação de brotos, provavelmente porque além de adsorver substâncias tóxicas, passaram a adsorver os nutrientes do meio de cultivo. Estudos já observaram também, a influência negativa do carvão ativado para o número de folhas, possivelmente por compensar

com maior estímulo ao crescimento das folhas pré-existentes ou do sistema radicular (VILLA et al., 2014).

De acordo com a análise de variância demonstrada na tabela 7, houve interação entre os fatores estudados (meio de cultura e fontes de ferro) para as variáveis relacionadas a parte aérea, onde para todas essas, o meio de cultivo MS associado ao Fe EDDHA como fonte de ferro foi mais eficiente para o desenvolvimento dos explantes. Assim como nesse estudo, Christensen et al. (2008) relataram o incremento número de brotações em hibisco, além do conteúdo de clorofila, área foliar e da massa seca dos explantes, com a utilização de Fe EDDHA em relação as mesmas dosagens de Fe EDTA. Similarmente, em pesquisas com aveleira propagadas *in vitro*, Garisson et al. (2013) verificaram que os explantes mantidos em meio de cultivo com Fe EDDHA, apresentaram maior comprimento, concentração de clorofila e folhas mais largas, do que os multiplicados em Fe EDTA.

Tabela 07 – Variáveis da parte aérea na multiplicação *in vitro* de explantes de morangueiro ‘Pircinque’ em diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e distintas fontes de ferro nos mesmos (Fe EDTA e Fe EDDHA). Lages/SC, 2018.

Fatores	Comprimento do explante (cm)		Comprimento brotações (cm)		Número de brotações		Número de folhas	
	KNOP	MS	KNOP	MS	KNOP	MS	KNOP	MS
FeEDTA	2,75 Ba*	4,46 Ab	1,00 Ba	2,04 Ab	1,71 Ba	2,57 Ab	3,86 Ba	4,62 Ab
FeEDDHA	2,83 Ba	5,3 Aa	1,00 Ba	3,00 Aa	1,71 Ba	2,90 Aa	3,67 Ba	5,38 Aa
Média	3,84		1,76		2,22		4,38	
CV (%)	16,55		20,50		6,69		8,35	

Fonte: próprio autor, 2018. * Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro.

Da mesma forma que nas variáveis da parte aérea, com a análise das do sistema radicular observou-se resultados mais satisfatórios no meio de cultura MS com Fe EDDHA, quando comparado com o Fe EDTA (Tabela 8). Em outros estudos, a substituição de Fe EDTA com a forma de quelato de Fe EDDHA também obtiveram efeitos positivos sobre a micropropagação de várias espécies (MAHESHWARI e SETH, 1965; CHOPRA e RASHID, 1969; RASHID e STREET, 1973). Um das justificativas para isso, é que o Fe EDTA, utilizado no protocolo do MS, não é estável e quando se trabalha com pH na faixa de 5,8 tem-se uma perda de 45% da sua concentração inicial de Fe (DALTON et al., 1983) e isso não é desejado, já que o ferro

é um micronutriente essencial para o crescimento e alongação das brotações, já que atua como cofator enzimático (HANSEN et al., 2006).

Tabela 08 – Variáveis sistema radicular na multiplicação *in vitro* de explantes de morangueiro ‘Pircinque’ em diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e distintas fontes de ferro nos mesmos (Fe EDTA e Fe EDDHA). Lages/SC, 2018.

Fatores	Comprimento da maior raiz (cm)		Comprimento médio de raízes (cm)		Número de Raízes		Intensidade de calo									
	KNOP	MS	KNOP	MS	KNOP	MS	KNOP	MS								
FeEDTA	1,00	Ba*	2,33	Ab	1,00	Ba	1,96	Ab	1,71	Ba	2,88	Ab	1,00	Bb	1,30	Ab
FeEDDHA	1,00	Ba	4,00	Aa	1,00	Ba	2,75	Aa	1,71	Ba	3,50	Aa	1,40	Ba	1,49	Aa
Média	2,07		1,68		2,45		1,30									
CV (%)	24,55		20,05		18,95		3,76									

Fonte: próprio autor, 2018. * Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro.

O enraizamento *in vitro* dos explantes de seleções de morangueiro foi beneficiado no meio de cultivo MS com o uso de Fe EDDHA. Antonopoulou et al. (2007) também constataram que a formação e comprimento médio de raízes *in vitro* do porta-enxerto de pessegueiro ‘GF-677’, foi maior em meio básico MS, com a inclusão de 0,2805 g L⁻¹ Fe EDDHA como fonte de ferro, assim como, também em pesquisas com porta-enxerto de pessegueiro, Molassiotis et al. (2003), obtiveram enraizamento de 100% dos explantes nutridos com Fe EDDHA, em contrapartida, nenhuma formação de raiz foi observada nos mantidos em meio com Fe EDTA.

Por outro lado, na utilização do MS com Fe EDDHA, a intensidade de calos foi superior quando comparada aos outros tratamentos estudados e essa formação de calogênese na base dos explantes pode ser prejudicial, retardando a formação *in vitro* de raízes adventícias (ANTONOPOULOU et al., 2007).

Ao estudar a influência dos dois meios de cultura e o número de folhas iniciais dos explantes, não ocorreu interação entre ambos os fatores para as variáveis comprimento de brotações e médio de raízes, número de brotações, folhas e raízes e intensidade de calo (Tabela 9). Para estas variáveis a presença ou ausência de folhas não influenciou o crescimento dos explantes, entretanto, mais uma vez, para os meios de cultivo ocorreu diferenças estatísticas significativas, onde o MS foi mais favorável para o desenvolvimento do morangueiro ‘Pircinque’.

Tabela 09 – Comprimento das brotações e médio de raízes (cm), número de brotações, folhas e raízes e intensidade de calos em morangueiro ‘Pircinque’ *in vitro* em diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e número de folhas (0, 2 e 4). Lages/SC, 2018.

Fatores		Comprimento brotações (cm)		Comprimento médio raízes (cm)		Número brotações		Número folhas		Número raízes		Intensidade de calo	
Meio cultura	KNOP	1,17	b*	1,00	b	1,85	b	3,47	b	1,76	b	1,35	b
	MS	1,77	a	1,28	a	2,37	a	4,85	a	2,49	a	1,48	a
Número folhas	0	1,37	ns	1,25	ns	2,02	ns	4,03	ns	2,13	ns	1,34	ns
	2	1,52		1,11		2,17		4,23		2,05		1,44	
	4	1,53		1,05		2,14		4,22		2,19		1,41	
Média		1,47		1,14		2,11		4,16		2,12		1,41	
CV (%)		19,61		21,74		10,31		9,27		13,07		5,92	

Fonte: próprio autor, 2018. * Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns Não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Em contrapartida, ao ser estudado o comprimento do explante principal e da maior raiz (cm), ocorreu interação entre os dois fatores avaliados (Tabela 10) e para ambas, o meio de cultivo MS destacou-se em relação ao meio de cultura KNOP, sendo que no final da avaliação, a parte aérea mais longa foi aquela onde se deixou duas ou quatro folhas na instalação do experimento e para o comprimento da maior raiz, não diferiu a presença ou ausência de folhas e ainda, dos explantes mantidos em KNOP com quatro folhas iniciais.

Tabela 10 – Comprimento do explante e da maior raiz (cm) em morangueiro ‘Pircinque’ *in vitro* em diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e número de folhas (0, 2 e 4). Lages/SC, 2018.

Fatores	Comprimento do explante				Comprimento maior raiz			
	KNOP		MS		KNOP		MS	
0	3,00	Ba	3,56	Ab	1,00	Bb	2,05	Aa
2	3,00	Ba	3,78	Aa	1,00	Bb	2,06	Aa
4	3,00	Ba	3,83	Aa	1,67	Aa	1,89	Aa
Média	3,36				1,61			
CV (%)	4,85				18,65			

Fonte: próprio autor, 2018. * Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro.

Esses resultados podem ser justificados pelo fato que a presença de folhas no explante auxilia a iniciação radicular, entretanto esse estímulo não pode ser atribuído

à fotossíntese, já que o processo fotossintético é muito baixo durante o enraizamento, acreditando-se que as folhas produzem alguma substância que promove o enraizamento (GRIMALDI et al., 2008). Além disso, Hartmann et al. (1990) explicam a importância da presença de folhas nos explantes, já que elas, além de translocarem carboidratos, contribuem para a formação de raízes, potencializando o enraizamento.

Ao avaliar a multiplicação do explantes de morangueiro nos dois meios de cultivo e quatro concentrações distintas de BAP, os dois fatores influenciaram isoladamente o comprimento do explantes e número de folhas (Tabela 11).

Tabela 11 – Comprimento do explante (cm) e número de folhas *in vitro* em morangueiro ‘Pircinque’ em dois diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e concentrações de BAP (0, 1, 2 e 3 mg L⁻¹). Lages/SC, 2018.

Fatores		Comprimento explante (cm)		Número folhas	
Meio cultura	KNOP	1,85	b*	3,13	b*
	MS	2,74	a	4,60	A
[] BAP	0 mg L ⁻¹	2,78	a*	3,85	ns
	1 mg L ⁻¹	2,64	a	4,10	
	2 mg L ⁻¹	1,98	b	3,88	
	3 mg L ⁻¹	1,77	b	3,64	
Média		2,29		3,87	
CV (%)		15,15		19,46	

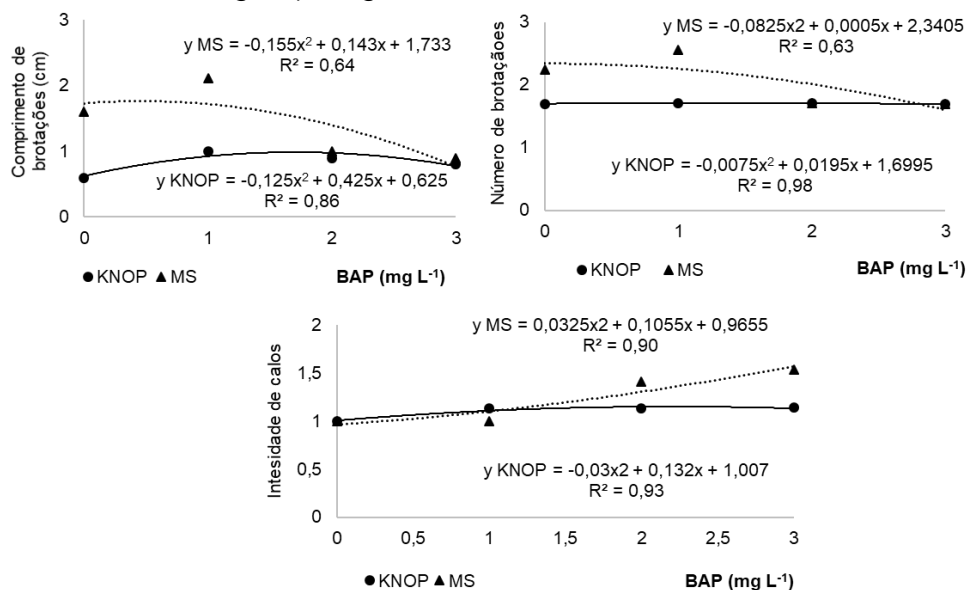
Fonte: próprio autor, 2018. * Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
^{ns} Não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Em relação aos dois meios de sustentação, a composição básica do MS, mais uma vez, favoreceu o crescimento dos explantes, influenciando no maior crescimento e quantidade de folhas, quando comparado ao KNOP. Entretanto, para ambas variáveis, a concentração de BAP só foi significativa para o comprimento do explante, onde a ausência ou o uso de 1 mg L⁻¹ deste regulador de crescimento conferiu parte aéreas mais alongadas, sendo que 2 e 3 mg L⁻¹ de BAP proporcionaram tamanho mais reduzido, logo, as concentrações mais elevadas do regulador de crescimento podem ter dificultado o desenvolvimento da parte aérea (VILLA et al., 2007).

A ANOVA para comprimento e número de brotos e intensidade de calos foi significativa para a interação dos meios de cultura e concentrações de BAP (Figura 6). Verifica-se que o meio de cultivo MS com 1 mg L⁻¹ de BAP favoreceu a formação de um maior número e comprimento de brotações, visto que as citocininas são

utilizadas para quebrar a dormência apical dos brotos e aumentar a taxa de multiplicação, sendo essa maximização um dos objetivos da micropropagação (VILLA et al., 2007; ROCHA et al., 2010; SIVPARSAD e GUBBA, 2012).

Figura 06 – Comprimento médio de brotações (cm), número de brotações e intensidade de calos *in vitro* em morangueiro ‘Pircinque’ em dois diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e concentrações de BAP (0, 1, 2 e 3 mg L⁻¹). Lages/SC, 2018.



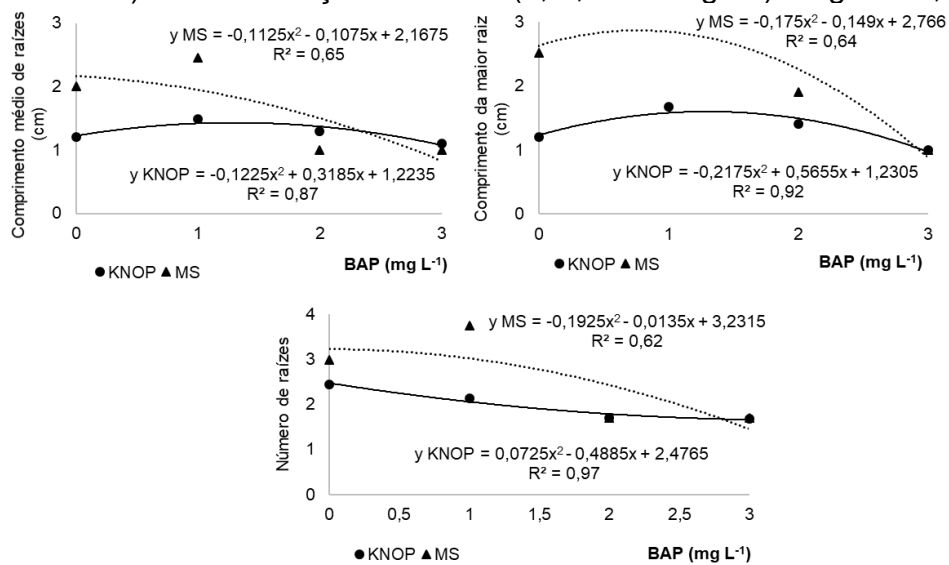
Fonte: próprio autor, 2018.

Brahm e Oliveira (2004), similar ao presente estudo, também concluíram que as concentrações de BAP que otimizaram o número de brotações por explante de morangueiro foram próximas aquela recomendada para a espécie, de 1 mg L⁻¹, sendo essa concentração indicada também por Dutra et al. (2012), no protocolo de multiplicação de morangueiro, cultivado em meio MS. Rocha et al. (2010) em pesquisas com morangueiros *in vitro*, verificaram comportamento quadrático quanto ao aumento da concentração de BAP para o comprimento das brotações e estas, sendo as maiores, obtidas no meio de cultura sem BAP. Em compensação, na cultivar trabalhada nesta pesquisa, a adição de 1 mg L⁻¹, foi mais eficiente.

Verifica-se, que tanto no KNOP quanto no MS, conforme se aumentou a concentração da citocinina, houve uma tendência de aumento de calogênese e em consequência disso, de forma geral, o excesso de BAP no meio de cultura pode afetar negativamente o crescimento das brotações por induzir a sua proliferação e estimular a ocorrência de hiperidricidade e formação de folhas anormais (PASQUAL, 2001;

BRAHM e OLIVEIRA, 2004). A análise de variância para as variáveis do sistema radicular de explantes de morangueiro também indicou interação entre os fatores meio de cultura e concentração de BAP (Figura 7) e novamente, o meio de cultivo MS, com a adição de 1 mg L^{-1} de BAP, favoreceu o desenvolvimento do sistema radicular, assim como da parte aérea, sendo superior ao KNOP nas três variáveis analisadas: comprimento médio e da maior raiz e número de raízes.

Figura 07 – Comprimento médio de raízes e maior raiz (cm) e número de raízes *in vitro* em morangueiro 'Pirquinque' em diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e concentrações de BAP (0, 1, 2 e 3 mg L^{-1}). Lages/SC, 2018.



Fonte: próprio autor, 2018.

Entre os reguladores vegetais utilizados na multiplicação *in vitro* de morangueiro, a 6-benzilaminopurina (BAP) tem sido a de maior uso comercial (BRAHM e OLIVEIRA, 2004) e, além disso, das citocininas comercialmente disponíveis, é a que geralmente proporciona melhores resultados (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Assim como neste estudo, outros explicam a ação do BAP também no desenvolvimento do sistema radicular. Em pesquisas com batata doce, Flores et al. (2015), demonstram que os resultados obtidos com essa citocinina foram significativamente superiores ao controle (meio isento do regulador de crescimento), uma vez que as plantas apresentaram um aumento considerável no número de segmentos nodais, crescimento dos brotos e, especialmente, em relação ao enraizamento (FLORES et al., 2015). Em contrapartida, Macedo et al. (2003)

confirmaram a inibição da formação de raízes nos explantes de abacaxizeiro cultivados em meio de cultura na presença de BAP e que esta foi estimulada pela presença de ANA. Com base nisso, em batata-doce, uma das estratégias adotadas para minimizar os efeitos da BAP no enraizamento das mudas, é a transferência dos brotos para um meio nutritivo isento deste regulador de crescimento (SIVPARSAD e GUBBA, 2012).

Contudo, constata-se que o enraizamento *in vitro* da cultura do morangueiro não é umas das etapas limitantes no processo de propagação, visto que, não há necessidade de uma fonte de auxina para estimular a emissão de raízes, que ocorre durante a multiplicação, com adição da citocinina. Alam et al. (2010), da mesma forma, ressaltaram que em batata-doce, muitas vezes, a multiplicação *in vitro* de brotos ocorre concomitantemente ao enraizamento, não sendo necessária a adição de suplementos ao meio nutritivo para induzir a regeneração de raízes.

Exceto para as variáveis comprimento da maior raiz (cm) e número de raízes *in vitro* de explantes de morangueiro 'Pircinque', não ocorreu interação entre os fatores meios de cultivo (KNOP e MS) e concentrações de GA₃ (0, 0,125, 0,250 e 0,375 mg L⁻¹), como demonstrado na tabela 12.

Tabela 2 – Multiplicação *in vitro* de explantes de morangueiro 'Pircinque' em dois diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e concentrações de GA₃ (0, 0,125, 0,250 e 0,375 mg L⁻¹). Lages/SC, 2018.

Fatores		Comprimento explante		Comprimento brotações		Número de brotações		Número de folhas		Comprimento médio raízes		Intensidade de calos	
Meio cultura	KNOP	3,65	b*	1,31	b	2,00	a	4,10	b	1,00	b	1,38	ns
	MS	4,44	a	2,21	a	2,52	a	6,27	a	1,08	a	1,41	
GA ₃	0	3,55	c	1,65	ns	2,18	ns	4,85	b	1,05	ns	1,46	a
	0,125	4,08	b	1,75		2,29		5,27	a	1,06		1,33	b
	0,250	4,17	ab	1,83		2,22		5,17	ab	1,06		1,40	ab
	0,375	4,38	a	1,80		2,37		5,43	a	1,00		1,41	ab
Média		4,04		1,76		2,26		5,18		1,04		1,40	
CV (%)		7,89		21,73		12,73		8,12		15,49		7,94	

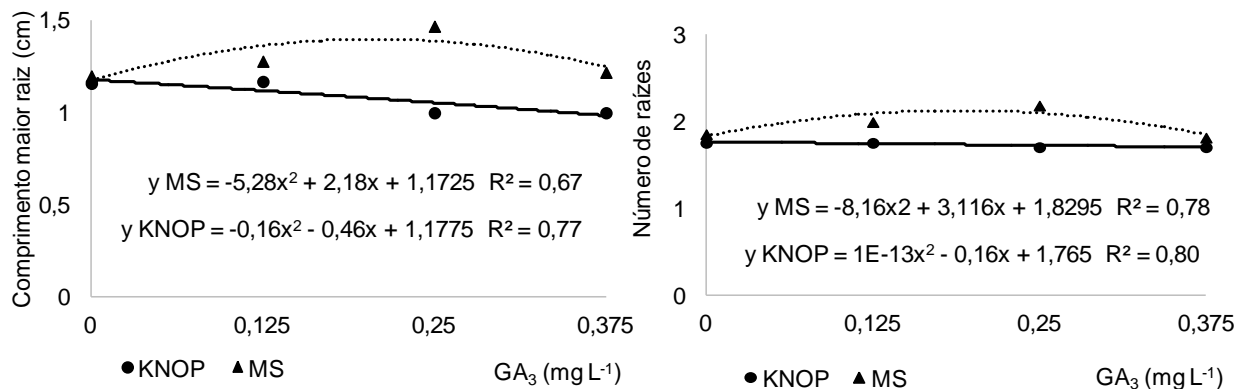
Fonte: próprio autor, 2018. * Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ns Não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Em relação aos meios de cultivo, para todas as variáveis explanadas na tabela 12, exceto intensidade de calos (na qual não houve diferença significativa entre os tratamentos), o MS possibilitou um maior crescimento e desenvolvimento dos

explantes de 'Pircinque'. Além disso, a adição do ácido giberélico influenciou o comprimento dos explantes, assim como, o número de folhas e intensidade de calos. Em geral, para essas três variáveis, as concentrações de 0,250 e 0,375 mg L⁻¹ de GA₃ foram satisfatórias, porém, com resultados positivos também com apenas 0,125 mg L⁻¹ de GA₃ para o número de folhas ou ainda, na ausência de GA₃ para a intensidade de calos.

Em contrapartida, quando se estudou o comprimento da maior raiz e o número médio de raízes, foi verificada a interação entre ambos os fatores para essas variáveis (Figura 8).

Figura 08 – Comprimento da maior raiz (cm) e número de raízes *in vitro* de explantes de morangueiro 'Pircinque' em dois diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e concentrações de GA₃ (0, 0,125, 0,250 e 0,375 mg L⁻¹). Lages/SC, 2018.



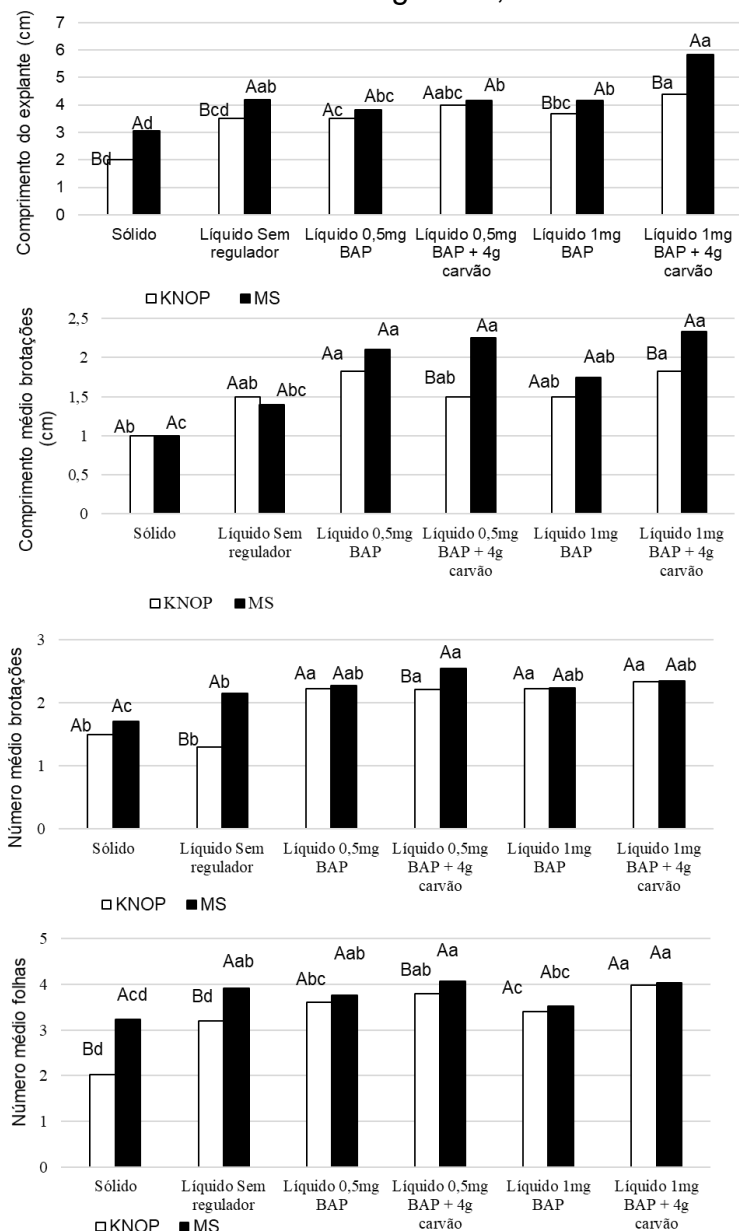
Fonte: próprio autor, 2018.

A partir da análise de regressão demonstrada na figura 8, constata-se que o desenvolvimento radicular no meio de cultivo MS com a adição de ácido giberélico foi favorecido quando comparado ao uso de KNOP com ou sem a presença de GA₃. Para ambas variáveis analisadas, houve uma tendência de aumento no comprimento e número de raízes até 0,250 mg L⁻¹ de GA₃ adicionado ao meio MS, e após esse ponto da curva, queda do desenvolvimento do sistema radicular de explantes de morangueiro 'Pircinque'.

Na figura 9, verificam-se as variáveis comprimento do explante e de brotações e número de brotações e folhas no experimento de combinações de citocinina e carvão ativado em meios de cultivo líquido (MS e KNOP), onde em geral, apresentaram resultados satisfatórios quando comparado ao meio de cultura tradicional (sólido). Rodríguez et al. (1991) e Kadota et al. (2001) caracterizam esse

sistema como ‘dupla-fase’ da cultura *in vitro*, que pode ser utilizado com sucesso na micropropagação do gênero *Pyrus*, principalmente com a finalidade de aumentar a taxa de multiplicação e crescimento dos brotos.

Figura 09 – Comprimento do explante e médio de brotações (cm) e número de brotações e folhas de explantes de morangueiro ‘Pircinque’ em dois diferentes meios líquidos de cultivo (KNOP e MS) e combinações de citocinina e carvão ativado. Lages/SC, 2018.



Fonte: próprio autor, 2018. *Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro; letras maiúsculas são usadas para comparar os meios de cultura e minúsculas, as combinações de citocinina e carvão ativado.

O comprimento dos explantes foi superior quando utilizado o meio de cultura MS líquido com 1 mg BAP + 4 g carvão ativado, porém, sem diferir dos meios líquidos MS sem regulador e KNOP com 0,5 mg BAP + 4 g carvão ativado. Já o comprimento

médio das novas brotações foi maior na presença do meio líquido MS (0,5 ou 1 mg BAP com ou sem carvão) e do KNOP (sem regulador e com 0,5 ou 1 mg de BAP, sem a presença de carvão). Radmann et al. (2009) destacam a importância de avaliação do crescimento das brotações formadas durante a fase de multiplicação, já que esta é uma variável determinante na qualidade do material destinado a fase de enraizamento.

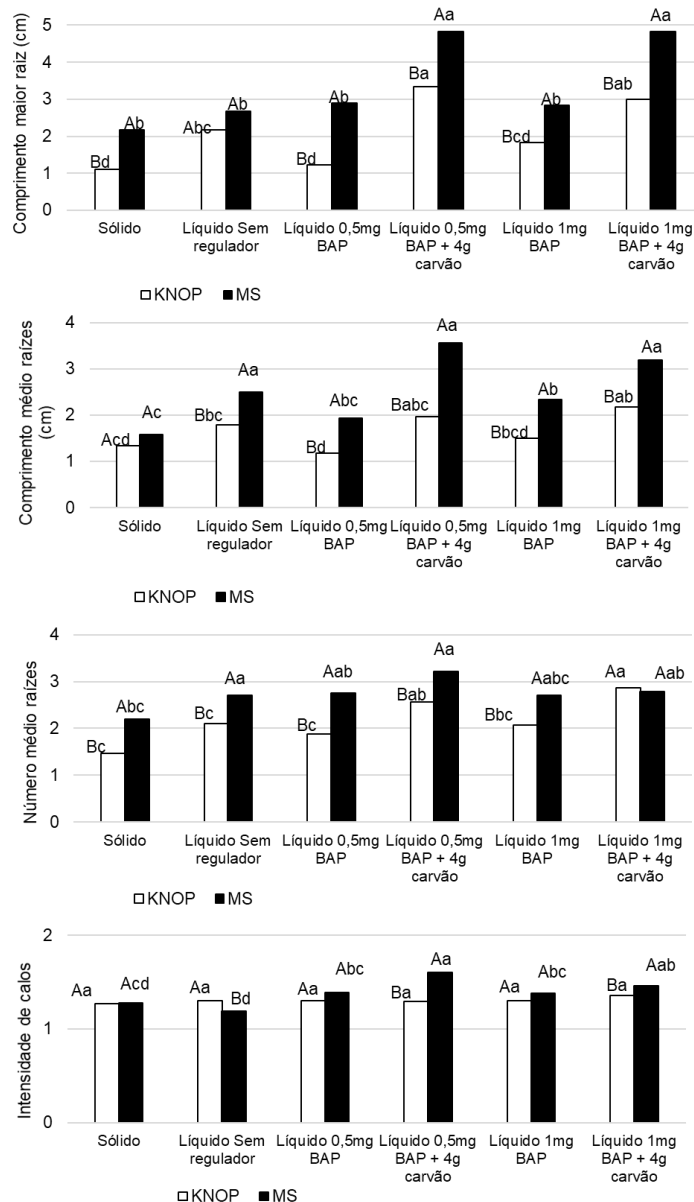
Em relação ao número médio de brotações, os destaques dos tratamentos foram para uso de KNOP com 1 mg de BAP, independente do carvão ou com somente 0,5 mg de BAP, enquanto o meio MS foi superior com 0,5 mg de BAP com carvão ativado. Para o número médio de folhas, os tratamentos com maior destaque foram MS + 0,5 mg de BAP com carvão e MS ou KNOP, também com carvão, porém com 1 mg de BAP, não diferindo do MS somente com 0,5 mg de BAP ou sem regulador de crescimento. Em estudos com *Aechmea setigera*, Vasconcelos et al. (2015) também concluíram que o sistema de cultivo dupla-fase proporciona um maior número de brotações regeneradas, dessa forma, de acordo com Fermino Junior et al. (2014), o sistema de cultivo *in vitro* dupla-fase surge como uma alternativa, podendo apresentar eficiência semelhante ao sistema convencional.

Similarmente, outros autores também verificaram que o uso do sistema de cultura dupla-fase foi eficiente na micropropagação de *Ananas comosus* (SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2012), de orquídeas *Vanilla planifolia* (OLIVEIRA et al., 2013), de *Helianthemum marminorense* (SERRANO-MARTÍNEZ, CANO-CASTILHO e CASAS (2012) e em geral, de acordo com Kozomara et al. (2008), pode ser considerado uma estratégia para o aumento das taxas de multiplicação de brotos para espécies lenhosas. Segundo Scherwinski-Pereira et al., (2012), esses resultados positivos merecem destaque, em virtude da redução a necessidade da manipulação em subcultivos (subdivisão e individualização), custos de produção e contaminação microbiológica.

As variáveis relacionadas ao sistema radicular dos explantes de morangueiro 'Pircinque' cultivados em sistema dupla-fase são demonstradas na Figura 10, onde para as quatro estudadas, os tratamentos que, em geral, se destacaram foram: MS + 0,5 mg ou 1 mg BAP + 4 g carvão de ativado. Além dos resultados satisfatórios demonstrados para essas variáveis, Scherwinski-Pereira et al. (2012) e Fermino Junior et al. (2014), confirmam que a presença da citocinina estudada (BAP),

possibilitam maior proliferação de brotos, assim como, comprimento da parte aérea destes brotos regenerados.

Figura 10 – Comprimento da maior raiz e médio de raízes (cm), número médio de raízes e intensidade de calos de explantes de morangueiro ‘Pirquinque’ em dois diferentes meios líquidos de cultivo (KNOP e MS) e combinações de citocinina e carvão ativado. Lages/SC, 2018.



Fonte: próprio autor, 2018. *Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro; letras maiúsculas são usadas para comparar os meios de cultura e minúsculas, as combinações de citocinina e carvão ativado.

De acordo com os resultados apresentados nas figuras anteriores, verifica-se que o sistema dupla-fase é uma opção satisfatória de cultivo *in vitro*, já que apresenta a fase semissólida como suporte constituída por meio de cultura facilmente disponível

para os tecidos (SANDHYARANI et al., 2011), além do meio de cultura líquido, que aumenta a superfície de contato dos explantes com o meio de cultura, ocasionando aumento na difusão, absorção e reposição de nutrientes *in vitro* (PULLMAN e SKRYABINA, 2007).

Com base nos diferentes experimentos, pode-se concluir que os diferentes meios de cultivo e componentes adicionados ao mesmo, influenciam o estabelecimento e multiplicação *in vitro* de explantes de morangueiro 'Pircinque'. Na tabela 13 seguem os melhores resultados para cada fase do cultivo *in vitro*.

Tabela 13 – Meio de cultivo e componentes a serem adicionados aos mesmos nas etapas de cultivo *in vitro* de explantes de morangueiro 'Pircinque'.

Fase do cultivo <i>in vitro</i>	Meio de cultivo	Componente	Concentração
Estabelecimento	KNOP	PPM	2 mL L ⁻¹
		Sacarose	30 g L ⁻¹
Multiplicação (etapa sólida)	MS	Ágar	6 g L ⁻¹
		Carvão ativado	4 g L ⁻¹
		Fe EDDHA	0,1 g L ⁻¹
		BAP	1 mg L ⁻¹
		GA ₃	0,25 mg L ⁻¹
		Multiplicação (etapa líquida)	MS

Fonte: próprio autor, 2018.

3.4 CONCLUSÕES

O meio de cultivo MS demonstrou maior eficiência do cultivo de explantes de 'Pircinque', exceto na etapa de estabelecimento, que a maior sobrevivência dos meristemas é obtida em meio KNOP com uso de PPM®.

A adição de diferentes componentes ao meio de cultivo MS favorece a multiplicação de explantes de morangueiro 'Pircinque', assim como o uso da técnica dupla-fase, com adição de uma pequena lâmina do meio de cultura MS líquido, após a manutenção em meio sólido.

4 CALOGÊNESE A PARTIR DE FOLHAS DE EXPLANTES DE CULTIVAR ITALIANA DE MORANGUEIRO 'PIRCINQUE'.

RESUMO

A calogênese a partir de diferentes explantes de morangueiro é relatada por diversos autores, já que é uma técnica viável tanto para a propagação vegetativa da espécie como para a obtenção de novas linhagens genéticas, que podem ser opções variadas para o lançamento de novas cultivares. Entretanto, pesquisas já confirmam a exigência de criação e adaptação de distintos protocolos para cada cultivar que se deseja a indução calogênica *in vitro*. Nesse sentido, objetivou-se a indução e obtenção de calos de explantes foliares de morangueiro cv. Pircinque, a partir de diferentes sentidos de corte das folhas (longitudinal e transversal), assim como, distintas concentrações de duas citocininas (BAP e 2iP) e uma auxina (ANA). Para obtenção e indução de calos nodulares, foram estudados três distintos fatores: sentido de corte foliar (longitudinal e transversal), regulador de crescimento (2iP - 2-isopenteniladenina, BAP - 6-benzilaminopurina e ANA - ácido α -naftaleno acético) e cinco concentrações (0; 4; 8; 12 e 16 mg L⁻¹), totalizando 30 tratamentos, com cinco repetições de cinco explantes cada. Os materiais foram inoculados com a superfície adaxial em contato com o meio de cultura MS com 100% da quantidade dos sais e vitaminas, suplementado com 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose e 4,5 g L⁻¹ de ágar. Após 45 dias as variáveis analisadas foram: tamanho do calo (cm²) e presença de calos (escala: 1 – ausente, 2 – pouco, 3 – médio e 4 – alto). Para a indução de calos *in vitro* de morangueiro 'Pircinque' as folhas devem ser cortadas transversalmente, de forma perpendicular a nervura da folha e as mesmas devem ser inoculadas em meio de cultura com 8 mg L⁻¹ de ácido α -naftaleno acético (ANA).

4.1 INTRODUÇÃO

Dentro do grupo das pequenas frutas, a cultura do morangueiro é a de maior expressão econômica, sendo apreciada nas mais variadas regiões do mundo (OLIVEIRA et al., 2011). Entretanto, a muda nacional, em geral, não atinge boa qualidade fisiológica e sanitária, o que torna boa parte dos produtores dependentes

da importação (ANTUNES e PERES, 2013), o que demanda práticas e tecnologias que auxiliem na propagação dessa espécie de grande importância econômica.

A organogênese de algumas cultivares de morango, a partir de explantes foliares, de pecíolos e de estolões é relatada por vários autores (FOLTA et al., 2006; BISWAS et al., 2010; PINHO et al. (2010) na busca de desenvolver protocolos específicos de cultura de tecido vegetal, que são usados como ferramentas na transformação genética, regeneração de órgãos e tecidos em plantas transgênicas e estudos fisiológicos de desenvolvimento das mesmas.

A calogênese é uma técnica utilizada para estudar o crescimento e desenvolvimento de calos *in vitro* e é comumente utilizada para facilitar a propagação das plantas por rotas organogênicas ou embriogênicas (ALMEIDA et al., 2015). Para ambas as rotas, a morfogênese requer o uso de hormônios vegetais que promovam a retomada da mitose e tecidos diferenciados, alterando o metabolismo celular em células quiescentes ativas (KIELSE et al., 2007), já que esses alteram a formação, tamanho, friabilidade e coloração dos calos.

Quando o processo é iniciado a partir de folhas, obtêm-se culturas nodulares, que são aglomerados globulares meristemáticos de coloração verde-clara com textura friável e o potencial de multiplicação destas é superior ao da organogênese convencional, alcançando índices similares aos observados na embriogênese somática (GUERRA e DAL VESCO, 2010; DAL VESCO e GUERRA, 2010).

Diante do exposto, buscou-se com esse estudo, a indução e obtenção de calos nodulares de explantes foliares de morangueiro cv. Pircinque, a partir de diferentes sentidos de corte das folhas (longitudinal e transversal), assim como, distintas concentrações de duas citocininas (BAP e 2iP) e uma auxina (ANA).

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi executado no Laboratório de Micropropagação Vegetal (LMV), pertencente ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC), localizado na cidade de Lages/SC.

Para obtenção de calos, foram estudados três distintos fatores: tipo de corte foliar (longitudinal e transversal), regulador de crescimento (2iP - 2-isopenteniladenina, BAP - 6-benzilaminopurina e ANA - ácido α -naftaleno acético) e

suas concentrações (0; 4; 8; 12 e 16 mg L⁻¹), totalizando 30 tratamentos, com cinco repetições de cinco explantes cada.

Os explantes foram obtidos a partir de plantas já cultivadas *in vitro* e constituíram de fragmentos de folhas, de aproximadamente $1 \pm 0,5$ cm², cortadas em dois sentidos: longitudinal, paralelo a nervura central da folha e transversal, de forma perpendicular a nervura da folha. Estes foram inoculados com a superfície adaxial em contato com o meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962 – Apêndice A) com 100% da quantidade dos sais e vitaminas, suplementado com 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose e 4,5 g L⁻¹ de ágar. O pH do meio de cultivo foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da adição do ágar, sendo este posteriormente autoclavado durante 20 minutos a 121°C, sob pressão de 1,5 atm.

Após a inoculação, os explantes foram mantidos no escuro por um período de dez dias, à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e após esse período, foram transferidos para sala de crescimento com 16 horas de fotoperíodo, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e intensidade luminosa de $42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecido por lâmpadas fluorescentes brancas, onde permaneceram distribuídos de forma inteiramente casualizada.

Após 45 dias as variáveis analisadas foram: tamanho do calo (cm²) e presença de calos (escala: 1 – ausente, 2 – pouco, 3 – médio e 4 – alto), como demonstrado na figura 11.

Figura 11 – Escala e intensidade de calos em explantes oriundos de folhas *in vitro* de morangueiro ‘Pircinque’ em função do sentido de corte e reguladores de crescimento em distintas concentrações. Lages/SC, 2018.



Fonte: próprio autor, 2018.

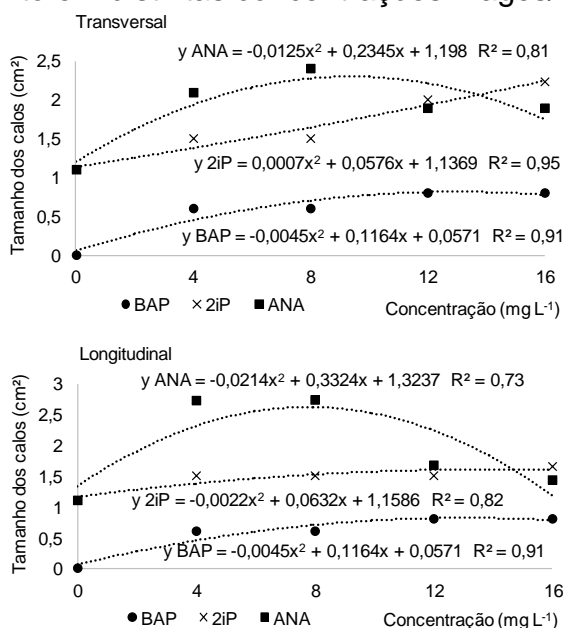
Para a análise dos dados, realizou-se a análise de variância aplicando o teste F e, quando este foi significativo, realizou-se a comparação pareada das médias pelo teste de Tukey com probabilidade de erro de 5% e para os fatores quantitativos, foi realizada análise de regressão polinomial. As variáveis discretas, provenientes de contagem, foram transformadas através da expressão $[\sqrt{(x+0,5)}]$, onde x, é a média

obtida de cada variável e a escala referente a intensidade de calos em $\log(x+K)$, onde x , é a média obtida de cada variável e K igual a 1.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obteve-se interação tripla entre os fatores estudados (tipo de corte, regulador de crescimento e concentração destes). Na figura 12, verifica-se a partir da análise de regressão, que para o tamanho de calos, em cm^2 , a influência dos reguladores de crescimento em diferentes concentrações foi similar para o fator sentido de corte das folhas. A utilização da auxina (ANA) proporcionou resultados superiores para a variável quando comparada as duas citocininas estudadas (BAP e 2iP), sendo que o uso de BAP foi o tratamento inferior, independente da concentração como o do sentido de corte da folha de morangueiro. Esse resultado era esperado, já que a adição de quantidades excessivas de auxina ao meio estimula a produção de calos, embora a calogênese ocorra mesmo em baixas concentrações (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990).

Figura 12 – Tamanho dos calos (cm^2) em explantes oriundos de folhas *in vitro* de morangueiro ‘Pircinque’ em função do tipo de corte e reguladores de crescimento em distintas concentrações. Lages/SC, 2018.



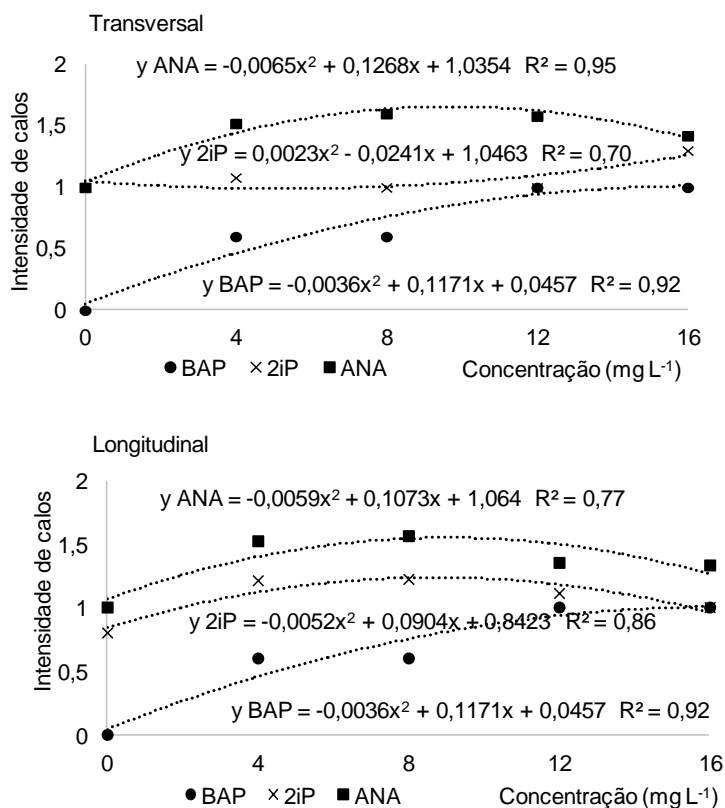
Fonte: próprio autor, 2018.

Alguns autores já estudaram a indução de calos e crescimento de pequenos aglomerados de coloração esverdeada com aspecto friável em morangueiro, como Omar et al. (2013) e Zhang et al. (2014), classificadas como embriogênese somática e também por Scherer et al. (2013) em *Ananas comosus* e Dal Vesco et al. (2011), em *Billbergia zebrina*, classificadas como culturas nodulares.

Em relação ao uso do 2iP, houve uma tendência de crescimento dos calos conforme aumentou o uso da citocinina, dando indícios que maiores concentrações do que as testadas neste trabalho, possam promover uma maior calogênese. Tanto no sentido transversal quanto no longitudinal, a concentração de 8 mg L⁻¹ de ANA resultou em calos de maior tamanho, sendo 2,40 e 2,73 cm², respectivamente. No entanto, a maior dimensão dos calos na concentração de 8 mg L⁻¹, não diferiu estatisticamente do uso de 4 mg L⁻¹ quando o sentido de corte foi o longitudinal. Assemelhando-se a este, alguns estudos realizados em diversas espécies, como *Passiflora alata* (PACHECO et al., 2012), *Passiflora suberosa* (GARCIA et al., 2011) e *Passiflora* spp. (ROSA et al., 2015) confirmaram que alta proliferação de calos foi obtida em meio de cultura com somente um tipo de regulador de crescimento, como a auxina. Entretanto, outros resultados confirmam que a interação entre auxinas e citocininas é, muitas das vezes, responsável pela alta indução de calos (CARVALHO et al., 2015).

Quanto a intensidade de calos (Figura 13), a não utilização dos reguladores de crescimento pouco promoveram a aglomeração de células. Resultados semelhantes foram encontrados por Feitosa et al. (2013) em explantes de *Jatropha curcas* L., onde tanto na ausência do AIB e quanto do BAP, notou-se pouca formação de calo, sendo que os autores destacam também, que em todos os tratamentos com a presença de auxina e/ou citocinina ocorreu a formação de calos compactos, como visualizado nesse estudo. Isso comprova que o suprimento exógeno de reguladores de crescimento ao meio de cultura é, em muitos casos, necessário para a calogênese (ROSA e DORNELAS, 2012; PÊGO et al., 2013).

Figura 13 – Intensidade de calos em explantes oriundos de folhas *in vitro* de morangueiro ‘Pircinque’ em função do tipo de corte e reguladores de crescimento em distintas concentrações. Lages/SC, 2018.

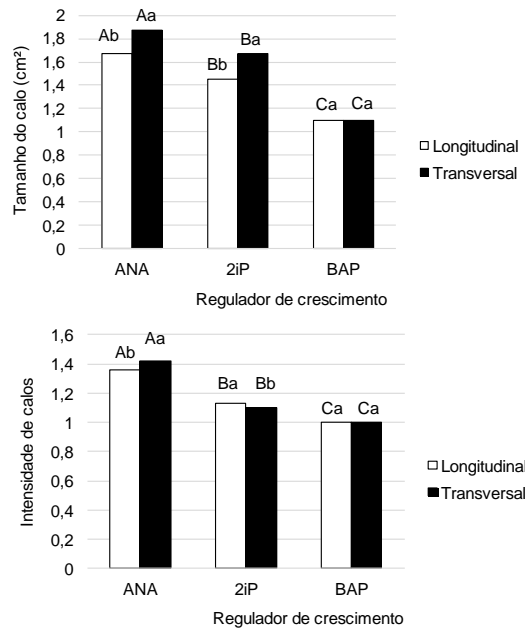


Fonte: próprio autor, 2018.

A influência dos reguladores de crescimento na indução de calos de morangueiro também foi estudada por Qin et al. (2011). Os autores verificaram 100% de regeneração de explantes da cv. Toyonaka, a partir de folhas jovens cultivadas em meio de cultura MS suplementado com a combinação de 1,5 mg L⁻¹ de TDZ + 0,4 mg L⁻¹ de AIB.

A fim de identificar e facilitar o entendimento de qual tipo de corte nas folhas foi o mais significativo entre os tratamentos, na figura 14 estão demonstradas as médias referentes as duas variáveis avaliadas (tamanho e intensidade dos calos) em função dos diferentes reguladores de crescimento estudados e o sentido longitudinal e transversal em que as folhas foram inoculadas ao meio de cultura. Verifica-se que para ambas, o uso de ANA se destacou e o corte transversal estimulou uma maior proliferação e crescimento dos calos com a utilização da auxina, provavelmente por ser o tratamento onde foi mantida parte da nervura da folha e quando se usou o BAP, ambos os cortes não diferiram estatisticamente.

Figura 14 – Tamanho dos calos (cm²) e intensidade de calos em explantes oriundos de folhas *in vitro* de morangueiro ‘Pircinque’ em função do sentido de corte e reguladores de crescimento. Lages/SC, 2018.



Fonte: próprio autor, 2018. *Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro; letras maiúsculas comparam os reguladores de crescimento e as minúsculas, o sentido de corte.

Em contrapartida, quando se utilizou o 2iP ou BAP, os comportamentos para as duas variáveis foram inferiores, nesta ordem, caracterizados por uma menor intensidade de calogênese, quando comparadas ao uso da auxina e independente do tipo de corte foliar utilizado. Estes resultados não corroboram com Barboza et al. (2014), que justificam a aplicação de forma exógenas em algumas espécies, por aumentarem o conteúdo endógeno de diferentes tipos de citocininas, elevando a taxa proliferativa.

Em relação ao sentido de corte dos explantes, outros estudos também demonstram como o tipo de material utilizado *in vitro* pode influenciar o crescimento de calos. Biswas et al. (2010) avaliaram a formação de calos em diferentes fontes de explantes de morangueiro cv. Rabi-01, Rabi-02 e Rabi-03 e observaram significativa influência do tipo de explante utilizado na formação de calos, destacando que explantes provenientes de segmentos nodais e estolões apresentaram resultados melhores em relação aos explantes obtidos a partir de tecidos foliares, assim como, a influência da idade dos tecidos utilizados e a variação da sensibilidade dos tecidos aos reguladores de crescimento. Em estudo similares, Folta et al. (2006) mostraram que em morangueiro ‘Laboratory Festival 9’, os explantes provenientes de folhas e

pecíolos mais jovens apresentam melhores resultados para a porcentagem de regeneração e, os explantes oriundos de estolões, apresentaram significativos problemas de contaminação.

Contudo, as maiores proliferações de calogênese foram encontradas no corte em sentido transversal das folhas de explantes de morangueiro 'Pircinque'. Erig e Schuch (2005), ao estudarem a morfogênese de folhas de macieira também verificaram que as maiores porcentagens de regeneração e intensidade de formação de calo foram obtidas com o fragmento delgado transversal de folha comparado ao longitudinal, assim como, Tang et al. (2002), que observaram que geralmente, os brotos *in vitro* de cerejeira surgiam a partir da nervura da folha ou em associação com o tecido vascular. Dessa forma justifica-se a influência do tipo de explante na indução de calos, onde se recomenda a utilização daqueles que contêm maior proporção de tecido meristemático, ou que apresentam maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1990).

Nesse sentido, aliado ao estudo dos explantes, o estudo demonstra a importância de verificar as diferenças entre os reguladores de crescimento, já que, segundo Rodrigues e Almeida (2010), o balanço hormonal obtido principalmente entre os níveis de citocininas e auxinas, exógenas e endógenas do calo, podem tanto estimular a proliferação celular, assim como, exercer um efeito antagônico, reduzindo a multiplicação dos mesmos.

4.4 CONCLUSÕES

Para a indução de calos *in vitro* de morangueiro 'Pircinque' as folhas devem ser cortadas transversalmente, de forma perpendicular a nervura da folha e as mesmas devem ser inoculadas em meio de cultura com 8 mg L⁻¹ de ácido α -naftaleno acético (ANA).

5 MULTIPLICAÇÃO E ENRAIZAMENTO DE CULTIVAR ITALIANA DE MORANGUEIRO 'PIRCINQUE' EM BIORREATORES DE IMERSÃO TEMPORÁRIA.

RESUMO

A técnica de propagação de explantes através de biorreatores de imersão temporária é uma ferramenta que possibilita, a partir do cultivo em meio líquido, aumentar a eficiência da produção de mudas *in vitro*. Diversas pesquisas com a cultura do morangueiro mostram a maior eficiência do sistema quando comparado ao processo convencional, em meio sólido, da micropropagação. Nesse sentido, o objetivo foi estabelecer um protocolo multiplicação e enraizamento da cultivar italiana de morangueiro 'Pircinque', em biorreatores de imersão temporária. Realizaram-se dois estudos distintos e independentes, caracterizados pelas etapas de multiplicação e enraizamento de explantes de morangueiro 'Pircinque'. Foram estudados dois meios de cultura (MS e KNOP modificado e, além disso, como tratamento testemunha, foi avaliado o crescimento dos explantes em meio de cultivo sólido, com a adição de 5 g L⁻¹ de ágar. Distintos tempos de imersão do meio de cultura aos explantes também foram estudados, sendo cinco (a cada cinco horas) ou oito (a cada três horas) vezes ao dia, durante 15 minutos. Sendo assim, o estudo compreendeu os fatores meio de cultura e tempo de imersão, assim como o tratamento testemunha (sólido). Verificou-se que o uso de sistema de biorreatores de imersão temporária é uma técnica eficiente para a multiplicação e enraizamento de explantes de morangueiro cv. Pircinque, quando comparada ao método convencional de micropropagação com uso de meio de cultura sólido. Em suma, o meio de cultivo MS líquido em contato cinco vezes ao dia com explantes de morangueiro 'Pircinque' favorece o crescimento da parte aérea e do sistema radicular.

5.1 INTRODUÇÃO

Devido à maior demanda de espécies de importância econômica, busca-se, por meio de ferramentas biotecnológicas, a produção de um grande número de mudas, em um curto espaço de tempo, e principalmente, obter materiais homogêneos e de qualidade.

Uma das estratégias para o cultivo *in vitro*, segundo Camolesi et al. (2010), está relacionada com a consistência do meio de cultivo, que pode ser um dos fatores a contribuir para diminuição dos custos, onde o uso de meio líquido tem proporcionado resultados iguais ou até melhores que a do meio sólido para várias espécies vegetais, em função de proporcionar maior eficiência ao processo de micropropagação, pela facilidade de preparo, permitir maior contato do material vegetativo com o meio, proporcionando incremento de produtividade e de eficiência no processo de propagação (PEREIRA e FORTES, 2003; PENCHEL et al., 2007).

Uma ferramenta que proporciona aumento da eficiência na produção de mudas *in vitro* encontra-se associada aos biorreatores de imersão temporária, com uso de meio de cultivo líquido. Este sistema é uma opção para a produção de mudas em larga escala, comparado à micropropagação convencional, pois apresenta vantagens como: aceleração e aumentos das taxas de multiplicação, uniformização da produção, redução de mão de obra e conseqüentemente no custo total por unidade produzida e aumento da produtividade, em função do sistema semi-automatizado (RIBEIRO e BASTOS, 2008; DEBIASI, 2011).

Existem diferentes sistemas de imersão temporária, porém todos seguem o mesmo princípio, relacionado ao contato dos materiais vegetais com o meio de cultura por algum período a uma frequência pré-determinada (SILVA et al., 2007; RECH FILHO et al., 2005). Hanhineva et al. (2005) iniciaram os estudos com uso de biorreatores para a micropropagação de morangueiro e o modelo utilizado foi o RITA® com sistema de imersão de 4 minutos a cada 5 horas, testando diferentes hormônios e combinações e obtiveram resultados positivos quanto a multiplicação dos explantes.

Diversos autores identificam ainda, os tipos de explantes que podem ser utilizados: pétalas (DEBNATH, 2008; OMAR et al., 2013), sépalas (DEBNATH, 2008), segmentos nodais (SHAKILA et al., 2007), brotos e meristemas retirados de estolões (MOHAMED et al., 2007; BHANKHER et al., 2008) e folhas (NEHRA et al., 1990; HANHINEVA et al., 2005; MOHAMED et al., 2007; DEBNATH, 2008; OMAR et al., 2013; ZHANG et al., 2014), sendo os dois últimos citados mais efetivos ao sistema.

Todavia, espécies e cultivares necessitam de protocolos específicos, pois podem apresentar resultados diferentes sob a mesma condição de cultivo (FORTES e PEREIRA, 2001), sendo assim, resultados satisfatórios já foram observados para cana-de-açúcar (CIDADE et al., 2006), abacaxi (SILVA et al., 2007), bromélias (MENGARDA et al., 2009), banana (ANDRADE et al., 2011) e eucalipto (OLIVEIRA et

al., 2014). Nesse sentido, estudos mais específicos que determinem a eficiência da multiplicação de diferentes seleções de morangueiro a partir da utilização de biorreatores de imersão temporária são necessários, a fim de verificar, o tipo de explante, meio de cultura, uso de reguladores de crescimento e também, o intervalo de tempo em que os materiais ficam em contato com o meio de cultivo líquido.

O objetivo do estudo foi estabelecer um protocolo multiplicação e enraizamento da cultivar italiana de morangueiro 'Pircinque', em biorreatores de imersão temporária, alcançando alta eficiência deste sistema.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Biofábrica de Plantas, localizada na cidade de Lages/SC, sendo esta, pertencente a Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/UEDESC).

Foram realizados dois estudos independentes, caracterizados pelas etapas de multiplicação e enraizamento de explantes de morangueiro 'Pircinque'. Os materiais vegetais iniciais utilizados foram oriundos de plantas já cultivadas *in vitro* e padronizados com quatro folhas cada e um comprimento de $2,5 \pm 5$ cm. Para ambos os experimentos, foi utilizado um sistema de imersão temporária com frascos duplos (garrafas de polietileno de 5 litros – Figura 15), contendo 300 mL de meio de cultivo e 14 explantes por garrafa.

Figura 15 – Sistema de biorreatores de imersão temporária em frascos duplos para multiplicação e enraizamento de explantes de morangueiro ‘Pircinque’. Lages/SC, 2018.



Fonte: próprio autor, 2018.

Foram estudados dois meios de cultura (MS e KNOP modificado – Apêndice A), ambos contendo além dos sais e vitaminas característicos de cada um deles, $37,3 \text{ mg L}^{-1}$ de Fe EDDHA, $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ de GA_3 e 30 g L^{-1} de sacarose, diferindo nas duas etapas a presença de 1 mg L^{-1} de BAP na multiplicação e $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e 1 mg L^{-1} de AIB no enraizamento. Além disso, como tratamento testemunha, foi avaliado o crescimento dos explantes em meio de cultivo sólido, com a adição de 5 g L^{-1} de ágar, assim como os outros componentes já citados anteriormente. Distintos tempos de imersão do meio de cultura aos explantes também foram estudados, sendo estes: cinco (a cada cinco horas) ou oito (a cada três horas) vezes ao dia, durante 15 minutos. Sendo assim, o estudo compreendeu os fatores meio de cultura e tempo de imersão, assim como o tratamento testemunha (sólido), totalizando seis tratamentos com três repetições de 14 explantes cada.

As variáveis analisadas no experimento de multiplicação foram número de brotações e folhas, comprimento do explante e comprimento médio de brotações e intensidade de calos (0 a 2), sendo considerado 0: sem calos, 1: calos pequenos e 2: calos grandes. Na etapa de enraizamento, além das variáveis citadas anteriormente, foram avaliados o número e comprimento da maior raiz, além do comprimento médio de raízes.

Os dados foram submetidos à análise de variância a partir do teste F e as médias, quando significativas estatisticamente, comparadas pelo teste de Tukey a 5%

de probabilidade. Os valores provenientes de contagem foram transformados na raiz quadrada de $x+0,5$ [$\sqrt{(x+0,5)}$], onde x é a média obtida de cada variável e a escala referente a intensidade de calos em $\log(x+K)$, onde x , é a média obtida de cada variável e K igual a 1.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do teste de Tukey ($p < 0,05$) verificou-se que as variáveis número de brotações e escala de intensidade de calos dos explantes de 'Pircinque' não foram influenciadas pela interação dos fatores (meio de cultivo x tempos de imersão do meio de cultura líquido), apenas de forma isolada (Tabela 14).

Tabela 14 – Número de brotações e escala de intensidade de calos (0 a 2) em explantes de morangueiro 'Pircinque' multiplicados em biorreatores de imersão temporária. Lages/SC, 2018.

	Número de brotações		Intensidade de calos	
MS	3,65	a*	1,65	A
KNOP	1,35	b	1,40	B
5x/dia	3,59	a	1,69	A
8x/dia	2,33	b	1,39	B
Sólido	1,57	c	1,50	Ab
CV (%)	5,71		6,32	

Fonte: próprio autor, 2018. *Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

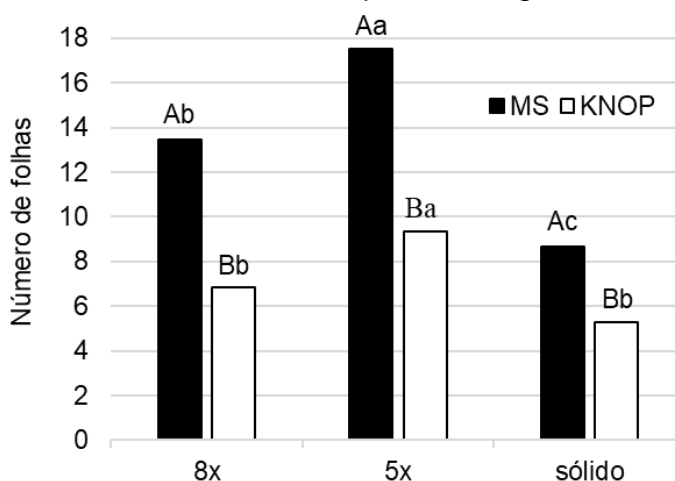
O meio de cultivo MS proporcionou a formação de um maior número de brotações quando comparado ao KNOP e em consequência, uma intensidade de calos superior nos explantes de morangueiro cv. Pircinque, em decorrência da taxa de multiplicação ser favorecida pelos componentes presentes no meio de cultivo MS. Os explantes imersos em meio líquido 5x/dia se destacaram quanto ao número de novas brotações em relação ao tratamento com 8x/dia com meio líquido e seguido do meio sólido, assim, o uso de biorreatores de imersão temporária (5x/dia) proporcionou maior taxa de multiplicação de morangueiro 'Pircinque', em torno de 56%, quando comparado ao sistema controle, sem uso de meio líquido e de sistema automatizado. Aliado aos resultados apresentados, Oliveira et al. (2014) destacaram também, que

os menores intervalos entre as imersões (2 e 4 horas) proporcionaram maior crescimento em massa fresca e número de brotos formados por explante de eucalipto.

Em relação a intensidade de calos presentes nos explantes (Tabela 16), aqueles cultivados em meio líquido imerso 5x/dia apresentaram maiores índices calogênicos, porém não diferindo do cultivo em meio sólido, sendo ambos tratamentos superiores a imersão 8x/dia. Essa variável estudada é de grande importância, pois é indesejável na multiplicação, uma vez que em condições de elevada formação de calos pode haver comprometimento da proliferação de gemas axilares e alongamento de brotações, afetando o desenvolvimento *in vitro*, principalmente em condições de propagação direta (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; NAVROSKI et al., 2013).

O número de folhas dos explantes é demonstrado na Figura 16, onde ocorreu interação dos dois fatores estudados, com maior formação de novas folhas no cultivo em meio MS com imersão 5x/dia durante 15 minutos. Além disso, independente se foi utilizado ou não o sistema de imersão temporária, o meio de cultura MS foi sempre superior ao KNOP, com melhores resultados nos tratamentos 5x/dia, 8x/dia e sistema convencional (sólido), respectivamente.

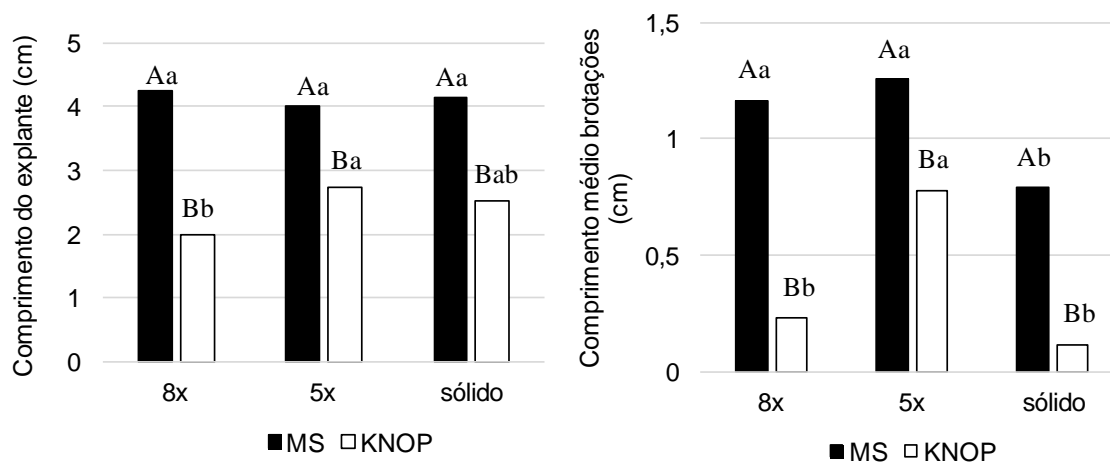
Figura 16 – Número de folhas em explantes de morangueiro ‘Pircinque’ multiplicados em biorreatores de imersão temporária. Lages/SC, 2018.



Fonte: próprio autor, 2018. *Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro; letras maiúsculas comparam os meios de cultura e as minúsculas, tempos de imersão em solução líquida.

Na figura 17 são demonstrados os dados para as variáveis comprimento do explante e médio de brotações de morangueiro 'Pircinque', sendo que, o maior comprimento principal dos explantes foi obtido sempre em meio de cultivo MS, independentemente do tempo de imersão em sistema de biorreatores e no tratamento controle. Na mesma figura, verifica-se o comprimento médio das brotações, que foi superior em meio MS com a utilização do sistema automatizado, nos dois diferentes tempos de imersão, cinco ou oito vezes ao dia. A eficiência do sistema automatizado em estudos com *Eucalyptus* também foi comprovado, onde, Oliveira et al. (2014) compararam os tratamentos de manejo de imersão do meio de cultivo em biorreator com o cultivo convencional em meio sólido e os autores observaram um ganho de 2,5 vezes em massa fresca dos explantes de cultivados no sistema de imersão, porém, a cada 2 horas (OLIVEIRA et al., 2014).

Figura 17 – Comprimento do explante e médio de brotações (cm) em explantes de morangueiro 'Pircinque' multiplicados em biorreatores de imersão temporária. Lages/SC, 2018.



Fonte: próprio autor, 2018. *Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro; letras maiúsculas comparam os meios de cultura e as minúsculas, tempos de imersão em solução líquida.

Na etapa de enraizamento de 'Pircinque' em sistema de biorreatores de imersão temporária não ocorreram interações entre os dois fatores para as seguintes variáveis: número de brotações, comprimento médio e da maior raiz e intensidade calogênica na base dos explantes (Tabela 15), sendo que as duas primeiras citadas, apresentaram resultados semelhantes, ao nível de 5% de probabilidade de erro. Em relação ao meio de cultivo utilizado, MS proporcionou explantes com maior número de brotações, assim como, comprimento médio da maior raiz. A imersão em meio de cultivo líquido cinco ou oito vezes ao dia, em sistema automatizado, para o número de

brotações foi superior (em torno de 21%) ao tratamento do sistema de micropropagação convencional, em meio de cultura sólido.

Tabela 15 – Número de brotações, comprimento da maior e médio de raízes (cm) e intensidade de calos em explantes de morangueiro ‘Pircinque’ durante enraizamento em biorreatores de imersão temporária. Lages/SC, 2018.

	Número de brotações		Comprimento maior raiz		Comprimento médio raízes		Intensidade de calos	
MS	2,78	a*	1,73	a	1,42	ns	1,36	ns
KNOP	2,25	b	1,42	b	1,26		1,29	
5x/dia	2,67	a	1,89	a	1,61	a	1,31	b
8x/dia	2,66	a	1,69	a	1,32	b	1,22	b
Sólido	2,10	b	1,00	b	1,00	c	1,48	a
CV (%)	17,69		18,22		16,01		10,41	

Fonte: próprio autor, 2018. *Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; ns Não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

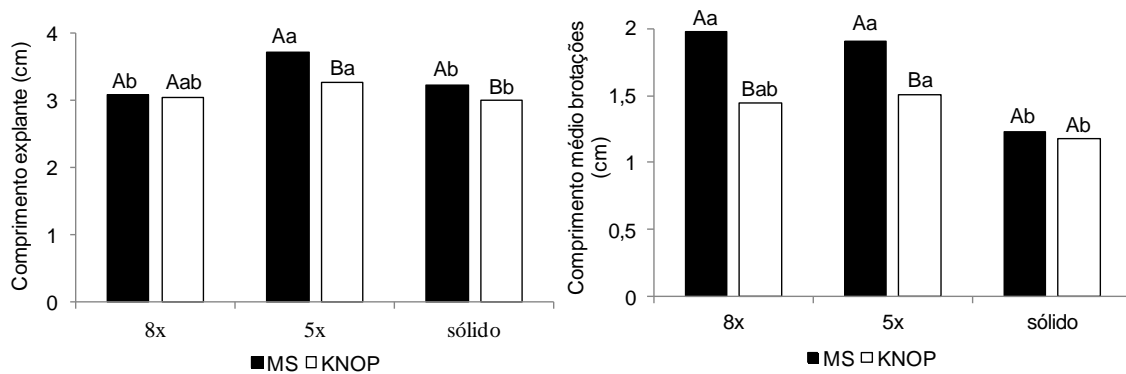
Em estudos similares, Rodrigues (2011), Teixeira (2011), Barros (2011), Debiasi (2011) e Cabral (2011) também relatam que para várias espécies, entre elas, cana-de-açúcar, abacaxi e banana, a eficiência produtiva com o uso de biorreatores, quando estabelecidos protocolos adequados, foi significativamente superior ao sistema convencional de micropropagação.

O comprimento médio de raízes, apresentado na Tabela 15, não foi influenciado pelos dois meios de cultivo estudados, não havendo diferenças significativas ($p < 0,05$) entre eles. Já o contato dos nutrientes aos explantes, cinco vezes ao dia, favoreceu o crescimento médio das novas raízes formadas durante a etapa de enraizamento, seguidos do tratamento 8x/dia e sólido. Comportamento semelhante ao obtido nesse estudo foi observado por Andrade et al. (2011), onde maiores valores para o comprimento da raiz em bananeiras foi verificado quando os explantes foram cultivados em meio de consistência líquida.

A intensidade de calos foi alterada apenas em função da presença de meio líquido ou sólido, onde o método convencional, com ágar, ocasionou maior índice calogênico. Alguns autores destacam as desvantagens de uma elevada intensidade de calos na base dos explantes, onde podem impedir ou interferir a formação de raízes (FOGAÇA et al., 2010) e até mesmo, após o período de cultivo *in vitro*, onde podem dificultar a sobrevivência de plantas no campo, devido a pobre conexão vascular entre o caule e as raízes (AJITKUMAR e SEENI, 1998).

O crescimento do explante e das brotações (cm) são demonstrados na Figura 18. O comprimento do explante foi superior em condições de imersão de meio de cultivo MS líquido 5x/dia. Esse mesmo tratamento também favoreceu o comprimento médio de brotações, porém não diferindo da presença do meio líquido MS 8x/dia. Sendo assim, para essas duas variáveis, a utilização de biorreatores de imersão temporária foi mais uma vez, superior ao tratamento controle, ou seja, técnica convencional utilizada na micropropagação de plantas.

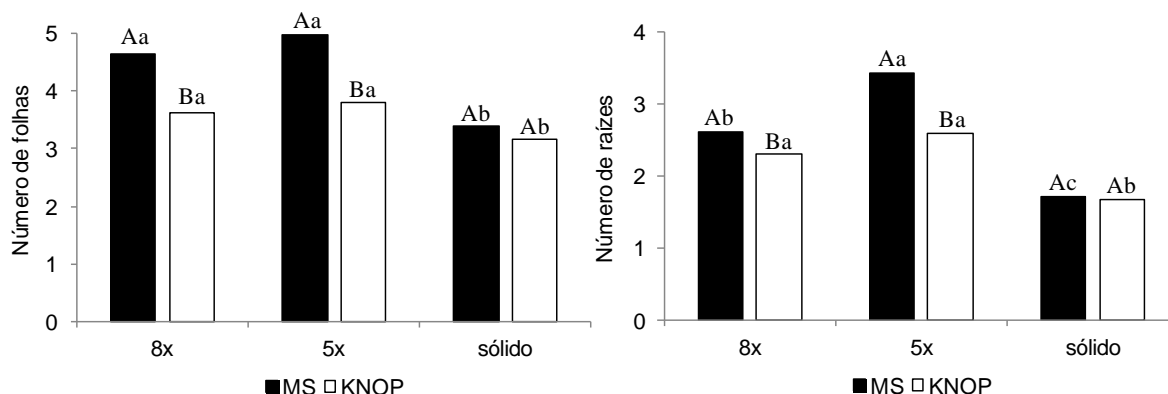
Figura 18 – Comprimento do explante e de brotações (cm) e intensidade de calos em explantes de morangueiro ‘Pircinque’ durante fase de enraizamento em biorreatores de imersão temporária. Lages/SC, 2018.



Fonte: próprio autor, 2018. *Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro; letras maiúsculas comparam os meios de cultura e as minúsculas, tempos de imersão em solução líquida.

O número médio de folhas e raízes, demonstrados na Figura 19, foram influenciados pelo método de cultivo (tradicional em meio sólido e em biorreatores com meio líquido) e pelos dois distintos meios de cultura (MS e KNOP).

Figura 19 – Número médio de folhas e raízes em explantes de morangueiro ‘Pircinque’ durante fase de enraizamento em biorreatores de imersão temporária. Lages/SC, 2018.



Fonte: próprio autor, 2018. *Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro; letras maiúsculas comparam os meios de cultura e as minúsculas, tempos de imersão em solução líquida.

Um maior número de folhas foi obtido em explantes cultivados em sistema de biorreatores de imersão temporária, independente da frequência de contato com o meio de cultura MS (cinco ou oito vezes). Mais uma vez, o uso dos nutrientes do meio de cultivo MS foi significativamente favorável para o desenvolvimento radicular (número de raízes) de morangueiro ‘Pircinque’, porém, com maior destaque quando o mesmo foi mantido em contato com os explantes por cinco vezes ao dia. Esse resultado não corrobora com os de Oliveira et al. (2014), que concluíram que na maioria dos casos os menores intervalos entre as imersões favoreceram o desenvolvimento das culturas pelo maior aproveitamento do meio de cultura líquido pela planta (OLIVEIRA et al., 2014).

Verifica-se que para ambas variáveis citadas anteriormente, número médio de folhas e raízes, o sistema de biorreatores de imersão temporária de meio de cultivo líquido favoreceu o desenvolvimento dos explantes de morangueiro ‘Pircinque’. De acordo com Oliveira et al. (2014), esse resultado confirma que a proliferação das raízes depende da disponibilidade de água e nutrientes no microambiente que as circundam. Nesse sentido, se este microambiente é pobre em nutrientes ou muito seco, o crescimento radicular é lento, e, na medida em que as condições melhoram, o crescimento radicular tende a aumentar (TAIZ e ZEIGER, 2013).

5.4 CONCLUSÕES

O uso de sistema de biorreatores de imersão temporária é uma técnica eficiente para a multiplicação e enraizamento de explantes de morangueiro cv. Pircinque, quando comparada ao método convencional de micropropagação com uso de meio de cultura sólido.

O meio de cultivo MS líquido em contato cinco vezes ao dia com explantes de morangueiro 'Pircinque' favorece o crescimento da parte aérea e do sistema radicular.

6 CRIOCONSERVAÇÃO DE EXPLANTES DE MORANGUEIRO 'PIRCINQUE' A PARTIR DAS TÉCNICAS *CRYOPLATE* E *DROPLET*¹

¹ Capítulo desenvolvido durante o período de doutorado sanduíche no *Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura - Unità di Ricerca per la Frutticoltura*, CREA-FRF (Forlì - Itália), realizado de janeiro a julho de 2017.

RESUMO

Estudos baseados no crescimento lento ou na criopreservação têm sido investigados e empregados para a conservação do material vegetal *in vitro*, entretanto, a sobrevivência e as porcentagens de regeneração dos explantes variam de acordo com diferentes variedades, mesmo quando é usado o mesmo método de criopreservação. Nesse sentido, é necessária a determinação de um protocolo apropriado para cada espécie, por isso, buscou-se estudar duas técnicas de criopreservação para explantes de morangueiro 'Pircinque', assim como, tempos de contato com a solução crioprotetora PVS₂ e o armazenamento ou não em nitrogênio líquido. Os tratamentos estudados nesse capítulo compreenderam três fatores distintos: método de criopreservação (*droplet* e *cryoplate*), tempo de contato dos explantes em solução crioprotetora de PVS₂ (0, 30, 60, 90 e 120 minutos) e o armazenamento ou não (testemunha) em nitrogênio líquido (NL), totalizando 20 tratamentos, com três repetições (placas de Petry) de 18 ápices cada. Verificou-se que explantes de morangueiro 'Pircinque' apresentam altas taxas de oxidação quando armazenados em nitrogênio líquido e que independente do tempo de contato da solução crioprotetora essas taxas são superiores a 76%. Além disso, o contato com PVS₂ nos tempos 60, 90 e 120 minutos favorece a sobrevivência dos explantes após a criopreservação, independentemente do método usado.

6.1 INTRODUÇÃO

A conservação de plantas *in vitro*, a partir da técnica de cultura de tecidos, é uma estratégia complementar à manutenção da variabilidade genética que permite a o armazenamento de germoplasma de plantas em ambiente asséptico e livre de patógenos (PILATTI et al., 2011; SANTOS et al., 2011).

Diante disso, estudos baseados no crescimento lento ou na criopreservação têm sido investigados e empregados para a conservação do material vegetal *in vitro*, sendo a última citada, bastante utilizada e compreende o armazenamento em pequenos volumes e em longo prazo do material vegetal à temperatura ultrabaixa (-196°C), geralmente em nitrogênio líquido (KACZMARCZYK et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2013; PENCE, 2011; SÁ et al., 2015) e é indicada para espécies que apresentam dificuldades de armazenamento pelos métodos tradicionais (ENGELMANN, 2011).

A técnica tem sido utilizada para a criopreservação de ápices caulinares de distintas espécies de plantas herbáceas e lenhosas, como cultivares de *Rosa x híbrida* L. (HALMAGYI e PINKER, 2006), *Colocasia esculenta* var. *esculenta* (L.) Schott (SANT et al., 2008), *Malus domestica* Borkh (HALMAGYI et al., 2010), cultivares de lírio *Lilium x lancifolium*, *Lilium x longiflorum*, *Lilium x siberia* (CHEN et al, 2011) e *Hancornia speciosa* Gomes (SANTOS et al., 2011).

Entretanto, a sobrevivência e as porcentagens de regeneração variam de acordo com diferentes espécies, mesmo quando é usada o mesmo método de crioconservação (CHEN et al., 2011), por isso, é necessária a determinação de um protocolo apropriado para cada espécie (KACZMARCZYK et al., 2011). Essa exigência ocorre em função das células apresentarem alto conteúdo de água livre, e quando expostas ao nitrogênio líquido, podem sofrer danos irreversíveis nas membranas devido aos efeitos da cristalização (SURANTHRAN et al., 2012).

Nesse sentido, são necessários estudos que verifiquem a ação de soluções crioprotetoras que evitem a desidratação dos explantes, que pode provocar modificações deletérias que afetam o metabolismo celular e a estrutura molecular e a integridade das organelas (SILVA et al., 2011; SERSHEN et al., 2012). Uma solução bastante utilizada é a PVS₂ (*Plant Vitrification Solution 2*), que consiste de uma mistura de crioprotetores, composto por 3,26 M de glicerol + 2,42 M de etileno glicol + 1,9 M de dimetilsufóxido + 0,4 M de sacarose, dissolvidos em meio de cultura MS líquido (SAKAI; KOBAYASHI; OIYAMA, 1990) e sua eficiência varia de acordo com o tempo ótimo de imersão do explante e a temperatura (geralmente utilizada a 0° C), para que haja alta taxa de regeneração após a criopreservação (ENGELMANN, 2011). Volk e Walters (2006) propuseram que esta solução age, por meio de dois mecanismos de crioproteção: um no qual a solução ocupa o lugar da água e o outro em que a PVS₂ muda o comportamento de congelamento da água remanescente nas células.

A partir do problema exposto, objetivou-se estudar duas técnicas de crioconservação para explantes de morangueiro 'Pircinque', assim como, tempos de contato com a solução crioprotetora PVS₂ e o armazenamento ou não em nitrogênio líquido.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado com a colaboração de dois institutos de pesquisa, o CREA - *Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura* (Forlì, Itália) e CNR - *Consiglio Nazionale delle Ricerche* (Firenze, Itália).

Os tratamentos estudados para a cultivar Pircinque nesse capítulo compreenderam três fatores distintos: método de crioconservação (*droplet* e *cryoplate*), tempo de contato dos explantes em solução crioprotetora de PVS₂ (0, 30, 60, 90 e 120 minutos) e o armazenamento ou não (testemunha) em nitrogênio líquido (NL). Dessa forma, representa um fatorial 2 x 5 x 2, com um total de 20 tratamentos, com três repetições (placas de *Petry*) de 18 ápices cada.

Explantes de morangueiro 'Pircinque', já cultivados *in vitro*, foram multiplicados em meio de cultivo KNOP modificado (KNOP, 1865 – Apêndice A) com 0,1 mg L⁻¹ de BAP, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose e 6,0 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado em 5,8 ± 0,1, por um período de 10 dias, que compreende a metade do tempo necessário para multiplicação *in vitro* da espécie. Posteriormente, os explantes foram armazenados em câmara fria com temperatura ajustada de 4°C e na ausência de luz, por sete dias.

Após esse período, foram excisados ápices dos explantes (de aproximadamente 2 ± 0,5 mm) em condições assépticas e transferidos para pré-cultura durante 24 horas em meio de cultura KNOP com metade da concentração de sais, acrescido de 0,3 M de sacarose e armazenados novamente em condições de 4°C e na ausência de luz.

A técnica de *cryoplate* iniciou com o contato dos explantes em solução de alginato de sódio 3% e posteriormente, os ápices foram gotejados e cobertos por solução de cloreto de cálcio (0,1 M), na qual permaneceram por 30 minutos para o processo de encapsulamento. Os explantes já encapsulados nas crioplaquetas foram lavados e mantidos por 30 minutos em solução de proteção (LS: loading solution), composta por 2 M de glicerol e 0,8 M de sacarose. Após essa etapa inicial, as

crioplacas foram submetidas aos diferentes tratamentos: 0, 30, 60, 90 e 120 minutos em solução crioconservadora (PVS₂ - *Plant vitrification Solution* nº 2), seguidos do congelamento ou não (controle) em nitrogênio líquido (NL), durante uma hora. Posteriormente, as crioplacas foram lavadas em solução contendo os nutrientes do meio de cultivo MS líquido com 1,2 M de sacarose e mantidas nesta, por 30 minutos. Em seguida, foram transferidas para o meio de recultivo KNOP com a presença de 0,2 mg L⁻¹ de BAP. Finalmente, foram submetidas a condições de 16 horas de fotoperíodo, temperatura de 25 ± 2°C e intensidade luminosa de 42 μmol m⁻² s⁻¹, fornecido por lâmpadas fluorescentes brancas.

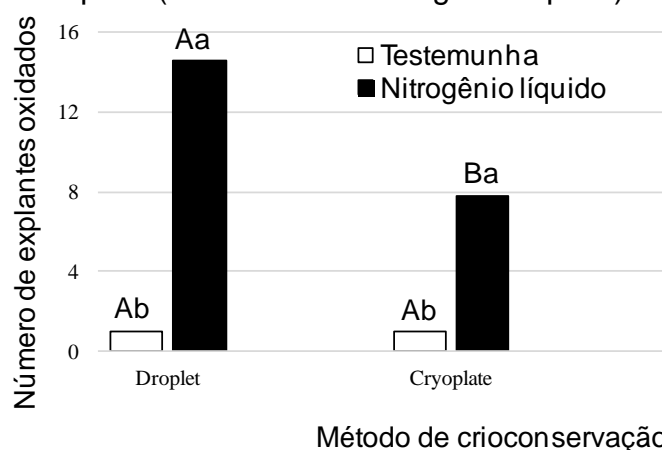
Por outro lado, a metodologia *droplet* se distingue da *cryoplate*, pois não há a etapa inicial, onde se realiza o encapsulamento do material vegetal e os ápices foram tratados e mantidos diretamente em solução de proteção (LS: *loading solution*) durante 30 minutos. Posteriormente, de acordo com os diferentes tratamentos (0, 30, 60, 90 e 120 minutos), os ápices foram posicionados em pequenas folhas de alumínio sobre a solução crioconservadora (PVS₂) e após os tempos necessários, as mesmas foram imersas rapidamente em NL por uma hora, exceto o tratamento controle, sem congelamento. Assim como no método *cryoplate*, finalizada essa etapa, os ápices ainda nas lâminas de alumínio, foram lavados por 30 minutos em solução MS líquido + 1,2 M de sacarose. E os ápices foram inoculados em meio de recultivo KNOP com a presença de 0,2 mg L⁻¹ de BAP e armazenados em sala de crescimento com condições controladas (16 horas de fotoperíodo, temperatura de 25 ± 2°C e intensidade luminosa de 42 μmol m⁻² s⁻¹).

A fim de verificar a eficiência das técnicas estudadas, foram avaliadas as variáveis: número de explantes oxidados e conseqüentemente, número de explantes sobreviventes. Os dados foram submetidos à análise de variância a partir do teste F e as médias, quando significativas estatisticamente, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e transformados na raiz quadrada de $x+0,5$ [$\sqrt{(x+0,5)}$], onde x é a média obtida de cada variável e para fatores quantitativos, foram realizadas análises de regressão polinomial.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A oxidação dos explantes de morangueiro ‘Pircinque’ foi influenciada pelos métodos utilizados de crioconservação, assim como, quando foram armazenados no nitrogênio líquido, caracterizado por interação entre os fatores (Figura 20). As técnicas *droplet* e *cryoplate* não diferiram entre si na condição testemunha (sem NL), porém, quando os explantes foram colocados em NL, os métodos diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), com médias de 15 e 8 explantes oxidados, respectivamente. Segundo Engelmann (2011) e Suranthran et al. (2012), células com alto conteúdo de água livre, quando expostas ao NL, podem sofrer danos irreversíveis nas membranas devido aos efeitos da cristalização, que acarretam na formação de cristais de gelo no interior dos tecidos.

Figura 20 – Número de explantes de morangueiro ‘Pircinque’ oxidados após técnicas de crioconservação (*cryoplate* e *droplet*), em armazenamento ou não em nitrogênio líquido (testemunha e nitrogênio líquido). Lages/SC, 2018.



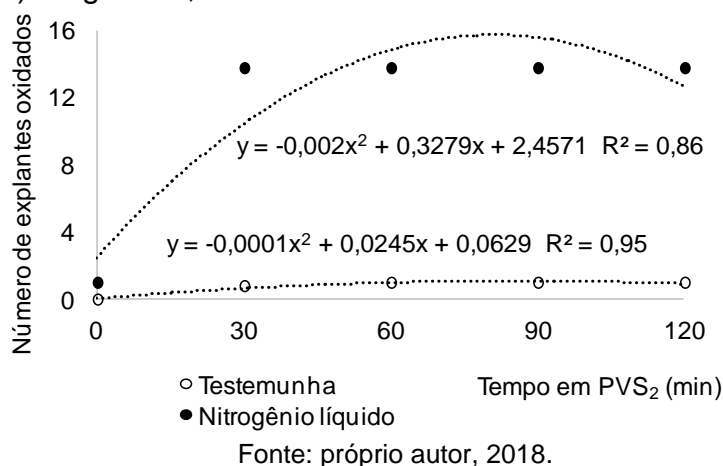
Fonte: próprio autor, 2018. *Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro; letras maiúsculas comparam as técnicas de crioconservação e as minúsculas, armazenamento em nitrogênio líquido.

Verifica-se que quando foi utilizada a técnica *droplet*, o número de explantes oxidados foi superior quando comparada com o método *cryoplate*. Contudo, Sant et al. (2008) e Guzmán-García, Bradai e Sánchez-Romero (2013) relatam que *droplet* apresenta elevada aplicabilidade para uma grande variedade de espécies e tecidos, o que demonstra a importância de se estudar e comparar métodos e espécies, pois os resultados tendem a ser diferentes.

Na figura 21, verifica-se a interação entre os fatores NL e tempos de contato do explantes em solução crioprotetora (PVS₂), onde pode ser observado claramente, que

no armazenamento em NL ocorreu uma maior taxa de oxidação, nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos, com uma média de 14 explantes dos 18 do total por repetição. Essa avaliação é de extrema importância, pois o período de duração no qual os explantes são tratados com as soluções crioprotetoras (PVS₂) determina a extensão da desidratação celular e a quantidade de componentes que irão permear as células (CHEN et al., 2011).

Figura 21 – Número de explantes de morangueiro ‘Pircinque’ oxidados após diferentes tempos de exposição em solução PVS₂ (0, 30, 60, 90 e 120 minutos) e armazenamento ou não em nitrogênio líquido (testemunha e nitrogênio líquido). Lages/SC, 2018.

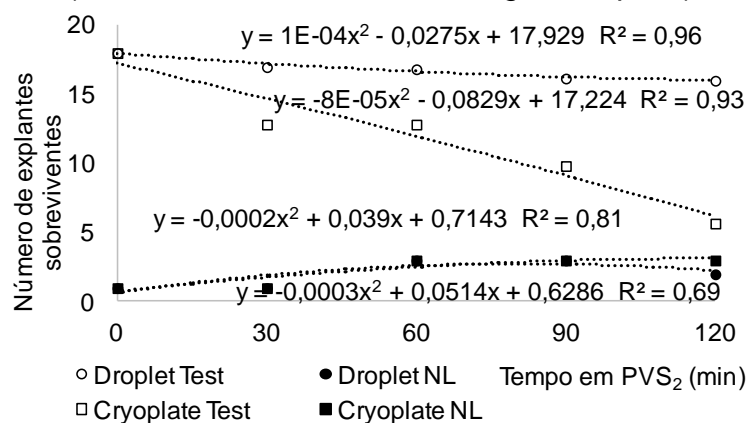


Já o tratamento controle, sem o armazenamento dos explantes em NL, a menor oxidação ocorreu na situação sem adição da solução crioprotetora, demonstrando que não somente o NL promove a liberação de compostos fenólicos, mas também, que o PVS₂ favorece essa característica indesejável na conservação dos materiais vegetais. Um dos fatores que explica esses elevados índices de oxidação é a utilização destas soluções de crioproteção, nas quais possuem níveis de toxicidade distintos e que devem ser identificados de acordo com a espécie em questão (REED, 2008).

A sobrevivência dos explantes após as diferentes técnicas de crioproteção foi influenciada pelos três fatores estudados: métodos, armazenamento em NL e tempos de contato dos explantes em PVS₂ (Figura 22). Em estudos com manutenção de explantes da palmeira (*Phoenix dactylifera* L.), Salma et al. (2014) verificaram a influência destes fatores para a espécie, embora ao final, ambos métodos de crioproteção (*cryoplate* e *droplet*) tenham apresentado resultados similares,

demonstrando serem efetivas para a crioconservação e recuperação dos materiais vegetais após a exposição ao nitrogênio líquido.

Figura 22 – Número de explantes sobreviventes de morangueiro ‘Pircinque’ após técnicas de crioconservação (*cryoplate* e *droplet*), em tempos de PVS₂ (0, 30, 60, 90 e 120 minutos) e armazenamento ou não em nitrogênio líquido (Test - testemunha e NL - nitrogênio líquido). Lages/SC, 2018.



Fonte: próprio autor, 2018.

Independentemente do método estudado, 100% dos explantes (18 ao total) se mantiveram com características de sobrevivência, na ausência do NL e solução de PVS₂. Nos tratamentos testemunhas, *droplet* foi superior ao método *cryoplate* nos tempos 30, 60, 90 e 120 min em contato com a solução crioconservadora. Porém, o número de explantes sobreviventes em condições de armazenamento em NL foi significativamente inferior, com média de um explante por repetição em 0 e 30 min em PVS₂ e seguido de três explantes nos tempos de 60, 90 e 120 min em PVS₂, independente dos dois métodos estudados.

Esse tempo de exposição ao PVS₂ varia muito entre as espécies e também, entre tecidos (HOOI et al., 2010; SILVA et al., 2013), por isso, diversos estudos já demonstram esses resultados. Kaya et al. (2013) criopreservaram com sucesso 13 espécies de eucalipto utilizando a técnica *droplet*, sendo que em geral, o tempo de exposição ao PVS₂ que proporcionou maior sobrevivência dos explantes foi 60 minutos, porém para 3 espécies 30 minutos foi considerado o tempo ótimo. Maślanka, Panis e Bach (2013), em estudos com *Galanthus elwsi*, uma planta ornamental, concluíram que os tempos 20 e 30 minutos não comprometeram a sobrevivência dos explantes após congelamento em nitrogênio líquido. O tempo de exposição ideal também foi estudado para *Byrsonima intermedia* A. Juss (SILVA et al., 2013), *Malus*

domestica Borkh. (CONDELLO et al., 2011) e cana-de-açúcar (BARRACO et al., 2011), com resultados mais adequados de 30, 60 e de 20 a 40 minutos, respectivamente. Já em estudos com explantes de videira, quanto maior o tempo de desidratação em PVS₂, menor a capacidade de regeneração (MARKOVIĆ et al., 2013), já que, geralmente quanto mais prolongado o tempo de exposição, mais letal às células (PANIS et al., 2011).

Diante do exposto, se torna importante verificar a duração do tratamento dos explantes em soluções crioprotetoras (PVS₂), uma vez que determina a extensão de desidratação celular (CHEN et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2013) e o quanto os explantes mantém a capacidade de manutenção de multiplicação posterior. Com base nisso, Panis et al. (2011), verificaram que nos tratamentos com PVS₂, o tempo varia consideravelmente entre as espécies, mas geralmente prolongados períodos de exposição são, eventualmente, letais para células.

6.4 CONCLUSÕES

Explantes de morangueiro 'Pircinque' apresentam altas taxas de oxidação quando armazenados em nitrogênio líquido.

Independente do tempo de contato da solução crioprotetora com os explantes de 'Pircinque' as taxas de oxidação são superiores a 76%.

O contato com PVS₂ nos tempos 60, 90 e 120 minutos favorece a sobrevivência dos explantes após a crioconservação, independentemente do método usado.

7 DIFERENTES AMBIENTES PARA EMISSÃO DE ESTOLÕES E FERTILIZANTE DE LIBERAÇÃO LENTA NO DESENVOLVIMENTO *EX VITRO* DE 'PIRCINQUE'.

RESUMO

Devido à grande demanda e interesse dos consumidores por frutos de morangueiro, a exigência por materiais de elevada qualidade fisiológica e sanitária tem se tornado cada vez maior. Além disso, por se tratar de uma espécie que exige a necessidade de renovação anual das lavouras de produção de frutas, a problemática se torna de elevada relevância. Diante do contexto, buscou-se verificar a influência de diferentes ambientes de cultivo, assim como, do fertilizante de liberação lenta (Osmocote®), no crescimento de mudas de morangueiro italiano 'Pircinque'. Na primeira etapa do estudo, foram avaliadas diferentes condições de cultivo das mudas, em estufa, telado, campo aberto, B.O.D. (câmara de germinação) e sala de crescimento, sendo os dois últimos citados, com temperatura e fotoperíodo controlados. Após um período de três meses de cultivo, de acordo com cada ambiente estudo, nos estolões coletados foram realizadas as extrações de meristemas para posterior cultivo *in vitro*. Em um segundo momento, na etapa de aclimatização de mudas micropropagadas de morangueiro cv. Pircinque, estudou-se também quatro doses de fertilizante de liberação lenta, chamado Osmocote®: 0, 5, 10 e 15 g planta⁻¹, adicionadas ao substrato comercial Agrinobre - TNMIX®. Com base nos resultados obtidos no primeiro estudo, concluiu-se que o cultivo em estufa de plantas de morangueiro 'Pircinque', favorece o crescimento e desenvolvimento das mudas, assim como, a posterior extração de meristemas para uso na técnica de micropropagação. Além disso, na etapa de aclimatização, verificou-se que a adição de Osmocote® (fertilizante de liberação lenta) não é necessária para o crescimento e desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular de mudas micropropagadas de morangueiro 'Pircinque'.

7.1 INTRODUÇÃO

O cultivo do morangueiro é de grande importância para a agricultura familiar tanto no aspecto econômico e social, como também cultural em algumas regiões (SPECHT e BLUME, 2011). Isso ocorre principalmente por ser a principal fruta dentre o grupo das pequenas frutas e o grande interesse comercial é dado pelo mercado

diversificado, tanto para a comercialização *in natura* como para o processamento na forma de geleias, doces, iogurtes, sucos, licores dentre outras utilidades que buscam o aproveitamento das características marcantes dos frutos, como o aroma, a coloração e o sabor (DUARTE FILHO, et al., 2007).

Um dos aspectos atualmente limitantes à produtividade do morangueiro no Brasil é a escassez de mudas de elevada qualidade fisiológica e sanitária e a fase de produção de mudas é crucial dentro da cadeia produtiva, pela necessidade de renovação anual das lavouras de produção de frutas, sendo assim, os gastos com a aquisição de mudas podem representar até 45% do custo de produção (OLIVEIRA et al., 2010). E, diante deste contexto, a micropropagação é muito utilizada, por ser prática e eficaz para a produção de plantas em larga escala de plantas de morangueiro, em função de permanecerem em um ambiente controlado e livre de doenças (BARBOSA et al., 2013; CALVETE et al., 2009).

A técnica de cultivo *in vitro* está relacionada com a qualidade da muda matriz, de onde são extraídos os estolões para retirada dos meristemas, sendo assim, o ambiente e as condições onde são mantidas essas mudas poderão afetar diretamente o sucesso da micropropagação e conseqüentemente, as características finais dos materiais obtidos. Para isso, o desenvolvimento de um processo de produção eficiente, para qualquer cultura, deve ser iniciado pela compreensão das etapas iniciais de desenvolvimento das plantas e da influência que os aspectos climáticos exercem sob os mesmos (FEITOSA et al., 2017). Um exemplo disto, é a produção de mudas em ambiente protegido, que auxilia na redução danos causados por estas intempéries climáticas nos tecidos celulares de plantas em estado juvenil (COSTA et al., 2017), promovendo ainda, melhores condições para o desenvolvimento da planta, aumento da produtividade e qualidade (RÊGO et al., 2012).

Além da propagação das mudas, que propicia a utilização de material propagativo sadio e vigoroso, na atividade agrícola, vários são os fatores que corroboram para que o produtor consiga o nível de qualidade que o consumidor requer, aliado à alta produtividade, sendo que a disponibilidade adequada de nutrientes às plantas durante a fase de desenvolvimento é essencial para o sucesso econômico na produção (FREITAS et al., 2011).

Um dos entraves na aclimatização de mudas muitas vezes ocorrem em função da utilização de substratos com baixos teores de nutrientes e este fato, também é aliado as perdas de nutrientes que ocorrem por lixiviação, devido ao manejo intenso

da irrigação, necessitando assim, da adição de fertilizantes, a fim de acelerar o processo de formação da muda (FERREIRA et al., 2008).

Uma alternativa é a utilização de fontes de fertilizante que apresentem liberação lenta ou controlada dos nutrientes, permitindo a disponibilidade contínua e, portanto, menor possibilidade de deficiência, dispensando aplicações parceladas de outras fontes, reduzindo os custos operacionais (MENDONÇA et al., 2008). De acordo com Ferreira et al. (2008), o Osmocote® à base de 14-14-14, de N-P₂O₅-K₂O, é uma boa opção, já que os nutrientes são liberados pela ação do binômio umidade e temperatura, por um período de três meses (FERREIRA et al., 2008). Ao mesmo tempo em que contem fontes de nitrogênio, fósforo e potássio, o Osmocote® apresenta ainda em sua formulação fontes de cálcio, boro, magnésio, enxofre, cobre, ferro, manganês, molibdênio e zinco (LANA et al., 2002; MASSAD et al., 2016).

Dessa forma, buscou-se verificar a influência de diferentes ambientes de cultivo, assim como, do fertilizante de liberação lenta (Osmocote®), no crescimento de mudas de morangueiro 'Pircinque'.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 Experimento 1 – Ambientes de cultivo de mudas de morangueiro 'Pircinque' visando à extração de meristemas para cultivo *in vitro*.

A localização de execução do estudo foi determinada de acordo com os tratamentos avaliados, sendo todos eles, no Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC), em Lages/SC.

Mudas de morangueiro 'Pircinque' foram padronizadas de acordo com o comprimento e número de folhas (aproximadamente 10 cm e duas folhas ao total) foram plantadas em vasos com capacidade de 0,45 litros em substrato comercial para plantas Agrinobre - TNMIX®, com irrigações manuais, de acordo com a exigência das plantas. Foram determinados diferentes ambientes de cultivo da cultivar Pircinque, em estufa, telado, campo aberto, B.O.D. (câmara de germinação) e sala de crescimento do Laboratório de Micropropagação Vegetal pertencente a Universidade. A estufa apresentava características de cobertura com filme de polietileno, diferentemente do telado, com a presença de sombrite® a 50% de luminosidade e o tratamento chamado

campo, simulou as condições em campo aberto e sem coberturas. Já as avaliações em B.O.D. e sala de crescimento foram caracterizadas por condições controladas de temperatura e fotoperíodo, de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e 16 horas, respectivamente, ambas localizadas em Laboratório de Micropropagação Vegetal, do CAV/UDESC.

Na primeira etapa do estudo, as plantas foram cultivadas durante três meses nas diferentes condições, de outubro a dezembro de 2017, e foram avaliadas a partir das seguintes variáveis: número de flores, folhas e estolões e comprimento final (cm). Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento, com duas mudas cada.

Após esse período, os estolões coletados, de acordo com cada ambiente estudo, foram levados para o Laboratório de Micropropagação para a extração de meristemas para posterior cultivo *in vitro*. Para o estabelecimento *in vitro*, antes da inoculação ao meio de cultura, a assepsia dos estolões foi realizada em câmara de fluxo laminar, apenas com a flambagem do material em bico de *Bunsen*, sem adição de esterilizantes químicos e os meristemas foram assepticamente extraídos, com o auxílio de lupa estereoscópica binocular. Os mesmos foram inoculados em tubos de ensaio com 10 mL de meio de cultura KNOP modificado (KNOP, 1865 – Apêndice A) que, além dos sais e vitaminas característicos, foram adicionados $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB, $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de GA_3 , $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de mio-inositol, 30 g L^{-1} de sacarose e $5,0 \text{ g L}^{-1}$ de ágar, onde antes da inclusão deste, ajustou-se o pH das soluções em $5,8 \pm 0,1$. Posteriormente, os tubos de ensaio permaneceram em condições de obscuridade por quatro dias, em sala de crescimento (fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e intensidade luminosa de $27 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), a fim de reduzir a oxidação fenólica dos mesmos.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, com cinco repetições e as variáveis estudadas foram o número de meristemas com contaminação bacteriana, oxidados e sobreviventes. Para ambos os estudos, os dados foram submetidos à análise de variância com aplicação do teste F e as médias, quando significativas estatisticamente, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, sendo os valores provenientes de contagem transformados na raiz quadrada de $x+0,5$ [$\sqrt{(x+0,5)}$], onde x é a média obtida de cada variável.

7.2.2 Experimento 2 – Fertilizante de liberação lenta no crescimento *ex vitro* de mudas micropropagadas de morangueiro ‘Pircinque’.

O experimento foi conduzido no Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC). Foram utilizadas mudas de morangueiro ‘Pircinque’ oriundas da técnica de propagação *in vitro*, já aclimatizadas por três meses. As mesmas foram plantadas em caixas de acrílico preto, com a parte da frente transparente, a fim de observar o crescimento e desenvolvimento tanto da parte aérea quanto do sistema radicular. Esta parede transparente foi coberta por lona preta, com objetivo de evitar a incidência de luz no interior da caixa e conseqüentemente, nas raízes.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, com um único fator sendo estudado: quatro doses do fertilizante de liberação lenta (Osmocote®): 0, 5, 10 e 15 g planta⁻¹, adicionadas ao substrato comercial Agrinobre - TNMIX®. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento, sendo cada repetição uma caixa de acrílico com uma muda cada.

As caixas de acrílico com as mudas foram mantidas em câmara de fitotron, com temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas, radiação de $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e isenta umidade relativa do ar, sendo a irrigação realizada manualmente, conforme a necessidade do material vegetal.

Após dois meses de avaliações, as variáveis analisadas foram: massa fresca das mudas (g), índice de clorofila (unidades SPAD), número de folhas e raízes, comprimento da maior raiz (cm) e comprimento médio de raízes (cm). Para avaliação do teor de clorofila foi utilizado o medidor portátil: SPAD-502-PLUS, da Minolta®, que realiza uma medição de absorbância da folha em duas regiões de comprimento de onda - nas regiões vermelhas e próximas do infravermelho e a partir dessas duas transmitâncias, o equipamento calcula o valor SPAD proporcional à quantidade de clorofila presente na folha.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade de erro e também, análise de regressão. Os valores provenientes de contagem foram transformados na raiz quadrada de $x+0,5$ [$\sqrt{(x+0,5)}$], onde x é o dado obtido de cada variável.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1 Experimento 1 – Ambientes de cultivo de mudas de morangueiro ‘Pircinque’ visando à extração de meristemas para cultivo *in vitro*.

Para todas as quatro variáveis estudadas na primeira etapa (número de flores, folhas e estolões e comprimento final das mudas), durante o crescimento das mudas em diferentes ambientes de cultivo, houve diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, sendo o destaque sempre para a manutenção das mudas em estufa (Tabela 16). Esses resultados satisfatórios para a manutenção em estufa agrícola podem ser atribuídos a fatores micrometeorológicos (COSTA et al., 2017), os quais segundo Costa et al., (2012), podem ser luminosidade e radiação fotossintética ativa.

Tabela 16 – Número de flores, folhas e estolões e comprimento final (cm) de mudas micropropagadas de morangueiro ‘Pircinque’ em diferentes ambientes (campo, telado, estufa, B.O.D. e sala de crescimento). Lages/SC, 2018.

	Número de flores		Número de folhas		Número de estolões		Comprimento final (cm)	
Campo	5,0	ab	7,8	b	4,5	c	14,6	c
Telado	5,0	ab	7,1	b	4,6	c	14,9	c
Estufa	6,3	a	10,2	a	20,4	a	29,9	a
BOD	3,9	b	7,3	b	10,3	b	21,8	b
Sala crescimento	1,1	c	5,0	c	0,0	d	11,6	d
CV (%)	18,53		17,32		8,76		8,47	

Fonte: próprio autor, 2018. *Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

O número de flores e folhas ao final da avaliação apresentaram comportamento similar, sendo em geral, superiores nas condições de estufa e quando as mudas foram mantidas em sala de crescimento, os totais de flores e folhas por repetição, foram significativamente inferiores. Da mesma forma ocorreu para as variáveis número de estolões e comprimento final das mudas, onde as plantas mantidas em estufa apresentaram crescimento vegetativo e desenvolvimento de estolões em maior número, seguidos dos tratamentos: B.O.D.; campo e telado; e sala de crescimento.

Costa et al. (2017), em estudos com pimenteira, também verificaram que o ambiente de cultivo estufa agrícola, propiciou as melhores médias de crescimento para as avaliações de altura das plantas. Os mesmos autores relatam que tal fato pode ser explicado pelo maior armazenamento de energia interna no ambiente, em função do filme de polietileno, o que atua diretamente no metabolismo das plantas e resulta maior crescimento das mesmas.

Na Tabela 17, verificam-se as variáveis avaliadas em laboratório, após a extração dos meristemas dos estolões coletados das mudas de morangueiros 'Pircinque' mantidas em diferentes ambientes de cultivo.

Tabela 17 – Porcentagem de meristemas com contaminação bacteriana, oxidados e sobreviventes de morangueiro 'Pircinque' extraídos de plantas cultivadas em diferentes ambientes (campo, telado, estufa, B.O.D. e sala de crescimento). Lages/SC, 2018.

	Contaminação bacteriana		Oxidação		Sobrevivência	
Campo	50,0	a*	50,0	a	50,0	b
Telado	25,0	B	50,0	a	75,0	a
Estufa	16,7	Bc	41,7	a	58,0	ab
B.O.D	14,3	Bc	42,8	a	57,1	ab
Sala crescimento	0,0	C	0,0	b	0,0	c
CV (%)	4,43		5,94		8,79	

Fonte: próprio autor, 2018. *Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Não ocorreram contaminações fúngicas no cultivo *in vitro* dos meristemas, entretanto, como já esperado, os maiores índices de presença de bacterioses ocorreram no campo, em detrimento das condições com menor proteção, como existente em telado, estufa ou laboratório, e assim, maior presença de micro-organismos contaminantes. Além disso, está relacionado com ocorrências de chuvas,

e as estufas, de acordo com Costa et al., (2015), propiciam condições mais adequadas de proteção, a partir do filme de polietileno, uma vez que não ocorre excedente hídrico.

Em geral, não houve diferenças significativas para os explantes com níveis de oxidação, já que em quando mantidas em sala de crescimento, as mudas não emitiram estolões, logo, não ocorreram contaminações, oxidação e conseqüentemente, sobrevivência dos meristemas. Ressalta-se a importância de avaliação da taxa de oxidação dos meristemas após o estabelecimento *in vitro*, já que de acordo com Anicezio (2012), se caracteriza pelo escurecimento do explante lesado, em função da liberação de compostos fenólicos e que poderá, provavelmente, afetar a qualidade da muda final.

Os estolões extraídos de mudas de morangueiro 'Pircinque' mantidas em telado proporcionaram uma maior sobrevivência dos meristemas estabelecidos *in vitro*, porém não diferindo dos tratamentos: B.O.D. e estufa; e seguidos de campo e sala de crescimento, mais uma vez demonstrando que as plantas mantidas nessa última condição, não apresentam características de crescimento e desenvolvimento adequados, possivelmente devido a falta de ventilação e renovação de ar que diferencia esse ambiente dos outros quatro estudados. Esse resultado está relacionado também, com as elevadas temperaturas existentes no ambiente de cultivo, sendo que, este fator pode contribuir para o maior abortamento floral e por conseqüência, menores médias de geração de frutos (COSTA et al., 2017) e no caso do presente estudo, a não produção de estolões. Sendo assim, altas temperaturas podem causar perdas significativas na produção de muitas espécies, em função da redução no número de sementes e ainda, aumento da abscisão das flores (ERICKSON e MARKHART, 2002).

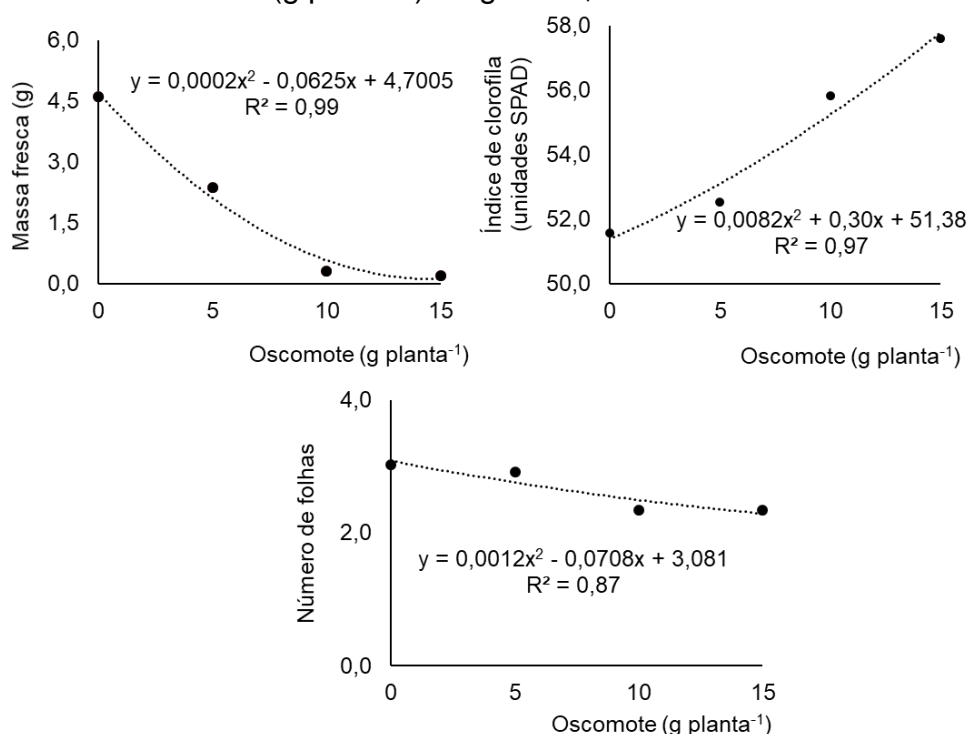
7.3.2 Experimento 2 – Fertilizante de liberação lenta no crescimento *ex vitro* de mudas micropropagadas de morangueiro 'Pircinque'.

Todas as variáveis estudadas, massa fresca das mudas, índice de clorofila (unidades SPAD), número de folhas e raízes, comprimento da maior raiz e comprimento médio de raízes, influenciaram significativamente o crescimento das mudas ($p < 0,05$).

Em relação às variáveis da parte aérea das mudas de morangueiro (Figura 23), verificaram-se comportamentos distintos em função da dose de Osmocote®. A massa

fresca das mudas (g) foi superior às demais com a não utilização do adubo, tendo um decréscimo com o aumento da dose do mesmo. Similar a esta variável, e em consequência desta, o número de folhas foi superior nas condições sem o uso do Osmocote®, porém, não diferindo estatisticamente da dose mais baixa (5 g planta⁻¹). Logo, o tratamento testemunha, sem a adição do fertilizante, proporcionou um maior desenvolvimento das mudas.

Figura 23 – Massa fresca (g), índice de clorofila (unidades SPAD) e número de folhas de morangueiro ‘Pircinque’ plantadas em substrato com diferentes doses de Osmocote® (g planta⁻¹). Lages/SC, 2018.



Fonte: próprio autor, 2018.

Diferentemente, Freitas et al. (2011), em pesquisas com mudas micropropagadas de abacaxizeiro, verificaram que o Osmocote®, proporciona acréscimos nas principais características da parte aérea, sendo a dosagem de 13 g planta⁻¹, que proporcionou maior incremento no comprimento da planta, no número de folhas e no peso da matéria seca da parte aérea. Os mesmos autores destacam a importância da variável altura da muda, já que esta é uma característica biométrica para a indicação do tamanho ideal para o plantio definitivo no campo.

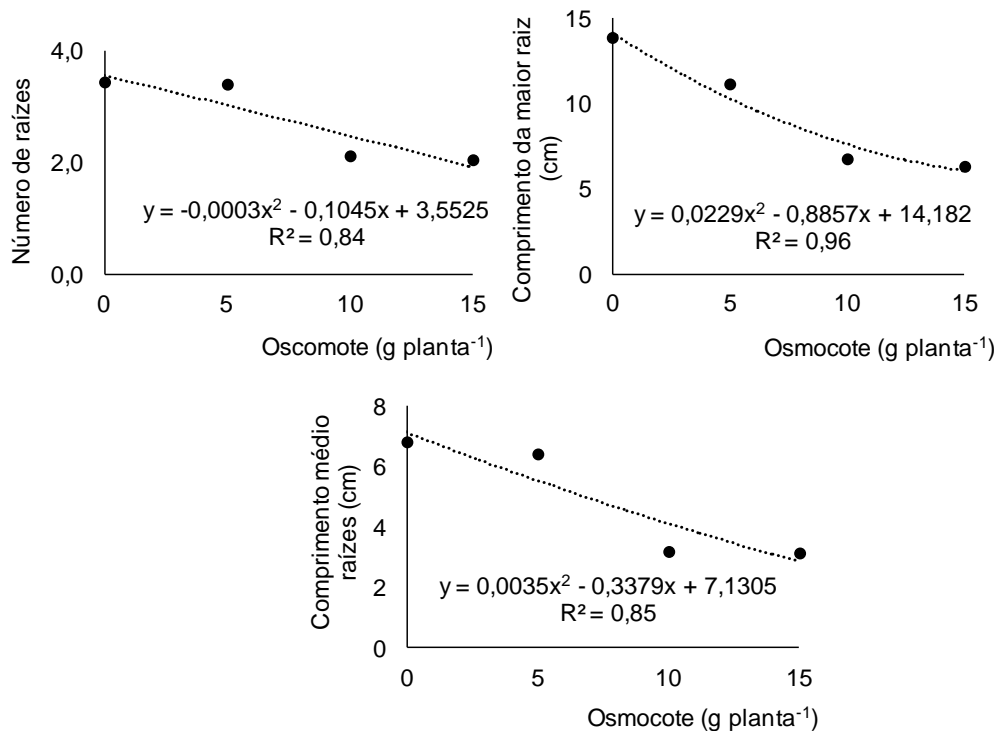
Em estudos com bananeiras micropropagadas, Martins et al. (2011), observaram maior desenvolvimento vegetativo das mudas com a adição de

Osmocote®, com incrementos médios maiores em altura (24,4 cm), diâmetro do colo (3,5 cm) e número de folhas vivas (7,5 folhas). Nomura et al. (2008) trabalhando com a mesma cultura, cultivar Nanicão, concluíram que as mudas aclimatizadas em substrato pobre em nutrientes, acrescido de fertilizante de liberação lenta, também apresentaram maiores valores de crescimento em altura, diâmetro do colo e massa seca da parte aérea, quando comparadas com mudas que receberam fertilizante de liberação normal de nutrientes aclimatadas no mesmo substrato.

Em contrapartida, o índice de clorofila, em unidades SPAD, apresentou um comportamento positivo em função das maiores doses do fertilizante de liberação lenta, com teores superiores de clorofila com a adição 15 g planta⁻¹. Este resultado é interessante, para compreender as respostas das mudas, já que a quantificação da clorofila foi distinta em função dos tratamentos estudados, haja vista que irá ter relação com o aumento de produtividade e atividade fotossintética (DISCROLL et al., 2006).

A influência do adubo Osmocote® sobre o sistema radicular foi similar para as três variáveis estudadas: número, comprimento médio e da maior raiz (Figura 24). O tratamento testemunha, assim como, a dose de 5 g planta⁻¹, proporcionaram um maior número de raízes e, além disso, raízes de maior comprimento (com médias de 3,5 raízes por muda, raízes maiores com 14,5 cm e raízes secundárias com 7 cm). Sendo assim, as duas doses mais altas avaliadas (10 e 15 g planta⁻¹ de Osmocote®), prejudicaram o crescimento e desenvolvimento radicular das mudas.

Figura 24 – Número de raízes, comprimento da maior raiz e médio de raízes (cm) de mudas de morangueiro 'Pircinque' plantas em substrato com diferentes doses de Osmocote® (g planta⁻¹). Lages/SC, 2018.



Fonte: próprio autor, 2018.

Freitas et al. (2011) também concluíram que com o aumento das dosagens de Osmocote®, houve redução da matéria seca das raízes de mudas micropropagadas de abacaxizeiro, com um comportamento linear, sendo que as plantas que não receberam o fertilizante apresentaram as maiores médias. Em contrapartida, Mendonça (2004), ao avaliar o comprimento e massa seca de raiz em mudas de maracujazeiro-amarelo, obteve um resultado positivo quanto a utilização do adubo de liberação lenta (Osmocote®).

Diante dos resultados apresentados, verifica-se que a utilização destes fertilizantes pode, além de facilitar o manejo no viveiro, manter constantes os níveis dos elementos essenciais para as mudas durante todo o período de crescimento (JOSÉ et al., 2009). Entretanto, de acordo com os mesmos autores, por um lado promovem o crescimento das mudas, por outro, dosagens elevadas deste adubo tendem a desequilibrar essa razão, ocasionando redução na qualidade das mudas.

Esse é um cuidado bastante importante que precisa ser observado com a cultura do morangueiro, pois é considerada pouco tolerante à salinidade, a qual reduz o crescimento, o desenvolvimento e conseqüentemente, a produtividade (PARANJPE

et al., 2003). Sendo assim, corroborando aos resultados apresentados neste estudo, Andriolo et al. (2009) e Paula et al. (2008), concluíram que mediante a utilização deste tipo de adubo solúvel, podem haver efeitos negativos do estresse salino para a cultura do morangueiro.

7.4 CONCLUSÕES

O cultivo em estufa de plantas de morangueiro 'Pircinque', favorece o crescimento e desenvolvimento das mudas, assim como, a posterior extração de meristemas para uso na técnica de micropropagação, proporcionando maior sobrevivência dos explantes após estabelecimento *in vitro*.

A adição de Osmocote® (fertilizante de liberação lenta) não é necessária para o crescimento e desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular de mudas micropropagadas de morangueiro 'Pircinque'.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pensando no grande interesse do consumidor, aliado ao retorno econômico que a produção de morangos pode gerar ao produtor, a busca por mudas homogêneas e de qualidade e que estas sejam produzidas em um menor período de tempo, torna-se interessante o estudo específico da propagação dessa espécie, a fim de potencializar a cadeia produtiva da cultura.

A técnica de micropropagação é aliada as linhas de pesquisa que buscam otimizar e acelerar a produção de mudas de morangueiro, tornando-se uma alternativa promissora, já que possibilita a propagação clonal destes materiais, podendo ainda, reduzir problemas de contaminações por viroses.

Neste cenário, a obtenção de um protocolo específico para novas cultivares que estão sendo introduzidas no Brasil e, além disso, a utilização de novas técnicas, mais práticas e com menor custo de produção de mudas, torna-se necessário não somente para a comunidade científica, tendo como objetivo também de gerar um retorno aos produtores de morango e viveiristas.

Sendo assim, com esta tese de doutorado buscou-se estudar a propagação *in vitro* da cultivar italiana de morangueiro 'Pircinque', na qual foi recentemente registrada e protegida no Brasil, como um complemento a outros estudos que já estão sendo realizados no país, que visam verificar a adaptabilidade deste material vegetal, nas nossas condições, as quais são muito adversas às da Itália.

Baseado nisso, todos os capítulos apresentados nesta tese possibilitaram a obtenção de um protocolo básico, com todas as informações necessárias para a propagação *in vitro* de morangueiro 'Pircinque', conforme destacadas abaixo.

Matrizeiro de mudas para estabelecimento *in vitro*

- Manutenção das plantas matrizes em estufa para obtenção de estolões e posteriormente, extração de meristemas.

Estabelecimento *in vitro*

- Inoculação de meristemas em meio de cultivo KNOP sólido.
- KNOP + 0,1 mg L⁻¹ BAP, 0,01 mg L⁻¹ AIB, 0,1 mg L⁻¹ GA₃, 0,1 g L⁻¹ mio-inositol, 30 g L⁻¹ sacarose e 5,0 g L⁻¹ de ágar + 2 mL L⁻¹ PPM.

Multiplicação e enraizamento *in vitro*

- Biorreatores de imersão temporária
- Meio de cultivo líquido MS (37,3 mg L⁻¹ de Fe EDDHA, 0,25 mg L⁻¹ de GA₃ e 30 g L⁻¹ de sacarose), em contato com os explantes cinco vezes ao dia, por 15 minutos.
- Multiplicação: MS + 1 mg L⁻¹ de BAP
- Enraizamento: MS + 0,05 mg L⁻¹ de BAP + 1 mg L⁻¹ de AIB

Aclimatização

- Apenas uso de substrato comercial TNMIX®.
- Não é necessária a adição de fertilizante de liberação lenta para o crescimento da parte aérea e sistema radicular de mudas.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAK, N. et al. The effect of various hormone types on *in vitro* propagation of strawberry. **Acta Horticulturae**, n. 829, p. 305-308, 2009.

AJITKUMAR, D.; SEENI, S. Rapid clonal multiplication through *in vitro* axillary shoot proliferation of *Aegle marmelos* (L.) Corr., a medicinal tree. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 422-426, 1998.

ALAM, I. et al. Effect of growth regulators on meristem culture and plantlets establishment in sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]. **Plant Omics Journal**, v. 3, n. 2, p. 35-39, 2010.

ALBERT, T. et al. The influence of propagation method on growth of the half highbush blueberry “Northblue”. **Acta Horticulturae**, v. 812, p. 141-146, 2009.

ALMEIDA, C. S. et al. Respostas morfogênicas de jenipapeiro em diferentes condições de cultura *in vitro*. **Revista Caatinga**, v. 28, n. 1, p. 58 – 64, 2015.

ALMEIDA, L. et al. Produção e qualidade da fruta do morangueiro sob influência da aplicação de boro. **Ciência Rural**, v. 44, n. 4, 2014.

ALVARD, D. et al. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.32, p.55-60, 1993.

ALVES, R. B. N. Influência de diferentes meios de cultura sobre o crescimento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) para a conservação *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, p. 510-515, 2010.

AMOO, S. O. et al. The role of meta-topolins in alleviating micropropagation problems. **Plant Growth Regulation**, v. 63, n. 2, p.197-206, 2010.

ANDRADE, R. A. et al. Micropropagação de mudas de bananeira em mio líquido. **Comunicata Scientiae**, v. 2, n. 3, p. 156-159, 2011.

ANDRIOLO, J. L. et al. Cultivo sem solo do morangueiro com três métodos de fertirrigação. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 691-695, 2009.

ANICEZIO, L. C. Efeito de antioxidantes e descontaminantes no estabelecimento de explantes de bananeira (*Musa spp*) *in vitro*. **Uniciências**, v. 16, n. 1, p. 9-16, 2012.

ANTONOPOULOU, C. The effect of Fe-EDDHA and of ascorbic acid on *in vitro* rooting of the peach rootstock GF-677 explants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 29, n. 6, p. 559–561, 2007.

ANTUNES, L. E. C. et al. Produção integrada de morango no Brasil. **Informe Agropecuário**, v. 236, p. 34-39, 2007.

ANTUNES, L. E. C. et al. Yield and quality of strawberry cultivars. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 222-226, 2010.

ANTUNES, L. E. C.; COCCO, C. Tecnologia para a produção de frutas e mudas do morangueiro. **Agropecuária Catarinense**, v. 25, n. 2, p. 61-65, 2012.

ANTUNES, L. E. C.; DUARTE F. J. Produção de mudas de morango. In: SANTOS, A. M. dos; MEDEIROS, A. R. M. **Sistema de produção do morango**. Sistemas de produção, 5. Pelotas: EMBRAPA CT, 2005.

ANTUNES, L. E. C.; PERES, N. A. Strawberry production in Brazil and South America. **International Journal of Fruit Science**, v. 13, n.1-2, p.156-161, 2013.

ANTUNES, L. E. C.; REISSER JÚNIOR, C. Fragole, i produttori brasiliani mirano all'esportazione in Europa. **Frutticoltura**, v. 69, p. 60-65, 2007.

ANTUNES, L. E. C.; REISSER JÚNIOR, C. Produção de morangos. **Jornal da Fruta**, v. 15, n. 191, p. 22-24, 2007.

ARRUDA, A. S. et al. Variação genômica intraclonal de explantes de morango em ambiente controlado. **Bioscience Journal**, v.22, n.1, p.119-124, 2006.

ASSIS, F.A. et al. Antioxidants in the control of microorganism contamination and phenol oxidation in *Eugenia pyriformis*. **Bioscience Journal**, v.34, n.1, p.49-58, 2018.

AUGUSTIN, L. et al. Micropropagação vegetal e sua importância econômica. In: BRAMMER, S. P.; IORCZESKI, E. (Eds.). **Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002. p. 135-153.

BARBOSA, L. M. P. et al. Biochemical and morpho-anatomical analyses of strawberry vitro plants hyperhydric tissues affected by BA and gelling agents. **Revista Ceres**, v. 60, n. 2, p.152-160, 2013.

BARBOZA, T. J. S. et al. Efeito de diferentes meios nutritivos e fitorreguladores visando à otimização da calogênese de *Annona mucosa* (Jacq.). **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v. 16, n. 4, p. 905-911, 2014.

BARRACO, G.; SYLVESTRE, I.; ENGELMANN, F. Comparing encapsulation-dehydration and droplet-vitrification for cryopreservation of sugarcane (*Saccharum* spp.) shoot tips. **Scientia Horticulturae**, v. 130, p. 320-324, 2011.

BARROS, A. C. B. **Biorreator de imersão temporária aplicado na biofabricação de cana-de-açúcar**. In: Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro*. (Org.) GERALD, L. T. S. São Paulo: Atiqua, ed. 1, p. 51-69, 2011.

BARROS, A. C. B. et al. Biorreator de imersão temporária aplicado na biofabricação de cana-de-açúcar. In: GERALD, L. T. S. (Org.). **Biofábrica de plantas**: produção industrial de plantas *in vitro*. 1 ed. São Paulo: Atiqua, 2011. cap. 3, p. 52-59.

BARUZZI, G. et al. Updates on Italian strawberry breeding programs coordinated by CREA-FRF. **Acta Horticulturae**, v. 1156, n. 1, p. 179-184, 2017.

BESSON, J. C. F. et al. Fontes e concentrações de carboidratos no rescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 1, p. 9-13, 2010.

BEYENE, G. T. et al. Effect of different transplanting dates and runner types on quality and yield of 'Elsanta' strawberry. **Acta Horticulturae**, v. 926, p. 483-489, 2012.

BHANKHER, A. K. et al. Micropropagation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Haryana Journal of Horticultural Sciences**, p. 214-216, 2008.

BIASI, L. A. et al. Estabelecimento *in vitro* de porta-enxertos de videira de ápices meristemáticos e segmentos nodais. **Scientia Agrícola**, v. 55, n. 2, 1998.

BISWAS, M. K. et al. Callus culture from leaf blade, nodal, and runner segments of three strawberry (*Fragaria sp.*) clones. **Turk Journal Biology**. v. 34, p. 75-80, 2010.

BISWAS, M. K. et al. Micropropagation and field evaluation of strawberry in Bangladesh. **Journal of Agricultural Technology**, v. 4, n. 1, p. 167-182, 2008.

BRAGA, F. T. et al. Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 2, p. 128-132, 2009.

BRAHM, R. U.; OLIVEIRA, R. P. Potencial de multiplicação *in vitro* de cultivares de morangueiro. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 26, n. 3, p. 507-510, 2004.

CABRAL, J. B. **Sistema de imersão temporária (SIT) na produção em larga escala de vitroplantas**. In: Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro*. (Org.) GERALD, L. T. S. São Paulo: Antiqua, ed. 1, p. 71-87, 2011.

CALVETE, E. O. et al. Agronomic and *in vitro* performance of micropropagated strawberry cultivars in different numbers of subculture. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.31, p.943-949, 2009.

CALVETE, E. O. et al. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 2, p.186-191, 2002.

CAMOLESI, M. R. et al. Volume do frasco e consistência do meio de cultura na multiplicação *in vitro* da bananeira 'Maçã'. **Ciência Rural**, v. 40, p. 255-260, 2010.

CARVALHO, M. A. F. et al. Indução, análises morfológicas e ultraestruturais de calos de maracujazeiro nativo. **Revista Ceres**, v. 62, n. 4, p. 340-346, 2015.

CARVALHO, M. F. C. C. et al. **Fatores inerentes à micropropagação**. Embrapa Algodão. Campina Grande, 2006.

CARVALHO, S. F. et al. Comportamento e qualidade de cultivares de morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) na região de Pelotas-RS. **Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha**, v. 14, p. 176-180, 2013.

CASTILLO, N. R. F. et al. Genetic stability of cryopreserved shoot tips of *Rubus* germplasm. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 46, n. 3, p. 246-256, 2010.

CEJAS, I. et al. Effects of cryopreservation of *Phaseolus vulgaris* L. seeds on early stages of germination. **Plant Cell Reports**, v. 31, n. 11, p. 2065-2073, 2012.

CHEN, X. L. et al. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. **South African Journal of Botany**, v. 77, n. 2, p. 397-403, 2011.

CHOPRA, R. N.; RASHID, A. Induction of shoot buds in *Anoectangium thomsonii* Mitt by a metal chelate Fe-EDDHA. **Zeitung Pflanzenphysiolog**, v. 61, p. 199–202, 1969.

CHRISTENSEN, B. et al. *In vitro* culture of *Hibiscus rosa-sinensis* L.: influence of iron, calcium and BAP on establishment and multiplication. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 93, n. 2, p. 151–161, 2008.

CIDADE, D. A. P. et al. Morfogênese *in vitro* de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 41:385-391, 2006.

COCCO, C. et al. Development and fruit yield of strawberry plants as affected by crown diameter and plantlet growing period. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 7, p. 730-736, 2010.

CONDELLO, E. et al. Cryopreservation of apple *in vitro* axillary buds using droplet-vitrification. **Cryo Letters**, v. 32, p. 175-85, 2011.

COSTA, E. et al. Diferentes tipos de ambiente protegido e substratos na produção de pimenteiras. **Horticultura Brasileira**, v. 35, n. 3, p. 458-466, 2017.

COSTA, E. et al. Production of baruzeiro seedling in different protected environments and substrates. **Engenharia Agrícola**, v. 32, p. 633-641, 2012.

COSTA, E. et al. Ambientes e substratos na formação de mudas e produção de frutos de cultivares de tomate cereja. **Horticultura Brasileira**, v. 33, p. 110-118, 2015.

COSTA, R. C. da et al. Telas de sombreamento na produção de morangueiro em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 98-102, 2011.

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

DAL VESCO, L. L. et al. Induction and scale-up of *Billbergia zebrina* nodule cluster cultures: Implications for mass propagation, improvement and conservation. **Scientia Horticulturae**, v. 128, n. 4, p.515-522, 2011.

DALTON, C. C. Iron phosphate precipitation in Murashige and Skoog media. **Physiol Plant**, v. 57, p. 472– 476, 1983.

- DEBIASI, C. **Utilização de biorreatores de imersão temporária em uma biofábrica de cultura de tecidos.** In: Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro*. (Org.) GERALD, L. T. S. São Paulo: Antiqua, ed. 1, p. 99-115, 2011.
- DEBNATH, S. C. Developing a scale-up system for the *in vitro* multiplication of thidiazuron-induced strawberry shoots using a bioreactor. **Canadian Journal of Plant Science**, p. 737-746, 2008.
- DIAS, M. S. C. et al. **Cultivares.** Informe Agropecuário, Belo Horizonte - Mg, v. 35, n. 279, p.39-47, 2014.
- DONNELLY, D. J. et al. *In vitro* culture of three *Rubus* species. **Acta Horticulture**, v. 112, p. 69-75, 1984.
- DONNO, D. et al. Currants and strawberries as bioactive compound sources: determination of antioxidant profiles with hplc-dad/ms. **Journal of applied botany and food quality**, v. 86, p.1-10, 2013.
- DRISCOLL, S. P.; PRINS, A.; OLMOS, E.; KUNERT, K. J.; FOYER, C. H. Specification of adaxial and abaxial stomata, epidermal structure and photosynthesis to CO₂ enrichment in maize leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 2, p. 381-390, 2006.
- DUARTE FILHO, J. et al. Cultivares. In: **Morango: conquistando novas fronteiras.** DIAS, M.S.C. (coord.). Informe Agropecuário, Belo Horizonte, vol. 28, n. 236, p. 20-23, 2007.
- DURNER, E. F. et al. Recent advances in strawberry plug transplant technology. **HortTechnology**, v. 12, n. 4, p. 545-550, 2002.
- DUTRA et al. **Protocolo de micropropagação em cana-de-açúcar.** Circular Técnica. Embrapa, Pelotas, 2011.
- DUTRA, L. F. et al. **Protocolos de Micropropagação de Plantas IV – Morangueiro.** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2012. 20 p. (Embrapa Clima Temperado. Sistema de Produção).
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 47, n. 1, p. 5-16, 2011.
- ERICKSON, A. N; MARKHART, A. H. Flower developmental stage and organ sensitivity of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) to elevated temperature. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 123-130, 2002.
- ERIG, A. C.; SHUCH, M. W. Morfogênese *in vitro* de brotos de macieira (*Malus domestica* orkh.) a partir de fragmentos delgados de folhas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 3, p. 575-581, 2005.
- ESCALONA, M. et al. Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) micropropagation in temporary immersion systems. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 743-748, 1999.

FACHINELLO, J. C. et al. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, volume especial, p. 109-120, 2011.

FAEDI, W. et al. The new 'Pircinque' strawberry cultivar released under Italy's PIR Project. **Acta Horticulturae**, v. 1049, n. 1, 961-1966, 2014.

FAGHERAZZI, A. F. et al. Strawberry production progress in Brazil. **Acta Horticulturae**, v. 1156, n. 1, 937-940, 2017.

FAO. FAOSTAT: Production-crops. Disponível em:
<<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 27 jan. 2018.

FARIA, G. A. et al. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação *in vitro* de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 267-270, 2006.

FEITOSA, F. R. C. et al. Efeitos de temperaturas, recipientes e substratos no desenvolvimento de *Brassica rapa* subsp. *Nipposinica*. **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 116, n. 1, p. 39-50, 2017.

FEITOSA, L.S. et al. Indução e análise histológica de calos em explantes foliares de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Bioscience Journal**, v. 29, n. 2, p. 370-377, 2013.

FERMINO JUNIOR, P. C. P. et al. Efeito de diferentes citocininas e sistema de cultura dupla-fase na micropropagação de Teca (*Tectona grandis* L.) estabelecida na Amazônia Sul-Occidental. **Evidência**, v. 14, p. 7-20, 2014.

FERREIRA, E. A. Influência de diferentes substratos e fertilizantes na aclimatização de plantas de figueira (*Ficus carica* L.). **Caatinga**, v. 21, n. 5 (Número Especial), p. 64-68, 2008.

FEUSER, S. et al. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isoenzyme and RAPD markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, p. 221-227, 2003.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças – 3ª ed. rev. e ampl. – ed. Viçosa, Viçosa, MG. 421 p. Rosáceas: Morango, um frutinho rasteiro, 387-393. 2007.

FLORES, R. et al. Otimização da produção de plantas *in vitro* de cultivares de *Ipomoea batatas*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 3, p. 429-437, 2015.

FLORES, R. et al. Sucrose and sorbitol on the *in vitro* conservation of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 3, p. 192-199, 2013.

FOGAÇA, C. M. et al. Microtuberização *in vitro* de cultivares de mandioca: aspectos morfológicos e anatômicos. **Acta Botânica Brasílica**, v. 24, n. 3, p. 624-630, 2010.

FOLTA, K. M. et al. Characterization of LF9, na octoploid strawberry genotype selected for rapid regeneration and transformation. **Planta**, v. 224, p. 1058-1067, 2006.

FONSECA, A. P. da et al. Estabilidade fenotípica de genótipos de morangueiro submetidos a número variável de subcultivos *in vitro*. **Ciência Rural**, v. 43, n. 8, p. 1345-1350, 2013.

FORTES, G. R. L.; PEREIRA, J. E. S. Estabelecimento *in vitro* da ameixeira cv. América. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, p. 183-185, 2001.

FORTES, G.R. L. Produção de mudas básicas. In: SANTOS, A. M; MEDEIROS, A. R. M. (Ed.) **Morango - Produção**. Brasília, EMBRAPA, Informações Tecnológicas, p.31-34. 2003.

FREITAS et al. Substratos e Osmocote® na nutrição e desenvolvimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Vitória. **Revista Brasileira de Fruticultura**, volume especial, ed. 672-679, 2011.

GARCIA, R. Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 106, p. 47-54, 2011.

GARRISON, W. et al. Improved shoot multiplication and development in hybrid hazelnut nodal cultures by ethylenediamine di-2-hydroxyphenylacetic acid (Fe EDDHA). **Canadian Journal of Plant Science**, v. 93, n. 3, p. 511-521, 2013.

GEORGE, E. F. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. The technology. 2. ed. Edington: Exegetics, 2008. 574 p.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture**. Hants: Exegetics Limited, 1984. 709p.

GIMÉNEZ, G. et al. Cell size in trays for the production of strawberry plug transplants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 7, p. 726-729, 2009.

GIMÉNEZ, G. et al. Cultivo sem solo do morangueiro. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p. 273-279, 2008.

GOMES, K. B. P. et al. Diagnóstico da cadeia produtiva do morango dos agricultores familiares do Distrito Federal. **Revista Eixo**, v. 2, n. 2, p. 9-14, 2013.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, EMBRAPA, CNPH, 1990. p. 99-169.

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

GRIMALDI, F. et al. Enraizamento *in vitro* de frutíferas da família Rosaceae. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 7, n. 2, p. 160-168, 2008.

- 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.
- GUIMARÃES, A. G. et al. Potencial produtivo de cultivares de morangueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 1, p. 112-120, 2015.
- GUSON, R. R. et al. Influência de diferentes concentrações de carvão ativado no crescimento e enraizamento *in vitro* de *Cattleya pumila* HOOK. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 5, n. 3, p. 551-563, 2012.
- GUZMÁN-GARCÍA, E.; BRADAI, F.; SÁNCHEZ-ROMERO, C. Cryopreservation of avocado embryogenic cultures using the droplet-vitrification method. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 1, p.183–193, 2013.
- HALMAGYI, A.; DELIU, C.; ISAC, V. Cryopreservation of *Malus* cultivars: comparison of two droplet protocols. **Scientia horticultrae**, v.124, n. 3, p. 387-392, 2010.
- HALMAGYI, A.; PINKER, I. Plant regeneration from Rosa shoot tips cryopreserved by a combined droplet-vitrification method. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 84, p. 145-153, 2006.
- HANHINEVA, K. et al. Shoot regeneration from leaf explants of five strawberry (*Fragaria x ananassa*) cultivars in temporary immersion bioreactor system. **In vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 41, p. 826-831, 2005.
- HANSEN, N.C. et al. Iron nutrition in field crops. In: BARTON, L.L.; ABADIA, J. (Ed.). **Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms**. Dordrecht: Springer, 2006. p. 23-59.
- HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 5.ed. New Jersey: [s.n.], 1990. 647p.
- HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, v. 85, n. 12, p. 1704-1712, 2003.
- HENZ, G. P. Desafios enfrentados por agricultores familiares na produção de morango no Distrito Federal. **Horticultura Brasileira**, v.28, p.260-265, 2010.
- HOCHMUTH, G. et al. Containerized strawberry transplants reduce establishment-period water use and enhance early growth and flowering compared with bare-root plants. **HortTechnology**, v. 16, n. 1, p. 46-54, 2006.
- HOFFMANN, A.; BERNARDI, J. **Produção de Morangos no Sistema Semi Hidropônico**: Introdução. 2006. Embrapa Uva e Vinho.
- HOOI, T.H. et al. A novel approach for preliminar PVS2 vitrification optimization parametes of *Dendrobium* Sonia-28 Orchid with evan blue staining. **Advances in Environmental Biology**, v. 4, n. 2, p. 284-290, 2010.

IEA - INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. 2008. **Pólos de produção do morango**. Disponível em: <www.iaa.sp.gov.br/out/vertexto.php?codtexto=11>. Acesso: 11 out. 2016.

JIMÉNEZ, V. M. et al. *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 86, n. 3, p. 389–395, 2006.

JOSÉ, A. C.; DAVIDE, A. C.; OLIVEIRA, S. L. Efeito do volume do tubete, tipo e dosagem de adubo na produção de mudas de aroeira (*Schinus terebinthifolia* Raddi). **Agrarian**, v. 2, n. 3, p. 73-86, 2009.

KACZMARCZYK, A. et al. Cryopreservation of threatened native Australian species- what have we learned and where to from here? **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 47, n. 1, p. 17-25, 2011.

KADOTA, M.; IMIZU, K.; HIRANO, T. Double-phase *in vitro* culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. **Scientia Horticulturae**, v. 89, p. 207-215, 2001.

KAITY, A. et al. Assessment of genetic and epigenetic changes following cryopreservation in papaya. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 9, p. 1529- 1539, 2008.

KARTHA, K. K. Advances in the cryopreservation technology of plant cells and organs. In: ALLEN, N. S. (Ed.). *Plant biology*. New York: Alan R. Liss, 1987. v. 3, p. 447-458.

KAYA, E. et al. Cryopreservation of *Eucalyptus* Genetic Resources. **CryoLetters**, v. 34, p. 608-618, 2013.

KIELSE, P. V. N.; FRANCO, E. T. H.; FRASSETTO, E. G. Indução de calogênese em explantes de *Parapiptadenia rigida*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 84-86, 2007.

KNOP, W. Quantitative Untersuchungen über den Ernährungs-prozess der Pflanzen. **Landwirtschaftliche Versuchsstation Poland**, v. 7, n. 5, p. 93-107, 1865.

KOZOMARA, B. et al. *In vitro* propagation of *Chimonanthus praecox* L., a winter flowering ornamental shrub. **In vitro cellular Development Biology-Plant**, v. 44, p. 142-147, 2008.

LANA, R. M. Q. et al. Utilização de diferentes substratos e de fertilizantes de liberação lenta na produção de mudas do cafeeiro em saquinhos. **Revista Ceres**, v. 49, n. 286, p. 577-586, 2002.

LARKIN, P. J. & SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultur for plant improvement. **Theorem Apply Genetic**, n. 60, p. 197-214, 1981.

LEE, Y. G. et al. Improved cryopreservation of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) using droplet-vitrification. **Cryoletters**, v. 32, n. 6, p. 487-497, 2011.

- LEMOS, E. E. P. Aspectos práticos da micropropagação de plantas: **Micropropagação de plantas por biorreatores**. Brasília: Embrapa, 2013. 407p.
- LEMOS, E. E. P. et al. Conservação *in vitro* de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, 2002.
- LIMA, S. de S.; Propagação vegetativa do *Protium* spp: *Protium heptaphyllum*, *Protium spruceanum* e *Protium guacayanum*. 2012. 89 f. **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia e recursos Naturais) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2012.
- LOPES, K.P. et al. Criopreservação de eixos embrionários zigóticos de algodoeiro. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 17, n. 3, p. 291-298, 2013.
- LORENZO, J. C. et al. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 54, p. 197-200, 1998.
- MACEDO, C. E. C. et al. 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**, v. 25, p. 501-504, 2003.
- MADAIL, J. C. M. et al. **Avaliação econômica dos sistemas de produção de morango: convencional, integrado e orgânico**. Comunicado técnico 181. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007.
- MADAIL, J. C. M. **Sistemas de produção da cultura do morango**: cv. Konvoy Cascata (mudas sadias) x cvs. tradicionais (mudas infectadas). Pelotas, RS: EMBRAPA – UEPAE de Cascata, 1982. 6p. (Comunicado Técnico 15).
- MAHESHWARI, S. C.; SETH, P. N. Induction of flowering in *Wolfia microscopica* by the iron salt of ethylenediamine-di-o-hydroxyphenylacetic acid (Fe-EDDHA). **Zeitung Pflanzenphysiolog**, v. 55, p. 89–91, 1965.
- MALDANER, J. et al. Crescimento de plântulas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen cultivadas *in vitro* sob dois níveis de nitrogênio e sacarose, durante seis subculturas sucessivas e aclimatização. **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, p. 133-140, 2007.
- MARKOVIĆ, Z. et al. Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) *in vitro* shoot tips. **Central European Journal of Biology**, v. 8, p. 993-1000, 2013.
- MARTINS, A. N. et al. Aclimação de mudas micropropagadas de bananeira “Nanicão Williams” em diferentes substratos e fontes de nutrientes. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 6, n. 1, p. 65-72, 2011.
- MAŚLANKA, M.; PANIS B.; BACH A. Cryopreservation of *Galanthus elwesii* Hook. apical meristems by droplet vitrification. **Cryoletters**, v. 34, p. 1-9, 2013.
- MASSAD, M. D. et al. Desenvolvimento de mudas de flamboyant e ipê-mirim em resposta a diferentes doses de Osmocote®. **Agropecuária científica no semiárido**, v. 12, n. 1, p. 83-92, 2016.

MENDONÇA, V. et al. Diferentes ambientes e Osmocote® na produção de mudas de tamarindeiro (*Tamarindus indica*). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p. 391-397, 2008.

MENDONÇA, V. et al. Osmocote e substratos alternativos na produção de mudas de maracujazeiro amarelo. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 4, p. 799-806, 2004.

MENGARDA, L. H. G. Estado físico do meio de cultura na propagação *in vitro* de bromeliaceae. **Scientia Agraria**, v. 10, p. 469-474, 2009.

MOHAMED, F. H. et al. High frequency, direct shoot regeneration from greenhouse-derived leaf disks of six strawberry cultivars. **Pakistan Journal Of Biological Sciences**, p. 96-101. 2007.

MOLASSIOTIS, A. et al. Fe-EDDHA Promotes Rooting of Rootstock GF-677 (*Prunus amygdalus* x *P. persica*) explants *in vitro*. **Biologia Plantarum**, v. 47, p. 141-144, 2003.

MORALES, R. G. F. et al. Produtividade do morangueiro em função da adubação orgânica complementar em cultivo protegido. **Ambiência**, v. 8, p. 23-33, 2012.

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

NAVROSKI, M. C. et al. Alongamento *in vitro* de genótipos de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Cerne**, v. 19, n. 4, p. 545-550, 2013.

NEHRA, N. S. et al. Regeneration of plants from immature leaf-derived callus of strawberry (*Fragaria x ananassa*). **Plant Science**, p. 119-126, 1990.

NIEDZ, R. P. Using isothiazolone biocides to control microbial and fungal contaminants in plant tissue cultures. **HortTechnology**, v. 8, n. 4, p. 598-601, 1998.

NIINO, T. et al. Dehydration improves cryopreservation of mat rush (*Juncus decipiens* Nakai) on cryo-plates. **CryoLetters**, v. 34, p. 549-560, 2013.

NOGUEIRA, G. F.; PASQUAL, M.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Survival of sugarcane shoot tips after cryopreservation by droplet-vitrification. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 11, p. 1524-1527, 2013.

NOMURA, E. S. et al. Crescimento de mudas micropropagadas da bananeira cv. Nanicão, em diferentes substratos e fontes de fertilizante. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, n. 3, p. 359-363, 2008.

OLIVEIRA, A. C. B.; BONOW, S. Novos desafios para o melhoramento genético da cultura do morangueiro no Brasil. **Informe Agropecuário**, v. 33, n. 268, p. 21-26, 2012.

OLIVEIRA, C. S. et al. Produção e qualidade de propágulos de morangueiro em diferentes concentrações de nitrogênio no cultivo sem solo. **Revista Ceres**, v. 57, n. 4, p. 554-559, 2010.

OLIVEIRA, C. S. et al. Produção e qualidade de propágulos de morangueiro em diferentes concentrações de nitrogênio no cultivo sem solo. **Revista Ceres**, v. 57, n. 4, p. 554-559, 2010.

OLIVEIRA, J. A. A. et al. Aclimatização de mudas micropropagadas de bananeira em diferentes substratos e recipientes. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 1, p.72-78, 2014.

OLIVEIRA, M. L. et al. Efeito do intervalo de imersão e de injeção de ar na multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em biorreator de imersão temporária. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 1, p. 37-45, 2014.

OLIVEIRA, M. L. et al. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* cultivado em meio semissólido e em biorreator de imersão temporária. **Scientia Forestalis**, v. 39, p. 309- 315, 2011.

OLIVEIRA, R. P. de; SCIVITTARO, W. B. Produção de frutos de morango em função de diferentes períodos de vernalização das mudas. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 91-95, 2009.

OLIVEIRA, R. P. et al. Mudanças certificadas de morangueiro: maior produção e melhor qualidade da fruta. **A Lavoura**, v. 108, n. 655, p. 35-38, 2005.

OLIVEIRA, R. P. et al. **Produção de Matrizes de Morangueiro por meio de Cultura de Tecidos**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005. 34 p. (Sistemas de Produção, 7).

OLIVEIRA, R. P. et al. Produção de mudas de morangueiro em casa-de-vegetação utilizando recipientes suspensos. **Horticultura Brasileira**, v. 25, p. 107-109, 2007.

OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B. Desempenho produtivo de mudas nacionais e importadas de morangueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n.3. p.520-522, 2006.

OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B. Produção de frutos de morango em função de diferentes períodos de vernalização das mudas. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 91- 95, 2009.

OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B.; ROCHA, P.S.G. Produção de cultivares de morango, utilizando túnel baixo em Pelotas. **Revista Ceres**, v. 58, n.5, p. 625-631, 2011.

OLIVEIRA, S.O. D. et al. A new procedure for *in vitro* propagation of vanilla (*Vanilla planifolia*) using a double-phase culture system. **Scientia Horticulturae**, v.161, n.3, p. 204-209, 2013.

OMAR, G. F. et al. Somatic embryo-like structures of strawberry regenerated *in vitro* on media supplemented with 2,4-D and BAP. **Indian Journal Of Experimental Biology**, p. 739-745, 2013.

PACHECO, G. et al. Plant regeneration, callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis. **Scientia Horticulturae**, v. 144, p. 42-47, 2012.

PADRO, M. D. A. et al. Cryopreservation of white mulberry (*Morus alba* L.) by encapsulation-dehydration and vitrification. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 108, n.1, p.167-172, 2012.

PAEK, K. Y. et al. Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. **In vitro Cellular Developmental Biology Plant**, v. 37, p. 149-157, 2001.

PAGOT, E.; HOFFMANN, A. Produção de pequenas frutas. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 1. 2003, Vacaria. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, p.9-17. (Documentos, 37), 2003.

PANIS, B. et al. Droplet-vitrification: the first generic cryopreservation protocol for organized plant tissues? **Acta Horticulturae**, v. 908, n. 1, p. 157 164, 2011.

PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant Science**, v. 168, n. 1, p. 45-55, 2005.

PARANJPE A. et al. Winter strawberry production in greenhouses using soilless substrates: an alternative to methyl bromide soil fumigation. **Horticultural Science**, v. 116, p. 98-105, 2003.

PASQUAL, M. **Meios de cultura**. Lavras; UFLA/FAEPE, 2001. 74 p.

PASSOS, F. A. **Influência de sistemas de cultivo na cultura do morango (*Fragaria x ananassa* Duch.)** Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. 105 p. (Tese doutorado), 1997.

PAULA, V. A. et al. Produção e distribuição de massa seca da parte aérea do morangueiro cultivado em ambiente protegido sob adubação orgânica. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 5931-5935, 2008.

PEIXOTO, A. P. B.; FARIA, G. A.; MORAIS, A. R. Modelos de regressão com platô na estimativa do tamanho de parcelas em experimentode conservação *in vitro* de maracujazeiro. **Ciência Rural**, v. 41, n. 11, p. 1907-1913, 2011.

PEÑA-RAMIREZ, Y. J. et al. Multiple adventitious shoot formation in spanish red cedar (*Cedrella odorata* L.) cultured *in vitro* using juvenile and mature tissues: an improved micropropagation protocol for a highly valuable tropical species. **In vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 46, p. 149-160, 2010.

PENCE, V. C. Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 47, n. 1, p. 176-187, 2011.

- PENCHEL, R. M. et al. **Tecnologia de biorreatores e propagação fotoautotrófica *in vitro***. In: Borém A (Ed.) Biotecnologia Florestal. Viçosa, UFV, 2007. p. 75-92.
- PEREIRA, J. E. S.; FORTES G. R. L. Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 1035-1043, 2003.
- PEREIRA, W. R. et al. Produtividade de cultivares de morangueiro, submetidas a diferentes épocas de plantio. **Horticultura Brasileira**, v. 31, p. 500-503, 2013.
- PIERIK, R. L. M. ***In vitro* culture of higher plants**. Dordrecht: Martinus Nyhoff, 1987. 344 p
- PILATTI, F. K. et al. *In vitro* and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. ***In Vitro Cellular Development Biology Plant***, v. 47, p. 82-98, 2011.
- PINHO, D. S. de. et al. Regeneração *in vitro* de melão, cv. Gaúcho. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1083-1089, 2010.
- PORTELA, I. P. et al. Efeito da concentração de nutrientes no crescimento, produtividade e qualidade de morangos em hidroponia. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 281-288, 2012.
- PREECE, J. Stock plant physiological factors affecting growth and morphogenesis. In: GEORGE, E.F. et al. (Eds.). **Plant propagation by tissue culture**. 3. ed. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2008. p. 403-422.
- PRIMROSE, S. B. **Modern biotechnology**. Oxford: Blackwell Scientific, 1987. 176 p.
- PULLMAN, G.S.; SKRYABINA, A. Liquid medium and liquid overlays improve embryogenic tissue initiation in conifers. *Plant Cell Reports*, v. 26, n. 3, p. 873-887. 2007
- QIN, Y. H. et al. Response of *in vitro* strawberry to antibiotics. **Plant growth Regulation**, v. 65, p. 183-193, 2011.
- QUIALA, E. et al. Biomass production of *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf., a medicinal plant, in temporary immersion systems. ***In vitro Cellular & Developmental Biology***, v. 42, p. 298-300, 2006.
- RADMANN, E. B. et al. Multiplicação *in vitro* e alongamento das brotações micropropagadas do porta-enxerto 'Tsukuba 1' (*Prunus pérsica* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 31, n. 3, p. 656-663, 2009.
- RAMLOV, F. et al. Efeitos do ágar no crescimento de explantes e na formação de calos em morfos pigmentares de *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie (Gracilariales, Rhodophyta). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, n. 3, p. 607-615, 2009.
- RANCILLAC, M. J.; NOURRISEAU, J. G. Micropropagation and strawberry plant quality. **Acta Horticulturae**, v. 265, p. 343-348, 1989.

RASHID, A.; STREET, H. F. The development of haploid embryoids from anther cultures of *Atropa belladonna* L. **Planta**, v. 113, p. 263–270, 1973.

RECH FILHO, A et al. 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. 4, p. 1799-1808, 2005.

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, 2009.

REED, B. M. et al. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 47, n. 1, p. 1-4, 2011.

REED, B. M. Plant Cryopreservation: **A Practical guide**. New York: Springer, 2008.

RÊGO, E. R.; FINGER, F. L.; RÊGO, M. M. **Consumption of pepper in Brazil and its implicarions on nutrition and health of humans and animals**. In: Peppers: Nutrition, Consumption and Health. *Proceedings...* New York: Nova Science Publishers. 2012. p.159-170.

REICHERT, L. J.; MADAIL, J. C. Aspectos socioeconômicos. In: SANTOS AM; MEDEIROS ARM (eds). **Morango: produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica/ Embrapa Hortaliças. 2003. p.12-15.

REZENDE, J. C. et al. Influência do meio de cultura e concentração de ágar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas da embriogênese somática direta. **Scientia Agraria**, v. 9, n. 1, p. 21-26, 2008.

RIBEIRO, J. M; BASTOS, D. C. **Biorreatores: aspectos gerais e sua utilização para cultura de tecidos vegetais**. Embrapa Semi-árido. Documentos, 214. Petrolina, 2008.

RIOS, S. A. L. Melhoramento genético do morangueiro. In: DIAS, M. S. C. **Morango conquistando novas fronteiras 28**. Belo Horizonte: Epamig, 2007. p. 14-19. (Informe Agropecuário, 236).

ROCHA, P. S. G. et al. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p. 1922-1928, 2010.

RODRIGUES, F. R.; ALMEIDA, W. A. B. Calogênese em *Cissus sicyoides* L. a partir de segmentos foliares visando à produção de metabólitos *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 333-340, 2010.

RODRIGUES, P. H. V. et al. Propagação de mudas de helicônia em biorreator de imersão temporária. **Bragantia**, v. 65, n. 1, p. 29-35, 2006.

RODRIGUES, P. H. V. **Produção de mudas em biorreator de imersão temporária: um novo desafio para as biofábricas**. In: Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro*. (Org.) GERALD, L. T. S. São Paulo: Antiqua, ed. 1, p. 89-97, 2011.

RODRÍGUEZ, R. et al. Pear *in vitro* propagation using a double-phase culture system. **HortScience**, v. 26, n. 1, p.62-64, 1991.

ROSA C. J. Y. B.; DORNELAS, M. C. *In vitro* plant regeneration and de novo differentiation of secretory trichomes in *Passiflora foetida* L. (Passifloraceae). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 108, p. 91-99, 2012.

ROSA, C. J. Y. B. et al. Speciesdependent divergent responses to *in vitro* somatic embryo induction in *Passiflora* spp. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 120, n. 69-77, 2015.

ROSA, H. T. et al. Crescimento vegetativo e produtivo de duas cultivares de morango sob épocas de plantio em ambiente subtropical. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, p. 604-613, 2013.

RUAN, J. et al. Flowering and Fruiting of Day-neutral and Ever-bearing Strawberry Cultivars in High-elevation for Summer and Autumn Fruit Production in Korea. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 54, n. 2, p.109-120, 2013.

SÁ, F. P. et al. Encapsulamento, crioproteção e desidratação na capacidade regenerativa de ápices caulinares de *Genipa americana*. **Ciência Rural**, v. 45, n. 11, 2015.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *Brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 9, n. 1, p. 30-33, 1990.

SALAJ, T. et al. Regrowth of embryogenic tissues of *Pinus nigra* following cryopreservation. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 106, n. 1, p. 55-61, 2011.

SALMA, M. et al. Comparison of droplet-vitrification and D-cryoplate for cryopreservation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) polyembryonic masses. **Scientia Horticulturae**, v. 179, p. 91–97, 2014.

SANDHYARANI, N., KISHOR, R., SHARMA, G. J. Clonal propagation of triploid *Acoruscalamus* Linn. using dual-phase culture system. **Journal of Crop Science & Biotechnology**, v.14, n.3, p.213–217, 2011.

SANT, R. et al. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 92, n. 1, p. 107-111, 2008.

SANTOS A. M.; MEDEIROS A. R. M. Produção de mudas comerciais. **Morango; produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2003. p.35-38. (Embrapa Informação Tecnológica. Frutas do Brasil, 40).

SANTOS, A. M.; MEDEIROS; A. R. M. (eds). **Morango. Produção. Frutas do Brasil**, 40. Embrapa CT, 2003. 81p.

SANTOS, M. da C. et al. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 3, p. 735-741, 2011.

SANTOS, T. C. et al. Conservação *in vitro* de acessos de vetiver, *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty (Poaceae). **Bioscience Journal**, v. 28, n. 6, p. 963-970, 2012.

SCHERER, R. F. et al. Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). **Scientia Horticulturae**, v. 151, p. 38-45, 2013.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. et al. Doublephase culture system for large scale production of pineapple. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.109, n.3, p. 263-269, 2012.

SCHMITT, J. D. et al. Frigoconservação das pontas de estolões na produção de muda com torrão e frutas de morangueiro. **Ciência Rural**, v. 42, n. 6, 2012.

SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Micropropagação de Plantas Frutíferas. In: FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. (eds.). **Propagação de Plantas Frutíferas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005, p. 155-173.

SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Micropropagação de Plantas Frutíferas. In: FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. (eds.). **Propagação de Plantas Frutíferas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005, p. 155-173.

SCHWARTZ, H. J. et al. Field performance and phenotypic stability of tissue culture - propagated strawberries. **Journal of the American Society Horticulture Science**, n. 106, p. 667-73, 1981.

SECRETARIA DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. Departamento de Produção Vegetal. Comissão Estadual de Sementes e Mudas do Estado do Rio Grande do Sul. 1998. **Normas e padrões de produção de mudas de fruteiras para o Estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: CESM. 100p.

SERRANO-MARTÍNEZ, F.; CANO-CASTILLO, M.; CASAS, J. L. In vitro propagation of *Helianthemum marminorense*. *Journal of Plant Biochemical and Biotechnology*, Dordrecht, v. 21, n. 2, p. 300-304, 2012.

SERSHEN, P.B. et al. Rate of dehydration, state of subcellular organization and nature of cryoprotection are critical factors contributing to the variable success of cryopreservation: studies on recalcitrant zygotic embryos of *Haemanthus montanus*. **Protoplasma**, v.249, p.171-186, 2012.

SHAKILA, S. et al. Micropropagation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) A newly introduced crop in Bangladesh. **American- Eurasian Journal of Scientific Research**, p. 151-154, 2007.

SILVA, A. B. et al. Métodos de micropropagação de abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 9, p. 1257-1260, 2007.

SILVA, A.F. et al. Botânica e fisiologia do morangueiro. In: DIAS, M. S. C. **Morango conquistando novas fronteiras 28**. Belo Horizonte: Epamig, 2007. p.7-13. (Informe Agropecuário, 236).

SILVA, L.C. et al. Shoot-tip cryopreservation by droplet vitrification of *Byrsonima intermedia* A. Juss.: a woody tropical and medicinal plant species from Brazilian Cerrado. **Cryo-Letters**, Lewes, v. 34, n. 4, p. 338-348, 2013.

SILVA, R.C. et al. Potencial germinativo e morfoanatomia foliar de plântulas de pinhão-manso originadas de germoplasma criopreservado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.8, p.836-844, 2011.

SILVEIRA, G. S. R.; GUIMARÃES, B. C. **Aspectos sociais e econômicos da cultura do morangueiro**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte - Mg, v. 35, n. 279, p.7-10, 2014.

SIMÕES, K. S. et al. Enraizamento de inhame em meios MS e carvão ativado. **Científica**, v. 42, n. 2, p. 164–169, 2014.

SIVPARSAD, B. J.; GUBBA, A. Development of an efficient plant regeneration protocol for sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cv. Blesbok. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 84, p. 14982-14987, 2012.

SKREBSKY, E. C. et al. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de Ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1471-1477, 2004.

SOBROSA, R. C.; CORDER, M. P. M. Efeito do genótipo sobre o potencial para produção de gemas e raízes adventícias em *Eucalyptus grandis* hill ex maiden *in vitro*. **Floresta e Ambiente**, v. 10, n. 1, p. 58-68, 2003.

SOUZA, J. A. et al. Efeito do tipo de ramo e do regime de luz fornecido à planta matriz no estabelecimento *in vitro* de araçazeiro cv. "Irapuã". **Ciência Rural**, v. 36, p. 1920-1922, 2006.

SPECHT, S.; BLUME, R. A. Competitividade da Cadeia do Morango no Rio Grande do Sul. **Revista de Administração e Negócios da Amazônia**, v. 3, n. 1, p. 35-59, 2011.

STEINMACHER, D. A. et al. Temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. **Annals of Botany**, v. 108, p. 1463-1475, 2011.

SURANTHRAN, P. et al. Effect of loading and vitrification solutions on survival of cryopreserved oil palm polyembryoids. **Plant Growth Regulator**, v. 66, n. 2, p. 101-109, 2012.

TACO. 2011. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. NEPA-UNICAMP. 4. ed. rev. e ampl. Campinas: NEPA-UNICAMP. 161p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Artmed, 5 ed. p. 164-197, 2013.

- TAKAYAMA, S.; AKITA, M. Bioengineering aspects of bioreactor application in plant propagation. In: GUPTA, S. D.; IBARAKI, Y. (Eds.). **Plant tissue culture engineering**. Dordrecht: Springer, 2006. p. 83-100.
- TAKEDA, F.; HOKANSON S. C. Strawberry fruit and plug plant production in the greenhouse. **Acta Horticulturae**, n. 626, p. 283-285, 2003.
- TANG, H. et al. Plant regeneration from leaves of sweet and sour cherry cultivars. **Scientia Horticulturae**, v. 93, p. 235-244, 2002.
- TEIXEIRA, J. B. **Biorreatores de imersão temporária** – o futuro da produção industrial de plantas *in vitro*. In: Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro*. (Org.) GERALD, L. T. S. São Paulo: Antiqua, ed. 1, p. 33-49, 2011.
- THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 6, p.618-631, 2008.
- UTINO, S. et al. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira-prata (*Musa AAB*) *in vitro*. I. concentrações de sais de ferro, cobre e zinco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 225-229, 2001.
- VASCONCELOS, J. M. et al. Sistemas de cultivo *in vitro* e aclimatização de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae). **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 4, p. 240-246, 2015.
- VERDIAL, M. F. et al. Fisiologia de mudas de morangueiro produzidas em sistema convencional e em vasos suspensos. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 524-531, 2009.
- VILLA, F. et al. Influência do carvão ativado e BAP na multiplicação *in vitro* de duas frutíferas de clima temperado. **Revista Ceres**, v. 54, n. 312, p. 118-124, 2007.
- VILLA, F. et al. Micropropagação de híbridos de orquídea em meio Knudson com adição de vitaminas do meio MS, benzilaminopurina e carvão ativado. **Semina**, v. 35, n. 2, p. 683-694, 2014.
- VOLK, G. M.; WALTERS, C. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behaviour in shoot tips during cryoprotection. **Cryobiology**, v. 52, n. 1, p. 48-61, 2006.
- YAMAMOTO, S. et al. Development of a cryopreservation procedure using aluminium cryo-plates. **CryoLetters**, 32, 256–265, 2011.
- ZHANG, Q. et al. Somatic embryogenesis, tetraploidy, and variant leaf morphology in transgenic diploid strawberry (*Fragaria vesca* subspecies *vesca* 'Hawaii 4'). **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 23, 2014.
- ZIV, M. Organogenic plant regeneration in bioreactors. In: ALTMAN, A.; ZIV, M.; IZHAR, S. (Ed.). **Plant biotechnology and *in vitro* biology in the 21st century**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. p. 673-676.

10 ANEXOS

ANEXO A – Certificado de registro da cultivar de morangueiro ‘Pircinque’, a partir de cadastro ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Lages/SC, 2018.

The image is a screenshot of a web browser window. The title bar reads "Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Google Chrome". The address bar shows the URL "extranet.agricultura.gov.br/php/snpc/cultivarweb/detalhe_cultivar.php?codsr=35316". Below the address bar is a yellow banner with the text "Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento". The main content area is a light green box containing the following information:

CULTIVAR:
Pircinque
NOME COMUM:
Morango
NOME CIENTÍFICO:
Fragaria x ananassa Duchesne ex Rozier
SITUAÇÃO:
REGISTRADA
Nº REGISTRO:
35355
DATA DO REGISTRO:
23/03/2016
MANTENEDOR (REQUERENTE):
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA- UDESC ENDEREÇO: AV. LUIZ DE CAMÕES, 2090 CEP: 88520-00 - LAGES - SC FONE: (49) 2101-9100
DESCRITORES
RELATÓRIO DE DESCRITORES

At the bottom of the page, there are two buttons: "Imprimir" and "Fechar".

11 APÊNDICES

APÊNDICE A – Comparação dos nutrientes dos meios de cultivo KNOP (KNOP, 1865) modificado e MS (Murashige e Skoog, 1962). Lages/SC, 2018.

KNOP (KNOP, 1865) modificado

Macronutrientes do meio de cultivo KNOP

Solução	Composição	Concentração (mg L ⁻¹)
A	Ca(NO ₃) ₂	500
B	KNO ₃	125
C	MgSO ₄ ·7H ₂ O	125
D	KH ₂ PO ₄	250
E	FeCl ₃ ·6H ₂ O	125

Micronutrientes do meio de cultivo MS

Solução	Composição	Concentração (mg L ⁻¹)
D	MnSO ₄ ·H ₂ O	16,9
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6
	H ₃ BO ₃	6,2
	KI	0,83
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
F	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37,3

Vitaminas do meio de cultivo MS

Solução	Composição	Concentração (mg L ⁻¹)
E	Glicina	2
	Ácido Nicotínico	0,5
	Piridoxina	0,5
	Tiamina	0,5

MS (Murashige & Skoog, 1962)

Macronutrientes do meio de cultivo MS

Solução	Composição	Concentração (mg L ⁻¹)
A	NH ₄ NO ₃	1650
B	KNO ₃	1900
C	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
G	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
H	KH ₂ PO ₄	170

Micronutrientes do meio de cultivo MS

Solução	Composição	Concentração (mg L ⁻¹)
D	MnSO ₄ ·H ₂ O	16,9
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6
	H ₃ BO ₃	6,2
	KI	0,83
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
F	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37,3

Vitaminas do meio de cultivo MS

Solução	Composição	Concentração (mg L ⁻¹)
E	Glicina	2
	Ácido Nicotínico	0,5
	Piridoxina	0,5
	Tiamina	0,5