

ANA LUIZA ARRUDA

PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO PARA MORANGUEIRO CULTIVAR JONICA.

Dissertação 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 Mestre em Produção Vegetal.

Orientadora: Prof. Dra. Aike Anneliese Kretzschmar
Coorientadora: Prof. Dra. Francine Regianini Nerbass

**LAGES, SANTA CATARINA
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Arruda, Ana Luiza
Protocolo de micropropagação para morangueiro cultivar
Jonica / Ana Luiza Arruda. – 2019.
88 p.

Orientadora: Aike Anneliese Kretzschmar
Coorientadora: Francine Regianini Nerbass
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages,
2019.

1. *Fragaria x ananassa* Duch. 2. Cultura de tecidos. 3.
Biocida. 4. Reguladores de crescimento. 5. Substratos. I.
Kretzschmar, Aike Anneliese. II. Nerbass, Francine Regianini.
III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de
Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Produção Vegetal. IV. Título.

ANA LUIZA ARRUDA

**PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO PARA MORANGUEIRO
CULTIVAR JONICA**

Dissertação 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 Mestre em Produção Vegetal.

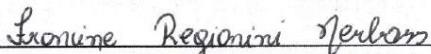
Banca Examinadora:

Orientadora:



Dra. Aike Anneliese Kreztschmar
Universidade do Estado de Santa Catarina

Coorientadora:



Dra. Flancine Regianini Nerbass
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membros:



Dr. Leo Rufato
Universidade do Estado de Santa Catarina



Dr. Murilo Dalla Costa
Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

Lages, 20 de fevereiro de 2019.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, apoio e incentivo

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, por me acompanhar em todos os momentos e me guiar sempre pelo melhor caminho.

Aos meus pais Antonio e Margarete, que são o meu alicerce. Obrigada por lutarem diariamente para que os meus sonhos se realizem. Meus exemplos de vida, agradeço imensamente por tudo.

Ao meu pedacinho de céu, Vô Roca! Sei que onde quer que esteja continua sendo luz no meu caminho, assim como foi durante a sua passagem aqui pela terra. Agradeço a Deus pela oportunidade de ter sido sua neta.

Ao meu namorado Arlindo, pelo apoio e compreensão durante este período.

Às minhas grandes e essenciais amigas, Fernanda e Samara, que mesmo longe sempre estiveram presentes. E à Pricila, amiga mais recente que sempre acompanhada de um mate tornou os meus dias mais felizes.

À minha orientadora, professora Aike, pela oportunidade de realização do mestrado.

À minha coorientadora, professora Francine por toda a ajuda ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Leo, pelo auxílio prestado ao longo deste trabalho.

Ao grupo da Fruticultura CAV/UDESC pelo aprendizado e auxílio na execução das atividades.

À Universidade do Estado de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, pela oportunidade de realização deste curso gratuito e de qualidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Por fim, é hora de fechar um ciclo e agradecer a todos que torceram por mim, com certeza cada um terá sempre um lugar especial no meu coração.

Obrigada!

“Todo mundo deveria ser aplaudido de pé pelo menos uma vez na vida,
porque todos nós vencemos o mundo”.

Livro: Extraordinário

RESUMO

ARRUDA, Ana Luiza. **Protocolo de micropropagação para morangueiro cultivar Jonica.** Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, CAV/UDESC. 88.p, Lages, SC, 2019.

A crescente demanda por mudas de morangueiro com alta qualidade genética e sanitária faz da micropropagação uma técnica recomendada para a obtenção destas plantas. Apesar da cultura de tecidos ser bastante difundida, são necessários estudos específicos que possibilitem o aperfeiçoamento dos métodos para cada espécie e cultivar. O objetivo deste estudo foi avaliar método de assepsia e formulações de meios nutritivos na propagação *in vitro* da cultivar italiana de morangueiro Jonica, com o propósito de uma multiplicação do material para constituição do matrizero comercial. Em condições *ex vitro* buscou-se avaliar a composição de diferentes substratos no crescimento das mudas. Para a introdução micropropagativa de morangueiro, foram obtidas plântulas originadas de ápices caulinares, cujo estabelecimento foi avaliado através dos seguintes experimentos: influência do biocida Plant Preservative Mixture - PPMTM (0,0 ou 2,0 mg L⁻¹); e estado físico do meio de cultura (sólido ou líquido). Para a multiplicação dos explantes foram testadas concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹); combinações de reguladores de crescimento (BAP- 0,0; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹; GA₃-0,0; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹; e ANA – 0,0; 0,05 e 0,1 mg L⁻¹); influência de concentrações de sacarose (0,0; 15,0; 30,0; 45,0 e 60,0 g L⁻¹); e efeito da utilização de cinco concentrações de silicato de potássio (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹). No enraizamento *in vitro* foram avaliados dois reguladores de crescimento (BAP e AIB) combinados em diferentes concentrações (0,0; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹). Por fim, diferentes formulações de substratos (100% turfa; 60% turfa : 40% casca de arroz; 50% turfa : 50% casca de arroz; e 40% turfa : 60% casca de arroz) foram avaliadas na etapa de aclimatização. A utilização de 2 mg L⁻¹ de PPMTM forneceu maiores porcentagens de sobrevivência dos explantes, bem como menores taxas de contaminação fúngica e bacteriana. O estabelecimento *in vitro* de morangueiro ‘Jonica’ é mais eficiente com o uso do meio de cultura convencional (sólido). A combinação de BAP (0,5 mg L⁻¹) + GA3 (1,0 mg L⁻¹) + ANA (0,1 mg L⁻¹) foi mais eficiente na multiplicação *in vitro* comparado a utilização isolada de BAP. A concentração de 30,0 g L⁻¹ de sacarose proporcionou maior desenvolvimento *in vitro*. A presença de silicato de potássio não

favoreceu as variáveis relacionadas à multiplicação e enraizamento *in vitro* de morangueiro. Foram obtidas plântulas enraizadas *in vitro* mesmo na ausência de reguladores de crescimento no meio de cultura. As plantas apresentaram a melhor resposta na etapa de aclimatização quando utilizada a formulação de substrato 50% turfa : 50% casca de arroz. Foi possível desenvolver um protocolo de micropropagação eficiente para a cultivar de morangueiro 'Jonica' a partir de plântulas regeneradas através de ápices caulinares.

Palavras-chave: *Fragaria x ananassa* Duch. Cultura de Tecidos. Biocida. Reguladores de crescimento. Substratos.

ABSTRACT

ARRUDA, Ana Luiza. **Micropropagation protocol for strawberry cultivar Jonica.** Dissertation (Master in Plant Production) - Agroveterinary Sciences Center, State University of Santa Catarina, CAV / UDESC. 88.p, Lages, SC, 2019.

The growing demand for strawberry seedlings with high genetic and sanitary quality makes micropropagation a recommended technique for obtaining these plants. Although tissue culture is widespread, specific studies are needed to improve the techniques for each species. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* propagation of the Italian cultivar of strawberry Jonica, with the purpose of providing seedlings in sufficient quantity to the producers for the commercial matrizeiro. Under *ex vitro* conditions, the composition of different substrates in the growth of the seedlings was evaluated. For a strawberry micropropagation, seedlings originating from shoot apices were obtained, whose determinant was evaluated through the following experiments: influence of the biocide Plant Preservative Mixture - PPMTM (0,0 or 2,0 mg L⁻¹); and physical state of the culture medium. For a multiplication, different concentrations (mg L⁻¹) of BAP (0.0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0) were tested; BAP-0.0; 0.5 and 1.0 mg L⁻¹; GA₃-0.0; 0.5 and 1.0 mg L⁻¹; and ANA -0.0; 0.05 and 0.1 mg L⁻¹; influence of sucrose strains (0.0; 15.0; 30.0; 45.0 and 60.0 mg L⁻¹); The effect of the use of five combinations of potassium silicate (0.0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg L⁻¹). Two growth regulators (BAP and AIB) combined with different concentrations (0.0, 0.5 and 1.0 mg L⁻¹) were evaluated in *in vitro* rooting. Finally, different formulations of substrates (100% peat, 60% peat: 40% peel of rice, 50% peat: 50% peel of rice, and 40% peat: 60% peel of rice) were evaluated in the acclimatization stage. The use of 2.0 mg L⁻¹ of PPMTM provided higher survival percentages of the explants, as well as lower contamination rates (fungal and bacterial). The *in vitro* establishment of 'Jonica' strawberry is more efficient with the use of conventional culture medium (solid). The combination of BAP (0.5 mg L⁻¹) + GA₃ (1.0 mg L⁻¹) + ANA (0.1 mg L⁻¹) was more efficient in *in vitro* multiplication compared to BAP alone. The concentration of 30.0 g L⁻¹ of sucrose provided greater *in vitro* development. The presence of potassium silicate did not favor the variables related to the multiplication and *in vitro* rooting of strawberry. *In vitro* rooted seedlings were obtained even in the absence of growth regulators to the culture medium. The plants presented better responses in the acclimatization stage when using the substrate formulation 50% peat: 50% rice husk.

It was possible to develop a micropropagation protocol for 'Jonica' strawberry cultivar from seedlings obtained through shoot apices.

Keywords: *Fragaria x ananassa* Duch. Tissue Culture. Biocide. Growth regulators. Substrates.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Características de frutos de morangueiro italiano cultivar Jonica	36
Figura 2- Lavagem superficial dos estolões coletados em estufa (A); desinfestação dos estolões realizada em câmara de fluxo laminar (B); e ápice caulinar (C).	39
Figura 3- Variáveis analisadas na etapa de estabelecimento <i>in vitro</i> : A- Contaminação Fúngica; B- Contaminação Bacteriana; C) Oxidação; D) Sobrevida; E) Regeneração.....	39
Figura 4- Variáveis analisadas na etapa de multiplicação <i>in vitro</i> : A- Número de Brotações; B- Comprimento de Brotações; e C) Número de Folhas.	40
Figura 5- Variáveis analisadas na etapa de enraizamento <i>in vitro</i> : A- Número de Raízes; e B- Comprimento Médio de Raízes.....	41
Figura 6- Número de brotações, comprimento médio de brotações (cm) e número de folhas de morangueiro ‘Jonica’ em função da concentração de sacarose no meio de multiplicação <i>in vitro</i>	52
Figura 7- Número de raízes e comprimento médio de raízes (cm) de morangueiro ‘Jonica’ em função da concentração de sacarose no meio de multiplicação <i>in vitro</i>	54
Figura 8- Número de brotações, comprimento médio de brotações (cm) e número de folhas de morangueiro ‘Jonica’ em função da adição de diferentes concentrações de silicato de potássio ao meio de cultura.	56
Figura 9- Índice SPAD de morangueiro ‘Jonica’ em função da adição de diferentes concentrações de silicato de potássio ao meio de cultura.....	57
Figura 10- Número de raízes e comprimento médio de raízes de morangueiro ‘Jonica’ em função de concentrações de silicato de potássio adicionado ao meio de cultura.	58

Figura 11- Correlação de Pearson entre: número de raízes e comprimento médio de brotações (A) e comprimento médio de raízes e comprimento médio de brotações (B) em explantes de morangueiro 'Jonica' submetidos a diferentes concentrações de silicato de potássio no meio de cultivo <i>in vitro</i>	60
Figura 12- Número de brotações, comprimento médio de brotações (cm), e número de folhas de morangueiro 'Jonica' em função da concentração de BAP.....	61
Figura 13- Número e Comprimento de Raízes em função da adição de BAP (A) ou AIB (B) em três concentrações (0,0; 0,5 e 1,0 mg.L ⁻¹) no meio de cultura MS para o enraizamento <i>in vitro</i> de morangueiro 'Jonica'.	66
Figura 14- Mudas micropropagadas de morangueiro aos 45 dias de aclimatização nos seguintes substratos: A- 100% Turfa; B- 60% Turfa : 40% Casca; C- 50% Turfa : 50% Casca; e D- 40% Turfa e 60% Casca.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Diferentes etapas e experimentos realizados para o desenvolvimento de protocolo de propagação <i>in vitro</i> para morangueiro italiano cultivar Jonica.	37
Tabela 2- Concentrações de sacarose no meio de cultura na multiplicação <i>in vitro</i> de morangueiro 'Jonica'	43
Tabela 3- Concentrações de Silicato de Potássio adicionadas ao meio de cultivo para multiplicação <i>in vitro</i> de morangueiro 'Jonica'.....	43
Tabela 4- Classificação do Coeficiente de Correlação de Pearson.....	44
Tabela 5- Concentrações de BAP no meio de cultura na multiplicação <i>in vitro</i> de morangueiro 'Jonica'.....	45
Tabela 6 - Combinações de reguladores de crescimento utilizados na multiplicação <i>in vitro</i> de morangueiro cultivar Jonica.	45
Tabela 7- Concentrações de sacarose no meio de cultura na multiplicação <i>in vitro</i> de morangueiro 'Jonica'	46
Tabela 8- Taxa de sobrevivência, oxidação e contaminação no estabelecimento <i>in vitro</i> de ápices caulinares de morangueiro 'Jonica' com ausência ou presença do biocida PPM TM	49
Tabela 9- Taxa de sobrevivência, oxidação e contaminação no estabelecimento <i>in vitro</i> de ápices caulinares de morangueiro 'Jonica' em diferentes estados físicos do meio de cultura.	51
Tabela 10- Influência de reguladores de crescimento no número de brotações, comprimento de brotações (cm) e número de folhas na multiplicação <i>in vitro</i> de morangueiro cv. Jonica.	63
Tabela 11- Resultados obtidos para o coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis: número de brotações, comprimento médio de brotações e	

número de folhas morangueiro 'Jonica' cultivado em meio contendo distintas concentrações e reguladores de crescimento.....	65
Tabela 12- Número e comprimento de raízes (cm) em função dos diferentes reguladores de crescimento e das distintas concentrações utilizadas no enraizamento <i>in vitro</i> de morangueiro Jonica.....	65
Tabela 13- Número de brotações e número de folhas em função dos diferentes reguladores de crescimento e das distintas concentrações utilizadas no enraizamento <i>in vitro</i> de morangueiro Jonica.....	67
Tabela 14- Percentual de sobrevivência (%), comprimento da parte aérea (cm), número de folhas, matéria fresca (g) e matéria seca (g) de mudas micropropagadas de morangueiro 'Jonica' em diferentes substratos. T=Turfa; C=Casca de Arroz.....	68
Tabela 15- Número de raízes e comprimento médio de raízes (cm) de mudas micropropagadas de morangueiro 'Jonica' em diferentes substratos. ...	70

LISTA DE ABREVIATURAS

AIB Ácido indol-3-butírico

ANA Ácido α -naftaleno-1-acético

BAP 6-Benzilaminopurina

cm Centímetros

cv. Cultivar

g L^{-1} Gramas por litro

GA_3 Ácido giberélico

mg L^{-1} Miligramas por litro

mL L^{-1} Mililitros por litro

MS Meio de cultura Murashige & Skoog (1962)

PPM Plant Preservative Mixture

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	23
1.1 OBJETIVOS.....	25
1.1.1 Objetivo Geral.....	25
1.2 Hipóteses.....	26
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1 Classificação e descrição botânica do morangueiro.....	27
2.2 Aspectos climáticos.....	28
2.3 Importância socioeconômica.....	28
2.4 Produção de mudas de morangueiro.....	29
2.4.1 Produção de mudas via estolões.....	30
2.4.2 Produção de mudas via sementes.....	31
2.4.3 Produção de mudas via micropromoção	31
2.5 Cultivar Jonica.....	35
2.5.1 Origem.....	35
2.5.2 Características do cultivar.....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Estabelecimento, multiplicação e enraizamento <i>in vitro</i> de morangueiro 'Jonica'.....	37
3.1.1 Estabelecimento.....	38
3.1.2 Multiplicação.....	40
3.1.3 Enraizamento.....	40
3.1.4 Experimento 1: Biocida PPM TM no estabelecimento <i>in vitro</i>	41
3.1.5 Experimento 2: Estado Físico do Meio de Cultura.....	41
3.1.6 Experimento 3: Sacarose.....	42
3.1.7 Experimento 4: Silicato de Potássio.....	43
3.1.8 Experimento 5: Concentrações de BAP.....	44
3.1.9 Experimento 6: Concentrações de BAP + GA ₃ + ANA.....	45
3.1.10 Experimento 7: Enraizamento <i>in vitro</i> com concentrações de BAP e AIB	46
3.2 Aclimatização de plantas micropropagadas de morangueiro cultivar Jonica....	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 Experimento 1: Biocida PPM TM no estabelecimento <i>in vitro</i>	49

4.2 Experimento 2: Estado físico do meio de cultura.....	50
4.3 Experimento 3: Sacarose.....	51
4.4 Experimento 4: Silicato de potássio.....	55
4.5 Experimento 5: Concentrações de BAP.....	61
4.6 Experimento 6: Concentrações de BAP + GA ₃ + AIB.....	63
4.7 Experimento 7: Enraizamento <i>in vitro</i> com concentrações distintas de BAP e AIB.....	65
4.8 Experimento 8: Utilização de diferentes substratos na etapa de aclimatização	68
5 CONCLUSÕES.....	71
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
7 ANEXOS.....	87

1 INTRODUÇÃO GERAL

As principais espécies de pequenas frutas produzidas mundialmente são o morangueiro, o mirtileiro e a framboeseira (FAOSTAT, 2017). Dentro deste grupo, o cultivo de morangos é o que possui maior expressão econômica, sendo apreciado em diversas regiões do mundo (OLIVEIRA et al., 2011).

A cultura do morangueiro (*Fragaria ananassa* Duch.) possui uma ampla distribuição geográfica devido à alta capacidade de adaptação desta fruta às condições de cultivo e clima (MORALES et al., 2012).

No ano de 2017, a produção brasileira de morangos foi de 155 mil toneladas (FAGHERAZZI, 2017), valor que se expande a cada ano, com predomínio do cultivo em pequenas propriedades, gerando um incremento significativo de renda e contribuindo para a diminuição do êxodo rural (ANTUNES & REISSER JÚNIOR, 2007; DIAS et al., 2007). Essa cultura é a base da economia de muitos municípios brasileiros, principalmente nas regiões Sul e Sudeste, que possuem 33% da superfície cultivada no país e 59% da área nacional de cultivo de morangos, respectivamente (PILLON, 2012; FAGHERAZZI et al., 2017). Segundo Antunes & Perez (2013) 98% da produção brasileira de morangos é comercializada como fruta fresca e 2% destinada ao processamento.

O destaque na produção da espécie do morangueiro baseia-se não somente no retorno econômico, mas também, por ser uma importante fonte de vitamina C, antocianinas e atividades antioxidantes, o que pode contribuir para a prevenção de doenças (COCCO et al., 2015), sendo o fruto amplamente consumido em função do seu aspecto atraente e sabor pronunciado (KHANIZADEH, 2009).

Apesar da característica perene da espécie, o cultivo de forma comercial deve ser renovado anualmente devido ao acúmulo de pragas e doenças de um ciclo de cultivo para o outro acarretando em baixa produtividade (ANTUNES & DUARTE FILHO, 2005). Por esse motivo, a etapa de produção de mudas é crucial já que a renovação das plantas acarreta investimentos representando em torno de 25% do custo total de produção (ANTUNES et al., 2014).

A demanda anual de mudas de morangueiro no país é estimada em 175 milhões, sendo que a produção nacional não atinge a qualidade nem a quantidade para atender a necessidade dos produtores (ANTUNES & PERES, 2013), tornando-

os dependentes da importação (GONÇALVES, 2015), o que inviabiliza o plantio e produção antecipados.

A maior parte das mudas de morangueiro produzidas no Brasil é originada a partir do plantio de matrizes no solo, em áreas com elevada incidência de pragas e doenças. Assim, não é atingido o padrão de qualidade porque muitos viveiristas não utilizam as tecnologias disponíveis por falta de conhecimento (OLIVEIRA et al., 2006).

A produção e a utilização de mudas sadias são os fatores mais importantes para a obtenção de frutas de alta qualidade e melhores respostas às tecnologias empregadas. Dessa forma, técnicas da cultura de tecidos possibilitam a produção de um grande número de plantas com excelente qualidade fitossanitária e genética em um menor espaço de tempo, por meio de vários ciclos de multiplicação *in vitro* (FONSECA et al., 2013). O emprego da técnica de micropropagação possibilita atender as exigências do mercado consumidor e ainda, oferecer mudas homogêneas e em quantidades suficientes para atender a demanda (DIAS et al., 2014). Aliado a isso, esta técnica atende as exigências necessárias para produção de matrizes de morangueiro.

A escolha da cultivar é a questão-chave para o sucesso na produção de frutos em diferentes sistemas de cultivo, devido ao elevado capital financeiro para a implantação da cultura e ao alto valor agregado do produto final (RUAN; LEE,; YEOUNG, 2013). A introdução de novas cultivares no mercado nacional incentiva produtores a investirem na cultura, sendo que as principais cultivares utilizadas no Brasil são oriundas de programas de melhoramento genético americanos (Universidades da Califórnia e da Flórida) e espanhóis (ANTUNES & PERES, 2013).

No Brasil, os programas de melhoramento genético da Embrapa Clima Temperado e do Instituto Agronômico de Campinas merecem destaque, pois os mesmos visam reduzir a dependência dos produtores de variedades estrangeiras. No entanto, ainda é limitada a disponibilidade de cultivares para os produtores brasileiros, e isto levou a Universidade do Estado de Santa Catarina por meio do Centro de Ciências Agroveterinárias (UDESC-CAV) à experimentação e divulgação do material genético de morangueiro proveniente da Itália. A cooperação foi firmada no ano de 2012 entre a UDESC-CAV e o *Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e L'analisi Dell'economia Agraria - Unità di Ricerca per la Frutticoltura - Forlì*, através da elaboração e condução do projeto “Criação e adaptação de genótipos de

moranguero por meio da cooperação científica com o CREA-FRF – Itália” com objetivo de introduzir e difundir novos materiais genéticos no Brasil.

A instituição de pesquisa italiana comanda oito programas de melhoramento genético localizados nas principais regiões produtoras da Itália, e a partir destes, a seleção PIR 04.072.021 atualmente denominada de ‘Jonica’, foi selecionada no ano de 2006 em virtude do hábito de crescimento compacto, vigor mediano, frutos grandes e de formato cônico e bom conteúdo de açúcares, tornando-se comercialmente difundida em 2013 (BARUZZI et al., 2017). A cultivar foi registrada e protegida junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 2016 (ANEXO A) e atualmente dois viveiros estão credenciados para produzir e comercializar as mudas em todo o território brasileiro.

As características da cultivar Jonica já estão sendo estudadas nas condições brasileiras. Fagherazzi et al. (2017) estudou quatro cultivares americanas (Albion, Camarosa, Strawberry Festival e Oso Grande) e duas cultivares italianas (Jonica e Pircinque) nas condições do Planalto Sul Catarinense e verificou na cultivar Jonica boa relação entre as variáveis sólidos solúveis totais e firmeza de polpa. Diel et al. (2017) concluíram que as cultivares de moranguero italianas refletem bom rendimento quando comparadas às cultivares americanas nas condições brasileiras, sendo promissoras para os produtores desta espécie.

Estudos específicos que favoreçam o cultivo *in vitro* da cultivar Jonica são necessários a fim de otimizar um protocolo de micropropagação, pois diferentes genótipos muitas vezes não respondem da mesma forma, quando cultivados nas mesmas condições (PREECE, 2008). Embora a metodologia de micropropagação de cultivares de moranguero esteja definida, 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 & OLIVEIRA, 2004).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Otimizar a propagação *in vitro* da cultivar de morangueiro italiana Jonica visando a produção de mudas para a constituição do matrizero comercial dos viveiristas e definir substratos adequados para a aclimatização *ex vitro*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Selecionar meio de cultura eficiente no estabelecimento e multiplicação *in vitro* do morangueiro cv. Jonica através do cultivo de ápices caulinares.
- Verificar a multiplicação *in vitro* de explantes de morangueiro 'Jonica' através da adição de silicato de potássio ao meio de cultivo.
- Verificar a concentração de sacarose que propicia melhor multiplicação *in vitro*.
- Analisar a necessidade da adição de auxinas ao meio nutritivo para o enraizamento *in vitro*.
- Estudar distintas formulações de substratos na etapa de aclimatização.

1.2 Hipóteses

- A utilização do biocida PPMTM no meio de cultura reduz a contaminação e aumenta o percentual de sobrevivência dos ápices caulinares.
- A combinação de reguladores de crescimento é mais eficiente na multiplicação *in vitro* do morangueiro cv. Jonica do que a utilização isolada.
- A adição de silicato de potássio aumenta a multiplicação *in vitro* de morangueiro 'Jonica'.
- Não há necessidade do uso de reguladores de crescimento para enraizamento *in vitro* de morangueiro 'Jonica'.
- O tipo de composição do substrato na etapa de aclimatização influencia o crescimento e desenvolvimento *ex vitro* de mudas de morangueiro 'Jonica'.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação e descrição botânica do morangueiro

O morangueiro pertence à família Rosaceae, subfamília Rosoideae, gênero *Fragaria* L., que inclui mais de vinte espécies, as quais diferem tanto funcionalmente quanto estruturalmente (SILVA; DIAS; MARO, 2007). Este gênero possui cinco grupos classificados quanto à ploidia: diploide, tetraploide, pentaploide, hexaploide e octaploide, incluindo neste último grupo a espécie cultivada atualmente (*Fragaria x ananassa* Duch) (HANCOCK; SJULIN; LOBOS, 2008).

A espécie *Fragaria x ananassa* é um híbrido natural entre as espécies *F. chiloensis*, oriunda do Chile, e *F. virginiana*, encontrado espontaneamente na América do Norte, e embora os parentais sejam naturais do continente americano, foi na Europa, por volta de 1760, onde ocorreram os cruzamentos esporádicos que originaram o híbrido, após franceses cultivarem as duas plantas no mesmo jardim (COSTA; ROSSI; LEAL, 2014).

O morangueiro é caracterizado em sua origem como uma planta herbácea perene, porém é cultivado como anual; e forma uma espessa roseta, podendo ser rasteira ou atingir de 15 a 30 cm de altura, com caule curto, denominado coroa.

O caule é um rizoma estolhoso, cilíndrico e retorcido com entrenós curtos em cujas gemas terminais surgem as folhas, estolhos e inflorescências (RONQUE, 1998).

As folhas são compostas, com três ou cinco folíolos, sendo que cada folha apresenta um pecíolo inserido na base da coroa protegido por um par de estípulas onde se encontram as gemas que podem evoluir para estolões (os quais são estruturas que apresentam meristemas de crescimento nas extremidades dando origem a novas plantas) ou novas coroas (PALHA, 2005).

O sistema radicular do morangueiro apresenta raízes primárias, as quais se originam na coroa e raízes secundárias, que se originam a partir das primárias e que são consideradas as mais importantes, pois são responsáveis pela absorção de água e de nutrientes (BUCCI; FAEDI; BARUZZI, 2010).

As flores desenvolvem-se numa inflorescência terminal contendo normalmente quinze flores, são actinomórficas com cinco pétalas e sépalas, possuem brácteas, agrupam-se em corimbos e são de coloração branca algumas

vezes ligeiramente rosada (LISTON; RICHARD; TIA-LYNN, 2014). Esta espécie apresenta flores hermafroditas, com estames, pistilos e anteras facilmente distinguíveis, dispostos em espiral sobre o receptáculo, sendo que a fecundação dos óvulos pode ser realizada pelo pólen da própria flor ou pelo pólen de flores da mesma planta ou de plantas diferentes trazidos por polinizadores (PALHA, 2005).

O morango é um pseudofruto, pois se origina de uma única flor com vários ovários, sendo que o desenvolvimento de cada ovário produz um fruto (ANTUNES et al., 2011). Os frutos verdadeiros são os aquênios, pontos pretos duros e superficiais, vulgarmente conhecidos como sendo as sementes, podendo chegar à 200 ou ainda, em frutos maiores, totalizar 400 aquênios (SANHUEZA et al. 2005).

2.2 Aspectos climáticos

O morangueiro é uma das espécies frutíferas de clima temperado que mais sofre influência das condições ambientais de cultivo; em razão disto apresenta respostas diferentes quando cultivadas em locais distintos (FAGHERAZZI, 2017).

É uma planta sensível à variação fotoperiódica, típica de climas frios, sendo as altas temperaturas o principal fator limitante da cultura (FILGUEIRA, 2007).

A partir do comportamento das cultivares em relação ao fotoperíodo e à temperatura, são definidos dois grupos distintos: as cultivares de fotoperíodo curto, que geralmente florescem quando o dia possui menos de 14 horas e temperatura inferior a 15°C, caso contrário, ocorre o crescimento vegetativo (emissão de estolões), e as cultivares insensíveis ao fotoperíodo (neutras) que florescem continuamente com temperaturas entre 10 e 28°C (DURNER, 2015).

2.3 Importância socioeconômica

O cultivo de morangueiro possui uma ampla distribuição geográfica em virtude de sua alta capacidade de adaptação às condições de cultivo e de clima (MORALES et al., 2012). Analisando a distribuição da produção de morangos pelos continentes, verifica-se que a Ásia produziu 3,9 milhões de toneladas, dominando quase metade da produção total (8,1 milhões de toneladas) do ano de 2014 (FAOSTAT, 2014). Logo a seguir têm-se as Américas e a Europa que apresentaram produções de 2,0 e

1,6 milhões de toneladas, respectivamente. Tanto a Oceania como África têm produções pouco expressivas (FAOSTAT, 2017).

Segundo dados da FAO, no ano de 2016 a produção mundial de morangos foi de 9,1 milhões de toneladas. Os maiores produtores foram a China seguida pelos Estados Unidos e México. Outros produtores importantes são: Turquia, Espanha, Egito e Coréia do Sul.

No grupo das pequenas frutas, a cultura do morangueiro é uma das mais expressivas e no Brasil, sendo produzidos em torno de 155 mil toneladas todos os anos em uma área de 4.310 hectares. O estado de Minas Gerais é o maior produtor nacional (74 mil toneladas), seguido pelo Paraná (21 mil toneladas) e Rio Grande do Sul (20 mil toneladas) (FAGHERAZZI et al., 2017).

No estado de Santa Catarina, a produção está concentrada basicamente no litoral, com destaque para o município de Rancho Queimado, que é considerado a capital catarinense do morango (LEI ESTADUAL Nº11.954 apud BARBOSA, 2009). Entretanto, polos não tradicionais vêm ganhando espaço, principalmente nos locais de maior altitude que permitem a produção de morangos no verão, devido as temperaturas mais amenas em relação ao litoral (SANTOS, 2005). Entre os novos polos, podem-se destacar os municípios de Urupema, São Joaquim, Urubici, Bom Jardim da Serra, Bom Retiro, Capão Alto, Campo Belo do Sul e Lages, cujo período de colheita permite obter melhores preços pela escassa oferta do produto (FAGHERAZZI, 2013; FAGHERAZZI et al., 2014).

Desta forma, o cultivo de morangos exerce um importante papel socioeconômico devido a sua alta rentabilidade (FACHINELLO et al., 2011). Esse fruto, por ser produzido em pequenas propriedades com utilização de mão de obra familiar (ALMEIDA et al., 2014), contribui na diminuição do êxodo rural e confere uma elevada importância socioeconômica nos polos produtores (ANTUNES & REISSER JÚNIOR, 2007; DIAS et al., 2007).

2.4 Produção de mudas de morangueiro

A utilização de mudas com boas características genéticas e fitossanitárias é uma das principais etapas do sistema de produção de diversas frutíferas (DUTRA et al., 2011). Para Oliveira & Scivittaro (2009) a muda é um dos insumos mais

importantes no sistema de produção de morangueiro, estando diretamente relacionada com a produtividade e a qualidade da fruta.

O Brasil necessita anualmente em torno de 175 milhões de mudas de morangueiro (ANTUNES & PERES, 2013) sendo que a quantidade produzida no país não é suficiente para atender a demanda, além da baixa qualidade fisiológica e fitossanitária das mudas produzidas (DUTRA et al., 2011).

A escassez na oferta de mudas nacionais, juntamente com a baixa qualidade fitossanitária e fisiológica das mesmas, torna os produtores dependentes da importação de mudas do Chile e da Argentina (ANTUNES & PERES, 2013). Entretanto os produtores relatam os altos custos gerados na importação dessas mudas, e o inconveniente de chegarem após o período ideal de plantio em que as baixas temperaturas do final do outono e início do inverno são pouco favoráveis ao crescimento vegetativo da parte aérea, limitando a fotossíntese e atrasando o início da produção (ALMEIDA et al., 2009).

2.4.1 Produção de mudas via estolões

No sistema tradicional de produção de mudas de morangueiro o plantio das matrizes é feito no solo, através da propagação vegetativa, via estolões (BARBOSA et al., 2013). Estes estolões são ramificações emitidas pela planta-matriz, em número variável, a depender da cultivar, que produzem gemas intercaladas as quais podem formar raízes e folhas e originar novas plantas (ANTUNES et al., 2011). Podem ser enraizados no solo ou em substratos, sendo comercializados como muda de raiz nua ou com torrão (GIMÉNEZ et al., 2008; VERDIAL et al., 2009; BEYENE et al., 2012).

A obtenção destas mudas é realizada por viveiristas registrados e sujeitos a fiscalização, embora, muitos produtores acabam produzindo suas próprias mudas, na tentativa de redução de custos (GUIMARÃES et al, 2015).

As limitações deste tipo de propagação vegetativa convencional de plantas, especialmente no morangueiro, são devido à presença de patógenos (fungos, bactérias e vírus) no material a ser propagado, cuja infecção é mantida nos diferentes ciclos de cultivo, acentuando e degenerando gradualmente a performance das cultivares (BISWAS; ISLAM; HOSSAN, 2008). Além disso, esta técnica exige produção elevada de estolões em um curto espaço de tempo com o objetivo de

produzir as mudas comerciais destinadas à renovação anual das lavouras no início do outono (GUIMARÃES et al., 2015).

2.4.2 Produção de mudas via sementes

Embora a propagação das plantas do gênero *Fragaria* possa ser feita através de sementes, esta não é utilizada comercialmente, pois as mudas demoram mais tempo a frutificar do que as plantas propagadas através de estolões, e fornecem um número limitado de propágulos (BHATT & DHAR, 2000). A reprodução sexuada através de sementes é utilizada apenas no melhoramento genético para obter variabilidade genética nos materiais em estudo (OLIVEIRA & BONOW, 2012).

2.4.3 Produção de mudas via micropropagação

A propagação *in vitro*, também conhecida como micropropagação, é uma das aplicações mais práticas da cultura de tecidos, sendo considerada uma técnica promissora para a clonagem massal de genótipos superiores (STEINER et al., 2008). A aplicação deste método vem tornando-se comum no mercado, com o objetivo de suprir à demanda de mudas sadias e livres de patógenos, produção em qualquer época do ano, em tempo e espaço físico reduzido, com alta fidelidade genética e maior produtividade, uniformidade e desempenho no campo (SCHUCH; ERIG, 2005).

A micropropagação apresenta uma sequência de fases para o desenvolvimento *in vitro* das culturas. O primeiro estágio, denominado de estabelecimento, consiste na retirada de um segmento de tecido (explante) da planta matriz, desinfestação e inoculação em meio nutritivo sob condições assépticas, sendo que, se esta etapa não for realizada adequadamente todo o processo pode ser comprometido pela ocorrência de contaminações fúngicas e bacterianas (CARVALHO; JESUS; SANTOS, 2012). O etanol e os compostos à base de cloro (halogênios) são as substâncias com ação germicida mais utilizadas no processo de desinfestação (COUTO, et al.; 2004). Além das contaminações, a oxidação fenólica pode dificultar o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro*, pois algumas enzimas oxidam os fenóis formando quinonas, as quais são responsáveis pela coloração marrom das culturas, além de causarem a inibição do crescimento e a morte dos

explantes em grande número de espécies (BASSAN et al., 2006). Estudando o estabelecimento *in vitro* de morangueiro 'Oso Grande' através do cultivo *in vitro* de meristemas, Rattanpal et al. (2011) descobriram que a utilização de 0,1% de cloreto de mercúrio durante quatro minutos foi eficiente para sobrevivência e controle de contaminações. No estabelecimento de morangueiro cv. Chandler, a maior porcentagem de sobrevivência foi alcançada com a utilização de cloreto de mercúrio (0,1%) por 7 minutos e cloreto de mercúrio (0,1%) por 7 minutos mais álcool etílico (70%) por 30 segundos (PALLEI et al., 2017).

A etapa de multiplicação, Segundo González-Olmedo et al (2005), consiste em estimular a proliferação de brotações, aumentar o número de gemas nos explantes e promover, se necessário, o alongamento das brotações. A taxa de multiplicação é o fator mais importante nesta etapa (RESMI & NAIR, 2011), sendo que, o número de subcultivos além de outros fatores como o genótipo, via morfogênica, tipo de explante e componentes do meio de cultivo utilizado possuem influência sobre a estabilidade genética das plantas obtidas (MEDEIROS, 2015). Elkichaoui (2014), estudando a propagação da cultivar de morangueiro 'Sweet Charlie' verificou que o maior número de brotações axilares foram obtidas quando utilizado o meio de cultura MS suplementado com 1,0 mg L⁻¹ de BAP. Zobayer et al. (2011), estudando o efeito de diferentes concentrações hormonais na formação de brotações de morangueiro RABI-Strawberry 3, encontraram resultados mais promissores ao combinar concentrações elevadas de cinetina (1,5 e 2,0 mg L⁻¹) com concentrações inferiores de BAP.

Após a fase de proliferação ou multiplicação, as brotações devem ser individualizadas e transferidas para um novo meio de cultivo para que possam alongar e enraizar (CARVALHO; JESUS; SANTOS, 2012). Avaliando diferentes concentrações da auxina AIB no desenvolvimento de raízes *in vitro* de morangueiro 'Sweet Charlie', Elkichaoui (2014) observou que a ausência deste regulador de crescimento no meio de cultivo foi mais eficaz para a formação do sistema radicular. Lal; Sharma; Hedge (2003) verificaram que o máximo enraizamento para morangueiro foi encontrado com 1,0 mg L⁻¹ de AIB.

O quarto e último estágio do processo de micropropagação é denominado de aclimatização e representa a retirada da planta de um ambiente *in vitro* (laboratório) para um ambiente de cultivo *ex vitro* (estufa) (ROCHA et al, 2008) ou seja, é fase de transição das plantas de condições artificiais para o ambiente natural (CLAPA; FIRA;

JOSHEE, 2013). Um fator importante envolvido na etapa de aclimatização é a escolha do substrato adequado, pois o mesmo pode facilitar ou impedir o crescimento e desenvolvimento das plantas micropagadas, conforme suas propriedades físico-químicas, influenciando diretamente no sucesso da aclimatização (COUTO et al., 2003, SHREBSKY et al., 2006). A manipulação de materiais orgânicos e inorgânicos, geralmente em misturas de dois ou mais componentes, tem sido utilizada na elaboração de substratos para a produção de mudas (FERMINO et al., 2010). No entanto, é necessário estar ciente dos substratos utilizados na produção de mudas, uma vez que os mesmos devem apresentar características químicas e físicas ideais para o crescimento das plantas (KLEIN, 2015). Waafa & Wahdan (2017) estudaram a influência de substratos na aclimatização de duas cultivares de morango (Festival e Marquez) e observaram maior porcentagem de sobrevivência quando as plântulas foram aclimatizadas em uma mistura de turfa + vermiculita + areia.

O sucesso de um sistema de micropagação depende do controle de um grande número de variáveis, tais como antecedentes genéticos, tipos de tecidos ou explantes, componentes nutricionais, reguladores de crescimento e ambientes de cultivo (GIRI; SHYAMKUMAR; ANJANEYULU, 2004), sendo necessário o desenvolvimento de protocolos de acordo com cada espécie e cultivar.

No cultivo *in vitro*, durante a elaboração do meio de cultura, a adição de fitorreguladores é realizada para suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes, uma vez que se encontram isolados das regiões produtoras na planta matriz (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Os hormônios vegetais estão entre os fatores fisiológicos mais importantes que afetam a regeneração de plantas *in vitro* (AL MALKI & ELMEER, 2010). As citocininas são conhecidas por apresentarem um papel fundamental na multiplicação, sendo que, o BAP é a mais utilizada na proliferação de brotações em morango (HADDADI et al., 2010).

Dentre os componentes nutricionais, o silício é considerado um elemento que não tem sido muito estudado na micropagação de plantas, contudo, do ponto de vista fisiológico, para o crescimento e o desenvolvimento das plantas, tem demonstrado efeito benéfico sobre o aumento de produção de diversas culturas (GOMES et al., 2008). Acredita-se que ele possa interferir na arquitetura das plantas e favorecer a fotossíntese, ao proporcionar folhas mais eretas, que têm maior

eficiência fotossintética (ZHOU, 1995). Alguns exemplos do uso do silício na micropropagação podem ser citados: em morangueiro a adição de silicato de sódio ao meio de cultura promoveu aumento da espessura do limbo foliar, da deposição de cera epicuticular e formação de depósitos de silício nas células, assim como o aumento da massa fresca e seca dos propágulos e maior teor de clorofila; em orquídeas, maior número de brotações foi obtido utilizando 5 mg L⁻¹ de Supa potássio® (fonte de silicato de potássio) enquanto que 5 mg L⁻¹ de Supa potássio® associado a 20 mg L⁻¹ de silicato de sódio proporcionou maior comprimento da parte aérea, maior número de raízes e maior comprimento médio de raízes (SOARES et al., 2007).

Devido à necessidade de dispor de um produto de qualidade para a comercialização, em função da exigência do mercado consumidor, é necessário que as mudas sejam de alta qualidade e que sejam produzidas em quantidade suficiente para atender a demanda (DIAS et al, 2014). Na produção de mudas de morangueiro se recomenda que sejam adquiridas plantas matrizes provenientes da cultura de tecidos (ANTUNES & DUARTE FILHO, 2005). Esta técnica permite a produção massal de mudas com alta qualidade genético-sanitária, atendendo as exigências e padrões necessários para a produção de matrizes de morangueiro (DIAS et al, 2014).

Para se obter mudas de qualidade e, dessa forma, contribuir para um acréscimo expressivo em produtividade, deve-se realizar a remoção de viroses do material vegetativo, que pode ser feita através de cultura de ápices caulinares, que se caracterizam como sendo um segmento do ápice do caule composto pelo meristema apical juntamente com os primórdios foliares e folhas em desenvolvimento (INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº22). Devido ao tecido meristemático não apresentar um sistema vascular desenvolvido e a maioria dos vírus infectar as plantas de forma sistêmica, é possível, através da técnica da cultura de tecidos com a utilização de ápices caulinares como explantes, obter-se mudas sadias sem maiores complexidades (GOMIDE, 2004). Outra vantagem da utilização de ápices caulinares como explantes, na maior parte dos casos, é a manutenção da identidade do genótipo regenerado, em virtude das células do meristema manterem de maneira mais uniforme a estabilidade genética. (MURASHIGE, 1974; GROUT, 1990).

No entanto, são relatados alguns problemas na cultura de tecidos, como a variação somaclonal, que afeta a qualidade das plantas geradas (CASSELLS &

CURRY, 2001). Devido a esta variação, eventualmente podem surgir indivíduos que se diferenciam da planta original em uma ou mais características e essas alterações podem ser estáveis e transmissíveis aos descendentes (CASSELLS & CURRY, 2001). A frequência de mutantes não pode ser prevista e, aparentemente, diversos fatores podem afetar a natureza e a frequência da variação somaclonal, entre eles, o genótipo doador do explante e as condições de cultivo (ILLG, 1990).

Na etapa de multiplicação, em plantas da espécie *Fragaria*, à medida em que se aumentam o número de subcultivos, aumentam as probabilidades de ocorrer variações nas características fenotípicas, como altura e vigor das plantas, tamanho e formato de frutos (DEBERGH & READ, 1991).

Por este motivo recomenda-se para o morangueiro, que sejam realizados apenas cinco ciclos de subcultivos com intervalos de 20-30 dias (OLIVEIRA et al., 2005), embora na Europa sejam aceitas até dez etapas de multiplicação, não sendo aconselhável ultrapassar este valor (EPPO, 2008).

2.5 Cultivar Jonica

2.5.1 Origem

A obtenção da cultivar Jonica foi através de uma livre polinização da cultivar Kilo [Rosalinda x Demetra (Irvine x Tudla)] na cidade de Cesena/Itália, sendo a primeira geração de plantas obtida no ano de 2006 na localidade de Scanzano Jonico, Região da Basilicata. A seleção do genótipo PIR 04.072.021 (PIR2) no campo de semensais ocorreu em virtude das características do hábito compacto da planta, das frutas de formato cônico e uniformes e pela sensibilidade ao fotoperíodo de dia curto (FAGHERAZZI, 2017).

2.5.2 Características do cultivar

É uma cultivar de dias curtos com baixa necessidade de frio e maturação precoce que apresenta frutos com massa média constante durante todo o período de produção, sendo que a manutenção das pétalas no fruto maduro durante o período invernal de produção é uma característica que a distingue das demais cultivares (GONÇALVES; MALTONI; COCCO, 2014).

Durante o período de produção, as plantas apresentam desenvolvimento médio a elevado de novas coroas, hábito vegetativo compacto, médio vigor, produtividade média a elevada, floração precoce, formato cônico regular, cor vermelho-brilhante (Figura 1), boa firmeza de polpa, elevada consistência e média acidez (GONÇALVES; MALTONI; COCCO, 2014).

Figura 1 - Características de frutos de morangueiro italiano cultivar Jonica



Fonte: Antonio Felipe Fagherazzi, 2017

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estabelecimento, multiplicação e enraizamento *in vitro* de morangueiro ‘Jonica’

No presente trabalho, foram desenvolvidos experimentos distintos relacionados ao desenvolvimento de um protocolo de propagação *in vitro* da cultivar de morangueiro italiana ‘Jonica’ os quais estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Diferentes etapas e experimentos realizados para o desenvolvimento de protocolo de propagação *in vitro* para morangueiro italiano cultivar Jonica.

Fase do Cultivo <i>in vitro</i>	Fatores
Estabelecimento	PPM TM (0,0 ou 2,0 mL L ⁻¹) Estado Físico do Meio (Sólido ou Líquido)
	Concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L ⁻¹)
Multiplicação	Combinações de BAP (0,0; 0,5 e 1,0 mg L ⁻¹) + GA3 (0,0; 0,5 e 1,0 mg L ⁻¹) + ANA (0,0; 0,05 e 0,01 mg L ⁻¹)
	Concentrações de Sacarose (0,0; 15,0; 30,0; 45,0 e 60,0 g L ⁻¹)
	Concentrações de Silicato de Potássio (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L ⁻¹)
Enraizamento	Regulador de Crescimento e Concentrações BAP (0,0; 0,5 e 1,0 mg L ⁻¹) e AIB (0,0; 0,5 e 1,0 mg L ⁻¹)
Aclimatização	Substratos (100% T*; 60% T:40% C*; 50% T:50% C; 40% T:60% C)

*T = turfa; C= casca de arroz. Fonte: Próprio Autor

Todos os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação Vegetal, pertencente à Universidade do Estado de Santa Catarina/Centro de Ciências Agroveterinárias (UDESC/CAV) na cidade de Lages-SC, durante os anos de 2017 e 2018.

Em todas as etapas, o meio de cultura basal utilizado foram os sais e vitaminas do MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) (ANEXO B), com acréscimo de 30 g L⁻¹ de sacarose (exceto no experimento em que o carboidrato foi uma fonte de estudo) e 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol. A suplementação com reguladores de crescimento foi feita de acordo com cada experimento. Foi efetuado o ajuste do pH

do meio para 5,8 \pm 0,2 antes da adição do agente solidificante (6 g L⁻¹ de ágar), sendo o meio de cultura posteriormente autoclavado por 20 minutos a 1,2 atm e 121°C.

Explantes de morangueiro 'Jonica' medindo 1,5 \pm 0,5 cm com duas folhas iniciais foram utilizados como material para os experimentos de multiplicação e enraizamento *in vitro*.

Os experimentos foram instalados em sala de crescimento, onde foram utilizados tubos de ensaio na etapa de estabelecimento (contendo 10 mL de meio de cultura) e frascos de vidro nas etapas de multiplicação e enraizamento (contendo 30 mL de meio nutritivo). Os mesmos foram expostos a um fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 \pm 2°C e intensidade luminosa de 42 μ mol m⁻².s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas.

3.1.1 Estabelecimento

O procedimento padrão adotado para os experimentos realizados na primeira etapa do cultivo *in vitro* iniciou com a coleta dos estolões de plantas matrizes acondicionadas em estufa, provida de sistema de irrigação via gotejamento além de parâmetros construtivos como paredes laterais e frontais vedadas e protegidas com telas, ante-câmara e pedilúvios individuais para cada acesso. Os tratamentos fitossanitários eram realizados semanalmente com aplicação dos seguintes princípios ativos: Tiofanato-Metílico e Metidationa (Fungicidas); Deltametrina e Abamectina (Inseticidas); e Casugamicina (Bactericida).

Três dias após a realização das aplicações, os estolões foram levados ao laboratório onde se procedeu uma lavagem superficial com detergente neutro, escova e água corrente (Figura 2A). Em seguida, o material foi levado para câmara de fluxo laminar e a assepsia foi realizada através da imersão em álcool 70% durante um minuto e logo após em solução de hipoclorito de sódio 2,5% e três gotas de detergente comercial Tween 20TM sob agitação constante por 15 minutos (Figura 2B). Após o escoamento, passaram por uma tríplice lavagem, com água destilada autoclavada. Os ápices caulinares (0,3-0,8 mm) foram extraídos (Figura 2C) e estabelecidos em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio MS com a composição original de sais e vitaminas e sem a adição de reguladores de crescimento. Logo

após a introdução dos mesmos de acordo com os tratamentos, permaneceram no escuro durante os primeiros sete dias para prevenção da oxidação fenólica.

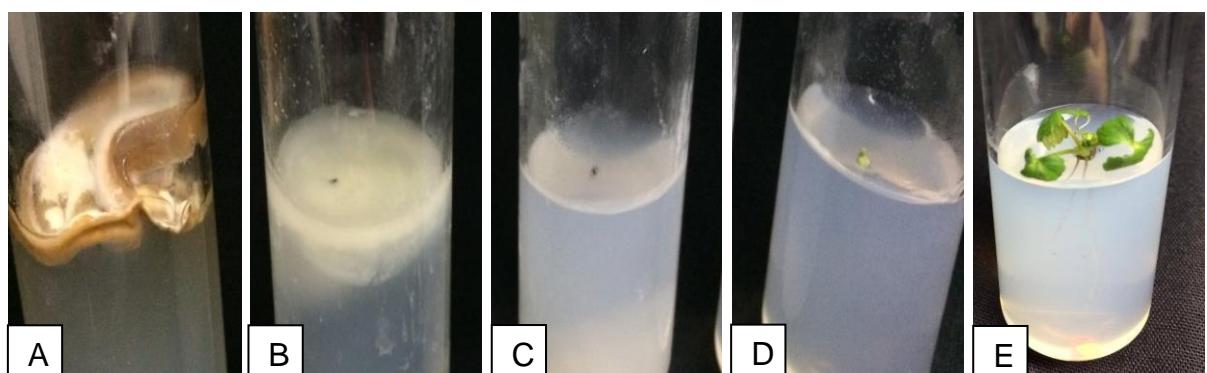
Figura 2 - Lavagem superficial dos estolões coletados em estufa (A); desinfestação dos estolões realizada em câmara de fluxo laminar (B); e ápice caulinar (C).



Fonte: Próprio autor.

Após 30 dias de cultivo *in vitro* dos ápices caulinares, avaliações foram realizadas. As contaminações fúngicas (Figura 3A) e bacterianas (Figura 3B) foram feitas através de contagem visual quanto à presença de micélios e colônias respectivamente. Foi considerado como oxidado (Figura 3C), o meristema que estava parcialmente ou totalmente escurecido e como meristema sobrevivente (Figura 3D e 3E) aquele que estava totalmente ou parcialmente com coloração verde característica da cultivar avaliada ou que apresentou regeneração da plântula.

Figura 3 - Variáveis analisadas na etapa de estabelecimento *in vitro*: A- Contaminação Fúngica; B- Contaminação Bacteriana; C) Oxidação; D) Sobrevivência; E) Regeneração.



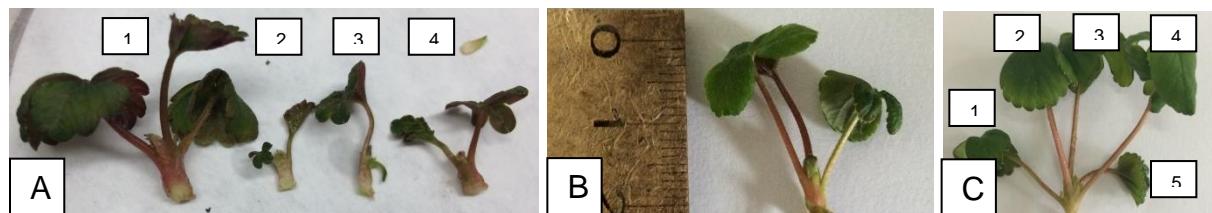
Fonte: Próprio autor.

3.1.2 Multiplicação

Na segunda etapa do processo de micropropagação, os explantes de moranguinho ‘Jonica’ previamente estabelecidos *in vitro* foram cultivados em meio MS com variação nos componentes de acordo com cada experimento realizado (Item 3.1, Tabela 1).

Aos 30 dias de cultivo as variáveis analisadas foram: número de brotações (Figura 4A), comprimento de brotações (Figura 4B) mediante medição com auxílio de uma régua e número de folhas (Figura 4C).

Figura 4 - Variáveis analisadas na etapa de multiplicação *in vitro*: A- Número de Brotações; B- Comprimento de Brotações; e C) Número de Folhas.



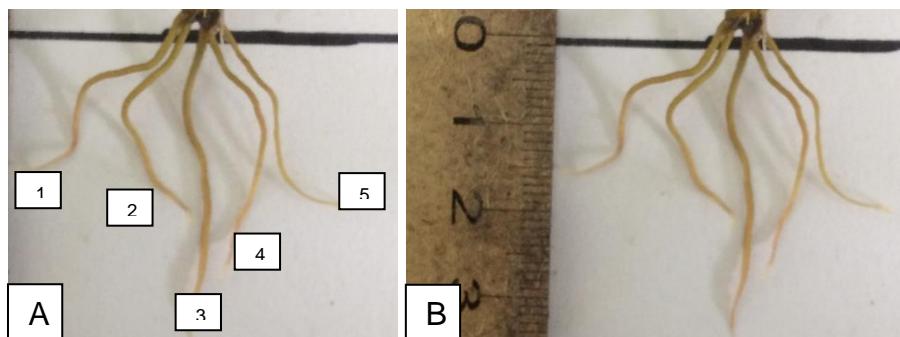
Fonte: Próprio autor.

3.1.3 Enraizamento

Na etapa de enraizamento *in vitro* os explantes de moranguinho cultivar Jonica foram introduzidos em meio nutritivo MS com variações tipos e concentrações de reguladores de crescimento (Item 3.1, Tabela 1).

Aos 30 dias de cultivo foram realizadas análises visuais em relação à formação de raízes: número de raízes (Figura 5A); e comprimento médio de raízes (Figura 5B), através de medição com auxílio de uma régua.

Figura 5 - Variáveis analisadas na etapa de enraizamento *in vitro*: A- Número de Raízes; e B- Comprimento Médio de Raízes.



Fonte: Próprio Autor

3.1.4 Experimento 1: Biocida PPMTM no estabelecimento *in vitro*

Este experimento teve como objetivo a avaliação da presença ou da ausência do biocida Plant Preservative Mixture (PPMTM) no meio de cultura para controle de possíveis contaminações. O biocida é composto pelos ingredientes ativos (5-cloro-2-metil-3-2H-isotiazolona e 2-metil-3-2H-isotiazolona).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições de dez tubos de ensaio cada. Foram estudados dois tratamentos: **A**- ausência de PPMTM no meio de cultura; e **B**- adição de 2 mL L⁻¹ de PPMTM ao meio de cultivo.

As variáveis estudadas foram: porcentagens de contaminações fúngicas e bacterianas, de oxidação e de sobrevivência (como descrito no item 3.1.1) aos 30 dias após a introdução no meio de cultura.

Os resultados foram avaliados de acordo com à análise de variância através da aplicação do teste F, e as médias quando significativas, foram comparadas pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade de erro. Os valores que não apresentaram normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk foram transformados em $\sqrt{x} + 0,1$, onde x é a média obtida de cada variável.

3.1.5 Experimento 2: Estado Físico do Meio de Cultura

Neste estudo, avaliou-se o uso da espuma fenólica com meio líquido em substituição ao meio de cultura semissólido tradicional no estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares de morangueiro 'Jonica'.

Com relação à espuma fenólica, adotou-se um procedimento padrão que consistiu em mergulhar a espuma em uma bandeja contendo aproximadamente 10 litros de água de tal forma que ocorresse a hidratação, deixando o material imerso durante 24 horas com frequência de troca da água a cada oito horas. Esse manejo foi realizado com o intuito de eliminar possíveis compostos ácidos remanescentes de sua fabricação.

Aos meios de cultivo (semissólido e líquido), foi adicionado 1 mL L⁻¹ do biocida Plant Preservative Mixture (PPMTM).

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com dois tratamentos e três repetições compostas dez tubos de ensaio cada. Os tratamentos foram: **A**- Meio de cultura sólido; e **B**- Meio de cultura líquido (sem adição de ágar) com espuma fenólica.

Aos 30 dias após a introdução *in vitro* foram analisadas as porcentagens de contaminações fúngicas e bacterianas, oxidação e sobrevivência dos meristemas. As avaliações foram realizadas de acordo com o exemplificado no item 3.1.1.

Os dados obtidos foram avaliados pela análise de variância através da aplicação do teste F, e as médias quando significativas, foram comparadas pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade de erro. Os valores que não apresentaram normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk foram transformados em $\sqrt{x} + 0,1$, onde x é a média obtida de cada variável.

3.1.6 Experimento 3: Sacarose

Plântulas de morangueiro 'Jonica' introduzidas no meio de cultura MS com adição de 1 mg L⁻¹ de BAP foram utilizadas para o estudo dos efeitos entre as diferentes concentrações de sacarose na etapa de multiplicação *in vitro*.

Os tratamentos diferiram entre si em relação às concentrações de sacarose adicionadas ao meio de cultura, conforme descrito na Tabela 2. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco repetições de três explantes cada. Em todos os experimentos realizados, o número de repetições foi estabelecido de acordo com o trabalho elaborado por Camargo et al. (2018) e em virtude da restrição no número de plântulas.

Tabela 2 - Concentrações de sacarose no meio de cultura na multiplicação *in vitro* de morangueiro 'Jonica'.

Tratamentos	Concentração de Sacarose (g L ⁻¹)
T1	0,0
T2	15,0
T3	30,0
T4	45,0
T5	60,0

Fonte: Próprio autor.

Aos 30 dias após a introdução no meio de cultura foram avaliados o número de brotações, comprimento médio de brotações, número de folhas, número de raízes e comprimento médio de raízes (descrição nos item 3.1.2 e 3.1.3).

Os resultados obtidos foram avaliados de acordo com à análise de variância através da aplicação do teste F, e quando as médias foram significativas a análise de regressão foi efetuada. Os valores que não apresentaram normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk foram transformados em $\sqrt{x} + 0,1$, onde x é a média obtida de cada variável.

3.1.7 Experimento 4: Silicato de Potássio

Brotações de morangueiro 'Jonica' obtidas pela regeneração de explantes *in vitro* foram utilizadas para este estudo.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos (Tabela 3) e cinco repetições de quatro explantes cada.

Tabela 3 - Concentrações de Silicato de Potássio adicionadas ao meio de cultivo para multiplicação *in vitro* de morangueiro 'Jonica'.

Tratamentos	Concentração de Silicato de Potássio (g L ⁻¹)
T1	0,0
T2	0,5
T3	1,0
T4	1,5
T5	2,0

Fonte: Próprio Autor

As variáveis analisadas aos 30 dias de cultivo foram: número de brotações, comprimento médio de brotações, número de folhas, número de raízes e comprimento médio de raízes (descrição no item 3.1.2 e 3.1.3). Além destas variáveis, foram realizadas medições indiretas no teor de clorofila nas folhas de moranguinho ‘Jonica’ com auxílio do medidor portátil SPAD-502-PLUS da Minolta®, que realiza uma medição de absorbância da folha em duas regiões de comprimento de onda (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 obtidos através da realização deste estudo foram avaliados por meio da análise de variância através da aplicação do teste F, e posteriormente foi efetuada a análise de regressão. Os valores que não apresentaram normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk foram transformados em $\sqrt{x} + 0,1$, onde x é a média obtida de cada variável. Além disso, para verificar o grau de ajustamento, foram calculados os respectivos coeficientes de determinação e o grau de correlação foi verificado através da Tabela 4, proposta por Devore (2006), que indica o grau de correlação pelo coeficiente de Pearson.

Tabela 4 - Classificação do Coeficiente de Correlação de Pearson

r	Definição
0,00 a 0,19	Correlação bem fraca
0,20 a 0,39	Correlação fraca
0,40 a 0,69	Correlação moderada
0,70 a 0,89	Correlação forte
0,90 a 1,00	Correlação muito forte

Fonte: Devore, 2006

3.1.8 Experimento 5: Concentrações de BAP

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco repetições de três explantes cada. Os tratamentos diferiram quanto à adição de diferentes concentrações da citocinina BAP no meio de cultivo, de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5 - Concentrações de BAP no meio de cultura na multiplicação *in vitro* de morangueiro 'Jonica'.

Tratamentos	Concentração BAP (mg L ⁻¹)
T1	0,0
T2	0,5
T3	1,0
T4	1,5
T5	2,0

Fonte: Próprio autor.

Aos 30 dias após a introdução dos explantes no meio de cultura foram avaliados o número de brotações, comprimento médio de brotações e número de folhas (descrição no item 3.1.2).

Os resultados obtidos foram avaliados de acordo com à análise de variância através da aplicação do teste F, e quando as médias foram significativas foi efetuado a análise de regressão. Os valores que não apresentaram normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk foram transformados em $\sqrt{x} + 0,1$, onde x é a média obtida de cada variável.

3.1.9 Experimento 6: Concentrações de BAP + GA₃ + ANA

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e cinco repetições de três explantes cada. Os tratamentos estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - Combinações de reguladores de crescimento utilizados na multiplicação *in vitro* de morangueiro cultivar Jonica.

Tratamentos	Concentrações (mg L ⁻¹)
T1	BAP (0,0) + GA ₃ (0,0) + ANA (0,00)
T2	BAP (0,5) + GA ₃ (0,5) + ANA (0,05)
T3	BAP (1,0) + GA ₃ (0,5) + ANA (0,05)
T4	BAP (0,5) + GA ₃ (1,0) + ANA (0,1)
T5	BAP (1,0) + GA ₃ (1,0) + ANA (0,1)

Fonte: Próprio Autor

Aos 30 dias de cultivo, as variáveis analisadas foram: número de brotações, comprimento de brotações e número de folhas, de acordo com a metodologia explicada no item 3.1.2.

Os resultados obtidos foram avaliados de acordo com à análise de variância através da aplicação do teste F, e quando as médias foram significativas foi efetuado o teste de Tukey à 5% de probabilidade de erro. Os valores que não apresentaram normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk foram transformados em $\sqrt{x} + 0,1$, onde x é a média obtida de cada variável. Além disso, para verificar o grau de ajustamento, foram calculados os respectivos coeficientes de determinação e o grau de correlação foi verificado através da Tabela 4 proposta por Devore (2006) (item 3.1.7), que indica o grau de correlação pelo coeficiente de Pearson.

3.1.10 Experimento 7: Enraizamento *in vitro* com concentrações de BAP e AIB

Foi realizado neste experimento um estudo relacionado ao enraizamento *in vitro* de morangueiro 'Jonica'. Para isso, foram utilizadas brotações obtidas pela etapa de multiplicação *in vitro*.

Utilizou-se o meio de cultura MS (item 3.2) suplementado com dois reguladores de crescimento (6-benzilaminopurina e ácido indolbutírico) e três concentrações (0,0; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹). Os seis tratamentos avaliados (Tabela 7) foram compostos por um esquema fatorial 2x3 em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições de três explantes cada.

Tabela 7 - Concentrações de sacarose no meio de cultura na multiplicação *in vitro* de morangueiro 'Jonica'.

Tratamentos	Regulador de Crescimento	Concentração (mg L ⁻¹)
T1	BAP	0,0
T2	BAP	0,5
T3	BAP	1,0
T4	AIB	0,0
T5	AIB	0,5
T6	AIB	1,0

Fonte: Próprio Autor

As variáveis-resposta verificadas após 30 dias de cultivo, segundo o item 3.1.3 foram: número de raízes e comprimento de raízes.

Os resultados obtidos foram avaliados através da análise de variância por meio da aplicação do teste F, e quando as médias foram significativas foi efetuado o teste de Tukey à 5% de probabilidade de erro. Os valores que não apresentaram normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk foram transformados em $\sqrt{x} + 0,1$, onde x é a média obtida de cada variável.

3.2 Aclimatização de plantas micropropagadas de morangueiro cultivar Jonica.

Este experimento foi realizado no Centro de Ciências Agroveterinárias pertencente à Universidade do Estado de Santa Catarina em Lages/SC. Para isso, utilizaram-se plântulas de morangueiro multiplicadas e enraizadas *in vitro*.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições de duas plantas cada por tratamento. Foram testados quatro tratamentos, de acordo com o tipo de substrato (não-esterilizado) fornecido pela empresa JB substratos: **S1**: Substrato 100% turfa; **S2**: Substrato 60% turfa e 40% casca de arroz; **S3**: Substrato 50% turfa e 50% casca de arroz; e **S4**: Substrato 40% turfa e 60% casca de arroz.

As plântulas foram lavadas em água corrente para a remoção dos resíduos do meio de cultura e transferidas para bandejas com 50 células contendo os respectivos substratos. Anteriormente à adição das plântulas, as bandejas foram umedecidas.

As plântulas permaneceram em túnel plástico com sistema de nebulização controlado (umidade relativa entre 85-97%). Após transcorridos dez dias do transplantio, foram adicionados, em cada planta, 50 mL de solução composta pelos nutrientes do meio MS (Anexo B), com exceção da sacarose e do ágar, cujo pH foi ajustado para $5,6 \pm 0,2$.

Aos 45 dias após o transplantio foram avaliados a sobrevivência das plantas, considerando-se como plantas sobreviventes aquelas tenras, com coloração esverdeada e que mantiveram ou produziram folhas e se desenvolveram. Foi avaliado também o comprimento da parte aérea, através de medição com auxílio de uma régua; a massa fresca total (mg); a massa seca total (mg) após a secagem das plantas em estufa a 65°C após a obtenção de massa constante; e número de folhas,

número de raízes e comprimento de raízes foram determinados de acordo com o exemplificado no item 3.1.2 deste trabalho.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade de erro. Os valores que não apresentaram normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk foram transformados em $\sqrt{x} + 0,1$, onde x é a média obtida de cada variável.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento 1: Biocida PPMTM no estabelecimento *in vitro*

Os resultados das porcentagens de sobrevivência, oxidação e de contaminações fúngicas e bacterianas dos ápices caulinares estabelecidos em virtude da presença ou da ausência do biocida PPMTM no meio de cultura podem ser verificados através da Tabela 8.

Tabela 8 - Taxa de sobrevivência, oxidação e contaminação no estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares de morangueiro 'Jonica' com ausência ou presença do biocida PPMTM.

PPM TM (mL L ⁻¹)	Sobrevivência (%)	Oxidação (%)	Contaminação	
			Fungo (%)	Bactéria (%)
0	20 b*	10 b	25 a	45 a
2	70 a	30 a	0 b	0 b
CV(%)	8,58	4,13	5,84	8,11

* Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Próprio Autor.

Apesar do uso cada vez mais rigoroso de técnicas estéreis e condições assépticas, a contaminação ainda é um problema persistente no cultivo *in vitro* de plantas (ORLIKOWSKA et al. 2016). O PPMTM tem se mostrado eficaz para a prevenção de contaminações fúngicas e bacterianas, sendo estável ao calor ao contrário dos antibióticos e fungicidas convencionais, podendo ser autoclavado (GEORGE & TRIPEPI, 2001).

A presença do agente biocida propiciou uma maior sobrevivência dos ápices caulinares estabelecidos, assim como, ausência de contaminações fúngicas e bacterianas. Em contrapartida, foi observado maior índice de oxidação nos meristemas cultivados em meio de cultura com a presença de PPMTM.

A ausência de contaminações e consequentemente maior sobrevivência dos ápices caulinares em decorrência da adição de PPMTM ao meio de cultura é devido à combinação de dois biocidas de amplo espectro (5-cloro-2-metil-3-2H-isotiazolona e 2-metil-3-2H-isotiazolona) presentes no composto que reduzem a formação de microorganismos (RIHAN et al., 2012; LUNA et al. 2013).

O PPMTM controla os microorganismos ao penetrar na parede microbiana e inibir diversas enzimas no ciclo do ácido cítrico e na cadeia de transporte de

elétrons, podendo também, inibir o transporte de monossacarídeos e aminoácidos do meio para as células microbianas; a complexidade da parede celular vegetal impede aparentemente que o biocida tenha o mesmo efeito sobre os tecidos vegetais (PLANT CELL TECHNOLOGY, 1998). O PPMTM é considerado mais eficaz contra populações bacterianas do que os antibióticos, porque pode inibir muitas enzimas diferentes envolvidas no metabolismo bacteriano (ORLIKOWSKA et al., 2015). Esse mecanismo impede o desenvolvimento precoce de resistência bacteriana embora não possa ser excluída (CHAPMAN, 2003).

No entanto, o efeito do PPMTM no metabolismo vegetal pode afetar a capacidade dos explantes em formar brotações, assim como resultados demonstrados por George & Triepi (2001), onde houve redução significativa na capacidade regenerativa de explantes de crisântemo.

O efeito anticontaminante do PPMTM tem sido relatado em diversas espécies, (SILVEIRA et al., 2016; DUTRA et al., 2008) inclusive no morangueiro (CAMARGO 2016). De acordo com Silveira et al. (2016) o aumento na concentração pode resultar em estresse dos tecidos e consequentemente maior produção de compostos fenólicos, sendo que para cada espécie estudada é determinante a escolha de uma concentração que impeça o crescimento de microrganismos sem causar oxidação no material.

4.2 Experimento 2: Estado físico do meio de cultura

Verifica-se na Tabela 9 que houve diferença estatística entre os estados físicos do meio de cultura (sólido e líquido) no estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares de morangueiro para as variáveis sobrevivência e oxidação, diferentemente das variáveis contaminações fúngicas e bacterianas, as quais não apresentaram diferenças significativas.

Tabela 9 - Taxa de sobrevivência, oxidação e contaminação no estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares de morangueiro 'Jonica' em diferentes estados físicos do meio de cultura.

Estado Físico do Meio	Sobrevivência (%)	Oxidação (%)	Contaminação	
			Fungo (%)	Bactéria (%)
Sólido	71,0 a*	17,0 b	8,3 ns	8,3 ns
Líquido	8,3 b	77,2 a	7,0	9,5
CV(%)	5,00	6,84	5,94	7,38

* Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. ns Não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Fonte: Próprio Autor.

A maior porcentagem de ápices caulinares sobreviventes, seguido do menor percentual de oxidação foram obtidos através da utilização do meio de cultura tradicional (sólido). Em comparação ao observado no experimento anterior, houve redução de 77% na taxa de oxidação dos ápices caulinares de morangueiro estabelecidos, apenas reduzindo a utilização do biocida PPMTM no meio de cultura de 2 para 1 mL L⁻¹. A maior oxidação dos ápices caulinares e consequentemente menor sobrevivência dos mesmos foi verificada com o cultivo em meio de cultura líquido. Não foram observadas diferenças estatísticas para as variáveis relacionadas às contaminações fúngicas e bacterianas.

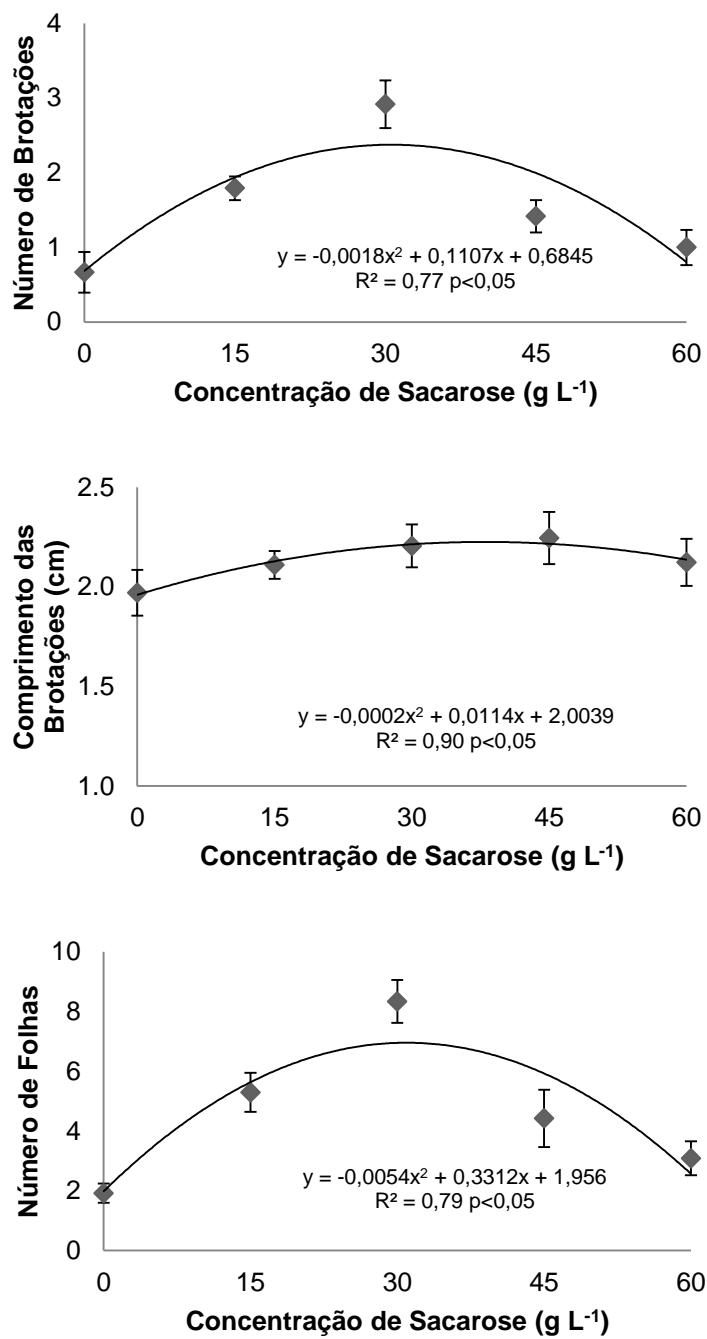
A técnica de utilização do meio de cultura líquido foi empregada visando à redução nos custos de produção, visto que o ágar é um dos componentes mais dispendiosos para a cultura de tecidos de plantas (CALDAS et al., 1998; JUNGHANS et al., 2009). A utilização do meio de cultivo líquido com suporte de espuma fenólica apresentou desvantagens em relação ao meio semissólido ocasionando 70% de morte dos ápices caulinares. A partir dos resultados obtidos pode-se inferir que o pré-tratamento realizado na espuma fenólica não foi suficiente para a eliminação de todos os resíduos químicos provenientes da sua fabricação.

4.3 Experimento 3: Sacarose

As concentrações de sacarose influenciaram o número de brotações, comprimento médio de brotações e número de folhas de morangueiro 'Jonica'.

Através da Figura 6, verifica-se a análise de regressão polinomial, onde os pontos de máxima são: 30,7 g L⁻¹; 28,5 g L⁻¹ e 30,5 g L⁻¹ para número de brotações, comprimento médio de brotações (cm) e número de folhas respectivamente.

Figura 6 - Número de brotações, comprimento médio de brotações (cm) e número de folhas de morangueiro 'Jonica' em função da concentração de sacarose no meio de multiplicação *in vitro*.



Fonte: Próprio autor.

A baixa capacidade fotossintética das plantas cultivadas *in vitro* e a dificuldade de trocas gasosas entre o ambiente interno e externo devido às condições herméticas ou semi-herméticas dos frascos justificam a adição de uma fonte de carbono externa (ALAM et al., 2010). A sacarose é a principal fonte de

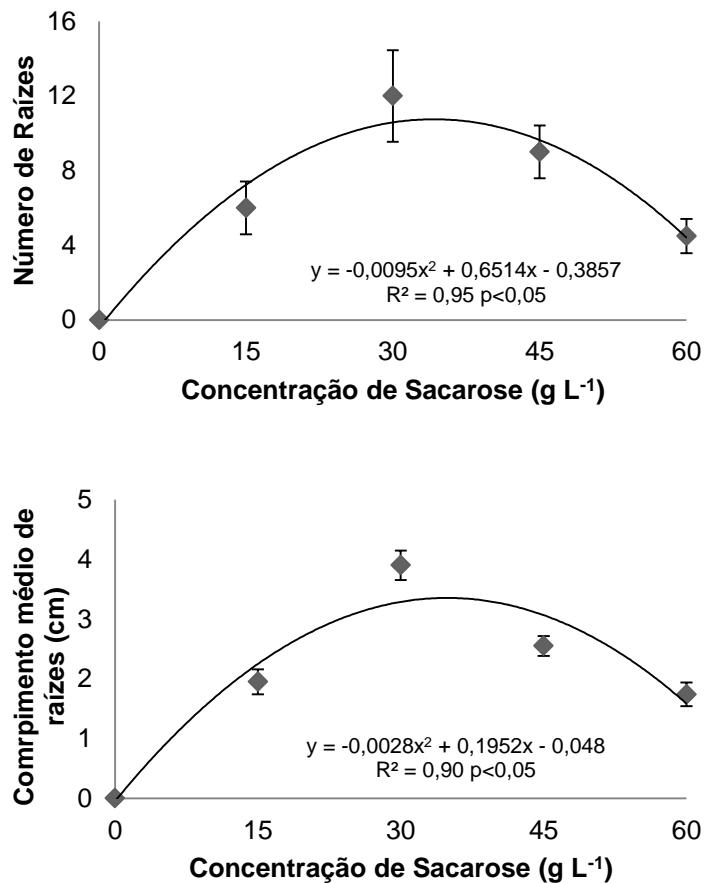
carboidratos utilizada na cultura de tecidos de plantas, fornecendo energia às células e movendo-se eficientemente através da membrana celular (SWAMY et al., 2010).

Os resultados alcançados com a realização desta pesquisa são semelhantes obtidos pelos autores Dutra et al. (2012), onde a concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose adicionada ao meio de cultura MS, no protocolo de micropropagação de moranguero utilizado pela Embrapa, garantiu os melhores resultados. Camargo (2018) também verificou que a concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose foi mais satisfatória para o desenvolvimento *in vitro* de explantes de moranguero italiano Pircinque. Resposta obtida através deste estudo, também foi encontrada por Morfeine (2014), que relatou médias superiores para número e comprimento de brotações com a concentração de sacarose de 30 g L⁻¹ para propagação *in vitro* de banana cv. Grand Naine.

A adição de uma concentração acima de 30 g L⁻¹ de sacarose ao meio de cultura promoveu diminuição nas variáveis relacionadas à parte aérea dos explantes, resultado este, que pode estar relacionado ao fato de que concentrações de sacarose superiores à 4% promovem excessivo potencial osmótico do meio causando deterioração das culturas (PÉREZ et al., 2004). Ahmad et al. (2007), relatam que os açúcares são percebidos pelas células *in vitro* como sinais químicos e altas concentrações de carboidratos podem atuar como agentes estressantes.

As regressões polinomiais relacionadas ao sistema radicular dos explantes de moranguero ‘Jonica’ em função das distintas concentrações de sacarose adicionadas ao meio nutritivo podem ser verificadas através da Figura 7. Os pontos de máxima foram de 34,2 g L⁻¹ e 34,8 g L⁻¹ de sacarose para as variáveis número de raízes e comprimento médio de raízes respectivamente.

Figura 7 - Número de raízes e comprimento médio de raízes (cm) de morangueiro ‘Jonica’ em função da concentração de sacarose no meio de multiplicação *in vitro*.



Fonte: Próprio autor.

No presente estudo, constatou-se que quando foi utilizada uma concentração de sacarose superior a aproximadamente 35 g L⁻¹ houve queda na curva para todos os parâmetros avaliados. O aumento da concentração de açúcares no meio de cultura pode interferir na formação de raízes, pois acarreta diminuição da absorção de sais e água, e isso pode afetar o crescimento da planta (BESSON et al., 2010). Além disso, o açúcar produzido pela planta durante a fotossíntese somado à sacarose contida no meio de cultivo propiciam alta absorção de açúcares pelas plantas, elevando a concentração total e prejudicando o enraizamento (THORPE et al., 2008)

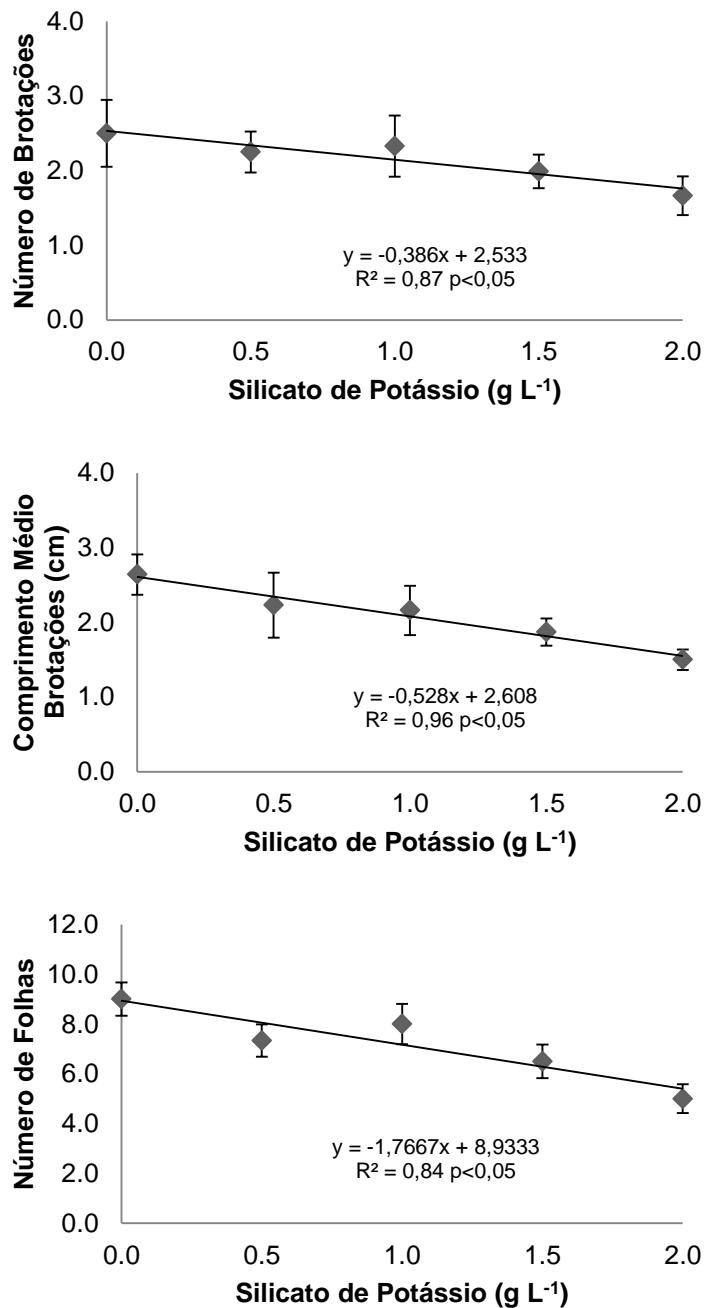
Em estudos com morangueiro ‘Pircinque’, Camargo (2018) também constatou que a concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose promoveu melhores resultados nas variáveis relacionadas ao sistema radicular dos explantes. Mohasseb et al. (2014), através de estudo realizado com morangueiro “Chandler”,

verificaram que a melhor concentração para indução do enraizamento *in vitro* foi de 40 g L⁻¹. Trabalhando com a cultivar de morangueiro Campinas, Calvete et al. (2002) observaram que a concentração de 45 g L⁻¹ de sacarose é ideal para a formação do sistema radicular. Esses mesmos autores verificaram que não houve formação de raízes na ausência de sacarose, concordando com os resultados obtidos no presente estudo e indicando que a falta de açúcares no meio reduz significativamente o desenvolvimento do sistema radicular, pois o crescimento e a inicialização das raízes são processos de alta demanda energética que só podem ocorrer por meio de substratos metabólicos disponíveis (THORPE, 1982; DE KLERK & CALAMAR, 2002).

4.4 Experimento 4: Silicato de potássio

De acordo com os resultados apresentados na Figura 8, é possível observar que as concentrações de silicato de potássio adicionadas ao meio de cultura influenciaram de forma negativa o número de brotações, comprimento médio de brotações e o número de folhas. À medida em que se elevaram as concentrações de silicato de potássio observou-se redução nos valores destas variáveis.

Figura 8 - Número de brotações, comprimento médio de brotações (cm) e número de folhas de morangueiro 'Jonica' em função da adição de diferentes concentrações de silicato de potássio ao meio de cultura.



Fonte: Próprio autor.

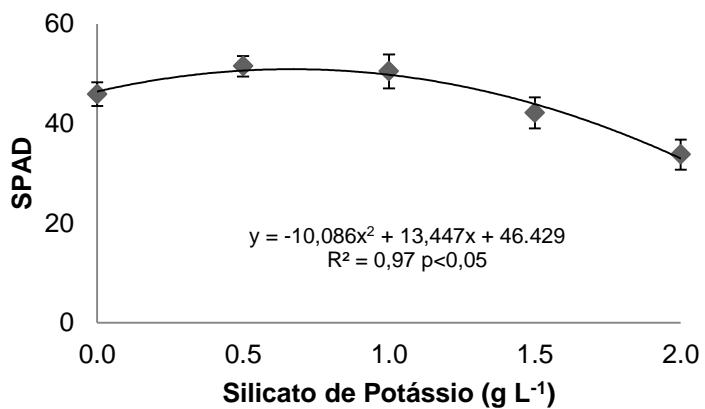
Assim como verificado neste estudo, a adição de silicato de potássio ao meio de cultivo MS acarretou em um menor número de folhas nos explantes de morangueiro cultivar Oso Grande (BRAGA et al., 2009). Estudando duas espécies de orquídeas, Pasqual et al. (2011) relatou que o número de folhas diminuiu com o aumento das concentrações de silicato de cálcio adicionadas ao meio de cultivo.

Alves et al. 2017, verificaram que o aumento das concentrações de silicato de cálcio provocou redução na área foliar e na altura da parte aérea de orquídea. Segundo Soares et al. 2008, a redução no número de folhas de plantas que recebem silício é um mecanismo para diminuir a transpiração.

A ausência de respostas em relação aos parâmetros analisados (com exceção do teor de clorofila) pode estar relacionada com a determinação da concentração ótima e da fonte de silício utilizada que varia de acordo com a espécie ou o genótipo da planta (SOARES et al., 2013). Outra explicação é que o excesso nutricional, como nesse caso o potássio, pode ter provocado um desequilíbrio levando a deficiências ou superacumulação de nutrientes (MALAVOLTA, 2006). Além disso, os resultados negativos obtidos com a adição de silicato de potássio podem ser atribuídos a uma interação desfavorável entre este e os demais componentes do meio, já que, de acordo com Borgatto et al. 2002, o crescimento *in vitro* de plantas, órgãos, tecidos e/ou células depende da perfeita interação entre os componentes essenciais do meio de cultura, como fontes de carbono e nutrientes minerais, sendo estes fatores limitantes para o desenvolvimento *in vitro*.

O índice SPAD teve um comportamento de curva de regressão polinomial, onde o ponto de inflexão é 0,67 g L⁻¹ de silicato de potássio adicionado ao meio nutritivo (Figura 9).

Figura 9 - Índice SPAD de morangueiro 'Jonica' em função da adição de diferentes concentrações de silicato de potássio ao meio de cultura.



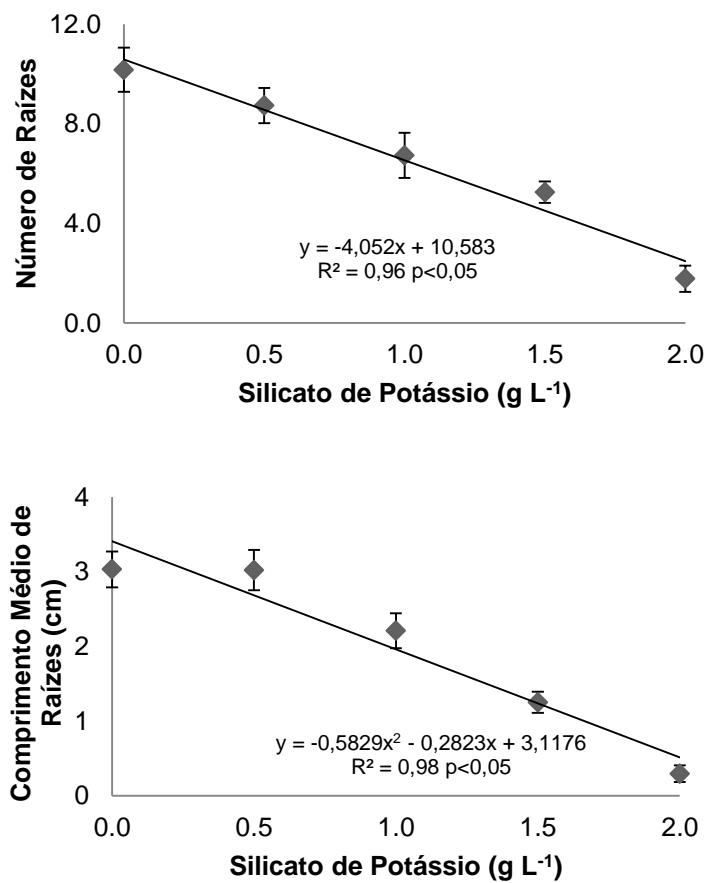
Fonte: Próprio Autor

A ação benéfica do silício tem sido associada a diversos efeitos indiretos, como aumento da eficiência fotossintética e do teor de clorofila (SIVANESAN &

PARK, 2014). De acordo com Takahashi (1995), a melhor arquitetura foliar proporcionada pelo silício permite maior penetração de luz, maior absorção de CO₂ e diminuição da transpiração excessiva, o que provoca o incremento das taxas fotossintéticas.

Na Figura 10 são demonstradas as regressões lineares para as variáveis relacionadas ao sistema radicular dos explantes de morangueiro 'Jonica'. Assim como na parte aérea, as concentrações de silicato de potássio adicionadas ao meio de cultura não contribuíram para o aumento dos parâmetros analisados.

Figura 10 - Número de raízes e comprimento médio de raízes de morangueiro 'Jonica' em função de concentrações de silicato de potássio adicionado ao meio de cultura.



Fonte: Próprio Autor.

Quando se aumenta a quantidade de raízes formadas *in vitro*, aumenta-se também a área de contato raiz/meio de cultura, refletindo em maior absorção dos nutrientes (SOARES et al., 2013). Dessa forma, pode-se observar que o tratamento testemunha contribuiu para o aumento no número e no comprimento médio de

raízes, sendo que a adição de quaisquer concentrações de silicato de potássio diminuiram as médias para estas variáveis.

Pesquisas desenvolvidas com a variedade de banana “Maçã” mostram que não houve efeito significativo da adição de diferentes fontes de silício ao meio de cultura MS no comprimento médio de raízes, em relação ao tratamento testemunha (ASMAR et al., 2011). Fontes de silicato não afetaram o desenvolvimento *in vitro* de orquídeas, sendo que houve diminuição no número e no comprimento médio de raízes das mesmas (COLOMBO et al., 2016) concordando com os resultados obtidos no presente estudo.

O efeito inibitório causado na formação do sistema radicular devido à adição de silicato de potássio ao meio nutritivo pode estar associado à própria concentração (GEORGE, 2008) visto que todo nutriente em excesso provoca um desbalanço nutricional tanto na plântula quanto no meio de cultura (SOARES et al, 2013).

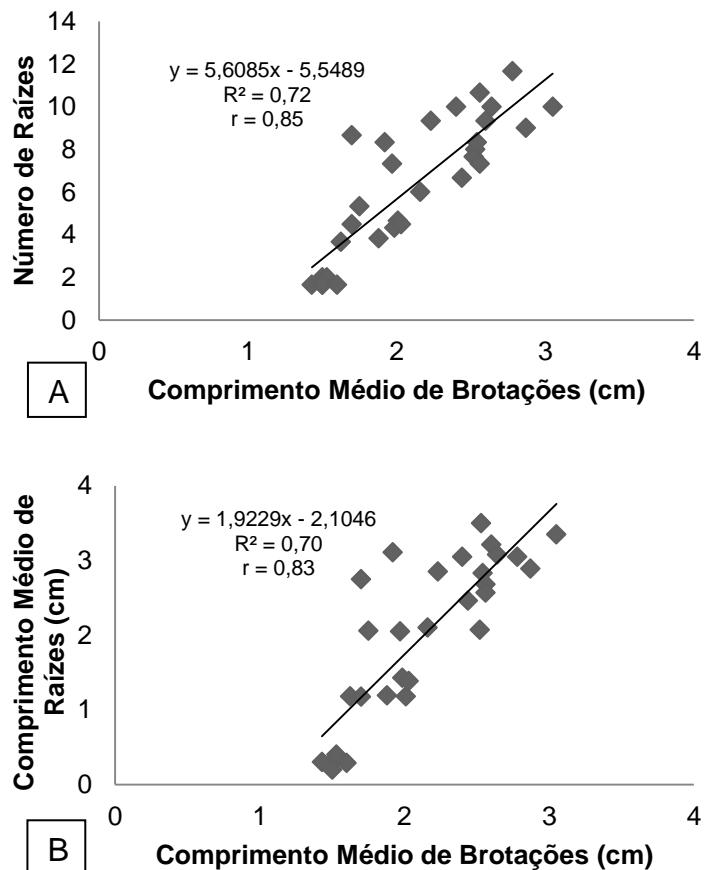
Em estudos de nutrição mineral é necessário considerar os nutrientes como um todo, porque no processo de absorção, um pode exercer influência sobre o outro, dadas as possíveis interações que possam ocorrer (MALAVOLTA et al., 1997).

Desejando verificar o grau de correlação entre as variáveis número de raízes e comprimento médio de raízes (Figura 10), fez-se necessário estimar a correlação de Pearson, cujo valor foi de $r = 0,94$. O fato desse valor ter caracterizado uma correlação significativa positiva muito forte, classificada de acordo com a tabela proposta por Devore (2006), indica que os resultados relativos a essas variáveis são dependentes, ou seja, houve diminuição no comprimento médio das raízes à medida em que se diminuiu o número de raízes ou vice-versa.

É possível que as concentrações de silicato de potássio causaram um desequilíbrio nutricional nas plantas inibindo a absorção de nutrientes a partir do meio de cultura, sendo assim, o silício não conseguiu exercer os efeitos benéficos sobre o crescimento e desenvolvimento das plântulas de morango.

Como as raízes são responsáveis pela absorção de água e nutrientes, uma menor emissão e um menor crescimento do sistema radicular geralmente refletem negativamente na taxa de crescimento da parte aérea. Isso pode ser visto na Figura 11, em que o desenvolvimento reduzido da parte aérea está correlacionado com o número de raízes ($r = 0,85$) e com o comprimento médio de raízes ($r = 0,83$).

Figura 11: Correlação de Pearson entre: número de raízes e comprimento médio de brotações (A) e comprimento médio de raízes e comprimento médio de brotações (B) em explantes de morangueiro 'Jonica' submetidos a diferentes concentrações de silicato de potássio no meio de cultivo *in vitro*.



Fonte: Próprio autor.

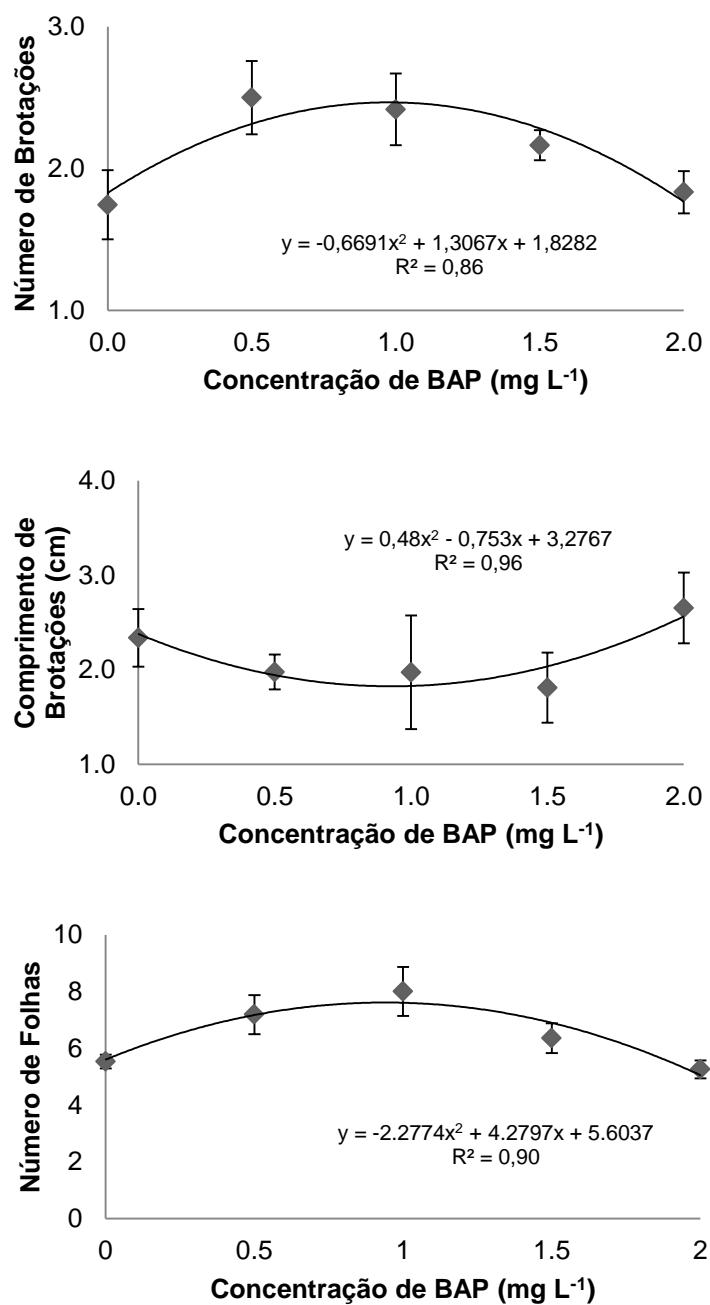
O crescimento de plântulas *in vitro* depende da otimização de meios de cultura que interajam perfeitamente com os componentes essenciais como fonte de carbono, nutrientes minerais e reguladores de crescimento (SOARES et al., 2013). A concentração ideal de silício necessária para o crescimento e desenvolvimento das plantas varia entre diferentes genótipos dentro da mesma espécie e entre espécies de plantas (LIM et al., 2012). Devido à falta de dados sobre a influência do silício na micropropagação de morangueiro torna-se necessário à realização de trabalhos futuros a fim de suprir essa deficiência de informações.

Baseado nos resultados obtidos através deste estudo, não se recomenda a utilização de silicato de potássio para a multiplicação *in vitro* de morangueiro Jonica.

4.5 Experimento 5: Concentrações de BAP

Na Figura 12 verifica-se a análise de regressão polinomial para as variáveis número de brotações, comprimento de brotações e número de folhas de morangueiro em função das concentrações de BAP adicionadas ao meio de cultura.

Figura 12 - Número de brotações, comprimento médio de brotações (cm), e número de folhas de morangueiro 'Jonica' em função da concentração de BAP.



Fonte: Próprio Autor.

A importância do BAP para a regeneração do morangueiro tem sido relatada por diversos autores (ADEL & SAWY, 2007; BISWAS et al. 2007; SAKILA et al. 2007). De acordo com Moreira et al. 2011, o BAP é o regulador de crescimento do grupo das citocininas que apresenta a maior eficiência na micropropagação, além de ser o de menor custo.

A concentração ótima de BAP para a variável número de brotações foi verificada com a utilização de $0,97 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. As respostas encontradas neste estudo foram semelhantes às alcançadas por diversos autores (BISWAS, et al. 2008; MORADI; OTROSHY; AZIMI, 2011), os quais recomendam a utilização de concentrações relativamente baixas de BAP em meio para o cultivo *in vitro* de morangueiro.

A adição de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP ao meio de cultura MS favoreceu o número de brotações de morangueiro italiano 'Pircinque' (2,5) (CAMARGO, 2018). Ashrafuzzaman et al. (2013) analisando diferentes concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* da variedade de morangueiro BARI Strawberry-1, verificaram maior número de brotações (7,0) quando utilizada a concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP no meio de cultura MS. Além do mais, os mesmos autores observaram menores taxas de indução de novas brotações nas concentrações de 0,0 e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. Segundo Grattapaglia e Machado (1998) a diminuição na taxa de multiplicação e no número de brotações por explante com a adição de concentrações elevadas de BAP pode estar ligada ao fato de que as citocininas estimulam a maior produção de partes aéreas até determinada concentração, o que varia de acordo com a espécie e, a partir desta, ocorre efeito tóxico.

Passey et al. (2003) testou a capacidade de regeneração de brotações de sete cultivares de morangueiro e detectou que dois genótipos mostraram uma capacidade limitada. O resultado sugere que há um forte componente genético entre diferentes cultivares que determina a capacidade de regeneração e através disso consegue-se explicar a baixa taxa de multiplicação encontrada para as cultivares italianas de morangueiro.

A concentração ótima para número de folhas foi $0,94 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP. De forma semelhante ao resultado alcançado neste estudo, Ashrafuzzaman et al. (2013) verificaram que o maior número de folhas na multiplicação *in vitro* da variedade de

morangueiro BARI Strawberry-1 foi obtido com 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ de BAP adicionado ao meio de cultivo.

4.6 Experimento 6: Concentrações de BAP + GA₃ + AIB

O efeito da combinação de reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de morangueiro 'Jonica' é apresentado na Tabela 10.

Tabela 10 - Influência de reguladores de crescimento no número de brotações, comprimento de brotações (cm) e número de folhas na multiplicação *in vitro* de morangueiro cv. Jonica.

Tratamentos	Número de Brotações	Comprimento de Brotações (cm)	Número de Folhas
BAP (0,0) + GA ₃ (0,0) + ANA (0,00)	1,2 c*	1,6 c	4,6 b
BAP (0,5) + GA ₃ (0,5) + ANA (0,05)	1,8 bc	1,7 c	4,8 b
BAP (1,0) + GA ₃ (0,5) + ANA (0,05)	1,8 bc	1,9 bc	5,2 b
BAP (0,5) + GA ₃ (1,0) + ANA (0,1)	3,7 a	2,1 a	7,1 a
BAP (1,0) + GA ₃ (1,0) + ANA (0,1)	2,3 b	2,0 ab	6,5 ab
CV (%)	7,70	8,09	8,90

* Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Próprio Autor

O equilíbrio hormonal tem um papel chave na regulação das respostas dos explantes cultivados *in vitro*, sendo que, a interação entre reguladores de crescimento proporcionam às plântulas diversas respostas (GHASEMI et al., 2015). A indução ou a inibição dos processos morfogenéticos *in vitro* dependem do balanço e da interação entre as substâncias de crescimento endógenas e exógenas (MONFORT et al., 2012). Experimentos testando diversas combinações de citocinina com outros reguladores de crescimento são muito comuns para ajustar o meio de cultura.

A sinergia entre citocininas, auxinas e giberelinas foi constatada no presente estudo; houve um aumento de 48% na taxa de multiplicação da cultura comparando-se a combinação de BAP (0,5 mg L⁻¹) + GA₃ (1,0 mg L⁻¹) + ANA (0,1 mg L⁻¹) com a utilização isolada de 0,5 mg L⁻¹ de BAP, que foi a concentração mais satisfatória para número de brotações no experimento anterior. O resultado encontrado foi similar em relação à resposta obtida no estudo de morangueiro italiano Pircinque

cultivado em sistema de biorreatores de imersão temporária cujo maior número de brotações foi de 3,65 (CAMARGO et al., 2017).

Diversos autores descrevem a influência do ácido giberélico na formação de brotações adventícias quando combinados com BAP (SAKILA et al., 2007; BHAT et al., 2012; LIWINCZUK et al., 2009). O número máximo de brotações por explante de morangueiro cv. Senga Sengana (5,8) foi obtido quando o meio de cultura MS foi suplementado com BAP (1,0 mg L⁻¹) + GA₃ (1,0 mg L⁻¹) (BHAT et al., 2016). O papel positivo de auxinas incorporadas no meio de cultura em combinação com citocininas para melhoria na multiplicação têm sido relatado por diversos autores em várias espécies (KONE et al., 2007; SIDDIQUE & ANNIS, 2009; SEGLIE et al., 2012)

Maior comprimento médio de brotações foi favorecido com as seguintes combinações: BAP (0,5 mg L⁻¹) + GA₃ (1,0 mg L⁻¹) + ANA (0,1 mg L⁻¹) e BAP (1,0 mg L⁻¹) + GA₃ (1,0 mg L⁻¹) + ANA (0,1 mg L⁻¹), sugerindo que essas concentrações são ideais para o crescimento da parte aérea de morangueiro 'Jonica' propagado *in vitro*. Neste sentido, quando as mudas produzidas *in vitro* não estão em condições de serem aclimatizadas devido ao seu tamanho reduzido, o cultivo em meio de cultura contendo essas combinações de reguladores de crescimento específicas provocam o alongamento das partes vegetativas e consequentemente um maior número de indivíduos poderá ser aclimatizado diminuindo o tempo de permanência do material vegetal *in vitro*.

Da mesma forma que o comprimento médio de brotações, o número de folhas também foi superior quando utilizadas as seguintes combinações: BAP (0,5 mg L⁻¹) + GA₃ (1,0 mg L⁻¹) + ANA (0,1 mg L⁻¹) e BAP (1,0 mg L⁻¹) + GA₃ (1,0 mg L⁻¹) + ANA (0,1 mg L⁻¹). O número de folhas é importante para o crescimento e desenvolvimento das plantas, desde a realização da fotossíntese, absorção de CO₂ e captação da energia solar (RODRIGUES et al., 2016). Assim, um maior número de folhas é associado a um maior metabolismo, crescimento e desenvolvimento da planta (BENINCASA & LEITE, 2002).

Todas as variáveis analisadas apresentaram graus significativos positivos de associações de acordo com a análise de correlação de Pearson (Tabela 12). A variável que apresentou maior correlação (considerada forte de acordo com a classificação proposta por Devore, 2006) foi número de brotações com o número de folhas ($r = 0,74$).

Tabela 11 - Resultados obtidos para o coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis: número de brotações, comprimento médio de brotações e número de folhas morangueiro 'Jonica' cultivado em meio contendo distintas concentrações e reguladores de crescimento.

Características	Número de Brotações	Comprimento Médio de Brotações	Número de Folhas
Número de Brotações	1		
Comprimento Médio de Brotações	0,53*	1	
Número de Folhas	0,74*	0,47*	1

* significativo à 5% de probabilidade de erro. Fonte: Próprio Autor.

4.7 Experimento 7: Enraizamento *in vitro* com concentrações distintas de BAP e AIB

Quando foram testadas distintas concentrações de BAP e AIB foi possível observar que houve interação entre os fatores estudados para as variáveis número e comprimento médio de raízes (Tabela 13).

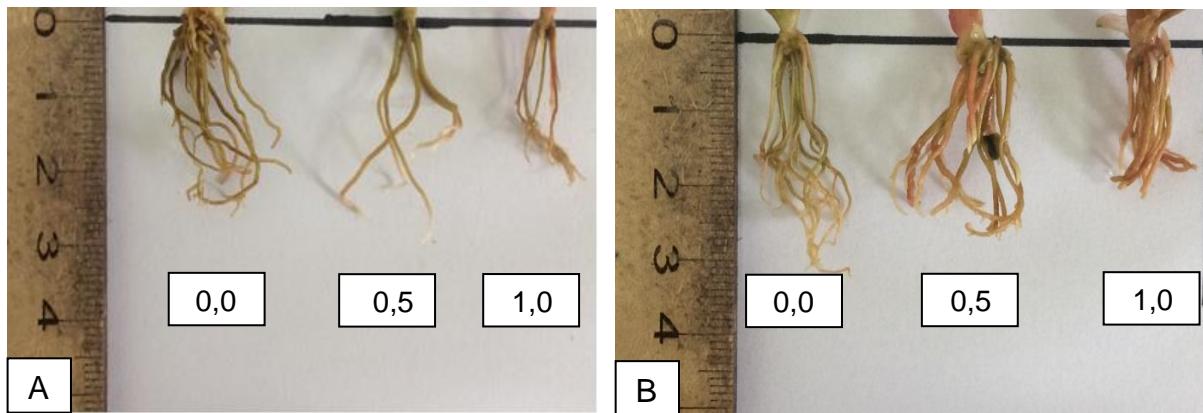
Tabela 12 - Número e comprimento de raízes (cm) em função dos diferentes reguladores de crescimento e das distintas concentrações utilizadas no enraizamento *in vitro* de morangueiro Jonica.

mg L ⁻¹	Número de Raízes		Comprimento Médio de Raiz (cm)	
	BAP	AIB	BAP	AIB
0,0	7,7 Aa	8,0 Aa	2,8 Ab	2,9 Aa
0,5	5,1 Bb	8,9 Aa	3,3 Aa	2,6 Bb
1,0	6,0 Bb	9,2 Aa	2,6 Aa	2,3 Ba
CV (%)	8,93		7,71	

*Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade de erro. Fonte: Próprio Autor.

Os valores mais satisfatórios para a variável número de raízes foram observados na ausência de reguladores de crescimento, bem como, nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ de AIB (Figura 13). Consequentemente, as menores médias para esta variável foram observadas na presença de qualquer uma das concentrações de BAP utilizadas.

Figura 13: Número e Comprimento de Raízes em função da adição de BAP (A) ou AIB (B) em três concentrações (0,0; 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹) no meio de cultura MS para o enraizamento *in vitro* de moranguero ‘Jonica’.



Fonte: Próprio Autor

A indução e formação de raízes *in vitro* é importante para uma aclimatização bem sucedida das plântulas e posterior crescimento no campo, uma vez que as raízes facilitam a absorção de nutrientes e água do solo (XIANSONG, 2010). A indução do enraizamento *in vitro* pode ser mediada pela adição de reguladores de crescimento de plantas ao meio de cultura (RAMA, 2012; GHASEMI et al., 2015).

As concentrações do regulador de crescimento do tipo citocinina tiveram efeito semelhante na fase de enraizamento teve efeito semelhante em ambas as concentrações utilizadas, coincidindo com os resultados encontrados por Quiroz et al. (2017) e Hanhineva; Kokko; Kärenlampi (2005). Esses autores verificaram que um enraizamento *in vitro* de moranguero eficiente foi encontrado em todos os genótipos avaliados quando a citocinina não foi utilizada. As citocininas são utilizadas para a quebra da dominância apical e aumento na taxa de multiplicação (VILLA et al., 2007; ROCHA et al., 2010; SIVPARSAD & GUBBA, 2012), não afetando ou até mesmo diminuindo a formação de raízes.

Em relação ao efeito do AIB no enraizamento *in vitro* de moranguero ‘Sweet Charlie’, Elkichaoui (2014) encontrou piores respostas nos tratamentos em que a auxina foi adicionada no meio de cultura independente da concentração utilizada (0,5; 1,0 ou 1,5 mg.L⁻¹). Concordando com o presente estudo, Quiroz et al. (2017) observaram que em ambos os acessos de *F. chiloensis* analisados, a adição de auxinas não melhorou de forma significativa a formação de raízes em comparação ao meio livre de hormônios. Isso mostra que é possível a produção de mudas sem a adição de auxinas exógenas, reduzindo os custos de produção, visto que esta etapa

representa aproximadamente 35% do custo total da micropropagação (HAZARIKA, 2003).

Jemmali et al. (2002) através de estudo realizado em relação à caracterização hormonal de morangueiro cv. Elsanta, observaram que seis citocininas e duas auxinas foram isoladas e identificadas em brotações axilares. Isto significa que a quantidade de hormônios dentro do tecido vegetal proporciona boas respostas de indução de novas brotações e enraizamento dos explantes, justificando os resultados encontrados no presente estudo, em que não houve diferenças estatísticas entre a adição de AIB e a ausência de reguladores no meio de cultura para o enraizamento *in vitro* de morangueiro 'Jonica'. A eliminação da etapa do enraizamento *in vitro* é desejável do ponto de vista econômico, pois reduz os custos de mão de obra, infraestrutura, espaço da sala de crescimento, energia elétrica e meio de cultura, além de produzir plantas aclimatizadas em menor período (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998), já que é possível aclimatizar as plântulas já a partir da etapa de multiplicação onde foi observado a formação do sistema radicular.

Apesar de apresentar maior número de raízes nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ de AIB, o comprimento de raízes foi menor quando comparado à utilização de BAP ou a não utilização de reguladores de crescimento. A presença de auxina é necessária na fase de indução do sistema radicular, conforme se aumenta a concentração, diminui o comprimento das raízes nos meios com auxinas, podendo ocasionar a inibição completa do crescimento da raiz (SALISBURY & ROOS, 1991).

A Tabela 13 mostra os resultados para as variáveis número de brotações e número de folhas.

Tabela 13: Número de brotações e número de folhas em função dos diferentes reguladores de crescimento e das distintas concentrações utilizadas no enraizamento *in vitro* de morangueiro Jonica.

mg L ⁻¹	Número de Brotações		Número de Folhas	
	BAP	AIB	BAP	AIB
0,0	1,5 Aa	1,1 Bb	6,2 Aa	5,9 Aa
0,5	2,5 Aa	0,66 Ba	5,9 Aa	5,0 Bb
1,0	2,2 Aa	0,16 Bb	5,8 Aa	4,3 Cb
CV (%)	9,01		8,68	

*Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade de erro. Fonte: Próprio Autor.

O BAP é uma citocinina que revela um bom potencial para induzir a regeneração direta da parte aérea de explantes na cultura de tecidos vegetais (GHASEMI et al., 2015). Pode-se observar que a citocinina, por si só, foi efetiva na regeneração de novas brotações. Resultados que concordam com o presente estudo, foram encontrados por Quiroz et al. (2017), onde as cultivares de moranguero chileno 'Purén' e 'Contulmo' apresentaram maior número de brotações com a utilização de citocininas.

No meio de cultura com a presença do AIB a multiplicação ocorreu de forma reduzida visto que as auxinas não são responsáveis pela proliferação de brotações axilares (GRIMALDI et al., 2008).

4.8 Experimento 8: Utilização de diferentes substratos na etapa de aclimatização

Foram constatadas diferenças para as variáveis comprimento da parte aérea (cm), número de folhas, matéria fresca (g), matéria seca (g) e sobrevivência em relação às diferentes formulações de substratos utilizados na etapa de aclimatização das mudas de moranguero 'Jonica' (Tabela 14).

A utilização da formulação do substrato contendo 50% de turfa e 50% de casca de arroz refletiu nos maiores valores de sobrevivência (%), comprimento da parte aérea, número de folhas e matéria fresca (g), enquanto que, o uso da formulação 50% turfa : 50% de casca de arroz e 40% turfa : 60% casca de arroz possibilitou maior valor de matéria seca (g) (Tabela 15).

Tabela 14: Percentual de sobrevivência (%), comprimento da parte aérea (cm), número de folhas, matéria fresca (g) e matéria seca (g) de mudas micropropagadas de moranguero 'Jonica' em diferentes substratos. T=Turfa; C=Casca de Arroz.

Tratamentos	Sobrevivência (%)	Comprimento da Parte Aérea (cm)	Número de Folhas	Matéria Fresca (g)	Matéria Seca (g)
100% T	86,0 b	7,2 c*	7,2 b	5,4 bc	0,71 b
60% T 40% C	86,0 b	6,8 d	7,3 b	4,4 c	0,45 c
50% T 50% C	93,0 a	8,6 a	10,5 a	8,1 a	0,93 a
40% T 60% C	80,0 b	7,9 b	8,5 b	6,0 b	0,76 ab
CV (%)	4,74	1,66	6,61	7,22	11,15

* Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. ^{ns} Não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Fonte: Próprio Autor.

A utilização do substrato contendo 50% de turfa e 50% de casca de arroz possibilitou o maior número de folhas (10,5), característica muito importante que pode estar relacionada com a alta sobrevivência proporcionada por esta mesma composição devido a melhor absorção de energia e com a possibilidade futura de maior crescimento das mudas a campo (SANTOS et al., 2004, MOREIRA et al., 2006).

O maior rendimento de matéria seca verificado com a utilização da formulação 50% turfa : 50% casca de arroz evidencia uma maior partição de carbono para as folhas o que aumenta o índice de área foliar resultando em uma maior interceptação de luz (SANTOS et al., 2015). Essa relação é crucial na adequação fotossintética das plântulas produzidas *in vitro*, visto que as mesmas possuem atividade fotossintética. Porém, quando se deslocam para um ambiente autotrófico são capazes apenas de controlar a transpiração e reduzir as perdas de água quando bem desenvolvidas (DIAS et al., 2014).

Os melhores resultados do substrato contendo 50% de turfa e 50% de casca de arroz (Figura 14) pode ser atribuído ao teor de sílica, que atua como agente antifúngico, bem como, ao aumento da porosidade consequentemente aumentando a disponibilidade de água (BOSA et al., 2003; BRAHM et al., 2013). De acordo com Schmitz et al. (2002), a adição de casca de arroz à turfa reduz o excesso de água, amenizando os problemas com excesso de umidade apresentados por esse material orgânico. Porém, o uso da casca de arroz como substrato deve ser observado com cautela, visto que o aumento na sua proporção favoreceu a redução do comprimento da parte aérea (cm), número de folhas e massa fresca (g), assim como observado por Anjos et al. (2018) na aclimatização de mini-rosa. Rota & Pauletti (2008), avaliando o uso de casca de arroz carbonizada em diferentes misturas com substrato comercial à base de turfa, observaram que a adição de mais de 50% de casca de arroz carbonizada ao substrato eleva muito o valor do pH afetando o desenvolvimento de mudas de *Viola tricolor L.*

Figura 14: Mudas micropropagadas de morangueiro aos 45 dias de aclimatização nos seguintes substratos: A- 100% Turfa; B- 60% Turfa : 40% Casca; C- 50% Turfa : 50% Casca; e D- 40% Turfa e 60% Casca.



Fonte: Próprio Autor

Pode-se observar através das características relacionadas ao sistema radicular das mudas de morangueiro 'Jonica' que o máximo valor para número de raízes foi obtido com a utilização de 50% turfa : 50% casca de arroz e 40% turfa : 60% casca de arroz (Tabela 16). Já a variável comprimento médio de raízes (cm) não diferiu significativamente entre os tratamentos avaliados (Tabela 16).

Tabela 15: Número de raízes e comprimento médio de raízes (cm) de mudas micropropagadas de morangueiro 'Jonica' em diferentes substratos.

Tratamentos	Número de Raízes	Comprimento Médio de Raízes (cm)
100% T	20 b*	7,6 ns
60% T 40% C	20 b	7,5
50% T 50% C	35 a	7,8
40% T 60% C	40 a	7,9
CV (%)	5,33	7,73

* Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. ^{ns} Não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Fonte: Próprio Autor.

Os resultados obtidos a partir do estudo deste estudo trazem vantagens do ponto de vista econômico visto que as melhores respostas foram obtidas com a mistura de dois substratos, cuja composição reduz a quantidade de turfa necessária em 50% do volume final, representando uma economia ao produtor.

5 CONCLUSÕES

Através desta dissertação de mestrado objetivou-se estudar a propagação *in vitro* da cultivar italiana de morangueiro 'Jonica', a qual é protegida e possui registro no Brasil, complementando outros estudos que vêm sendo realizados no país e que buscam avaliar a adaptabilidade deste material genético nas condições brasileiras.

Com base nos distintos experimentos realizados neste estudo, podem ser verificados abaixo os resultados mais satisfatórios encontrados para cada fase de cultivo *in vitro* de morangueiro 'Jonica'.

Estabelecimento *in vitro*

- Inoculação de ápices caulinares em meio de cultivo MS sólido contendo 1 mL L⁻¹ de Plant Preservative Mixture (PPMTM).

Multiplicação *in vitro*

- Combinação dos reguladores de crescimento BAP (0,5 mg L⁻¹) + GA₃ (1,0 mg L⁻¹) + ANA (0,1 mg L⁻¹)
- 30 g L⁻¹ de sacarose
- Ausência de silicato de potássio

Enraizamento *in vitro*

- Meio MS sem reguladores de crescimento

Aclimatização

- Utilização do substrato formulado com 50% de turfa e 50% de casca de arroz

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEL, E.L. & SAWY, M. Somaclonal Variation in Micro-propagated Strawberry Detected at the Molecular Level. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.9, p. 72–725, 2007.
- AHMAD T., ABBASI N.A., HAFIZ I.A., ALI A. (2007). Comparison of sucrose and sorbitol as main carbon energy source in morphogenesis of peach rootstock GF-677. **Pakistan Journal of Botany**, v.39, n.4, p.1264–1275, 2007.
- AL MALKI, A. A. H. S. & ELMEER, K. M. S. Influence of auxin and cytokinine on *in vitro* multiplication of *Ficus anastasia*. **African Journal of Biotechnology**, v.95, p.635-639, 2010.
- ALMEIDA, I. R. et al. **Zoneamento agroclimático para a produção de morango no Rio Grande do Sul**. Embrapa Clima Temperado Documentos, 283. Pelotas, 2009.
- ALMEIDA, L. et al. Produção e qualidade da fruta do morangueiro sob influência da aplicação de boro. **Ciência Rural**, v. 44, n. 4, 2014.
- ALVES, G. A. C. et al. Silicato de cálcio no desenvolvimento *in vitro* de *Cattleya loddigesii* LINDLEY. **Journal of Agronomic Sciences**, v.6, n.1, p.44-52, 2017.
- ANJOS, D. C. et al. Regional Substrates of the Brazilian Northeast on Acclimatization and Development Morphological of Minirose. **Journal of Agricultural Science**, v.10, n.6, 2018.
- ANTUNES, L. E. C.; DUARTE FILHO. 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.; REISSER JÚNIOR, C. Fragole, i prodotti brasiliani mirano all'esportazione in Europa. **Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura**, v.69, p.60-65, 2007.
- ANTUNES, L. E. C.; CARVALHO, G. L.; SANTOS, A. M. **A cultura do morango**. Brasília: Coleção Plantar, 2 ed., 2011.
- ANTUNES, L. E. C.; PERES, N. Strawberry production in Brazil and South America. **International Journal of Fruit Science**, v.13, n.1, p.156-161, 2013.
- ANTUNES, L.E.C.; VIGNOLO, G.K.; GONÇALVES, M.A. Morango mostra tendência de crescimento de mercado. In: Campo & Negócios, **Anuário HF** p.54-57, 2014.
- ASHRAFUZZAMAN, M. et al. Micropropagation of strawberry (*Fragaria ananassa*) through runner culture. **Bangladesh Journal of Agricultural Research**, v.38, n.3, p.467-472, 2013.

- ASMAR, S. A. et al. Fontes de silício sem desenvolvimento de plântulas de bananeira micropropagadas 'Maçã'. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7, p. 1127-1131, 2011.
- 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.
- BARUZZI, G. et al. Updates on Italian strawberry breeding programs coordinated by CREA-FRF. **Acta Horticulturae**, v. 1156, n. 1, p. 179-184, 2017.
- BASSAN, J. S. et al. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (SPRENG.) TAUB.). **Ciência Florestal**, v. 16, n. 4, p. 381-390. 2006.
- BENINCASA, M. M. P. & LEITE I. C. Fisiologia vegetal. Jaboticabal: Funep, 2002. 168 p.
- BESSON, J. C. F. et al. Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento 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.; KEHOE, E.; MACSIURTA, M.; HUNTER, A. Effect of different transplanting dates and runner types on quality and yield of 'Elsanta' strawberry. **Acta Horticulturae** v. 926, p. 483-489, 2012.
- BHATT, I. D.; DHAR, U. Micropropagation of Indian wild strawberry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 60, p.83–88, 2000.
- BHAT, R. P. et al. Effect of plant growth regulators on establishment and growth of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) var. Chandler *in vitro*. **Agriculture Science Research Journals**, v.2, n.12, 623-632, 2012.
- BHATT, K. M. et al. Micropropagation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. Senga Sengana. **Environment & Ecology**, v.34, p.1292-1296, 2016.
- BISWAS, M.K. et al. Multiple Shoots Regeneration of Strawberry under Various Colour Illuminations. **American-Eurasian Journal of Scientific Research**, v.2, p.133-135, 2007.
- BISWAS, M. K.; ISLAM, R.; HOSSAN, M. Micropropagation and field evaluation of strawberry in Bangladesh. **Journal of Agricultural Technology**, v.4, n.1, p.167-182, 2008.

- BORGATTO, F. et al. Calcium, potassium and magnesium treatment of *Chrysanthemum morifolium* cv. “bi time” and callogenesis *in vitro*. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 4, p. 689-693, 2002.
- BOSA, et al. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de gipsofila. **Horticultura Brasileira**, v.21, n.2, p.207-210, 2003.
- 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.
- BRASIL. Instrução normativa nº22, de 22 de agosto de 2012. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Brasília/DF, ago 2012.
- BUCCI, A.; FAEDI, W.; BARUZZI, G. La Fragola: orige ed evoluzione. In. ANGELENI, R. (coord.); FAEDI, W. (coor.; org.). **La Fragola**. Bologna: Script, 2010, p. 1-11.
- CALDAS, L. S. et al. **Meios Nutritivos**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Eds.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. v.1. Brasília: Embrapa CENARGEN, p.87-132, 1998.
- CALVETE, E. O. et al. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 2, p.186-191, 2002.
- CAMARGO, S. da S.; Avanços no sistema de micropropagação de cultivar italiana de morangueiro ‘Pircinque’, recentemente registrada e protegida no Brasil. 2018. 154 f. **Tese** (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2018.
- CARVALHO, A. C. P. P. de; JESUS, A. A. de; SANTOS, E. de O. **Produção de Mudas Micropropagadas de Bananeira**. Circular Técnica. Embrapa, Fortaleza, 2012.
- CASSELLS, A. C. & CURRY, R. F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.64, p. 145–157, 2001.
- CHAPMAN, J. S. Biocide resistance mechanisms. **International Biodeterioration & Biodegradations**, v.51, p.133–138, 2003.
- CLAPA, D.; FIRA, A.; JOSHEE, N. An efficient *ex vitro* acclimatization method for horticultural plants using float hidroculture. **HortScience**, v.48, n.9, p.1159-1167, 2013.

COCCO, C. et al. Effects of site and genotype on strawberry fruits quality traits and bioactive compounds. **Journal of Berry Research**, Amsterdam, v.5, p.145-155, 2015.

COLOMBO, R. C. et al. Response of *Cattleya forbesii* orchid to increasing silicon concentrations *in vitro*. **Revista Caatinga**, v.29, p.18-24, 2016.

COSTA, A. F.; ROSSI, D. A.; LEAL, N. R. Origem, Evolução e o Melhoramento do Moranguero. In: ZAWADNEAK, M. A. C.; SCHUBER, J. M.; MÓGOR, A. F. **Como produzir morangos**. Curitiba: UFPR, 2014. p.15-68.

COUTO, M. et al. Efeito de diferentes substratos durante a aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto mirabolano 29C (*Prunus cerasifera* EHRH.) em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 29, p. 125-128, 2003.

COUTO, J. M. F. et al. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de Mogno (*Swietenia macrophylla* King). **Revista Árvore**, v. 28, n.5, p. 633-642. 2004.

DEBERGH, P. C.; READ, P. E. **Micropropagation**. In: Micropropagation technology and application. (Org) DEBERGH, P. C.; READ, P. E. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 1-13, 1991.

DE KLERK, G .J .M. & CALAMAR, A. Effect of sucrose on adventitious root regeneration in apple. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v.70, p.207-212, 2002.

DIAS, M. S. C. et al. **Produção de morangos em regiões não tradicionais**. Informe agropecuário, Belo Horizonte – MG, v.28, n.236, p.24-33, 2007.

DIAS, M. S. C. et al. Cultivares. **Informe Agropecuário**, v. 35, n. 279, p.39-47, 2014.

DIAS, G. M. G. et al. Photosynthesis and leaf anatomy of *Anthurium* cv. Rubi plantlets cultured *in vitro* under different silicon (Si) concentrations. **Australian Journal of Crop Science**, v.8, p.1160-1167, 2014.

DIEL, M. I. et al. Yield and Quality Performance of Italian and American Strawberry Genotypes in Brazil. **Journal of Agricultural Science**, v.10, n.2, p.139-147, 2017.

DURNER, E. F. Photoperiod affects floral ontogeny in strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) plug plants. **Scientia Horticulturae**, v. 1, p.154–159, 2015.

DUTRA, L. F. et al. **Introdução ao cultivo *in vitro* de Erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**. Boletim de Pesquisa. Embrapa Florestas, Colombo, 2008.

DUTRA, L. F. et al. **Protocolo de micropropagação em cana-de-açúcar**. Circular Técnica. Embrapa, Pelotas, 2011.

DUTRA, L. F. et al. **Protocolos de Micropopulação de Plantas IV – Morangueiro**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2012. 20 p. (Embrapa Clima Temperado. Sistema de Produção).

ELKICHAOUI, A. Y. In Vitro, Propagation of Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) Through Organogenesis via Runner Tips. **Annals of Plant Sciences**, v.3, n.3, p.619-627, 2014.

EPPO. European and Mediterranean Plant Protection Organization. Certification schemes for strawberry. Paris: EPPO, 11 p. 2008.

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.

FAGHERAZZI, A. F. Avaliação de cultivares de morangueiro no Planalto Sul Catarinense. 2013.105 f. **Dissertação** (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC, 2013.

FAGHERAZZI, A. F. et al. La fragolicoltura brasiliana guarda avanti. **Frutticoltura**, n. 6. p.20-24, 2014.

FAGHERAZZI, A. F. Adaptabilidade de novas cultivares e seleções de morangueiro para o Planalto Sul Catarinense. 2017. 147 f. **Tese** (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC, 2017.

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

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

FERMINO, M. H. et al. Aproveitamento dos resíduos da produção de conserva de palmito como substrato para plantas. **Horticultura Brasileira**, v.28, n.3, p.282-286, 2010.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3. ed. rev. Viçosa. 421 p. 2007.

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.

GEORGE, M. W. & TRIPEPI, R. Plant Preservative Mixture™ Can Affect Shoot Regeneration from Leaf Explants of Chrysanthemum, European Birch, and Rhododendron. **HortScience**, v.36, n.4, p.768-769, 2001.

- GEORGE, E. F. Plant tissue culture procedure - Background. In: GEORGE, E.F. et al. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Dordrecht : Springer, 2008. v.1, p.1-28.
- GIMÉNEZ, G. et al. Cultivo sem solo do morangueiro. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p. 273-279, 2008.
- GIRI, C. C.; SHYAMKUMAR, B.; ANJANEYULU, C. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. **Trees**, n. 18, p. 115-135. 2004.
- GHASEMI, Y. et al. Adventitious shoot and root regeneration of wild strawberry (*F. viridis* Duch.) by means of tissue culture medium optimization. **Biological Forum – An International Journal**, v.7, n.2, p.436-441, 2015.
- GOMES, F. B. et al. Uso de silício como indutor de resistência em batata a *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera:Aphididae). **Neotropical Entomology**, v.37, p.185-190, 2008.
- GOMIDE, D. G. Influência do número de subcultivos na multiplicação in vitro e na aclimatização de plantas micropagadas de morangueiro. 2004. 93 f. **Dissertação** (Mestrado Agronomia/Produção Vegetal) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2004.
- GONÇALVES, M. A.; MALTONI, M. L.; COCCO, C. Novas opções de morango italianas podem ampliar base genética do plantio no Brasil. **Revista Cultivar**, v.88, p.19-21, 2014.
- GONÇALVES, M. A. Produção de mudas de morangueiro e comportamento a campo. 2015. 153 f. **Tese** (Doutorado em Fruticultura de Clima Temperado) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.
- GONZÁLEZ-OLMEDO, J. L. et al. New contributions to propagation of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). **In Vitro Celular & Developmental Biology Plant**. v. 47, p. 87- 90, 2005.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: ABCTP/ 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.
- GUIMARÃES, A. G. et al. Potencial produtivo de cultivares de morangueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.37, n.1, p.112-120, 2015.

HADDADI, F. et al. Micropropagation of strawberry cultivar Camarosa : Prolific shoot regeneration from in vitro shoot tip using Thidiazuron with N6-benzylaminopurine. **Hortscience**, v.45, p.453-56, 2010.

HANCOCK, J. F.; SJULIN, T. M.; LOBOS, G. A. Strawberries. In: HANCOCK, J. F. (Ed). **Temperate fruit crop breeding**. New York: Springer, 2008. p.455.

HANHINEVA K.; KOKKO, H.; KÄRENLAMPI, S. Shoot regeneration from leaf explants of five strawberry (*Fragaria × ananassa*) cultivars in temporary immersion bioreactor system. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**. v.41, p.826–831, 2005.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue – cultured plants. **Current Science**, v. 85, n.12, p.1704-1712, 2003.

ILLG, R. D. **Variação somaclonal**. In: Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. (Org) TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. Brasília: ABCTP / Embrapa – CNPH, p. 287– 295, 1990.

JEMMALI, A. et al. Morphological and hormonal characterisation of strawberry vitroplants raised through axillary or stipular adventitious shooting. **Plant Growth Regulation**, v.38, p.273-278, 2002.

JUNGHANS, T. G. et al. **Redução de custos na micropopragação**. In: JUGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. (eds.) Aspectos práticos da micropopragação de plantas. Cruz das Almas: Embrapa MFT, p.153-175, 2009.

KHANIZADEH, S. et al. Horticultural characteristics and chemical composition of advanced raspberry lines from Quebec and Ontario. **Lwt - Food science and technology**, v.42, n.4, p. 893–898, 2009.

KLEIN, C. Utilização de substratos alternativos para produção de mudas. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 4, p.43-63, 2015.

KONE, M. et al. *In vitro* morphogenesis from cotyledon and epicotyl explants and flow cytometry distinction between landraces of *Bambara groundnut* (*Vigna subterranea* (L.) Verdc), an under-utilised grain legume. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v.88, p.61–75, 2007.

LAL, M.; SHARMA, S.; HEGDE, M. V. Micropropagation of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch). **Indian Journal of Horticultural Research**, v.37, n.3, p.231-234, 2003.

LEMOS E. E. P. et al. Micropopragação de clones de banana cv. Terra em biorreatore de imersão temporária. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, p.482-487, 2001.

LISTON, A.; RICHARD, C.; TIA-LYNN, A. *Fragaria*: a genus with deep historical roots and ripe for evolutionary and ecological insights. **American Journal of Botany**, v.101, n.10, p.1686-1699, 2014.

LITWINCZUK, W. et al. Development of *in vitro* shoot cultures of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) “Senga Sengana” and “Elsanta” under the influence of high doses of gibberellic acid. **Folia Horticulture Turae**, v.21, n.2, p.43-52, 2009.

LUNA, C. et al. Endophytic bacteria from *Ilex paraguariensis* shoot cultures: localization, characterization, and response to isothiazolone biocides. **In Vitro Cell Development Biology**, v.49, p.326–332, 2013.

MALAVOLTA, E. et al. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Potafos, 1997. 319 p.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2006. 638p.

MEDEIROS, D. S. Taxa de multiplicação de mudas Micropropagadas de bananeira cv. Grande naine E cv. Prata catarina influenciada pela fase de Estabelecimento de cultura. 2015. 119 f. **Dissertação** (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

MOHASSEB et al. Effect of different concentrations of sucrose in culture media of strawberry. **International Journal of Academic Research**, v.6, n.4, p.262-270, 2014.

MONFORT, L. E. F. et al. Efeito do BAP no cultivo *in vitro* de *Ocimum selloi* Benth. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.14, n.3, p.458-63, 2012.

MORADI, K.; OTROSHY, M.; AZIMI, M. R. Micropropagation of strawberry by multiple shoots regeneration tissue cultures. **Journal of Agricultural Technology**, v.7, p.1755-1763, 2011.

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.

MOREIRA, M. A. et al. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n.5, p.875-879, 2006.

MOREIRA, C.M. et al. Indução de brotação *in vitro* em curauá: sistema de cultivo e concentrações de BAP. **Horticultura brasileira**, v. 29, n. 2, 2011.

MORFEINE, E. A. Effect of Sucrose and Glucose Concentrations on Micropropagation of *Musa* sp. cv. Grand Naine. **Journal Of Applied And Industrial Sciences**, v. 2, n. 2, p.58-62, 2014.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v.25, p.135 – 66, 1974.
- OLIVEIRA, R. P. et al. Produção de Matrizes de Morangueiro por meio de Cultura de Tecidos. **Sistema de Produção**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005.
- 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. **Otimização da produção nacional de mudas de morangueiro**. Embrapa Clima Temperado. Documentos, 162. Pelotas, 2006.
- 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, F. F. M. et al. Micropropagação de *Mimosa caesalpiniæfolia* Benth. a partir de segmentos nodais e ápices caulinares. **Revista Caatinga**, v.20, n.3, p.151-9, 2007.
- 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. et al. Produção de cultivares de morango, utilizando túnel baixo em Pelotas. **Revista Ceres**, v. 58, n.5, p.625-631, 2011.
- OLIVEIRA, A. C. B.; BONOW, S. **Novos desafios para o melhoramento genético da cultura do morangueiro no Brasil**. Informe Agropecuário, Pelotas/RS, v. 33, n. 268, p. 21-26, 2012.
- ORLIKOWSKA, T. et al. Influence of the biocides PPM™ and Vitrofural on bacteria isolated from contaminated plant tissue cultures and on plant microshoots grown on various media. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.87, n.3, p.223-230, 2015.
- ORLIKOWSKA, T. et al. Bacteria in the plant tissue culture environment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.128, p.487-508, 2016.
- PALHA, M. da G. 2005. A planta do Morangueiro. In: **Manual do Morangueiro**, 1 ed. Portugal, 2005, cap. 2.

PALLEI, S. et al. Callus Induction and Indirect Regeneration of Strawberry (*Fragaria x Ananassa*) Duch. Cv. Chandler. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.6, n.11, p.1311-1318, 2017.

PAASEI, A. J.; BARRET, K. J.; JAMES, D. J. Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch.) using a range of explant types. **Plant Cell Reports**, v.21, p.497-401, 2003.

PASQUAL, M. et al. Influência da qualidade de luz e silício no crescimento in vitro de orquídeas nativas e híbridas. **Horticultura Brasileira**. v.29, p.324–329, 2011.

PÉREZ, A. et al. Effect of Sucrose, Inorganic Salts, Inositol, and Thiamine on Protease Excretion during Pineapple Culture in Temporary Immersion Bioreactors. **In vitro cellular & Developmental Biology Plant**, v.40, n.3, p.311-316, 2004.

PILLON, C. N. Prefácio. In: VIZZOTO, M. et al. (Orgs). **Palestras e resumos: VI Simpósio Nacional do Morango; V Encontro Sobre Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul**. Brasília: Embrapa, 2012, p. 5.

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.

QUIROZ, K. A. et al. Meristem culture and subsequent micropropagation of Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis* (L.) Duch.). **Biological Research**, v.50, p.1-11, 2017.

RAMA, B. P. et al. Effect of plant growth regulators on establishment and growth of strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) var. Chandler *in vitro*. **Agricultural Science Research Journal**, v. 2, n.12, p.623-632, 2012.

RATTANPAL, H. S.; GILL, M.; SANGWAN, A. Micropropagation of strawberry through meristem culture. **Acta Horticulturae**. v.890, p.149-153, 2011.

RESMI, L.; NAIR, A. S. Differential effect of cytokinins in the micropropagation of diploid and triploid *Musa* cultivars. **International Journal of Integrative Biology**, v. 11, n.1, p. 35-38, 2011.

RIHAN, H. Z. et al. The effect of using PPM (plant preservative mixture) on the development of cauliflower microshoots and the quality of artificial see produced. **Scientia Horticulturae**, v.141, p.47–52, 2012.

RODRIGUES D. B. et al.. Growth regulators and substrates for *Oncidium baueri* Lindl. Micropropagation. **Semina**, v.37, p.2901-2910, 2016

ROCHA, M. A. C. et al. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de genótipos de jenipapeiro (*Genipa americana* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 3,

p.769-774, 2008.

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

RONQUE, E. R. V. **A cultura do moranguero**. Curitiba: Emater, 1998. 206p.

ROTA, L. D., & PAULETTI, G. F. Efeito da adição de casca de arroz em substrato comercial a base de turfa na produção de mudas de *Viola tricolor* L. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.14, n.3-4, p.45-48, 2008.

RUAN, J.; LEE, Y.H.; YEOUNG, Y.R. Flowring and Fruiting of Day-neutral and Everbearing 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.

SAKILA, S. et al. Micropropagation of Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) a newly introduced crop in Bangladesh. **American-Eurasian Journal of Scientific Research**, v.2, p.151-154, 2007.

SALISBURY, F. B. & ROOS, C.W. **Plant Physiology**. Wadsworth, California: 1991. cap.17, p.357-378.

SANHUEZA, R. M. V. et al. Sistema de produção de morango para mesa na região da serra gaúcha e encosta superior do nordeste. **Informe Agropecuário**. 2005

SANTOS, J. A. et al. Efeito do calcário dolomítico e nitrato de potássio no desenvolvimento inicial de mudas da bananeira 'Prata-Anã' (AAB), provenientes de cultura *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, n.1, p.150-154, 2004.

SANTOS, A. M. D.; MEDEIROS, A. R. M. D.; WREGE. **Irrigação e fertirrigação**. Sistema de Produção do Morango. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005. (Embrapa Clima Temperado. Sistemas de Produção).

SANTOS, L. A. et al. Crescimento, índices fisiológicos e produtividade de cultivares de feijoeiro sob diferentes níveis de adubação. **Revista Ceres**, v.62, n.1, p.107-116, (2015).

SCHMITZ, J. A. K. et al. Propriedades químicas e físicas de substratos de origem mineral e orgânica para o cultivo de mudas em recipientes. **Ciência Rural**, v.32, n.6, p.937-944, 2002.

SCHUCH, M.W.; ERIG, A.C. Micropropagação de Plantas Frutíferas. In: FACHINELLO, J.C., HOFFMANN, A., NACHTIGAL, J.C. **Propagação de Plantas Frutíferas**. Brasília: Embrapa – SPI / Embrapa – CNPH, 2005. Cap.8, p.155-174.

- SEGLIE, L. et al. In vitro seed germination and seedling propagation in *Campanula* spp. **Plant Biosyst**, v.146, p.15–23, 2012.
- SHREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J. Substrato na aclimatização de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen produzida *in vitro* sob diferentes doses de sacarose. **Ciência Rural**, v. 36, p.1416-1423, 2006.
- SIDDIQUE, I. & ANIS, M. Direct plant regeneration from nodal explants of *Balanites aegyptiaca* L. (Del.): A valuable medicinal tree. **New Forests**, v.37, p.53–62, 2009.
- SILVA, A. F.; DIAS, M. S. C.; MARO, L. A. C. **Botânica e fisiologia do moranguinho**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte-MG, v. 28, n. 236, p. 7-13, 2007.
- SILVEIRA, S. S. et al. Micropropagation of *Calophyllum brasiliense* (Cambess.) from nodal segments. **Brazilian Journal of Biology**, v.76, n.3, p.656-663, 2016.
- SIVANESAN, I.; PARK, S. W. The role of silicon in plant tissue culture. **Frontiers in Plant Science**, v.5, p.1-4, 2014.
- SOARES, J. D. R. et al. Adubação com silício via foliar na aclimatização de um híbrido de orquídea. **Ciênc. Agrotec**, v. 32, n. 2, p. 626-629, 2008.
- SOARES, J. D. R et al. Concentrações de silício e GA₃ na propagação *in vitro* de orquídea em condição de luz natural. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.12, p.286-292, 2013.
- STEINER, N. et al. *Araucaria angustifolia* Biotechnology. **Functional Plant Science and Biotechnology**, v.2, n.1, p.20-28, 2008.
- 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.
- SWAMY, M. K. et al. Effect of different carbon sources on *in vitro* morphogenetic response of Patchouli (*Pogostemon cablin* benth). **Journal of Phytology**, v.8, p.11-17, 2010.
- TAKAHASHI, E. **Uptake mode and physiological functions of silica**. In: Matsuo T, Kumazawa K, Ishii R, Ishihara K & Hirata H (Eds.) Science of the rice plant. Tokyo, Food and Agriculture Policy Research Center, p.420-433, 1995.
- THORPE, T. A. Carbohydrate utilization and metabolism. In: **Tissue Culture in Forestry**. Eds: J.M. Bonga and D.J. Durzan, The Hague, p. 325-368, 1982.
- THORPE, T. et al. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects and support systems. In: GEORGE, E.F. et al. **Plant propagation by tissue culture**. 3.ed. Netherland: Springer, 2008. V.1, 501p.

- 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.
- VERDIAL, M. F. et al. Fisiologia de mudas de morangueiro produzidas em sistema convencional e em vasos suspensos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 524-531, 2009.
- XIANSONG, Y. Rapid production of virus-free plantlets by shoot tip culture *in vitro* of purple-coloured sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). **Pak. J. Biol**, v.42, n.3, p.2069-2075, 2010.
- WAAFA, A. F. & WAHDAN, H. M. Influence of substrates on in vitro rooting and acclimatization of micropropagated strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Middle East Journal of Agriculture Research**, v.6, p.682-691, 2017.
- ZHOU, T. S. The detection of the accumulation of silicon in *Phalaenopsis* (Orchidaceae). **Annals of Botany**, London, v.75, n.6, p.605-607, 1995.
- ZOBAYER, N. et al. Study of shoot multiplication of strawberry (*Fragaria ananassa*). **Int. J. Agril. Res. Innov. & Tech**, v.1, p.69-72, 2011.

7 ANEXOS

ANEXO A – Certificado de Registro da Cultivar Jonica, a partir de cadastro junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Lages, UDESC.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Google Chrome
sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/detalhe_cultivar.php?codsr=35317

CultivarWeb

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

CULTIVAR:	Jonica
NOME COMUM:	Morango
NOME CIENTÍFICO:	Fragaria ×ananassa Duchesne ex Rozier
SITUAÇÃO:	REGISTRADA
Nº REGISTRO:	35356
DATA DO REGISTRO:	23/03/2016
MANTENEDOR (REQUERENTE):	UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA- UDESC ENDERECO: AV. LUIZ DE CAMÕES, 2090 CEP: 88520-00 - LAGES - SC FONE: (49) 2101-9100
DESCRITORES	RELATÓRIO DE DESCRIPTORES

ANEXO B – Composição do meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), Lages.

Macronutrientes [] 100x – utilizar 10 mL.L ⁻¹	Concentração Final (mg L ⁻¹)	Solução Estoque (g L ⁻¹)
Solução A – NH ₄ NO ₃	1650	165
Solução B – KNO ₃	1900	190
Solução C – CaCl ₂ .7H ₂ O	440	44
Solução G – MgSO ₄ .7H ₂ O	370	37
Solução H – KH ₂ PO ₄	170	17

Micronutrientes [] 100x – utilizar 10 mL.L ⁻¹	Concentração Final (mg L ⁻¹)	Solução Estoque (g L ⁻¹)
Solução D – MnSO ₄ . H ₂ O	22,3	2,23
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	0,86
H ₃ BO ₃	6,2	0,62
KI	0,83	0,083
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,0025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,0025

Vitaminas [] 100x – utilizar 10 mL.L ⁻¹	Concentração Final (mg L ⁻¹)	Solução Estoque (g L ⁻¹)
Solução E – Glicina	2	0,2
Ácido Nicotínico	0,5	0,05
Piridoxina	0,5	0,05
Tiamina	0,1	0,01

FeEDTA [] 100x – utilizar 10 mL.L ⁻¹	Concentração Final (mg L ⁻¹)	Solução Estoque (g L ⁻¹)
Solução F – FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	2,78
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3	3,73