

**RÚBIA DE SOUZA**

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO*, MICROPROPAGAÇÃO E VARIAÇÃO  
SOMACLONAL DE LÚPULO (*Humulus lupulus* L.)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em  
Produção Vegetal, na Universidade do Estado de Santa  
Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau  
de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Dr. Jefferson Luís Meirelles Coimbra  
Coorientador: Dr. Adriano Michel

**LAGES, SC  
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC**

de Souza, Rúbia

Estabelecimento in vitro, micropropagação e variação  
somaclonal de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) / Rúbia de Souza. --  
2020.

80 p.

Orientador: Jefferson Luís Meirelles Coimbra

Coorientador: Adriano Michel

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de  
Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2020.

1. Genótipos. 2. Lúpulo. 3. Cultura de tecidos. 4.  
Micropropagação. I. Luís Meirelles Coimbra, Jefferson. II. Michel,  
Adriano. III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de  
Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em  
Produção Vegetal. IV. Título.

**RÚBIA DE SOUZA**

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO*, MICROPROPAGAÇÃO E VARIAÇÃO  
SOMACLONAL DE LÚPULO (*Humulus lupulus* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal pela Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Produção Vegetal.

**Banca Examinadora:**

Orientador: \_\_\_\_\_

Dr. Jefferson Luís Meirelles Coimbra  
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC/Lages)

Membro: \_\_\_\_\_

Dr. Altamir Frederico Guidolin  
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC/Lages)

Membro: \_\_\_\_\_

Prof. Dra. Patrícia Maria Oliveira Pierre Castro  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC/Curitibanos)

**Lages, 21 de fevereiro de 2020**



Dedico a minha família, em especial aos meus pais João Celso e Marlene, que não mediram esforços para que eu chegasse até aqui.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado força e saúde, para que seguisse sempre em frente.

Aos meus queridos e amados pais, João Celso e Marlene. Sou eternamente grata a vocês por todo amor e compreensão, por serem meus primeiros e melhores professores. Por me ensinarem o sentido da vida, e a valorizar cada pequena conquista, vocês são meus pilares.

As minhas irmãs, Daiane e Andressa, agradeço por toda compreensão nos momentos de ausência, por sempre me apoiarem e me incentivarem. A minha pequenina sobrinha Valentina, por encher meu coração de alegria e mostrar que as coisas podem ser tão simples.

Ao meu namorado, Andrei Emanuel, por ser o meu maior incentivador, e que mesmo distante sempre esteve ao meu lado. Obrigada por tudo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jefferson Luís Meirelles Coimbra, por acreditar em mim e me proporcionar a oportunidade de ser sua orientada. Sou imensamente grata por todos os ensinamentos transmitidos, pela paciência e dedicação em ensinar durante o Mestrado.

Ao Prof. Dr. Altamir Frederico Guidolin, por todo o auxílio e incentivo durante a execução do meu trabalho. Obrigada pela paciência, dedicação, amizade e por sempre me ajudar a encontrar a luz no fim do túnel.

Ao coorientador, Prof. Dr. Adriano Michel, por todos os ensinamentos transmitidos durante minha passagem pelo Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética Vegetal do IFRS – Campus Sertão, que foram cruciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas de Laboratório, cujo convívio alegrava ainda mais meus dias, e em especial as minhas amigas Cristiane e Rita, minhas companheiras de chimarrão e que muito me ajudaram nesses dois anos de Mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade do Estado de Santa Catarina, por ter concedido a oportunidade de cursar o Mestrado e desenvolver este trabalho.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem fazer parte desse trabalho e contribuir com os seus conhecimentos.

A CAPES pelo apoio financeiro durante a realização dessa pesquisa.

Enfim, a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.





“ Há apenas uma maneira de  
evitar críticas: não falar, não  
fazer e não ser nada. ”  
Aristóteles



## RESUMO

O lúpulo é uma espécie de cultivo recente no Brasil. É uma planta herbácea, dioica e de propagação assexuada. Os jardins de lúpulo são implantados com plantas femininas, pois são elas que dão origem aos cones, que traz em seu interior um composto chamado lupulina. Os cones são utilizados principalmente na fabricação de cervejas, conferindo a bebida sabor e aroma característico, proporcionando também maior estabilidade à espuma. Seu cultivo no território brasileiro vem sendo fomentado, com o objetivo de tornar o Brasil autossuficiente na produção de lúpulo, visto que praticamente todo o lúpulo utilizado na indústria cervejeira é proveniente de importações (3,5 mil toneladas/ano). A implantação de um jardim de lúpulo requer mudas vigorosas e de alta qualidade fitossanitária, e a cultura de tecidos nos possibilita isso, além de produzir mudas em grande quantidade, em pequeno espaço físico e durante todas as estações do ano. Portanto, a definição de um protocolo de meio de cultura para o estabelecimento de lúpulo *in vitro* para distintos genótipos, e o estudo do efeito de subcultivos em causar variação somaclonal em lúpulo são de extrema importância. Neste sentido, o trabalho foi dividido em dois capítulos, onde os objetivos foram: *i*) caracterizar as respostas de diferentes genótipos sob diferentes reguladores de crescimento e estudar o inter-relacionamento de variáveis-resposta de importância no crescimento *in vitro* de lúpulo; *ii*) verificar e caracterizar a ocorrência de variação somaclonal no processo de multiplicação *in vitro* de genótipos de lúpulo. Os experimentos foram realizados na Universidade do Estado de Santa Catarina (Udesc), no laboratório de cultura de tecidos do Instituto de Melhoramento e Genética Molecular (Imagem). O primeiro experimento foi conduzido utilizando delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 6x3 (seis meios de cultura e três genótipos), sendo o meio de cultura utilizado como base o MS acrescido de combinações de reguladores de crescimento (BAP: 1,0 mg L<sup>-1</sup>; AIA: 0,02 mg L<sup>-1</sup>; GA<sub>3</sub>: 0,1 mg L<sup>-1</sup>). As variáveis-respostas avaliadas foram comprimento radicular (cm), altura de brotos (cm), número de brotos e número de segmentos nodais. O segundo experimento foi conduzido em delineamento de blocos ao acaso, com quatro repetições, em esquema fatorial 5x3 (cinco subcultivos e três genótipos). Em cada unidade experimental foram tomadas amostras de 5 plantas. As variáveis-resposta foram selecionadas pelo método de seleção de modelos *Stepwise*, e dessa forma as variáveis selecionadas foram: altura de broto no momento da aclimação (cm), altura de broto após a aclimação (cm), maior espaço entrenó (cm), área foliar (cm<sup>2</sup>) e massa fresca da parte aérea (mg). Para ambos os experimentos os genótipos avaliados foram Chinook, Columbus e HallertauerM. Os dados foram avaliados considerando sua natureza (laboratoriais, biológicos), dessa forma propomos uma forma de analisar os dados e extrair resultados precisos. Os genótipos Chinook e Columbus tiveram melhor desenvolvimento radicular quando cultivados em meio de cultura contendo a combinação de BAP + AIA, enquanto que para as variáveis número de segmentos nodais e altura de broto, o melhor desempenho para ambos os genótipos, se deu em meio de cultura contendo apenas AIA. Enquanto que o genótipo HallertauerM não teve seu desenvolvimento favorecido de maneira significativa em nenhum dos meios de cultura estudados. O comportamento similar entre os genótipos Chinook e Columbus, pode ser explicado pela origem dos mesmos, ambos americanos. Verificou-se a ocorrência de variação somaclonal para o genótipo Chinook durante os cinco subcultivos. Para o genótipo Columbus a variação foi detectada apenas em R<sub>2</sub>, indicando que o genótipo recuperou e manteve sua estabilidade fenotípica. Enquanto que o genótipo HallertauerM manteve sua estabilidade fenotípica ao longo de cinco subcultivos.

**Palavras-chave:** Genótipos. Lúpulo. Cultura de tecidos. Micropropagação.



## ABSTRACT

Hops are a species of recent cultivation in Brazil. It is a herbaceous, dioecious and asexual propagation plant. Hop gardens are implanted with female plants, as they give rise to the cones, which contain a compound called lupulin. The cones are used mainly in the manufacture of beers, giving the drink a characteristic flavor and aroma, also providing greater stability to the foam. Its cultivation in the Brazilian territory has been promoted, with the objective of making Brazil self-sufficient in the production of hops, since practically all the hops used in the beer industry come from imports (3,5 tonnes/year). The implementation of a hops garden requires vigorous seedlings of high phytosanitary quality, and the culture of fabrics allows us to do this, in addition to producing seedlings in large quantities, in a small physical space and during all seasons of the year. Therefore, the definition of a culture medium protocol for the establishment of hops *in vitro* for different genotypes, and the study of the effect of subcultures in causing somaclonal variation in hops are extremely important. In this sense, the work was divided into two chapters, where the objectives were: *i*) to characterize the responses from different genotypes under different growth regulators through the interrelationship of response variables important to *in vitro* hop growth; *ii*) verify and characterize the occurrence of somaclonal variation in the *in vitro* multiplication process of hop genotypes. The experiments were carried out at the State University of Santa Catarina (Udesc), in the tissue culture laboratory of the Institute of Improvement and Molecular Genetics (Imegem). The first experiment was conducted using a completely randomized design, in a 6x3 factorial scheme (six culture media and three genotypes), with the culture medium being used as the basis of MS plus combinations of growth regulators (BAP: 1,0 mg L<sup>-1</sup>; AIA: 0,02 mg L<sup>-1</sup>; GA3: 0,1 mg L<sup>-1</sup>). The response variables evaluated were root length (cm), shoot height (cm), number of shoots and number of nodal segments. The second experiment was conducted in a randomized block design, with four replications, in a 5x3 factorial scheme (five subcultures and three genotypes). Samples from 5 plants were taken in each experimental unit. The response variables were selected using the Stepwise model selection method, and thus the selected variables were: shoot height at the time of acclimatization (cm), shoot height after acclimatization (cm), larger internode space (cm), leaf area (cm<sup>2</sup>) and fresh mass of the aerial part (mg). For both experiments the evaluated genotypes were Chinook, Columbus and HallertauerM. The data were evaluated considering their nature (laboratory, biological), so we propose a way to analyze the data and extract accurate results. The genotypes Chinook and Columbus had better root development when grown in culture medium containing the combination of BAP + IAA, while for the variables number of nodal segments and shoot height, the best performance for both genotypes, occurred in medium culture containing only IAA. While the HallertauerM genotype did not have its development significantly favored in any of the studied culture media. The similar behavior between the Chinook and Columbus genotypes can be explained by their origin, both American. There was the occurrence of somaclonal variation for the Chinook genotype during the five subcultures. For the Columbus genotype, the variation was detected only in R<sub>2</sub>, indicating that the genotype recovered and maintained its phenotypic stability. While the HallertauerM genotype maintained its phenotypic stability over five subcultures.

**Keywords:** Genotypes. Hops. Tissue culture. Micropropagation.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Cultivo de lúpulo em sistema de condução vertical em haste única. .... 25
- Figura 2 - Sistemas de condução para lúpulo a) sistema de condução guarda-chuva, b) sistema de condução vertical haste única, podendo ser conduzindo em “V”, c) sistema de condução latada. .... 26
- Figura 3 - Inflorescências de lúpulo a) flor da planta masculina de lúpulo, b) cones formados da inflorescência da planta feminina de lúpulo. .... 27
- Figura 4 - Explantes/segmentos nodais de lúpulo, cultivados em diferentes meios de cultura (representado pelas diferentes cores). Cada meio proporcionou um desenvolvimento do número de segmentos nodais, de maneira quanto maior o número de segmentos nodais mais novas plantas serão obtidas. .... 49
- Figura 5 - Estimativas dos efeitos diretos e indiretos das variáveis comprimento radicular (CMR), altura de brotos (ABR), número de brotos (NBR) sobre a variável número de segmentos nodais (NSN) (variável principal). .... 52
- Figura 6 - Representação esquemática utilizada para a obtenção das plântulas ao longo de cinco subcultivos. .... 55
- Figura 7 - Plantas do genótipo de lúpulo Chinook micropropagadas. a) planta de lúpulo com desenvolvimento normal; b, c) formação de calo na base do explante nos subcultivos R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>; d) broto com apenas uma folha por nó; e) emissão de três folhas em um único nó; f, g) emissão de folha e broto sem origem da gema axilar..... 63





## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Meios de cultura avaliados. .... 42
- Tabela 2 - Valores de F da análise de covariância para as variáveis comprimento radicular (CMR), altura de brotos (ABR), número de brotos (NBR) e número de segmentos nodais (NSN). Modelo ajustado pela distribuição *lognormal* e inserção da covariável (NBR), sendo exibida a análise com as variáveis originais e para as variáveis após o ajuste. Considerações realizadas para os três genótipos de lúpulo em seis meios de cultura. .... 45
- Tabela 3 - Análise da variação para comprimento radicular (CMR), altura de brotos (ABR) e número de segmentos nodais (NSN), com a decomposição da variação atribuível a meios de cultura, para cada nível de genótipo. .... 46
- Tabela 4 - Estimativas dos contrastes de efeitos atribuíveis a genótipos, para cada nível de meio de cultura para as variáveis comprimento radicular (CMR), altura de brotos (ABR) e número de segmentos nodais (NSN) regenerados no cultivo *in vitro*. .... 47
- Tabela 5 - Resumo da análise de variância multivariada para as variáveis respostas: altura de broto (momento da aclimação e após a aclimação) (cm), maior espaço entrenó (cm), área foliar (cm<sup>2</sup>) e massa fresca da parte aérea (mg). .... 60
- Tabela 6 - Teste multivariado dos efeitos simples: subcultivos dentro de genótipo. Apresentação dos valores de teste *F* e do teste multivariado Wilk's (U). Comparação dos contrastes pela probabilidade de *F*. .... 61
- Tabela 7 - Coeficientes canônicos padronizados (CCP) e a estatística de teste da razão de verossimilhança para as variáveis-respostas: altura da plântula no momento da aclimação (ALT<sup>1</sup>), altura de planta após aclimação (ALT), maior espaço entrenó após aclimação (MEEN), área foliar após aclimação (ARF) e massa fresca da parte aérea após aclimação (MFA). .... 62
- Tabela 8 - Coeficiente de correlação intraclasse (t) e para as variáveis-respostas: altura da plântula no momento da aclimação (ALT<sup>1</sup>), altura de planta após aclimação (ALT<sup>2</sup>), maior espaço entrenó após aclimação (MEEN), área foliar após aclimação (ARF) e massa fresca da parte aérea após aclimação (MFA), calculado através da estimativa dos componentes da variância (entre e dentro). .... 66



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

±	Mais ou menos
°C	Graus celsius
AIA	Ácido indolil-3-acético
AIC	Critério de Informação de Akaike
BAP	6-benzilaminopurina
CaOCl <sub>2</sub>	Hipoclorito de cálcio
cm	Centímetros
g L <sup>-1</sup>	Gramas por litro
GA <sub>3</sub>	Ácido giberélico
mg L <sup>-1</sup>	Miligramas por litro
ml	Mililitros
MS	Meio de cultura Murashige e Skoog
NaOCl	Hipoclorito de Sódio
P/Pr	Probabilidade
r	Coefficiente de correlação
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
t	Coefficiente de correlação intraclasse



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>25</b>
2.1	A CULTURA DO LÚPULO .....	25
2.2	INDÚSTRIA CERVEJEIRA E O LÚPULO .....	28
2.3	ATUALIDADE E EXPECTATIVAS PARA A CULTURA .....	30
2.4	CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	31
<b>2.4.1</b>	<b>Meio de cultura</b> .....	<b>33</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Reguladores de crescimento</b> .....	<b>34</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Explante e desinfestação</b> .....	<b>35</b>
2.5	VARIAÇÃO SOMACLONAL .....	36
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO I: REGULADORES DE CRESCIMENTO E SEU REFLEXO EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE LÚPULO CULTIVADOS <i>IN VITRO</i></b> .....	<b>39</b>
3.1	RESUMO .....	39
3.2	INTRODUÇÃO .....	39
3.3	MATERIAL E MÉTODOS .....	41
<b>3.3.1</b>	<b>Material vegetal</b> .....	<b>41</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Meio de cultura</b> .....	<b>42</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Assepsia, isolamento e incubação</b> .....	<b>42</b>
<b>3.3.4</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>42</b>
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
3.5	CONCLUSÕES .....	52
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO II: ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS EM LÚPULO OCASIONADAS PELA MICROPROPAGAÇÃO</b> .....	<b>53</b>
4.1	RESUMO .....	53
4.2	INTRODUÇÃO .....	53
4.3	MATERIAL E MÉTODOS .....	55

<b>4.3.1</b>	<b>Genótipos utilizados e origem dos subcultivos .....</b>	<b>55</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Meio de cultura .....</b>	<b>56</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Assepsia, isolamento e incubação .....</b>	<b>56</b>
<b>4.3.4</b>	<b>Aclimação .....</b>	<b>56</b>
<b>4.3.5</b>	<b>Variáveis-resposta .....</b>	<b>57</b>
<b>4.3.6</b>	<b>Delineamento experimental e análise estatística .....</b>	<b>57</b>
<b>4.4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>4.5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>66</b>
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>67</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>69</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é uma espécie herbácea, perene, alógama, de propagação assexuada, sendo cultivados genótipos europeus e norte-americanos (HEALE; LEGG; CONNELL, 1989). É utilizado na fabricação de fármacos, aromatizantes e há mais de 3 mil anos já era utilizado na conservação de bebidas fermentadas e também como planta medicinal, e até mesmo servida como salada. O lúpulo é a única fonte produtora de lupulina, que possui grande importância na indústria cervejeira, por conferir à cerveja aroma e sabor amargo característico, maior estabilidade à espuma, além de ter grande importância na conservação da bebida.

O lúpulo utilizado no Brasil provém, majoritariamente, de importações, pois propagou-se a ideia de que a planta não se adapta ao clima brasileiro, já que necessita de clima frio e cerca de 14 horas de luz diariamente. Porém, empresas e instituições brasileiras estão demonstrando cada vez mais interesse pela cultura, realizando pesquisas com a espécie, e desenvolvendo genótipos mais adaptados ao nosso clima, mais tolerantes a seca e a condições de altas precipitações. Isso vem despertando o interesse de agricultores e cervejeiros no cultivo de lúpulo, pois sabe-se da demanda existente pelo lúpulo e do alto valor agregado dos cones, tendo-se como objetivo suprir todo o mercado interno e ainda se tornar um exportador (VASCONCELOS, 2017). O interesse pela nova cultura foi tanto, que no ano de 2019 o lúpulo foi registrado no Ministério da Agricultura, e atualmente são mais de 40 genótipos registrados (Anexo A).

O interesse dos brasileiros no cultivo de lúpulo demanda grande quantidade de mudas com qualidade fitossanitária elevada. A micropropagação pode ser considerada como uma importante ferramenta, pois possibilita a obtenção de centenas e até milhares de mudas ao longo de um ano, a partir de uma única planta matriz, diferentemente do método de estaquia convencional, que exige um maior intervalo de tempo e produz mudas de baixa qualidade.

Porém a definição de um protocolo de meio de cultura para o desenvolvimento dos explantes é um dos principais pontos críticos, pois varia entre espécies e até mesmo entre diferentes genótipos. Outro problema encontrado na micropropagação é a ocorrência de variação somaclonal (variações encontradas em plantas oriundas do cultivo *in vitro*). Assim, há a necessidade de se realizar estudos envolvendo diferentes meios de cultura e genótipos, avaliando caracteres morfológicos, para que a micropropagação possa ser utilizada com sucesso, ou seja, originar plantas completas e idênticas a planta matriz.





## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A CULTURA DO LÚPULO

O gênero *Humulus* é composto por três espécies, *H. japonicus* S&Z, *H. yunnanensis* H. e *H. lupulus* L., sendo que apenas o último possui importância na indústria cervejeira. O *Humulus lupulus* L. pertence à família Cannabaceae (ordem Rosales). É uma liana herbácea perene, rizomatosa e dioica (alogamia obrigatória). As plantas possuem hastes ocas e ásperas, com tricomas rígidos, verdes ou arroxeados. As folhas são opostas, palmadas, serradas e locadas, possuindo estípulas. É uma planta que possui forte dominância apical, iniciando o crescimento lateral (onde as flores serão emitidas) apenas quando cessa o vertical, que pode chegar a oito metros, necessitando ser conduzida em sistema tutorado (Figura 1) (MARCOS et al., 2011; PEARSON, 2013).

Figura 1 – Cultivo de lúpulo em sistema de condução vertical em haste única

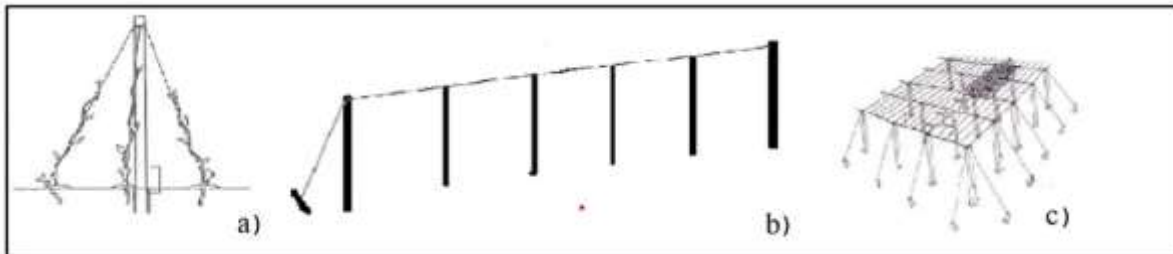


Fonte: CERVECEROS DE MÉXICO, 2017.

O lúpulo pode ser conduzido de três maneiras: sistema guarda-chuva (Figura 2a) (sistema de produção artesanal ou ornamental), sistema vertical (Figura 2b) (cultivos comerciais, terreno com declives de até 12%, colheita da planta toda), sistema latada (Figura 2c) (similar ao utilizado em videiras, permite a colheita dos cones em etapas, conforme o amadurecimento dos mesmos). A escolha do modo de condução depende do objetivo do cultivo

e essencialmente da mecanização disponível, que está diretamente relacionada com os tratamentos culturais, como adubação, controle de doenças, pragas, plantas daninhas e colheita.

Figura 2 – Sistemas de condução para lúpulo a) sistema de condução guarda-chuva, b) sistema de condução vertical haste única, podendo ser conduzindo em “V”, c) sistema de condução latada



Fonte: FISHER; FISHER, 1998 (a); GONTIJO, 2017 (b); MIELE; MANDELLI, 2003 (c).

Durante o inverno a parte aérea da planta senesce, e a planta entra em um período de dormência, ficando apenas os rizomas sob o solo. Neste período a planta acumula energia, para o início de um novo ciclo de brotações, que ocorrerá no início da primavera. Os rizomas possuem gemas vegetativas e raízes, que podem atingir de sete a oito metros de profundidade. É durante a primavera e o verão que as plantas crescem enrolando-se aos suportes (sisal), com o auxílio dos tricomas. O crescimento da planta é reduzido no primeiro ano de cultivo, e só atinge seu potencial produtivo no quarto ano, permanecendo em plena produtividade por até 20 anos (MARCOS et al., 2011).

Como citado anteriormente, o lúpulo é uma planta dioica, ou seja, são encontradas plantas com flores masculinas e plantas com flores femininas. A morfologia floral é bastante distinta entre as plantas, e elas surgem dos ramos axilares das folhas. A inflorescência masculina é uma panícula (Figura 3a), enquanto a feminina constitui-se de inflorescências ao redor de um eixo central (ráquis) composto por nós, cada nó possui um par de brácteas com um par de bractéolas, cada uma representando uma flor. Quando essa inflorescência atinge maturação forma um estróbilo, comumente chamado de “cone” (Figura 3b), sendo este o produto destinado a comercialização (MARCOS et al., 2011; PEARSON, 2013). Cada par de bractéolas protege um aquênio, que é revestido por glândulas de lupulina, que produzem uma secreção com aspecto de pó amarelo, chamado de lupulina, sendo que o valor comercial é devido a quantidade e qualidade deste composto.

A lupulina é constituída por substâncias ricas em resinas (amargor), polifenóis (antioxidantes) e óleos essenciais (aroma). Sendo que o maior interesse da indústria cervejeira está voltado para as flores não fertilizadas. A proporção de cada constituinte pode variar de acordo com o genótipo, o ambiente e técnicas de cultivo, o ponto de colheita, e também fatores

pós-colheita, como a secagem, peletização e armazenamento (DURELLO; SILVA; BOGUSZ Jr, 2019). Nas resinas a quantidade de alfa e beta-ácidos pode variar, sendo que para alfa-ácidos são encontrados percentuais que variam entre 3 e 17 %, e beta-ácidos entre 3 e 7 %. No mundo todo, existem mais de 30 genótipos americanos e mais de 40 genótipos europeus de importância na indústria cervejeira (SPÓSITO et al., 2019).

Figura 3 – Inflorescências de lúpulo a) flor da planta masculina de lúpulo, b) cones formados da inflorescência da planta feminina de lúpulo



Fonte: KLEINMAN; FELGER, 2010 (a); elaborada pela autora, 2019 (b).

Portanto, são implantados jardins (como são chamados) com apenas plantas femininas, com vista na produção industrial, exceto em alguns países de origem Anglo-saxônicos ou de acordo com o gosto de cervejeiro, que se permite a polinização pela planta macho, obtendo-se lúpulos com pequenas porcentagens de sementes (MARCOS et al., 2011).

Citogeneticamente, o lúpulo cultivado é diploide ( $2n = 2x = 20$ , ou ainda cromossomos sexuais homomórficos em plantas femininas  $2n = 2x = 18 + XX$ , e cromossomos sexuais heteromórficos em plantas masculinas  $2n = 2x = 18 + XY$ ) (DANILOVA et al., 2006; SHEPHEARD et al., 2000). O centro de origem do lúpulo é a China, migrando para o leste da América e oeste da Europa, resultando em duas distintas populações, americanos e europeus (FARAGÓ et al., 2009; REVILLA; MARTINEZ, 2002). Porém, a Europa é considerada o centro de diversidade da espécie (ROCHA, 2005).

O lúpulo distribui-se nas áreas temperadas do globo, aparecendo de forma espontânea no hemisfério Norte, com latitude acima de  $32^\circ$  até os  $55^\circ$ , sendo a sua distribuição diretamente relacionada com as condições edafoclimáticas. As plantas possuem preferência por solos profundos, que permitam o bom desenvolvimento radicular, bem drenados, relevo plano e com pH entre 6,0 e 6,5. A matéria orgânica do solo também se faz importante, uma vez que favorece aeração, retenção de água e reduz os riscos de compactação do solo. Assim como a prática de

irrigação também se faz importante (RODRIGUES; MORAIS, 2015). O comprimento mínimo do dia, abaixo do qual a planta cessa seu crescimento vegetativo é considerado de 8-10 horas.

Os insetos que mais acometem o lúpulo são os afídeos (*Phorodon humuli*) e a aranha vermelha (*Tetranychus telarius*, *T. urticae*). A aranha vermelha é considerada a praga mais severa, podendo levar à exaustão dos nutrientes presentes nas folhas, resultando na queda das mesmas e conseqüentemente a morte das plantas. As principais doenças que acarretam danos a cultura são o oídio (*Sphaerotheca humuli*) e o míldio (*Pseudoperonospora humuli*) (RODRIGUES; MORAIS, 2015).

De acordo com Martins (1987), a diversidade genética pode ser caracterizada pela variabilidade fenotípica (morfológica e quantitativa) entre os indivíduos, sistemas reprodutivos e também pelas estratégias adaptativas ao ambiente. Como mencionado anteriormente, existem lúpulos de distintas populações (europeia e americana), sendo que foram lúpulos silvestres, nativos da Europa, Ásia e América do Norte, que deram origem aos cultivados atualmente. Assim, de acordo com Spósito et al. (2019), os lúpulos silvestres pertencem a subespécies diferentes, sendo o europeu pertencente a subespécie *H. lupulus* subsp. *cordifolius* e os americanos *H. lupulus* subsp. *neomexicanus*, *H. lupulus* subsp. *pubescens* e *H. lupulus* subsp. *lupuloides*. As diferenças entre essas subespécies se concentram em características morfológicas das folhas e dos cones, sendo os lúpulos europeus os mais tradicionais, conferindo maior suavidade e aroma a cerveja, quando comparado ao lúpulo americano.

Os europeus levaram consigo diferentes genótipos de lúpulo quando migraram para o Novo Mundo, marcando o ano de 1629 com a introdução do lúpulo nos Estados Unidos. No Brasil, há indícios de que os primeiros cultivos da planta se deu em 1950, pelo austríaco Roland Hoblik, no município de Nova Petrópolis, no estado do Rio Grande do Sul, sendo os cones produzidos comercializados para as cervejarias da época (SPÓSITO et al., 2019).

## 2.2 INDÚSTRIA CERVEJEIRA E O LÚPULO

Segundo Vasconcelos (2017) o Brasil encontra-se em terceiro lugar no *ranking* mundial de maior produtor de cerveja, produzindo 14,1 bilhões de litros da bebida em 2016, estando atrás apenas da China e dos Estados Unidos. Porém, majoritariamente, o lúpulo utilizado na fabricação da cerveja brasileira é proveniente de importações, perfazendo cerca de 3,5 mil toneladas por ano, com custo anual próximo à 60 milhões de dólares (CONAB, 2019).

O número de cervejarias artesanais vem crescendo rapidamente no Brasil. Esse crescimento é explicado tanto pelo crescente interesse do consumo de cervejas artesanais,

quanto pelo turismo cervejeiro (KRAFTCHICK et al., 2014). Ao final do mês de setembro do ano de 2018, o Brasil possuía 835 cervejarias produtoras, quando em 2002 não haviam 50 estabelecimentos. O crescimento exponencial desses estabelecimentos iniciou a partir do ano de 2010, e o ritmo do crescimento não diminuiu. O estado do Rio Grande do Sul é o estado que possui o maior número de cervejarias artesanais, com 179 estabelecimentos legais, seguido de São Paulo (144), Minas Gerais (112), Santa Catarina (102), Paraná (88) e Rio de Janeiro (56) (MÜLLER; MARCUSSO, 2018).

O primeiro registro de produção de cerveja utilizando o lúpulo foi nos mosteiros do norte europeu, sendo a bebida preferida em muitas sociedades antigas. A Inglaterra contestou a importação de cerveja sem lúpulo, justamente pelos ingleses possuírem um gosto considerado secular, dessa forma o lúpulo foi legalizado na Inglaterra em 1554 (MEUSSDOERFFER, 2009). Hoje a cerveja é considerada a principal bebida alcoólica do mundo em termos de volume e valor (SWINNEN, 2011).

A utilização do lúpulo na fabricação da cerveja além de conferir diferentes sabores, aromas e estabilidade, está relacionada também a questões tradicionais e de preferência. O lúpulo foi ganhando maior espaço quando se percebeu que além de sabor e aroma, ele conferia também maior durabilidade a bebida, possibilitando o transporte a espaços mais longos (LAVINSCKY, 2017).

Cada genótipo de lúpulo é destinado a uma finalidade, ou seja, existem genótipos considerados de amargor, aromáticos e amargor-aromático. A qualidade dos cones ou da lupulina produzida varia de acordo com o genótipo, tipo de solo, adubação, altitude, incidência solar, clima do local e ano em que foi produzido. A variação detectada para um mesmo genótipo, em relação a qualidade da lupulina, cultivado em diferentes ambientes deve-se ao tipo de caractere em questão, tratando-se de um caractere quantitativo, e dessa forma sendo controlado por vários genes.

A mistura de diferentes lúpulos é utilizada para que se obtenha teores de alfa e beta-ácidos desejáveis, permitindo dessa forma a obtenção de gostos e aromas únicos. Desse modo, o lúpulo possui funções de conferir amargor característico para cada estilo de cerveja, equilibrando a doçura do malte proporcionando assim um final refrescante. Os lúpulos característicos por conferir amargor ou “lúpulo de fervura”, possuem teores de alfa-ácidos mais elevados, e quanto maior for esse teor mais amargura ele tende a conferir a cerveja produzida; atribuir aroma à cerveja é outra função primordial do lúpulo. Os lúpulos que conferem aroma ou “lúpulo de acabamento”, possuem elevados teores de beta-ácidos, que conferem aromas diversos à cerveja, adicionados ao final do cozimento; e conservar a cerveja, conferindo maior

estabilidade, permitindo maior tempo de armazenamento. Essa propriedade é de menor importância nos dias de hoje, pois com o uso de boas práticas na fabricação e refrigeração, diminuiu-se a contaminação da cerveja (SPÓSITO et al., 2019).

### 2.3 ATUALIDADE E EXPECTATIVAS PARA A CULTURA

Em 2017 a área plantada de lúpulo mundialmente foi de 91.881 hectares, com uma produção mundial de 148.603 toneladas de lúpulo, sendo os Estados Unidos o maior produtor (47.340 toneladas), seguido da Etiópia (38.418 toneladas) e em terceiro lugar a Alemanha (32.582 toneladas) (FAO, 2017).

Pesquisas com a cultura lúpulo no Brasil são recentes e existem demandas por informações concretas e específicas sobre o cultivo, manejo, adaptação, produtividade, qualidade da lupulina e aquisição de mudas. Assim, o trabalho de pesquisadores e agricultores está mudando o atual cenário, de forma que o cultivo do lúpulo vem sendo incentivado (em regiões aptas para a produção) como uma maneira de suprir a demanda brasileira existente, reduzindo a importação do lúpulo, e conseqüentemente, os custos para a fabricação da cerveja.

O lúpulo é uma cultura alternativa promissora, principalmente para pequenos agricultores, pela elevada mão-de-obra e alto retorno financeiro por área (RODRIGUES; MORAIS, 2015). O retorno pode chegar a 295 mil reais (a partir do segundo ano), pois uma única planta de lúpulo produz em média um quilo de cones, cujo preço varia de 200 a 400 reais, a depender da qualidade do mesmo. Ou seja, ao invés de se cultivar 5 hectares com uma espécie de cultivo anual, como a soja, que traria um rendimento líquido de aproximadamente R\$ 12.000,00, o lúpulo traria um retorno financeiro 24 vezes maior.

Porém, existem algumas dificuldades e serem enfrentadas pelos agricultores, como a aquisição de mudas e o beneficiamento dos cones de lúpulo. Além do elevado custo das mudas (60 reais a unidade), são pouquíssimos os fornecedores de mudas no Brasil, e possivelmente insuficientes para atender a demanda crescente, visto que para a implantação de um hectare são necessárias 2.200 plantas (VASQUEZ; CAVECHIA, 2017). O outro entrave se deve pelo motivo de que, até o momento, não existem unidades de beneficiamento de lúpulo instaladas no Brasil, o que dificulta o processo produtivo, visto que após a colheita os cones de lúpulo precisam ser processados o mais rápido possível para não comprometer a sua qualidade. O lúpulo é comercializado em diversas formas, em *pellets*, cones embalados a vácuo, pó ou extratos.

O lúpulo só foi registrado no Brasil no ano de 2019, e atualmente já são 47 cultivares registradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2020). Segundo os autores Spósito et al. (2019), o Brasil possui uma área de cultivo de lúpulo que não ultrapassa 20 hectares, distribuídas pelos estados do Rio Grande do Sul (5 produtores), Santa Catarina (12), Paraná (3), São Paulo (4), Rio de Janeiro (5), Minas Gerais (1) e Distrito Federal (1). São cultivados principalmente os genótipos Cascade, Centennial, Fuggle, Magnum, Hallertauer, Northern Brewer e Nugget. E com o aumento das pesquisas realizadas com a espécie, o Brasil já possui um genótipo adaptado as nossas condições climáticas, a Mantiqueira. Além disso, a Universidade do Estado de Santa Catarina é sede da Associação Brasileira de Produtores de Lúpulo (APROLÚPULO), que realizam atividades relacionados a cultura, disponibilizando materiais sobre práticas de manejo, informações sobre a espécie e divulgando pesquisas realizadas, buscando conectar os interessados.

#### 2.4 CULTIVO *IN VITRO*

A biotecnologia vegetal agrupa diversas técnicas, que tem por finalidade otimizar e facilitar o trabalho realizado por pessoas, dentre eles o do melhorista, que leva anos pesquisando formas de criar genótipos mais adaptados para as condições edafoclimáticas e com características desejáveis pelo mercado consumidor. Dentre as técnicas podemos citar a cultura de tecidos, que consiste em utilizar pequenas partes do tecido vegetal (folha, segmentos nodais, pecíolos, meristemas, gemas) ou estruturas inteiras (bulbos) e cultivá-las *in vitro*, proporcionando uma condição artificial favorável para que ocorra o desenvolvimento dessas estruturas até a formação de plântulas inteiras e, em teoria, geneticamente iguais as plantas matrizes. Isso é possível, pois as células vegetais possuem capacidade de regenerar uma planta completa, fenômeno conhecido como totipotência, o que possibilita a manipulação das células, tecidos e órgãos *in vitro* (TORRES et al., 2000).

A cultura de tecidos assume grande importância, uma vez considerada ferramenta crucial para a clonagem de plantas em nível comercial (micropropagação), na conservação de espécies, essencial para a transformação genética, permite interação de fatores bióticos e abióticos, resultando em plantas vigorosas e sadias (AMOO; FINNIE; STANDEN, 2009; BAJAJ; FURMANOWA; OLSZOWSKA, 1988; QUISEN; ANGELO, 2008; VILARINHO, 2009). Além disso, permite a realização de técnicas de mutação *in vitro*, seleção *in vitro* com o auxílio de marcadores e obtenção de variantes somaclonais (GAMBORG; PHILLIPS, 1995).

O cultivo de explantes *in vitro* de lúpulo teve início na década de 1960, por Griffin e Coley-Smith (1968) que utilizaram segmentos nodais da cv. Eastwell Golding, com o objetivo de estudar o processo de infecção dos tecidos de lúpulo por *Pseudoperonospora humuli*. Desde então, técnicas de cultura de tecidos em lúpulo têm sido usadas, como por exemplo a clonagem de genótipos selecionados, desenvolvendo um sistema de multiplicação de partes aéreas (ROY; LEGGETT; KOUTOULIS, 2001), esses autores identificaram o meio de cultura White como o mais eficiente para regeneração dos explantes e um método de assepsia um pouco complexo e oneroso; produção de plantas livres de vírus (ADAMS, 1975; VINE; JONES, 1969); conservação de germoplasma *in vitro* (REED et al., 2003; REVILLA; MARTINEZ, 2002), regeneração de tecidos não-meristemáticos (GURRIARÁN; REVILLA; TAMÉS, 1999), e introdução de genes via transformação genética (ALDINGER et al., 2009; HORLEMANN et al., 2003). Lembrando que a regeneração de plântulas *in vitro* é um pré-requisito para obtenção de plantas transgênicas (FARAGÓ; PŠENÁKOVÁ; FARAGOVÁ, 2011).

A seleção de plantas superiores depende da variabilidade genética, que normalmente é conservada em Bancos de Germoplasma *in vivo*, podendo ainda ser *in vitro* para espécies propagadas vegetativamente. A cultura de tecidos dá suporte para a transformação genética e introgressão de genes, podendo ainda, aumentar a variabilidade genética através da variação somaclonal, que nem sempre é favorável, pois quando se trata de propagação clonal, transformação genética ou conservação de germoplasma desejamos manter a fidelidade genética (FERREIRA; CALDAS; PEREIRA, 1998; SANTIAGO et. al., 2012).

Conforme Caldas et al. (1998) a regeneração da plântula *in vitro* depende de três fatores: espécie (genótipo, cultivar ou variedade), tipo de explante (raiz, folha, caule, gema) e a condição de cultura (meio de cultura, temperatura, luz, reguladores de crescimento), portanto o sucesso da técnica depende da combinação correta de todos os fatores (GURIARÁN; REVILLA; TAMÉS, 1999; MUSTAFA et al., 2011).

Segundo Thorpe (1995), existem duas principais rotas distintas responsáveis pela regeneração de plântulas: a embriogênese e a organogênese. Normalmente a embriogênese somática é induzida com auxinas, resultando em estruturas semelhantes a um embrião. A organogênese normalmente se dá pelo balanço citocininas/auxina presente em meio de cultura, induzindo a diferenciação do tecido em órgãos diretamente do explante, chamada de organogênese direta. A organogênese pode ainda ocorrer de forma indireta, quando os órgãos se formam de estruturas denominadas “calos”, podendo uma ou mais células serem as responsáveis pela formação de plântula.



### 2.4.1 Meio de cultura

O meio de cultura atua diretamente na conversão do explante em plântula. Todos os componentes do meio de cultura devem estar em concentrações suficientes para uma eficiente regeneração de plântulas, caso contrário a obtenção de clones será falha (BARRUETO-CID, 2014; REZENDE et al., 2011). Assim como as plantas retiram do solo os elementos essenciais, em cultura de tecidos não poderia ser diferente, de modo que esses elementos devem estar incluídos no meio de cultura.

A melhor composição do meio de cultura é variável entre espécies, entre genótipos e para o tipo de explante utilizado. Para o cultivo *in vitro* de mamão foram avaliadas diferentes formulações e suplementações do meio MS, visando a definição do melhor protocolo. Os autores puderam concluir que a redução da concentração de nitrato de amônia, nitrato de potássio, sacarose e ágar e a ausência de ferro foi favorável ao desenvolvimento dos ápices caulinares (BERTOZZO; MACHADO, 2010). Miranda et al. (2016), verificaram que para o desenvolvimento de gemas axilares de candeia o melhor meio de cultura foi o MS na concentração de 100% e acrescido de BAP e ANA. Para o cultivo de segmentos nodais de lúpulo, Machado et al. (2018) identificou que o meio MS acrescido de TDZ proporcionou melhor desenvolvimento para número de brotos, em contrapartida ocasionou elevada formação de calo.

Essencialmente o meio de cultura é constituído por compostos inorgânicos, orgânicos, inertes e complexas substâncias naturais. Essas substâncias controlam o padrão de desenvolvimento dos tecidos, células e órgãos *in vitro*. O cultivo *in vitro*, por exemplo, pode restringir o processo fotossintético, e por isso os meios de cultura são baseados nas exigências das plantas. Além dos componentes básicos fornecidos (macro e micronutrientes), o meio de cultura pode ser complementado com compostos orgânicos, suprimindo dessa forma as necessidades energéticas, estruturais e metabólicas das células.

Existem diversos meios nutritivos descritos na literatura, como o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), o B5 (GAMBORG; MILLER; OJIMA, 1968) e o WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980). Com a definição de protocolos, tornou possível a repetitividade dos resultados obtidos em qualquer época ou local. A decisão de escolha de um meio de cultura normalmente é baseada na literatura, em experimentos conduzidos para determinada espécie ou tipo de explante. O meio MS é o mais utilizado para o cultivo *in vitro*, os autores Paiva; Paiva (2001), descrevem a importância de cada constituinte utilizado neste meio de cultura.

### 2.4.2 Reguladores de crescimento

Os reguladores de crescimento são biomoléculas que induzem respostas fisiológicas, como o desenvolvimento de raízes, alongamento de entrenós, indução de brotos, frutificação etc. (BARRUETO-CID, 2014). A composição e a concentração dos reguladores de crescimento no meio de cultura são determinantes para crescimento e para o estabelecimento de sistemas de cultivo *in vitro*. As classes de reguladores de crescimento mais utilizadas em cultura de tecidos são as auxinas e as citocininas.

A auxina foi o primeiro fitormônio descoberto, sendo alvo dos primeiros estudos fisiológicos sobre o mecanismo de expansão celular vegetal. As auxinas exercem importante função no crescimento, alongamento/expansão celular, desencadeando diversos processos fisiológicos, sendo frequentemente usadas para o enraizamento de brotos e indução de calos (BARRUETO-CID, 2014; KRIKORIAN, 1991). O AIA (ácido indolil-3-acético) é a auxina natural mais abundante. De acordo com Jardim et al. (2010) a utilização de ANA (3,0 mg L<sup>-1</sup>) em meio de cultura MS para o desenvolvimento de segmentos nodais de pau-rosa favoreceu a emissão de raízes. Mas existem relatos de quando a auxina é utilizada em baixas doses ela também favorece o desenvolvimento da parte aérea de plântulas (BARBOZA; CALDAS, 2001; MORAIS; ASMAR; LUZ, 2014; RUBIN et al., 2007).

As citocininas possuem papel importante na divisão celular, utilizadas na cultura de tecidos para promover a brotação de gemas e podem inibir a dominância apical. Estão também envolvidas na diferenciação de cloroplastos e retardamento da senescência foliar. Sabe-se da grande importância das citocininas, porém pouco se conhece sobre o mecanismo de ação a nível molecular. O uso de 6-benzilaminopurina sobre o desenvolvimento de segmentos nodais de lúpulo foi avaliado por Copatti et al. (2019), sendo que o uso de BAP na dose de 0,8 mg L<sup>-1</sup> favoreceu o crescimento da parte aérea, enquanto que a dose de 0,4 mg L<sup>-1</sup> foi eficiente para indução radicular.

Diferentemente das outras duas classes hormonais, a descoberta da classe das giberelinas se deu em fungos (*Fusarium fujikuroi*), e não em plantas, sendo identificada e denominada assim na década de 1930. Somente na década de 1950 evidenciou-se a ocorrência natural de giberelinas em plantas vasculares. As giberelinas estão relacionadas com o alongamento de brotos, alongamento e divisão celular, expansão foliar (BARRUETO-CID, 2014; TAIZ; ZEIGER, 2004), sendo que sua ação frequentemente ocorre de maneira integrada a outros hormônios vegetais (KERBAUY, 2019).

Segundo Skoog; Miller (1957) numa primeira fase do processo morfogênico, razões baixas de auxina/citocinina favorecem a formação de meristemas adventícios. Razões altas levam à formação de raízes, portanto a combinação desses dois tipos de reguladores de crescimento (auxinas e citocininas) se torna fundamental na indução de organogênese nas células vegetais *in vitro*. A razão entre as concentrações de cada um destes reguladores de crescimento varia com a família, gênero, espécie e até mesmo genótipo da planta (DUCAN; WIDHOLM, 1988; FRELLO; STUMMANN; SEREK, 2002). A combinação de BAP ( $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ ) e AIA ( $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) formou um balanço hormonal favorável para o desenvolvimento de segmentos nodais e ápices de plântulas de pau-rosa cultivados *in vitro* (JARDIM et al., 2010)

### 2.4.3 Explante e desinfestação

Sabe-se também que os explantes são constituídos de células em diversos estados: fisiológico, bioquímico e de desenvolvimento. Por tanto, espera-se que o ambiente *in vitro* cause reações diversificadas nos diferentes tipos celulares, fazendo com que apenas algumas células do explante respondam com a formação de um órgão ou uma plântula completa (MANTELL; MATTEWS; McKEE, 1994). Dessa forma, imprescindivelmente, a escolha do tecido deve ser baseada na escolha de explantes que contenham células com a potencialidade totipotente.

Segundo Barrueto-Cid (2014), explante é definido como qualquer parte separada da planta destinada ao uso *in vitro*, como folha, pecíolo, fragmentos de raízes, flores, gemas, nós, pólen, entre outros. Os tipos de explantes podem reagir de forma diferente para determinada condição *in vitro*. Em um estudo realizado com maracujá, verificou-se que o segmento nodal contendo a segunda gema axilar proporcionou o melhor desenvolvimento para as três espécies estudadas (FARIA et al., 2007). Ao se comparar o desenvolvimento de segmentos nodais, segmentos nodais e sementes para o estabelecimento *in vitro* de orégano, se constatou que o melhor explante foi segmentos nodais, e para hortelã segmentos nodais e sementes não diferiram entre si, podendo ser utilizados com sucesso qualquer um dos dois (LATTUADA et al., 2019). Para o cultivo de amora, o uso de gemas apicais proporcionou menores índices de contaminação quando comparado ao cultivo de segmentos nodais (PÉREZ; AREVICH; PUPO, 2019).

Um importante ponto do cultivo *in vitro* com relação ao explante é a assepsia ou desinfestação, que normalmente é feita com alvejantes comerciais à base de cloro, como hipoclorito de sódio ( $\text{NaOCl}$ ) ou hipoclorito de cálcio ( $\text{CaOCl}_2$ ). Esse procedimento tem como objetivo a remoção de contaminantes (fungos) da superfície do explante (BARRUETO-CID,

2014), visando o estabelecimento de plântulas saudáveis, já que a partir desta etapa, todos os explantes e/ou plântulas contaminados são eliminados. A etapa de estabelecimento da cultura *in vitro* é considerada complexa na micropropagação das espécies, devido aos elevados níveis de contaminantes presentes nos tecidos vegetais, inclusive bactérias e fungos endógenos, que são mais difíceis de serem eliminados dos explantes (NIEDZ; BAUSHER, 2002; WATT et al., 2003).

## 2.5 VARIAÇÃO SOMACLONAL

Durante o cultivo *in vitro* as plântulas regeneradas são submetidas à subcultivos (repicagens) e em seguida inoculados em um novo meio de cultura para indução de novas brotações, que serão submetidas à nova repicagem, para que se obtenha, ao final do processo, um grande número de plantas. Quando uma planta passa por inúmeros subcultivos, ela pode não mais manter o padrão clonal da planta matriz, sendo essa alteração classificada como variação somaclonal.

Alguns fatores como o tipo de explante, idade da cultura, tempo de cultivo *in vitro*, número de subcultivos, uso de reguladores de crescimento, meio de cultura, condições de cultivo, são de extrema importância na estabilidade genética das plântulas regeneradas (ROUT; MOHAPATRA; MOHAN, 2006). Assim como a fase de calo, que comumente ocorre na cultura de tecidos, aumenta as chances de ocorrência de variação somaclonal, pois as células se dividem de forma acelerada, e esse fato pode ocasionar erros durante a duplicação do DNA.

O genótipo também pode influenciar na taxa de variação somaclonal (BARRUETO-CID, 2014). Para *Chrysanthemum* o genótipo foi considerado como principal fator ligado a ocorrência de variação somaclonal (MARTIN; UBERHUAGA; PEREZ, 2002; MINANO et al., 2009), assim como para espécies de *Solanum* (AVERSANO et al., 2009; BORDALLO et al., 2004). De acordo com George (1993), espécies diploides e com baixo número de cromossomos são capazes de manter o seu nível de ploidia durante vários subcultivos, possuindo baixas probabilidades de alteração cariotípicas.

A ocorrência da variação somaclonal em cultura de tecidos é frequente, e esse fenômeno é definido como uma variação que ocorre nas plantas cultivadas *in vitro*, em relação ao material inicial utilizado para o cultivo. Em geral são mudanças não desejáveis, principalmente quando o objetivo é micropropagar plantas em larga escala. A variação somaclonal pode ser de dois tipos: epigenética ou genética (BARRUETO-CID, 2014).

A variação epigenética não é transmitida pela reprodução sexuada, pois se trata de alterações químicas, por exemplo, que ocorrem no DNA, como alteração na cromatina, movimentação de transposons, mudanças na metilação do DNA, ou seja, não alteram a sequência de bases nitrogenadas. Já a variação somaclonal genética é aquela causada por mudanças em sequências de bases nitrogenadas, alterando a sequência genômica, alterações no número cromossômico (aneuploidias), deleções e/ou substituição de nucleotídeos, rearranjos do genoma, sendo, portanto, transmitida pela reprodução sexuada e assexuada.

Ainda existe carência acerca das variações epigenéticas, porém, estudos nessa área estão se tornando intrigantes. A epigenética pode explicar algumas variações fenotípicas herdáveis que não podem ser explicadas pela sequência de bases nitrogenadas, permite explicar quais os mecanismos envolvidos na resposta do organismo ao ambiente e compreender a plasticidade fenotípica (BASTOW et al., 2004; HE; AMASINO, 2005). Os processos epigenéticos podem favorecer o potencial evolutivo das espécies em resposta ao estresse do ambiente, podendo ser alterada diretamente pelas interações com o ambiente (WHITELAW; WHITELAW, 2006).

A regeneração de plantas *in vitro* ocorre através de divisões mitóticas, então na teoria, as plantas obtidas deveriam ser idênticas à planta clone, com as mesmas características agronômicas, originando, portanto, uma população uniforme. Porém a ocorrência de variação somaclonal é espontânea e aleatória, inesperada e indesejada, originando uma população heterogênea, tornando a clonagem de genótipos *in vitro* ineficaz. Mas, em contrapartida, as variações somaclonais genéticas podem ser de grande valia para o melhoramento genético, pois pode permitir o surgimento de características estáveis e de interesse.

E apesar das vantagens da micropropagação oferece, algumas espécies apresentam instabilidade fenotípica quando submetidas a este procedimento (SAHIJRAM; SONEJI; BOLLAMMA, 2003). De acordo com Podwyszynska (2005) as variações fenotípicas podem surgir após anos de cultivo. Porém essas variações em plantas regeneradas *in vitro* são pouco estudadas durante o período reprodutivo, sendo que frequentemente essas variações afetam o ciclo da cultura, produção e cor dos frutos e flores, número de ramos primários e resistência a patógenos. Mas apesar desse fato, é de extrema importância que o desenvolvimento das plantas micropropagadas seja acompanhada, inclusive durante o cultivo *in vitro*, pois se não detectado durante a fase inicial a variação pode ser rapidamente multiplicada, ocasionando perda das características desejáveis da planta matriz, além de ser um risco para a conservação e intercâmbio de germoplasma (BAIRU; AREMU; VAN STADEN, 2011).



### 3 CAPÍTULO I: REGULADORES DE CRESCIMENTO E SEU REFLEXO EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE LÚPULO CULTIVADOS *IN VITRO*

#### 3.1 RESUMO

O lúpulo é uma cultura que vem sendo utilizada recentemente no Brasil. A cultura de tecidos pode ser uma importante alternativa para a propagação rápida de lúpulo, pois possibilita a obtenção de plantas em elevado número, pequeno espaço físico e a multiplicação pode ocorrer ao longo de todo o ano. Este trabalho tem por objetivo caracterizar respostas de diferentes genótipos sob diferentes reguladores de crescimento e estudar o inter-relacionamento de variáveis-resposta de importância no crescimento *in vitro* de lúpulo. Três genótipos foram cultivados em seis meios de cultura com diferentes combinações de reguladores de crescimento, sendo BAP, AIA e GA<sub>3</sub>. As médias foram comparadas por contrastes e o inter-relacionamento da variáveis-resposta foi realizado pela análise de trilha. Os genótipos americanos revelaram desenvolvimento radicular favorável sob a combinação BAP+AIA, enquanto o uso de AIA ocasionou melhor desenvolvimento da parte aérea. A origem dos genótipos mostrou-se importante na definição do melhor protocolo para o cultivo *in vitro*. O coeficiente de trilha evidenciou que a variável número de brotos tem maior efeito direto sobre número de segmentos nodais. Em experimentos de laboratório, o uso de uma covariável e distribuição adequada da variável incrementou a precisão experimental significativamente.

**Palavras-chave:** *Humulus lupulus*, cultura de tecidos, distribuição lognormal, covariância, AIC.

#### 3.2 INTRODUÇÃO

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é uma planta perene, dioica e com hábito de crescimento trepador pertencente à família Cannabaceae. Somente as plantas femininas produzem o cone, estrutura essa que dá origem a uma substância chamada lupulina. Seu uso se destaca na fabricação de cervejas, por possuir propriedades organolépticas, antibacterianas, conferindo também maior estabilidade a espuma da cerveja, sendo ainda utilizado na confecção de fármacos, destacando-se como um calmante natural (MARCOS et al., 2011; PEARSON, 2013). Segundo Vasconcelos (2017) o Brasil encontra-se em terceiro lugar no *ranking* mundial de maior produtor de cerveja. Porém, todo o lúpulo utilizado na fabricação da cerveja brasileira é proveniente de importações, perfazendo cerca de 3,5 mil toneladas por ano, com custo anual próximo à 60 milhões de dólares (CONAB, 2019).

O grande interesse pela cultura do lúpulo no Brasil é favorecido pela sua demanda crescente, visto que o número de cervejarias só aumenta no país (MAPA, 2019). E como mencionado anteriormente, o Brasil não é um país autossuficiente na produção de lúpulo, porém vem demonstrando potencial para isto. E ainda, o retorno por hectare pode chegar a R\$ 275 mil

(VASQUEZ; CAVECHIA, 2017), visto que uma única planta de lúpulo produz em média um quilo de cones, cujo preço varia de R\$ 200 a R\$ 400, tornando-se uma atividade altamente rentável. Atualmente, as mudas de lúpulo são comercializadas a um preço médio de R\$ 60,00, o que é considerado um valor elevado quando comparado a outras frutíferas, como a maçã, que possui uma média de R\$ 12,00 por muda. Dessa forma, a micropropagação torna-se uma alternativa para reduzir o custo das mudas, e conseqüentemente o custo de implantação de um jardim de lúpulo.

Devido à importância econômica do lúpulo, o cultivo *in vitro* é uma das alternativas mais viáveis na obtenção massal de mudas, visto que por ser uma espécie que para fins comerciais a propagação é predominantemente assexuada (rizomas ou pelo enraizamento de estacas nodais). A qualidade das mudas utilizadas na implantação de um jardim de lúpulo, é um fator que implica diretamente no rendimento da cultura e inúmeras dificuldades são encontradas com a multiplicação via rizomas e estaquia. A multiplicação pelos métodos citados anteriormente, somente ocorrem no período da primavera, que marca o início da brotação do lúpulo, além de facilitarem a disseminação de fungos sistêmicos, bactérias e vírus, que causam diminuição da qualidade do produto e da produtividade da cultura (GOLENIOWSKI; FLAMARIQUE; BIMA, 2003).

A cultura de tecidos é muito utilizada no melhoramento de plantas para produção de indivíduos geneticamente idênticos e de elevada qualidade fitossanitária (AMOO; FINNIE; STANDEN, 2009). Além de facilitar o transporte e intercâmbio de genótipos, possibilita também um melhor controle das condições de crescimento das plantas e facilita a exposição de um grande número de plantas a agentes mutagênicos (criando variabilidade genética). Entretanto, a escolha do meio de cultura adequado ao cultivo de uma espécie ou cultivar pode ser considerada um dos fatores mais importantes no desenvolvimento de mudas. A partir do meio de cultura os tecidos vegetais serão supridos de água, macro e micronutrientes e produtos orgânicos (como os reguladores de crescimento) necessários para o desenvolvimento do explante em condições de cultivo *in vitro* (BARRUETO-CID, 2014). Dentre os reguladores de crescimento, os mais utilizados são: *i*) ácido 3-indolacético (AIA) (auxina), utilizado para indução de calo ou no enraizamento de brotos; *ii*) cinetina (CIN) e a 6-benzilaminopurina (BAP) (citocinina sintética), responsáveis por promover a divisão celular, induzindo a brotação de gemas axilares; *iii*) ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) (giberelina), objetiva o alongamento de brotos ou entrenós (BARRUETO-CID, 2014; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Na cultura de tecidos, além das diferentes respostas obtidas entre espécies, a variação entre genótipos frequentemente existe. Entretanto, a maioria dos trabalhos publicados estudam



apenas um único genótipo (HORLEMANN et al., 2003; MACHADO et al., 2018; MARTÍNEZ; TAMÉS; REVILLA, 1999; PEREDO; REVILLA; ARROYO-GARCÍA, 2006; ROY; LEGGETT; KOUTOULIS, 2001). Desconhecemos até o presente momento, trabalhos que avaliem o desenvolvimento *in vitro* de genótipos de lúpulo de diferentes origens (Americana e Europeia).

Ainda que a adoção de reguladores de crescimento contribua para a solução das dificuldades encontradas na regeneração de explantes *in vitro*, as possibilidades de combinações entre os reguladores de crescimento são imensas, promovendo uma variedade de resultados sobre as principais variáveis de estabelecimento (raízes, brotos, calos). Entendendo as inúmeras possibilidades e dificuldades para a seleção de meios de cultura para o cultivo *in vitro* de lúpulo, nós propusemos caracterizar as respostas de diferentes genótipos sob diferentes reguladores de crescimento e estudar o inter-relacionamento de variáveis-resposta de importância no crescimento *in vitro* de lúpulo (*Humulus lupulus* L.).

### 3.3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.3.1 Material vegetal

Foram utilizados como explantes segmentos nodais jovens de plantas femininas de *Humulus lupulus* de três genótipos: Hallertauer Mitterlfrüh (HallertauerM) (origem europeia), Columbus e Chinook (origem americana), que foram mantidos em casa de vegetação, com temperatura e umidade controladas. As plantas matrizes foram pulverizadas a cada 5 dias com fungicidas (Elatus, Mancozebe e Cypress), como forma de diminuir a perda de plantas por contaminação fungíca. Após coletados foram lavados em água corrente por cinco minutos e seccionados em corte bisel com aproximadamente dois centímetros de comprimento, com duas gemas axilares cada nó. Posteriormente os explantes foram levados para câmara de fluxo laminar para o processo de assepsia.

#### 3.3.2 Meio de cultura

O meio de cultura base utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de vitaminas, 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, solidificado com 8 g L<sup>-1</sup> de ágar, com pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. O meio foi autoclavado por 20 minutos a 121 °C e posteriormente acondicionados em tubos de ensaio (20x200 mm) que foram vedados com papel alumínio. Os seis meios de cultura testados estão descritos no Tabela 1.

Tabela 1 – Meios de cultura avaliados

Meio de Cultura	Meio básico	BAP (mg L <sup>-1</sup> )	AIA (mg L <sup>-1</sup> )	GA <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )
M1	MS + vitaminas	-	-	-
M2	MS + vitaminas	1,0	0,02	0,1
M3	MS + vitaminas	1,0	0,02	-
M4	MS + vitaminas	1,0	-	-
M5	MS + vitaminas	-	0,02	-
M6	MS + vitaminas	-	-	0,1

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

BAP (6-benzilaminopurina); AIA (ácido indolil-3-acético); GA<sub>3</sub> (ácido giberélico).

### 3.3.3 Assepsia, isolamento e incubação

Para assepsia dos explantes foi utilizado hipoclorito de sódio (2,0 % de cloro ativo) com Tween 20 (3 gotas para cada 100 ml de solução). Os explantes permaneceram em agitação por 15 minutos. Posteriormente, foram lavados três vezes com água destilada estéril e em seguida isolados em tubos de ensaio contendo o meio de cultura, fechados com papel alumínio e vedados com filme plástico transparente. Após o isolamento, os tubos foram mantidos em câmara de crescimento de cultivo *in vitro*, com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 24 ± 2 °C. E após 15 dias foi realizada a avaliação dos explantes. Os caracteres avaliados foram comprimento radicular (cm), altura de brotos (cm), número de brotos e número de segmentos nodais.

### 3.3.4 Análise estatística

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, num esquema fatorial 6x3 (seis meios de cultura e três genótipos). Cada tratamento foi composto por 10 repetições, totalizando 180 unidades experimentais. Os dados foram submetidos a análise pelo software SAS (*University Edition*) através do procedimento *Glimmix*, considerando o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + g_i + m_j + gm_{ij} + e_{ij}$$

Onde:  $Y_{ij}$  é o valor observado da variável resposta do genótipo  $i$  no meio  $j$ ;  $\mu$  é o efeito associado à média geral;  $g_i$  é o efeito fixo genótipo  $i$  ( $i=1, 2, 3$ );  $m_j$  é o efeito fixo do meio de

cultura  $j$  ( $j=1, \dots, 6$ );  $gm_{ij}$  é o efeito fixo da interação dos fatores meio e genótipo; e  $e_{ij}$  refere-se ao efeito do resíduo.

O proc *Glimmix* foi utilizado devido a possibilidade de ajustar a distribuição da variável. As variáveis-resposta tiveram a distribuição ajustada pela Lognormal ( $\rho = \ln$ ), com o argumento *dist=lognormal*. A correção de independência dos erros foi feita pelo ajuste da matriz de variâncias e covariâncias dos erros (matriz Huynh-Feldt (HF)), considerando simultaneamente o pressuposto da homogeneidade das variâncias.

A análise de dispersão gráfica, inspeção dos resíduos, identificação de *outliers* e transformações de dados também foram realizadas como alternativas para adequar o modelo estatístico. Além disso, a variável número de brotos foi identificada como uma variável  $x$  (independente), sendo, portanto, utilizada como covariável para auxiliar na interpretação dos resultados e aumentar a precisão das estimativas dos estimadores em avaliação. Sendo que  $x$  foi incorporado ao modelo estatístico descrito anteriormente. A melhoria do ajuste, ou seja, a comparação entre o modelo ajustado e o modelo anterior, foi verificada por meio do Critério de Informação de Akaike (AIC). Após a inspeção da análise de covariância, a decomposição dos graus de liberdade da interação foi realizada por meio do argumento *Slice*, para o fator meio de cultura dentro de cada nível do fator genótipo. Posteriormente, a discriminação dos meios de cultura foi realizada através de contrastes univariados de interesse.

Para determinação das correlações fenotípicas e análise dos coeficientes de trilha, foram avaliadas quatro variáveis-resposta. A análise foi realizada com o auxílio do software Genes (CRUZ, 2001). As correlações fenotípicas foram particionadas em efeitos diretos e indiretos das variáveis comprimento radicular, altura de brotos e número de brotos sobre o número de segmentos nodais, pela análise de trilha.

### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimentos em cultura de tecidos originam dados de difícil modelagem, tanto para ajuste da distribuição do erro quanto para o ajuste da homogeneidade das variâncias. Frequentemente nas avaliações dos experimentos uma enorme quantidade de números “zeros” é contabilizada, devido à falta de formação do órgão de interesse (raiz, por exemplo), que pode ser explicado pelo efeito inibitório do regulador de crescimento ou da própria ausência dele. Estas evidências podem comprometer o atendimento das pressuposições do modelo estatístico (normalidade e homogeneidade). Para ensaios biológicos ou dados de contagem com números pequenos, as transformações recomendadas são a Poisson e Logística (STEEL; TORRIE;

DICKEY, 1997), porém estas transformações não foram eficientes para que os dados atendessem os pressupostos da normalidade e homogeneidade. Neste trabalho o uso de transformações ( $\sqrt{y}$ ,  $\frac{y+\frac{3}{8}}{n+\frac{3}{4}}$ ,  $\log_{10}\frac{y}{1+y}$ ,  $\log y$ ) como solução para o não atendimento da normalidade, ocasionou a perda da homogeneidade das variâncias dos dados observados. Além disso as variáveis número de brotos e número de segmentos nodais não atenderam a pressuposição da normalidade com nenhuma das transformações recomendadas.

O efeito dos genótipos, do meio de cultura e da interação genótipo x meio foi avaliado por meio da análise de covariância (Tabela 2). Desta forma, verificou-se que a variável número de brotos é uma variável independente, a estatística  $F$  não foi significativa mesmo após o ajuste de distribuição *lognormal*. Ou seja, os efeitos principais e a interação não influenciaram nos resultados obtidos. Dessa forma a variável número de brotos pode ser utilizada como uma covariável, a qual melhorou o modelo estatístico e conferiu incremento na precisão, permitindo uma interpretação aprimorada dos dados biológicos.

Assim, a utilização da covariável número de brotos, juntamente com o ajuste da distribuição *lognormal*, ocasionou uma melhora no modelo, conforme os valores de AIC (Tabela 2). Verifica-se uma expressiva redução do AIC para todas as variáveis quando ajustadas. A variável número de segmentos nodais foi a variável que apresentou a maior redução do AIC quando se procedeu o ajuste no modelo. Neste caso, o número de segmentos nodais foi positivamente correlacionado com o número de brotos ( $r = 0,67$ ). Segundo Akaike (1974), o AIC é considerado uma medida relativa da qualidade de um modelo estatístico ajustado, podendo ser utilizado como uma ferramenta para escolha de modelos. Sendo que quanto menor o valor de AIC melhor será o modelo (BURNHAM; ANDERSON, 2002). A análise proposta é simples, porém não é frequentemente utilizada em cultura de tecidos. Essa metodologia tem grande potencial para ser aplicada de forma rotineira na análise de experimentos laboratoriais, conferindo resultados mais fidedignos.

Tabela 2 – Valores de F da análise de covariância para as variáveis comprimento radicular (CMR), altura de brotos (ABR), número de brotos (NBR) e número de segmentos nodais (NSN). Modelo ajustado pela distribuição *lognormal* e inserção da covariável (NBR), sendo exibida a análise com as variáveis originais e para as variáveis após o ajuste. Considerações realizadas para os três genótipos de lúpulo em seis meios de cultura

FV	GL	Variáveis				Variáveis ajustadas <sup>a</sup>		
		CMR	ABR	NBR	NSN	CMR	ABR	NSN
<b>G</b>	2	4,06*	5,49*	0,45 <sup>ns</sup>	0,18 <sup>ns</sup>	6,29*	6,47*	4,44*
<b>M</b>	5	2,88*	3,83*	1,00 <sup>ns</sup>	0,56 <sup>ns</sup>	1,00 <sup>ns</sup>	3,54*	1,06 <sup>ns</sup>
<b>G*M</b>	10	1,99*	1,55 <sup>ns</sup>	0,66 <sup>ns</sup>	1,92*	2,53*	2,16*	2,93*
<b>AIC</b>		433,72	690,33	610,38	868,08	256,82	356,12	219,19

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

\*Significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste F. <sup>ns</sup> não significativo. <sup>a</sup>: valores ajustados pela distribuição *lognormal* e pela covariável NBR. G: genótipo. M: meio de cultura. AIC: critério de informação de Akaike. FV: fontes de variação. GL: número de graus de liberdade.

Além disso, pode ser notado que houve aumento dos valores de F calculados, fato relacionado com a redução dos valores dos quadrados médios residuais (Tabela 2). O uso da covariância ajuda a controlar o erro experimental e aumentar a precisão para a comparação dos tratamentos, auxiliando na interpretação dos resultados (RAMALHO; FERREIRA; OLIVEIRA, 2000). Além disso, permite a eliminação do erro sistemático, o qual não tem controle do pesquisador e pode causar resultados e interpretações errôneas (HAIR et al., 2009). Segundo Coimbra et al. (2007), o fato de experimentos biológicos comumente quantificarem variáveis inter-relacionadas, faz com que uma análise que considere a dependência entre as variáveis (covariância) seja mais apropriada. Além disso as variáveis estão positivamente correlacionas com a variável número de brotos, de forma que o aumento de uma ocasiona simultaneamente o aumento da outra.

Antes do ajuste do modelo, a variável altura de brotos não apresentou significância para a interação genótipo x meio de cultura. Entretanto, após o ajuste, o teste F revelou diferença estatística para a interação dos fatores em todas as variáveis (Tabela 2). Para as variáveis comprimento radicular e número de segmentos nodais, a interação genótipo x meio de cultura foi altamente significativa (P= 0,0088 e P=0,0229). Este fato indica uma dependência entre os efeitos dos meios de cultura com os genótipos. Sendo assim, este resultado demanda a descrição qualitativa da interação, uma vez que a análise de covariância apresentada não pode ser conclusiva. Portanto, os efeitos simples do meio de cultura para cada nível do fator genótipo estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Análise da variação para comprimento radicular (CMR), altura de brotos (ABR) e número de segmentos nodais (NSN), com a decomposição da variação atribuível a meios de cultura, para cada nível de genótipo

FV	GL	CMR		ABR		NSN	
		F	Pr>F	F	Pr>F	F	Pr>F
Meio Chinook	5	2,05	0,07	4,99	<0,01	2,02	0,07
Meio Columbus	5	1,65	0,15	3,09	<0,01	4,15	<0,01
Meio HallertauerM	5	2,17	0,06	1,04	0,39	1,62	0,15

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

M1 (ausência de reguladores de crescimento), M2 (BAP+AIA+GA<sub>3</sub>), M3 (BAP+AIA), M4 (BAP), M5 (AIA) e M6 (GA<sub>3</sub>), sendo as doses de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,02 mg L<sup>-1</sup> de AIA e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>.

Pr: probabilidade pelo teste F.

H<sub>0</sub>: M1=M2=...=M6.

Os resultados indicam que as variações entre os meios de cultura, dentro dos genótipos avaliados foram significativas, exceto para o genótipo HallertauerM nas três variáveis (Tabela 3). Verifica-se também variação significativa para número de segmentos nodais e altura de brotos no genótipo Columbus. Enquanto que, a variável comprimento radicular não apresentou significância, independente do meio de cultura e do genótipo. Porém, pode-se analisar dentre as probabilidades apresentadas na Tabela 3, que algumas se aproximam do nível de significância 5%, sendo este um teste *F* médio. Uma questão importante a ser levantada, é de que o resultado do teste *F* é impreciso (global). Portanto, quando o objetivo é a verificação da probabilidade de contrastes específicos, não se deve levar em consideração resultados médios (CARDELLINO; SIEWERDT, 1992). Dessa forma, para as variáveis comprimento radicular, altura de brotos e número de segmentos nodais, a variação entre os meios de cultura, para os genótipos avaliados, pode ser analisada por meio das estimativas dos contrastes (Tabela 4), consistindo na decomposição de graus de liberdade da Tabela 3.

Os genótipos Chinook e Columbus tiveram o melhor desenvolvimento radicular quando cultivados em meios de cultura contendo combinações de reguladores de crescimento (contraste 2) (Tabela 4). O balanço entre as classes hormonais (principalmente auxina e citocininas) controlam o desenvolvimento vegetal e definem o órgão a ser formado (MERCIER, 2019). Neste caso a dose de AIA a 0,02 mg L<sup>-1</sup> combinado com a dose de BAP a 1,0 mg L<sup>-1</sup> proporcionou um balanço hormonal favorável a auxina, ocasionando o melhor desenvolvimento de raízes para os genótipos Chinook e Columbus. De fato, o AIA revela efeito sobre o enraizamento, além disso a segmentação dos explantes faz com que, naturalmente, ocorra um acúmulo desse hormônio na região basal do mesmo, já que o transporte de auxina segue um sentido polar.

Tabela 4 – Estimativas dos contrastes de efeitos atribuíveis a genótipos, para cada nível de meio de cultura para as variáveis comprimento radicular (CMR), altura de brotos (ABR) e número de segmentos nodais (NSN) regenerados no cultivo *in vitro*

FV	GL	CMR	ABR	NSN
<b>C1: M Chinook</b>	1	-2,19 <sup>ns</sup>	-2,49 <sup>ns</sup>	1,26 <sup>ns</sup>
<b>C1: M Columbus</b>	1	0,27 <sup>ns</sup>	-3,24 <sup>*</sup>	-1,34 <sup>ns</sup>
<b>C1: M HallertauerM</b>	1	2,44 <sup>ns</sup>	0,24 <sup>ns</sup>	0,65 <sup>ns</sup>
<b>C2: M Chinook</b>	1	0,94 <sup>ns</sup>	-0,74 <sup>ns</sup>	-0,04 <sup>ns</sup>
<b>C2: M Columbus</b>	1	1,57 <sup>*</sup>	0,56 <sup>ns</sup>	0,76 <sup>ns</sup>
<b>C2: M HallertauerM</b>	1	-0,90 <sup>ns</sup>	-0,98 <sup>ns</sup>	-0,80 <sup>*</sup>
<b>C3: M Chinook</b>	1	-0,01 <sup>ns</sup>	-0,27 <sup>ns</sup>	-0,05 <sup>ns</sup>
<b>C3: M Columbus</b>	1	-0,50 <sup>ns</sup>	-0,17 <sup>ns</sup>	-0,26 <sup>ns</sup>
<b>C3: M HallertauerM</b>	1	-0,43 <sup>ns</sup>	0,44 <sup>ns</sup>	0,17 <sup>ns</sup>
<b>C4: M Chinook</b>	1	0,09 <sup>ns</sup>	0,43 <sup>ns</sup>	0,31 <sup>ns</sup>
<b>C4: M Columbus</b>	1	-0,40 <sup>ns</sup>	0,39 <sup>*</sup>	0,14 <sup>ns</sup>
<b>C4: M HallertauerM</b>	1	-0,08 <sup>ns</sup>	0,26 <sup>ns</sup>	0,05 <sup>ns</sup>
<b>C5: M Chinook</b>	1	0,10 <sup>ns</sup>	0,69 <sup>*</sup>	0,36 <sup>*</sup>
<b>C5: M Columbus</b>	1	0,10 <sup>ns</sup>	0,57 <sup>*</sup>	0,40 <sup>*</sup>
<b>C5: M HallertauerM</b>	1	0,35 <sup>ns</sup>	-0,17 <sup>ns</sup>	-0,12 <sup>ns</sup>

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, \*\* significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

M: meio de cultura; C<sub>1</sub>: M1 vs. M2, M3, M4, M5, M6; C<sub>2</sub>: M2, M3 vs. M4, M5, M6; C<sub>3</sub>: M4 vs. M5; C<sub>4</sub>: M4 vs. M6; C<sub>5</sub>: M5 vs. M6.

M1 (ausência de reguladores de crescimento), M2 (BAP+AIA+GA<sub>3</sub>), M3 (BAP+AIA), M4 (BAP), M5 (AIA) e M6 (GA<sub>3</sub>), sendo as doses de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,02 mg L<sup>-1</sup> de AIA e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>.

O efeito de enraizamento pode ser intensificado ao se submeter o tecido a uma solução de auxina. Porém existem limitações quanto a explicação dos efeitos causados pelo balanço auxina/citocininas, como o conhecimento insuficiente sobre a capacidade de absorção, transporte e inativação pelo tecido vegetal, além das alterações dos níveis hormonais endógenos causados pela aplicação hormonal exógena (BARRUETO-CID, 2014; PERES; KERBAUY, 2019). Deveras, para que a combinação de auxina e citocinina seja eficiente deve haver um balanço entre elas, ou seja, doses que sejam suficientes para induzir o processo de enraizamento sem causar toxicidade ao explante, o que levaria a formação de calo. O uso combinado de auxina e citocinina também foi favorável ao desenvolvimento de raízes de outras espécies, como por exemplo, de *M. sergipenses* (coroa-de-frade) (BRAVO FILHO et al., 2018). Porém nem sempre os resultados são iguais ou similares, visto que a resposta é dependente de vários outros fatores, como tipo e idade do explante e condição nutricional da planta doadora. Por exemplo, Jardim et al. (2010), encontraram melhores resultados quando utilizaram apenas auxina no cultivo de *A. rosaeodora* (pau-rosa). Enquanto Machado et al. (2018), detectaram

que o melhor meio para o enraizamento de lúpulo foi o meio MS acrescido de apenas 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Os autores Roy, Leggett e Koutoulis (2001), ao avaliarem o percentual de explantes enraizados e número de raízes por explantes de lúpulo identificou que melhor meio de cultura foi o MS acrescido de AIA (5,71 mg L<sup>-1</sup>) mais IBA (4,9 mg L<sup>-1</sup>). Esses resultados só confirmam a verdadeira interação existente entre genótipo e meio de cultura, pois como sabe-se, o desenvolvimento dos explantes está envolvido tanto com fatores hormonais como fatores genéticos.

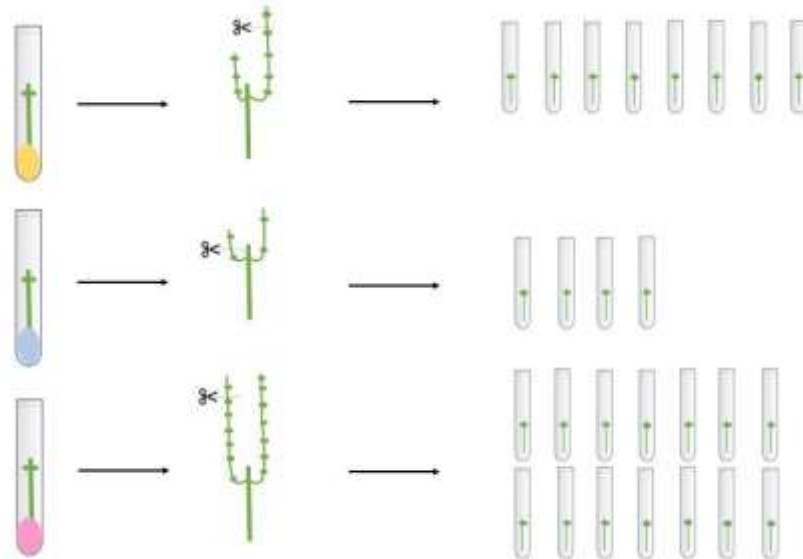
Ainda com relação aos genótipos Chinook e Columbus, o M5 (AIA) proporcionou o maior crescimento de brotos (4,43 e 4,99 cm) e número de segmentos nodais (5,70 e 5,90), possuindo diferença significativa quando comparado ao M6 (GA<sub>3</sub>), superando também as médias do uso isolado de BAP (contrastes 5 e 3) (Tabela 4). Frequentemente, em cultura de tecidos a adição de AIA ao meio de cultura visa a indução de primórdios radiculares, e não o crescimento de partes aéreas. Esse mesmo efeito de AIA sobre o crescimento de brotos também foram relatados no cultivo *in vitro* de abacaxi (BARBOZA; CALDAS, 2001), tomilho (RUBIN et al., 2007) e hortelã-pimenta (MORAIS; ASMAR; LUZ, 2014), indiciando que quando adicionado em baixas doses ele pode favorecer o alongamento de brotos de algumas espécies. Tal fato pode ser explicado pela acidificação que a auxina causa na parede celular, induzindo o afrouxamento da mesma, permitindo a maior absorção de água e de potássio e a consequente expansão celular. A auxina atua como um sinalizador para a divisão, alongamento e diferenciação celular, tendo um importante papel na dominância apical. Além disso, segmentação de brotos e a consequente quebra da dominância apical em plantas, faz com que a auxina (que segue seu fluxo do ápice para a base da planta) seja fornecida em menores concentrações, liberando a gema axilar da inibição de desenvolvimento. Desta forma, aumentando a altura dos brotos e o número de segmentos nodais. A cultura de tecidos utiliza frequentemente esta técnica, cultivando *in vitro* segmentos nodais diminutos, com gemas laterais, que em poucos dias se tornam uma planta completa (MERCIER, 2019).

Esse resultado obtido para altura de brotos e número de segmentos nodais é de extrema importância na cultura de tecidos. O número de segmentos nodais é uma importante variável para a micropropagação do lúpulo (bem como para outras culturas), sendo o segmento nodal o tipo de explante mais utilizado para a multiplicação de plantas. Cada segmento nodal de uma planta de lúpulo possui um nó que contém duas gemas, que darão origem a novos brotos. Desta forma a multiplicação se torna exponencial, sendo que quanto mais segmentos nodais, maior será o número de novas plantas (Figura 4). Além disso, o segmento nodal é um explante onde as chances de ocorrência de variação somaclonal são menores, pois normalmente ocorre



regeneração de plântulas sem a fase intermediária de calo, mantendo, dessa forma, a fidelidade genética.

Figura 4 – Explantes/segmentos nodais de lúpulo, cultivados em diferentes meios de cultura (representado pelas diferentes cores). Cada meio proporcionou um desenvolvimento do número de segmentos nodais, de maneira quanto maior o número de segmentos nodais mais novas plantas serão obtidas



Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

De forma geral, pode-se verificar que o M1 ocasionou baixo crescimento médio de brotos para os três genótipos (Chinook: 2,22 cm, Columbus: 2,38 cm e HallertauerM: 2,70 cm). Esses resultados são contrastantes com os de Machado et al. (2018), em que o meio sem a adição de fitormônios apresentou a maior média para altura de brotos de lúpulo. Possivelmente a concentração endógena de fitormônios dos genótipos avaliados seja insuficiente para estimular o crescimento dos brotos formados, uma vez que houve baixo desempenho em M1 para os três genótipos, demonstrando que o desenvolvimento dos explantes *in vitro* depende da interação e do balanço entre os fitormônios endógenos e exógenos do explante (MONFORT et al., 2012).

O genótipo HallertauerM não apresentou diferenças significativas para comprimento radicular e altura de broto, independentemente do meio de cultura utilizado. Contudo, apresentou a maior média para comprimento radicular (1,48 cm) quando cultivado em M1, enquanto que a maior média para altura de brotos (2,90 cm) foi quando cultivado em M4 (BAP) e obteve o maior número de segmentos nodais (7,60) quando cultivado no M6 (GA<sub>3</sub>) (Tabela 4).

Apesar de não ocorrerem diferenças significativas para o genótipo HallertauerM para as variáveis comprimento radicular e altura de broto, nota-se que os meios M2 (BAP+AIA+GA<sub>3</sub>) e M3 (BAP+AIA) reduziram significativamente o número de segmentos nodais, e limitaram o desenvolvimento radicular e o crescimento de brotos, quando comparado ao uso isolado dos reguladores de crescimento (contraste 2) (Tabela 4). A exposição dos explantes do genótipo HallertauerM à meios de cultura com mais de um regulador de crescimento pode ter sido excessivo, quando somado aos níveis endógenos de fitormônios, ocasionando um balanço hormonal desfavorável, reduzindo o seu desenvolvimento *in vitro*. Um fato importante a se destacar em relação ao M2 (BAP+AIA+GA<sub>3</sub>) é que este meio de cultura ocasionou a formação de calos em 27% dos explantes cultivados, independente do genótipo. O excesso de reguladores de crescimento no meio de cultura pode causar toxicidade ao explante, levando a divisão celular rápida e excessiva, havendo, portanto, a formação de calo.

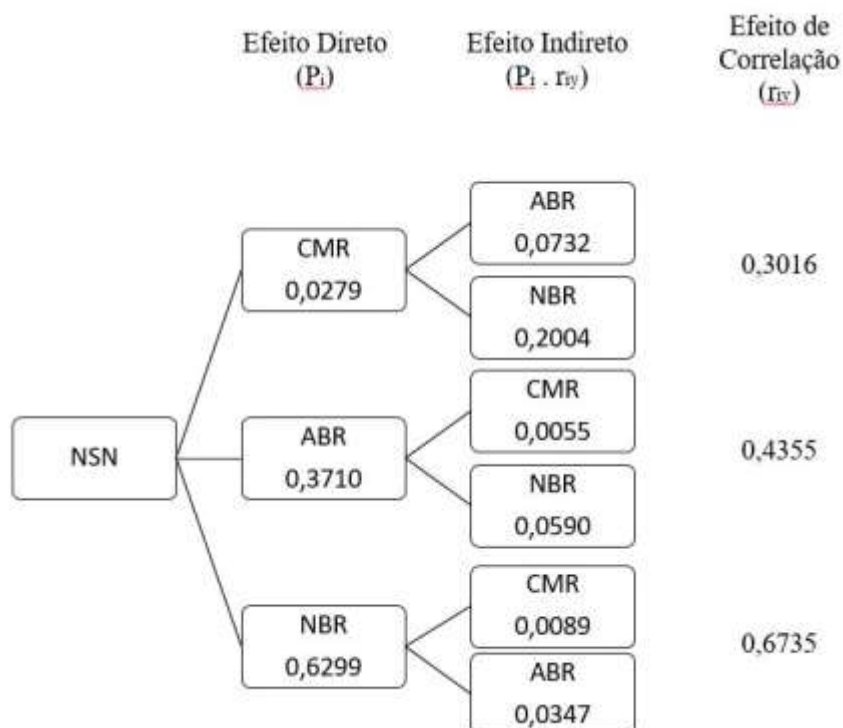
Uma observação importante é que pôde-se identificar os meios de cultura mais favoráveis ao desenvolvimento *in vitro* dos genótipos Chinook e Columbus e meios distintos para o genótipo HallertauerM, de acordo com a variável desejada (Tabela 4), pois como apresentado, a interação genótipo x meio de cultura foi significativa para todas as variáveis-resposta ajustadas (Tabela 2). Reconhecidamente, o desenvolvimento do explante está diretamente ligado a fatores genéticos (AZEVEDO; HOULLOU-KIDO; BENKO-ISEPPON, 2007; BRAHM; OLIVEIRA, 2004; BRAVO et al., 2008). Essa similaridade no desenvolvimento dos genótipos Chinook e Columbus pode ser explicada pela origem dos mesmos, ambos americanos, enquanto HallertauerM possui origem europeia.

Essa variação encontrada entre os genótipos em relação a origem dos mesmos é essencial para o melhoramento genético. As diferenças genéticas e morfológicas encontradas entre genótipos faz parte do processo evolutivo e domesticação das espécies, percebidas pela mudança do comportamento humano, que estão diretamente relacionadas com o desenvolvimento da agricultura (SERENO; WIETHÖLTER; TERRA, 2008). A Região Europeia é considerada o centro de diversidade da espécie, sendo os primeiros registros da planta europeus (LOSKUTOV, 1999). A cultura foi levada para a América do Norte por colonizadores Europeus. Desde então, os americanos lançam inúmeras variedades de lúpulo, cada vez mais produtivas. O fato do genótipo HallertauerM não ter seu desenvolvimento favorecido significativamente pelo meio de cultura, pode estar relacionado com sua adaptabilidade, assim como as plantas de lúpulo silvestres. Enquanto os genótipos de origem americana, que passaram por vários processos de seleção para aumento da produtividade, possuem limitação para se adaptarem e se desenvolverem bem em qualquer ambiente, sendo,

portanto, mais exigentes em nutrientes. Dessa forma, os genótipos de origem americana são menos eficientes na síntese de fitormônios, quando comparados aos genótipos de origem europeia, fazendo com que se desenvolvam melhor *in vitro* quando esses elementos (reguladores de crescimento) são prontamente disponibilizados para absorção e em concentração ideal.

Para o melhor entendimento do inter-relacionamento das variáveis-resposta avaliadas no crescimento *in vitro* de lúpulo, foi realizada uma análise de trilha (Figura 5). As variáveis CMR, ALTBR e NBR se associaram positivamente com a variável número de segmentos nodais. Porém, apenas a correlação entre variáveis-resposta não permite conclusões sobre o estudo de causa-efeito, pois se trata de uma medida de associação. A investigação da causa-efeito é realizada através dos coeficientes de trilha, ou seja, a partição da correlação em efeitos diretos e indiretos. As estimativas dos efeitos diretos e indiretos das variáveis CMR, ABR e NBR sobre a variável NSN são apresentados na Figura 5. A soma dos efeitos diretos e indiretos resulta no coeficiente de correlação. As variáveis NBR e ABR evidenciaram os maiores efeitos diretos, os maiores coeficientes de correlação e efeitos indiretos baixos com NSN. A variável NBR revelou um coeficiente de correlação alto (0,6735) e efeito direto alto (0,6299), indicando que a seleção truncada dessa variável pode proporcionar ganhos satisfatórios na variável NSN. A variável CMR apresentou o menor coeficiente de correlação (0,3016) e o menor efeito direto (0,0279). Dessa forma a seleção dessa variável pode ocasionar ganhos insatisfatórios para a variável NSN. Tal fato, provavelmente seja devido ao efeito indireto via NBR (0,2004) que está respondendo por aproximadamente 66% do efeito direto da variável CMR com o NSN. As variáveis NBR e ABR, de alta correlação positiva com a variável NSN e, com efeito direto no mesmo sentido, indica a presença de causa-efeito, ou seja, estas são as principais variáveis que determinam a alteração da variável NSN. Tal fato revela que a seleção direta sobre as variáveis NBR e ABR será eficiente para aumentar o NSN (CRUZ; REGAZZI, 1997).

Figura 5 – Estimativas dos efeitos diretos e indiretos das variáveis comprimento radicular (CMR), altura de brotos (ABR), número de brotos (NBR) sobre a variável número de segmentos nodais (NSN) (variável principal)



Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

### 3.5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos conclui-se que: *i*) a aplicação de uma distribuição da variável resposta apropriada e o uso de covariável para melhorar o modelo, pode ser considerada uma alternativa para melhoria significativa dos dados experimentais em cultura de tecidos; *ii*) para os genótipos de origem americana, Chinook e Columbus, o uso de AIA (0,02 mg L<sup>-1</sup>) e BAP (1,0 mg L<sup>-1</sup>) combinados proporcionou o melhor desenvolvimento radicular, e o uso de apenas AIA (0,02 mg L<sup>-1</sup>), ocasionou o melhor desempenho para altura de brotos e número de segmentos nodais; *iii*) o desenvolvimento *in vitro* do genótipo HallertauerM foi desfavorecido quando cultivado em combinações de reguladores de crescimento até então estudados; *iv*) a variável número de brotos está altamente correlacionada e com alto efeito direto sobre a variável número de segmentos nodais, desta forma, a seleção desta variável pode selecionar indiretamente o número de segmentos nodais, que possui grande importância na multiplicação de clones *in vitro*.

## 4 CAPÍTULO II: ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS EM LÚPULO OCASIONADAS PELA MICROPROPAGAÇÃO

### 4.1 RESUMO

A micropropagação é uma técnica promissora para o lúpulo (*Humulus lupulus*). Porém a estabilidade fenotípica das plantas micropropagadas da cultura é pouco conhecida. A caracterização das plantas micropropagadas se faz necessária, como uma forma de identificar possíveis variações que venham a ocorrer. O objetivo do presente trabalho foi verificar e caracterizar a ocorrência de variação somaclonal no processo de multiplicação *in vitro* de genótipos de lúpulo. Três genótipos foram estabelecidos *in vitro* e micropropagados durante cinco subcultivos. As variáveis-resposta foram selecionadas pelo método *Stepwise*, e submetidas a análise de variância multivariada (Manova), contrastes multivariados, coeficientes canônicos padronizados (CCP) e correlação intraclasses (t). A variação somaclonal foi detectada para os genótipos Chinook e Columbus, ambos de origem Americana. Não foram detectadas variações significativas para o genótipo HallertauerM, independente do subcultivo.

**Palavras-chave:** lúpulo, somaclones, repicagem, cultura de tecidos.

### 4.2 INTRODUÇÃO

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é uma planta herbácea, dioica e com hábito de crescimento trepador. Comercialmente os jardins de lúpulo são implantados apenas com plantas fêmeas, cujas flores formam uma estrutura denominada cone, responsável por produzir um composto denominado “lupulina”. Seu principal uso é na fabricação de cervejas, conferindo a bebida estabilidade e sabor característico. A cultura do lúpulo foi registrada no Brasil em 2019, e com isso, pesquisas estão sendo realizadas e seu cultivo, fomentado desde então.

O Brasil é um dos maiores produtores de cerveja no mundo, e a maior fração do lúpulo utilizado é proveniente de importações. Existe a necessidade de que o Brasil se torne autossuficiente na produção e comercialização de mudas. Porém a propagação por estaquia convencional é realizada apenas nos períodos em que a planta se encontra em plena brotação, e também é responsável por produzir mudas de baixa qualidade fitossanitária. Uma alternativa promissora para produzir mudas em grande escala, em pequeno espaço físico e independente da estação do ano, além de qualidade fitossanitária elevada das mudas, é a micropropagação. Esta é uma técnica de cultura de tecidos conhecida mundialmente como um processo de clonagem, sendo um método sofisticado de propagação assexuada. Além da produção em massa de plantas clonais, a micropropagação é também um estágio básico para outros procedimentos de cultura de tecidos, como para a eliminação de vírus (POSTMAN; DENOMA; REED, 2005), criopreservação (MARTÍNEZ; TAMÉS; REVILLA, 1999; REED et al., 2003) e transformação

genética (HORLEMANN et al., 2003), ponto este importante para o melhoramento genético de plantas, por exemplo. Contudo, essa técnica tem como grande limitação o frequente aparecimento de indivíduos distintos da planta matriz em um ou mais caracteres.

Até a década de 1960, poucos pesquisadores da área de cultura de tecidos preocupavam-se em analisar detalhadamente as plantas regeneradas. O motivo era simples: as plantas são originárias de células ou tecidos que não passam pela reprodução sexual, portanto a uniformidade genética não seria questionável. Admitiam-se que todas as variações observadas eram decorrentes de mutações. Porém, as mutações são eventos raros e casuais. Isto não se evidenciava na cultura de tecidos, em que um número expressivo de variantes era observado. Em razão disso, essa variação foi denominada de “somaclonal”, que acabou despertando grande interesse científico e apresentou potencial de uso no melhoramento genético de plantas (FERNANDES, 1987).

De acordo com a estabilidade e sua transmissão aos descendentes, a variação somaclonal pode ser classificada como: *i*) Variação somaclonal genética: termo empregado para expressar a variação espontânea de plantas regeneradas de cultura de células ou tecidos *in vitro*, e é transmitida por reprodução sexuada e assexuada, pois altera a sequência de bases nitrogenadas; e *ii*) Variação somaclonal epigenética: variação transitória em um fenótipo, sem alteração do genótipo, ou seja, não altera a sequência de bases nitrogenadas, não sendo transmitida por reprodução sexuada (BAIRU; AREMU; VAN STADEN, 2011; GAMBORG; PHILLIPS, 1995).

A carência de domínio dessa tecnologia, é responsável pelo abastecimento do mercado com mudas de qualidade duvidosa, podendo gerar baixa credibilidade frente aos agricultores devido à alta taxa de variação somaclonal (SANTOS; RODRIGUES, 2004). Alguns fatores, tais como: espécie, genótipo, tipo de explante, meio de cultura e número de subcultivos, são relatados como importantes para o desencadeamento da variação somaclonal. Raramente a variação encontrada no cultivo *in vitro* é benéfica, sendo normalmente indesejável (LARKIN; SCOWCROFT, 1981). Salvo exceções, como por exemplo, em espécies ornamentais, pois a obtenção de uma variante (variegação em folhas ou pétalas, formato de brácteas) permite a obtenção de uma nova cultivar.

Portanto, a caracterização das plantas de lúpulo obtidas por micropropagação e que posteriormente serão destinadas aos agricultores é de suma importância, como uma forma de monitorar as possíveis variações que venham a ocorrer, auxiliando na definição do número máximo de subcultivos que se pode realizar para um genótipo, sem que se perca a identidade genética do mesmo, realizando dessa forma uma pré-seleção de possíveis variantes, como já se

realiza em algumas culturas (KUNERT; M.BAAZIZ; CULLIS, 2003; SAHIJRAM; SONEJI; BOLLAMMA, 2003).

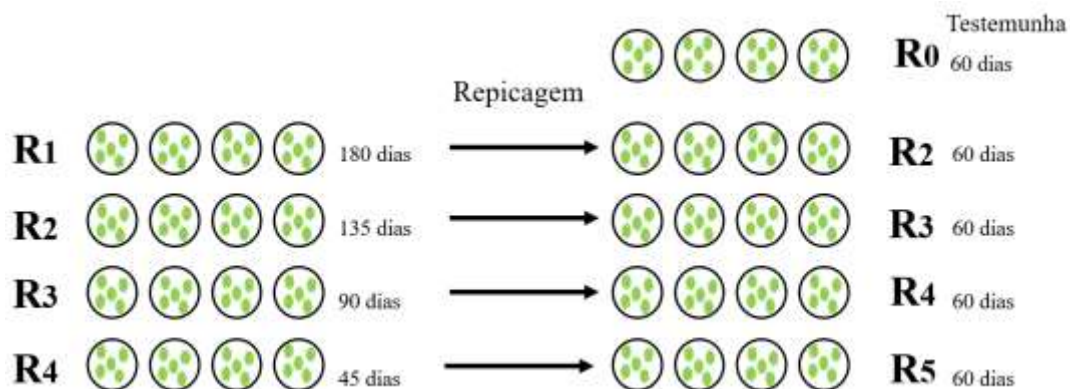
Dada a importância da micropropagação na obtenção de mudas superiores, e a escassez de informações sobre a cultura de tecidos em lúpulo, o objetivo do presente trabalho foi verificar e caracterizar a ocorrência de variação somaclonal no processo de multiplicação *in vitro* de genótipos de lúpulo.

#### 4.3 MATERIAL E MÉTODOS

##### 4.3.1 Genótipos utilizados e origem dos subcultivos

Foram utilizados como explantes os segmentos nodais de plantas femininas de *Humulus lupulus* de um genótipo de origem Europeia: Hallertauer Mitterlfrüh (HallertauerM) e dois genótipos de origem Americana: Columbus e Chinook, utilizando-se apenas uma planta matriz de cada genótipo. Primeiramente, para todos os genótipos foram obtidos quatro subcultivos (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub>). As repicagens ocorreram a cada 45 dias, portanto foram regeneradas plântulas com diferentes tempos de cultivo *in vitro* (180, 135, 90 e 45 dias, respectivamente). Após a obtenção dos quatro subcultivos, a testemunha de cada genótipo foi estabelecida *in vitro*, cultivando-se *in vitro* segmentos nodais, que não sofreram repicagens (R<sub>0</sub> – testemunha). No momento em que se estabeleceu a testemunha, foi realizada uma repicagem das plântulas dos subcultivos já estabelecidos. Dessa maneira, ao final obtivemos todas as plântulas com o mesmo tempo de cultivo *in vitro* (60 dias), proporcionando um desenvolvimento uniforme das plântulas (Figura 6). Os subcultivos R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> e R<sub>5</sub> foram contrastados com R<sub>0</sub> (testemunha).

Figura 6 – Representação esquemática utilizada para a obtenção das plântulas ao longo de cinco subcultivos



Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

### 4.3.2 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de vitaminas, 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 8 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem. O meio de cultura foi autoclavado por 20 minutos a 121 °C e posteriormente acondicionados em recipientes de vidro que foram vedados com papel alumínio.

### 4.3.3 Assepsia, isolamento e incubação

Para assepsia dos explantes foi utilizado hipoclorito de sódio (2,0 % de cloro ativo) com Tween 20 (3 gotas para cada 100 ml de solução). Os explantes permaneceram em agitação por 15 minutos. Após, foram lavados três vezes com água destilada estéril. A repicagem foi realizada quando as plântulas atingiram cerca de sete centímetros de altura (a cada 45 dias aproximadamente). Após o isolamento, os frascos foram mantidos em câmara de crescimento de cultivo *in vitro*, com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 24 ± 2°C.

### 4.3.4 Aclimação

A aclimação ocorreu aos 60 dias de cultivo *in vitro*. As plântulas foram retiradas dos frascos de cultivo, lavadas em água corrente para remoção do excesso de meio de cultura. Em seguida, as plântulas foram transferidas para recipientes plásticos (capacidade de 180 ml), preenchidos com substrato Carolina Soil + vermiculita expandida (1:1 v.v<sup>-1</sup>) umedecido, mantidos em casa de vegetação. As informações de temperatura e umidade foram verificadas e controladas por meio de um data logger com registros a cada duas horas. Para a manutenção da umidade, cada copo foi protegido por um saco plástico transparente durante 15 dias, que foi sendo aberto ao longo dos dias, de forma gradual, e o substrato foi umedecido conforme a necessidade da planta.

### 4.3.5 Variáveis-resposta

No momento da aclimação foram avaliadas as seguintes variáveis: número de brotos (NBR<sup>1</sup>), número de folhas (NF<sup>1</sup>), altura da plântula (ALT<sup>1</sup>, cm), número de raízes (NR<sup>1</sup>), número de segmentos nodais (NSN<sup>1</sup>), comprimento radicular (CR<sup>1</sup>, cm) e clorofila total (CL<sup>1</sup>, valor SPAD). Trinta dias após o transplante as mudas foram avaliadas quanto: número de brotos secundários (NBRS), número de folhas (NF<sup>2</sup>), altura da plântula (ALT<sup>2</sup>, cm), número de raízes (NR<sup>2</sup>), número de segmentos nodais (NSN<sup>2</sup>), comprimento radicular (CR<sup>2</sup>, cm), maior espaço entrenós (MEEN, cm), área foliar da segunda folha expandida (ARF, cm<sup>2</sup>), comprimento da



nervura principal da segunda folha expandida (COMPNP, mm), largura da segunda folha expandida (LARGF, mm), clorofila total (CL<sup>2</sup>), massa fresca da parte aérea (MFA, mg), massa fresca de raízes (MFR, mg), massa seca da parte aérea (MSA, mg) e massa seca de raízes (MSR, mg). As plantas foram secas em estufa, a 42 °C, por 24 horas e pesadas em balança de precisão (0,0001g). Quando necessário, as medidas foram realizadas com auxílio de paquímetro digital. As leituras de clorofila foram realizadas com um medidor de clorofila (Minolta® SPAD-502) e a área foliar foi mensurada utilizando o aplicativo para smartphone Petiole (SELEZNOV; KUZMENKO, 2013).

#### 4.3.6 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento utilizado foi blocos casualizados com quatro repetições, em esquema fatorial 5x3 (cinco subcultivos e três genótipos). Em cada unidade experimental foram tomadas amostras de 5 plantas. As variáveis-respostas foram submetidas ao método de seleção *Stepwise*. Neste procedimento, todas as variáveis são verificadas pela estatística *F*, e são selecionadas as variáveis que mais explicam o modelo.

Para entender a variação global dos tratamentos foi realizada uma análise de variância multivariada (Manova). Como regra geral para a análise multivariada, a equação do modelo estatístico é uma extensão do método univariado, apenas com os termos escalares substituídos por vetores. Cada termo do modelo possui dimensão “v” cujos elementos são identificados pelo mesmo símbolo do fator, com acréscimo de um “j” para identificar a variável-resposta correspondente. Considerou-se o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ikl} = \mu + b_i + g_k + s_l + g_{s_{kl}} + e_{ikl} + d_{ikl}$$

Sendo:  $Y_{ikl}$  é o vetor das observações das cinco variáveis-resposta do genótipo  $k$ , no subcultivo  $l$ , no bloco  $i$ ;  $\mu$  é o vetor de médias das cinco variáveis-resposta;  $b_i$  é o vetor dos efeitos diferenciais do bloco  $i$  para as cinco variáveis;  $g_k$  é o vetor dos efeitos diferenciais do genótipo  $k$  ( $k=1, 2, 3$ );  $s_l$  é o vetor dos efeitos diferenciais do subcultivo  $l$  ( $l=0, 2, \dots, 5$ );  $g_{s_{kl}}$  é o vetor dos efeitos diferenciais da interação genótipo e subcultivo;  $e_{ikl}$  refere-se ao efeito do erro experimental (entre as parcelas);  $d_{ikl}$  é o efeito associado ao erro amostral, obtido pelas repetições dentro das parcelas (medidas das cinco plantas).

Após análise de variância multivariada, foram testados contrastes multivariados, previamente definidos: C<sub>1</sub>: subcultivo R<sub>0</sub> vs subcultivo R<sub>2</sub>; C<sub>2</sub>: R<sub>0</sub> vs R<sub>3</sub>; C<sub>3</sub>: R<sub>0</sub> vs R<sub>4</sub>; C<sub>4</sub>: R<sub>0</sub> vs R<sub>5</sub>. Em cada contraste, foram obtidos valores de coeficientes canônicos padronizados (CCP), visando identificar a contribuição de cada variável-resposta. Os valores de CCP são

interpretados da seguinte maneira: *i*) valores positivos indicam efeito de separação entre tratamentos e variáveis com valores mais elevados de CCP apresentam maior peso na diferenciação; *ii*) valores negativos são interpretados de forma semelhante, porém com efeito oposto, ou seja, expressam efeito de supressão da variável-resposta em questão, ou seja, indicam semelhança entre os tratamentos (CRUZ-CASTILLO et al., 1994; HAIR et al., 2009).

Como medida de confiabilidade calculou-se o coeficiente de correlação intraclasse (*t*) para cada variável-resposta, por meio das classificações hierárquicas:

$$t = \frac{\hat{\sigma}^2 g}{\hat{\sigma}^2 g + \hat{\sigma}^2 s + \hat{\sigma}^2 p}$$

Sendo:  $\hat{\sigma}^2 g$  é a estimativa do componente da variância entre os genótipos; e  $\hat{\sigma}^2 s$  é a estimativa do componente da variância entre subcultivos dentro de genótipo;  $\hat{\sigma}^2 p$  é a estimativa entre plantas dentro de subcultivos.

As análises foram obtidas por meio do software SAS 9.4. Foram utilizados os procedimentos *Proc reg* (Stepwise), *Proc glm* (Manova, contrastes e CCP) *Proc mixed* (componentes da variância para as classificações hierárquicas).

#### 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A mensuração de diferentes variáveis-respostas em uma mesma unidade experimental, nos permite submeter todas as variáveis, simultaneamente, à mesma análise estatística (multivariada) (HAIR et al., 2009). O uso de análises multivariadas vem se tornando rotineiro, devido aos avanços em programas computacionais (FERREIRA, 2008; SILVA; MACHADO, 2001). Além disso, os contrastes multivariados permitem testar hipóteses, trabalhando com todas as variações existentes, comparando tratamentos específicos, e verificando a contribuição de cada variável resposta, que é determinada em cada contraste ao se utilizar os CCP (RENCHER, 2002). O uso da análise multivariada nesse trabalho, pode ainda ser justificado pelo fato de que as relações entre as diferentes variáveis-resposta para a cultura do lúpulo não são plenamente conhecidas.

Porém, um elevado número de variáveis pode dificultar a elucidação das verdadeiras causas de variação. Uma das explicações se deve a presença de multicolinearidade, que se faz presente quando existe algum nível de inter-relação entre as variáveis avaliadas. Os danos causados pela multicolinearidade não se devem somente pela sua presença, mas principalmente, pelo grau com que ela se manifesta. De acordo com Montgomery e Peck (1981), o grau de multicolinearidade da matriz pode ser estabelecido com base no número de condições (razão

entre o maior e o menor autovalor da matriz). Dessa forma, quando o número de condições for menor do que 100 a multicolinearidade é considerada fraca, entre 100 e 1000 é considerada de moderada a forte, e quando superior a 1000 a multicolinearidade é considerada severa. A presença de multicolinearidade severa pode afetar os coeficientes canônicos, não representando a verdadeira relação entre as variáveis (HAESBAERT, 2016), além de causar sérios efeitos na aplicabilidade geral do modelo estimado (HAIR et al., 2009).

As variáveis-resposta avaliadas apresentaram multicolinearidade severa, com um número de condições de 1.144,64, o que constitui um sério problema para a análise. Os autores Coimbra et al. (2005), apresentam o método *Stepwise* como uma alternativa prática para solucionar este problema, identificando e eliminando as variáveis que estão inflacionando a multicolinearidade, e selecionando as variáveis que maximizam a estimativa do coeficiente de determinação e eliminando as variáveis que distorcem a real informação. O método consiste em passos de adição e remoção de variáveis, de maneira sucessiva, até que não se tenham mais variáveis a serem retiradas e inseridas no modelo. A seleção é feita com base em um critério, sendo, neste caso, utilizado a estatística *F* (ZIMMER; ANZANELLO, 2014).

Após a seleção das variáveis, observou-se a desinflação da multicolinearidade, obtendo-se um número de condições de 56,63 (fraca), o que não constitui um problema sério para a interpretação dos resultados. As variáveis selecionadas foram: *i*) MEEN; *ii*) ALT<sup>1</sup>; *iii*) ARF; e *iv*) MFA, as quais contribuíram de maneira significativa para o aumento do coeficiente de determinação, além da variável básica *v*) (ALT<sup>2</sup>). Essas variáveis foram utilizadas para inferir sobre possíveis variações causadas pelos efeitos de genótipos e subcultivos. A seleção deste conjunto de variáveis proporciona a redução de custos, recursos humanos e tempo na condução de ensaios experimentais (ANDERSEN; BRO, 2010; GAUCHI; CHAGNON, 2001; PIERNA et al., 2009), uma vez que não há necessidade de mensurar as demais variáveis, visto que o modelo continuou com elevado valor de R<sup>2</sup> (0,91), sendo esta uma forma de avaliar a qualidade do ajuste do modelo.

Além disso, em experimentos com mais de uma observação por unidade experimental (como é o caso de experimentos que avaliam clones, com avaliação de inúmeras plântulas), são gerados além do erro experimental, o erro amostral. Dessa forma, a análise de variância multivariada apresenta, além dos efeitos principais (G e S) e da interação entre eles (G\*S), a partição dos erros experimental (entre) e amostral (dentro). A razão entre os erros entre e dentro revelou efeito significativo, indicando uma variação dentro das parcelas (Tabela 5), ou seja, presença de alterações fenotípicas em plantas micropropagadas de lúpulo.

Tabela 5 – Resumo da análise de variância multivariada para as variáveis respostas: altura de broto (momento da aclimação e após a aclimação) (cm), maior espaço entrenó (cm), área foliar (cm<sup>2</sup>) e massa fresca da parte aérea (mg)

Fontes de variação	NGL	DGL	U
<b>Bloco (B)</b>	15	105,30	0,41 <sup>**</sup>
<b>Genótipo (G)</b>	10	8,00	0,01 <sup>*</sup>
<b>Subcultivo (S)</b>	20	14,22	0,05 <sup>ns</sup>
<b>G*S</b>	40	168,43	0,11 <sup>**</sup>
<b>Erro Entre (e)</b>	210	-	-
<b>Erro Dentro (d)</b>	1080	-	-
<b>Razão e/d</b>	210	1059,40	0,27 <sup>**</sup>

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

\*\* Significativo a 1% de probabilidade de erro; \* Significativo a 5% de probabilidade de erro; <sup>ns</sup> não significativo; NGL: graus de liberdade do numerador; DGL: graus de liberdade do denominador; U: valor do teste de Lambda de Wilks; e: erro entre; d: erro dentro.

A existência de variação dentro das parcelas, indicada pela significância na razão entre os erros (Tabela 5), mostra a importância da decomposição dos erros na análise de variância (ALMEIDA et al., 2011). Como mais de uma observação foi obtida na mesma unidade experimental, o procedimento mais correto é considerar todas as observações (medida de todas as plantas e não sua média), evitando dessa forma que o resíduo experimental seja estimado de forma errônea, e conseqüentemente afetando os testes de hipóteses.

A diferença verificada para o fator genótipo (Tabela 5), indica variabilidade genética entre os genótipos para as variáveis avaliadas em condições de cultivo *in vitro*, e pode ser explicada principalmente, pelas origens dos mesmos, Americana e Europeia. Os genótipos Americanos (Chinook e Columbus) foram criados com uma base genética mais restrita, quando comparado ao de origem Europeia (HallertauerM), visto que os primeiros registros da planta são oriundos da Europa. Desde a chegada da cultura do lúpulo na América, os americanos criaram inúmeras variedades, selecionando as mais produtivas e com qualidade de alfa e beta ácidos superiores às já existentes.

A interação G\*S também apresentou variação significativa, indicando que pelo menos um dos genótipos difere em algum nível do fator subcultivo. Dessa forma, para melhor elucidação dos efeitos causados pelos fatores, o próximo passo a ser realizado é a análise dos efeitos simples. A análise do fator subcultivo, separadamente, para cada genótipo testado (subcultivo dentro de genótipos), para todas as variáveis-respostas analisadas simultaneamente é apresentada na Tabela 6. O fato de buscarmos fidelidade genotípica no processo de micropropagação, os efeitos simples dos subcultivos dentro de genótipo nos auxiliam nessa investigação, indicando se há ocorrência de variação somaclonal para determinado genótipo e em quais subcultivos ela é detectada.

Tabela 6 – Teste multivariado dos efeitos simples: subcultivos dentro de genótipo. Apresentação dos valores do teste F para a comparação dos contrastes testados pela estatística multivariada de Wilk's (U)

<b>Genótipo</b>	<b>Efeito</b>	<b>Valor U</b>	<b>Valor F</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>Chinook</b>	<b>C1: R<sub>0</sub> vs R<sub>2</sub></b>	0,5290	7,30	<0,0001
	<b>C2: R<sub>0</sub> vs R<sub>3</sub></b>	0,6223	4,98	0,0012
	<b>C3: R<sub>0</sub> vs R<sub>4</sub></b>	0,7460	2,80	0,0290
	<b>C4: R<sub>0</sub> vs R<sub>5</sub></b>	0,6243	4,94	0,0013
<b>Columbus</b>	<b>C1: R<sub>0</sub> vs R<sub>2</sub></b>	0,4147	11,58	<0,0001
	<b>C2: R<sub>0</sub> vs R<sub>3</sub></b>	0,8862	1,05	0,4002
	<b>C3: R<sub>0</sub> vs R<sub>4</sub></b>	0,8948	0,96	0,4508
	<b>C4: R<sub>0</sub> vs R<sub>5</sub></b>	0,9359	0,56	0,7284
<b>Hallertauer M.</b>	<b>C1: R<sub>0</sub> vs R<sub>2</sub></b>	0,9485	0,45	0,8142
	<b>C2: R<sub>0</sub> vs R<sub>3</sub></b>	0,9124	0,79	0,5638
	<b>C3: R<sub>0</sub> vs R<sub>4</sub></b>	0,9615	0,33	0,8929
	<b>C4: R<sub>0</sub> vs R<sub>5</sub></b>	0,9145	0,77	0,5791

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

$$U = \frac{|E|}{|E + H|}$$

Todas as comparações envolvendo o genótipo Chinook foram significativas, revelando variação entre os clones obtidos nos diferentes subcultivos. Igualmente, foi observado para o genótipo Columbus, porém neste genótipo a variação foi detectada apenas no segundo subcultivo (C<sub>1</sub>). De modo contrário, o genótipo HallertauerM mostrou-se capaz de manter suas características fenotípicas ao longo de cinco subcultivos, não revelando diferença significativa para nenhum dos contrastes realizados (Tabela 6).

Compreendendo a variação intrínseca dos subcultivos dentro de cada genótipo, torna-se necessário compreender quais variáveis contribuíram de modo relevante para a significância da variação entre os vetores de médias dos tratamentos. A variação entre os subcultivos, para cada genótipo, pode ser analisada de forma minuciosa mediante os coeficientes canônicos padronizados (CCP) para as cinco variáveis-resposta separadamente para cada contraste testado (Tabela 7).

Tabela 7 – Coeficientes canônicos padronizados (CCP) e a estatística de teste da razão de verossimilhança para as variáveis-respostas: altura da plântula no momento da aclimação (ALT<sup>1</sup>), altura de planta após aclimação (ALT), maior espaço entrenó após aclimação (MEEN), área foliar após aclimação (ARF) e massa fresca da parte aérea após aclimação (MFA)

Genótipo	Contrastes	U	ALT <sup>1</sup>	ALT	MEEN	ARF	MFA
<b>Chinook</b>	<b>C1: R<sub>0</sub> vs R<sub>2</sub></b>	0,53**	0,87	-2,89	0,03	0,54	0,72
	<b>C2: R<sub>0</sub> vs R<sub>3</sub></b>	0,62**	1,27	-3,03	-0,08	0,78	1,07
	<b>C3: R<sub>0</sub> vs R<sub>4</sub></b>	0,74*	0,93	-2,95	0,94	0,41	0,53
	<b>C4: R<sub>0</sub> vs R<sub>5</sub></b>	0,62**	1,27	-2,97	0,15	0,55	0,49
<b>Columbus</b>	<b>C1: R<sub>0</sub> vs R<sub>2</sub></b>	0,41**	1,13	0,17	0,55	-0,43	-0,63
	<b>C2: R<sub>0</sub> vs R<sub>3</sub></b>	0,89 <sup>ns</sup>	0,49	1,29	-0,91	0,22	-0,56
	<b>C3: R<sub>0</sub> vs R<sub>4</sub></b>	0,89 <sup>ns</sup>	0,81	-2,81	0,78	0,23	0,61
	<b>C4: R<sub>0</sub> vs R<sub>5</sub></b>	0,93 <sup>ns</sup>	-0,24	0,84	-1,21	0,55	0,44
<b>Hallertauer M.</b>	<b>C1: R<sub>0</sub> vs R<sub>2</sub></b>	0,95 <sup>ns</sup>	2,37	-3,10	0,44	0,76	-0,37
	<b>C2: R<sub>0</sub> vs R<sub>3</sub></b>	0,91 <sup>ns</sup>	0,18	-1,42	-0,49	1,15	0,79
	<b>C3: R<sub>0</sub> vs R<sub>4</sub></b>	0,96 <sup>ns</sup>	2,00	-2,15	-0,28	1,23	-0,44
	<b>C4: R<sub>0</sub> vs R<sub>5</sub></b>	0,91 <sup>ns</sup>	2,14	-3,10	-0,19	0,98	0,07

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

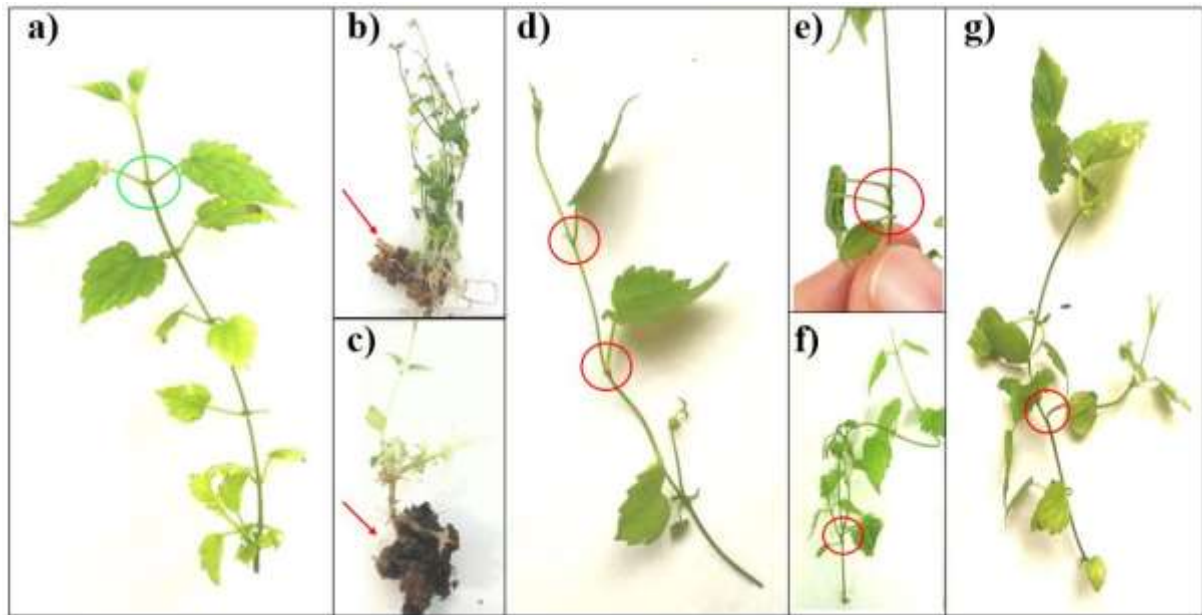
\*\* Significativo a 1% de probabilidade de erro; \* Significativo a 5% de probabilidade de erro; <sup>ns</sup> não significativo; U: valor do teste de Lambda de Wilks.

A micropropagação ocasionou variação nas características morfológicas avaliadas do genótipo Chinook em todos os subcultivos avaliados, sugerindo baixa estabilidade fenotípica. A variável que mais influenciou para diferenciar os subcultivos R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> e R<sub>5</sub> da testemunha R<sub>0</sub> foi a altura de plântula no momento da aclimação (ALT<sup>1</sup>), indicando que houve diferença significativa entre os clones enquanto cultivados *in vitro*, provavelmente devido aos estresses do próprio cultivo *in vitro* (ambiente), visto que após a aclimação a altura das plantas (ALT<sup>2</sup>) foi a variável que mais aproximou os tratamentos (Tabela 7). Além disso, esse mesmo genótipo, respondeu ao cultivo *in vitro* com a formação de calos, e a passagem por essa fase intermediária pode aumentar as chances de ocorrer variação somaclonal, pois a rápida divisão celular (mitose) pode afetar diretamente a integridade genética e/ou fenotípica (BAIRU; AREMU; VAN STADEN, 2011; ISRAELI; LAHAV; REUVENI, 1995).

A presença do efeito significativo em todos os contrastes realizados para o genótipo Chinook, pode ser explicada pela contribuição positiva e significativa, fundamentalmente da variável altura da plântula no momento da aclimação (ALT<sup>1</sup>), que reduziu ao longo dos subcultivos comparativamente ao R<sub>0</sub> (médias observadas). Porém, após a aclimação, a variável altura das plantas (ALT<sup>2</sup>) passou a ser a variável que mais aproximou os tratamentos (Tabela 7). Estes resultados podem ser corroborados pela avaliação visual de algumas anormalidades morfológicas das plântulas (Figura 7). Foram observados neste genótipo a

formação de calos na base do explante durante os subcultivos  $R_2$  e  $R_3$  (Figura 7 b, c), surgimento de brotos com apenas uma folha por nó (Figura 7d), nós com três folhas (Figura 7e) e emissão de brotos e folhas sem possuírem origem axilar (Figura 7 f, g).

Figura 7 – Plantas de lúpulo Chinook micropropagadas a) planta com desenvolvimento normal, b, c) formação de calo na base do explante nos subcultivos  $R_2$  e  $R_3$ , d) broto com apenas uma folha por nó, e) emissão de três folhas em um único nó, f, g) emissão de folha e broto sem origem da gema axilar



Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Visto que as folhas de uma planta normal de lúpulo são emitidas aos pares em cada nó e posicionadas de forma oposta (Figura 7a), podemos dizer que 5 % das plantas avaliadas desse genótipo apresentaram desenvolvimento anormal até o quinto subcultivo, ou seja, são eventos de rara ocorrência. Em outras culturas, como a bananeira, detectou-se 10% de plantas anormais até o nono subcultivo (SANTOS; RODRIGUES, 2004), para *Heliconia Bihai*, até o  $R_{18}$ , houve 61,40 % de variantes regenerados *in vitro* (RODRIGUES, 2008), o que inviabiliza o uso da micropropagação para a espécie (ausência de identidade genética). Para abacaxizeiro ornamental, 15,93 % das plantas regeneradas foram albinas e 3,94 % apresentaram variação nas folhas (RODRIGUES et al., 2007). Para a cultura do morangueiro, cuja micropropagação é muito utilizada, não foram detectadas variações somaclonais para dois genótipos (Vila Nova e Oso Grande) (CALVETE et al., 2009).

Com relação ao genótipo Columbus, a diferença detectada no contraste  $C_1$  ( $R_0$  vs  $R_2$ ) foi atribuída à altura da plântula no momento da aclimação ( $ALT^1$ ) (1,13). De modo contrário, a massa fresca da parte aérea foi a variável que mais contribuiu para aproximar estes subcultivos

(-0,63). Porém, essa variação presente em R<sub>2</sub> em relação a testemunha (C<sub>1</sub>), não foi detectada nos demais subcultivos (comparações C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>), indicando que o genótipo foi capaz de recuperar e manter sua estabilidade fenotípica.

Os somaclones podem, ainda, estabilizar suas características morfológicas nos ciclos subsequentes da micropropagação (JAIN, 1993), ou seja, durante o cultivo *in vitro*, como foi o caso do genótipo Columbus. O genótipo apresentou variação em R<sub>2</sub>, e nos subcultivos seguintes essa variação não foi mais detectada, indicando que o genótipo foi capaz de recuperar e manter sua estabilidade fenotípica. Para afirmar que o genótipo recuperou e manteve a sua estabilidade fenotípica se faz necessária avaliações durante o desenvolvimento da planta, pois as variações somaclonais podem se manifestar mais tardiamente.

Ambos os genótipos de origem Americana, Chinook e Columbus, apresentaram variação somaclonal. A variação somaclonal em lúpulo, pode ter sua ocorrência causada pelas condições do cultivo *in vitro*, principalmente ao estresse oxidativo, causado pelo uso de agentes esterilizantes (hipoclorito) e lesões no tecido ocasionado pelas sucessivas repicagens (PEREDO; ARROYO-GARCÍA; REVILLA, 2009). O fato da variação somaclonal não ter sido mais detectada a partir de R<sub>3</sub> para Columbus, pode ser explicada pela capacidade das células vegetais em modular o genoma (plasticidade), e mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA, que atua diretamente na estrutura da cromatina, e pode ser desencadeada por alguns fatores como ambiente e idade da cultura. Esse tipo de comportamento da planta tem sido apontado como uma forma de tolerância e adaptação do genótipo ao estresse causado pelo cultivo *in vitro* (BOYKO; KOVALCHUK, 2011; BRUCE et al., 2007; CHINNUSAMY; ZHU, 2009; RICHARDS, 2011).

Apenas o genótipo HallertauerM (origem Europeia) se manteve estável ao longo dos cinco subcultivos, quando comparado com a testemunha. Esse fato que pode ser explicado pela maior adaptabilidade do genótipo (como discutido no Capítulo anterior), visto que ele passou pelos mesmos processos de cultivo dos outros dois genótipos. Podemos considerar o genótipo HallertauerM como mais rústico, pelo fato de manter suas características, mesmo em ambientes de grande estresse, como o da cultura de tecidos. Isso pode estar diretamente relacionado aos locais de origem dos genótipos, visto que a Europa é considerada o centro de diversidade da espécie (LOSKUTOV, 1999; ROCHA, 2005).

A diferente capacidade de um genótipo em se manter estável ao longo do processo de multiplicação *in vitro* também foi confirmada para bananeira (SANTOS; RODRIGUES, 2004) e comigo-ninguém-pode (SHEN et al., 2007). Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam a importância da ocorrência de variação somaclonal em genótipos de lúpulo. É comum os



genótipos responderem ao processo de micropropagação de maneira diferente (BAIRU; AREMU; VAN STADEN, 2011). Se os genótipos são submetidos às mesmas condições de ambiente e mesmo assim respondem de maneira distinta, há evidências de que a variação somaclonal revele componente genotípico. A instabilidade genotípica detectada pode ser considerada um importante fator, visto que existe a possibilidade de obtenção de um novo genótipo, com característica diferente em comparação a planta de matriz. Além disso, a cultura de tecidos se torna uma alternativa promissora para gerar variabilidade genética em plantas (LEE; LEE; LIM, 2002; ORBOVIĆ et al., 2008; RASHEED et al., 2003; WANG et al., 2007), além de ser uma etapa vital para a transformação genética.

Teoricamente, a micropropagação não deveria causar nenhuma variação, pois se trata de um mecanismo de reprodução assexuado, envolvendo apenas mitose (BAIRU; AREMU; VAN STADEN, 2011). Porém, o processo de repicagem pode ser o suficiente para causar variação somaclonal, podendo alterar apenas um único par de bases nitrogenadas, (BRETTELL et al., 1986), modificação em sequências repetidas (KIDWELL; OSBORN, 1993; LAPITAN; SEARS; SILL, 1988), perda de DNA cloroplástico (DAY; ELLIS, 1984) tornando as plantas albinas, reorganização do DNA mitocondrial (LI et al., 1988; SHIRZADEGAN et al., 1989), além de alterações nos padrões de metilação do DNA (MÜLLER et al., 1990). Ainda, existe a possibilidade de que essas alterações apareçam simultaneamente (SYMILLIDES; HENRY; DE BUYSER, 1995). Algumas dessas modificações podem ocasionar alterações no fenótipo da planta, possibilitando a visualização direta. No entanto, a qualificação de cada variante só se torna possível mediante análises moleculares (uso de nucleases sensíveis à metilação, SNP (polimorfismo de um único nucleotídeo), microssatélites, RFLP (polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição) (BAIRU; AREMU; VAN STADEN, 2011).

Um indicativo da presença ou não de semelhança entre indivíduos diz respeito ao coeficiente de correlação intraclasse ( $t$ ). Este coeficiente indica a semelhança dos indivíduos dentro das classes, sendo representado por uma razão de componentes da variância. De acordo com as magnitudes dos componentes de variância, deve-se aumentar o número de plantas avaliadas para se obter maior precisão nas avaliações (Tabela 8). Observam-se valores de  $t$  satisfatórios apenas para ALT<sup>2</sup> e MEEN (0,40 e 0,49), enquanto que para as demais variáveis os valores de  $t$  foram considerados baixos. Se o coeficiente  $t$  é muito baixo ( $< 0,40$ ), indica que a variação entre subcultivos e entre as plantas dentro da unidade experimental é maior do que a variação entre genótipos. Assim, quanto menor o coeficiente de correlação intraclasse obtido, maior é o número de plantas necessárias para avaliação.

Tabela 8 – Coeficiente de correlação intraclasse (t) e para as variáveis-respostas: altura da plântula no momento da aclimação (ALT<sup>1</sup>), altura de planta após aclimação (ALT<sup>2</sup>), maior espaço entrenó após aclimação (MEEN), área foliar após aclimação (ARF) e massa fresca da parte aérea após aclimação (MFA), calculado através da estimativa dos componentes da variância (entre e dentro)

Causa de variação	Componentes da variância				
	ALT <sup>1</sup>	ALT <sup>2</sup>	MEEN	ARF	MFA
<b>Entre Genótipos</b>	1,42	7,85	0,46	0,23	4037,78
<b>Entre subcultivos dentro de genótipos</b>	2,18	3,46	0,08	0,01	2022,58
<b>Entre clones dentro de unidade experimental</b>	4,45	8,51	0,41	0,59	10374,01
<b>Coeficiente de correlação intraclasse (t)</b>	0,18	0,40	0,49	0,28	0,25

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Quando os valores são mensurados em diferentes indivíduos, porém de uma origem comum, o coeficiente de correlação intraclasse permite obter uma ideia de intensidade com que os alelos são transmitidos, dessa forma, refletindo o coeficiente de herdabilidade. Os maiores valores, como os obtidos para MEEN (0,49) e ALT<sup>2</sup> (0,40), demonstram alto controle genético na expressão desses caracteres e pouca influência do ambiente, indicando condições adequadas para possível seleção de clones superiores com tais características.

#### 4.5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos conclui-se: *i)* os genótipos de lúpulo de origem Americana, Chinook e Columbus, apresentaram maior disposição para ocorrência de variação somaclonal; *ii)* a formação de calo durante a micropropagação do genótipo Chinook pode ter sido responsável pela anormalidade em 5% das plantas regeneradas; *iii)* o genótipo HallertauerM (Europeu) se manteve estável ao longo de cinco subcultivos, o que permite a sua multiplicação em larga escala.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O lúpulo pode ser considerado como uma espécie de exploração recente no Brasil, com potencial para ser utilizado como uma fonte alternativa de renda, devido à grande demanda existente pelos cones para a fabricação de cerveja, principalmente as artesanais, tendo em vista que essa bebida tem ganhado o gosto dos brasileiros, e ao elevado valor econômico da mesma, valendo em média R\$ 300,00 o quilograma de cones.

A obtenção de mudas de lúpulo com qualidade fitossanitária superior, é possível através da micropropagação. Os segmentos nodais, utilizados como explantes, dos três genótipos avaliados, Chinook, Columbus e HallertauerM demonstraram excelente capacidade para regenerar plantas completas quando cultivados *in vitro*.

No momento do estabelecimento da cultura *in vitro*, o caractere de maior importância é o número de segmentos nodais, pois é esta parte da planta que será utilizada para a multiplicação em escala desses clones. Então dessa forma, com o estudo realizado, foi possível verificar que os genótipos Chinook e Columbus, ambos de origem americana, tiveram melhor desempenho para esta variável quando cultivados em meio MS contendo 0,02 mg L<sup>-1</sup>. O fato do genótipo HallertauerM não ter sido influenciado de maneira significativa e positiva para este caractere, em nenhum dos meios avaliados, e pensando na redução de custos para a produção de mudas, isso nos indica que ele pode ser estabelecido em meio MS com ausência de reguladores de crescimento.

Por vezes, a variável número de segmentos nodais pode ser um pouco mais onerosa de se mensurar, quando comparada à variável número de brotos. Dessa forma, o estudo da inter-relação das variáveis-respostas nos indicou que a seleção truncada da variável número de brotos proporcionará ganhos satisfatórios para a variável número de segmentos nodais.

Mas ainda outro ponto importante e crítico da micropropagação é a ocorrência de variação somaclonal, onde além do genótipo utilizado, outro fator que aumenta as taxas de ocorrência dessa variação, é o número de subcultivos realizados. Dessa forma, os genótipos foram avaliados durante cinco subcultivos, e as plantas avaliadas quanto a ocorrência de variações fenotípicas ocorridas pela variação somaclonal.

O genótipo HallertauerM se manteve fenotipicamente estável ao longo de cinco subcultivos, demonstrando ser um genótipo mais rústico, pois manteve suas características mesmo quando submetido a condições estressantes, como é o caso da cultura de tecidos. Assim como ocorreu no primeiro capítulo deste trabalho, onde, de maneira geral, foi capaz de desenvolver de igual forma, independente do meio de cultura utilizado.

Os genótipos de origem americana, Chinook e Columbus, apresentaram variação somaclonal. Sendo que a ocorrência se deu, de maneira mais proeminente, no genótipo Chinook, pois para este genótipo foram detectadas variações ao longo dos cinco subcultivos, e ainda, formação de calo durante o cultivo *in vitro*, com regeneração de plântulas anormais foram possíveis de serem visualizadas.

Desta forma, para o sucesso da micropropagação destes genótipos avaliados, sugere-se que não sejam utilizadas para a repicagem plântulas que formaram calos, e que todas as plântulas anormais sejam descartadas, como maneira preventiva de se evitar a propagação de plantas somaclonais. E de maneira mais específica para o genótipo Chinook, aconselha-se o acompanhamento do desenvolvimento das mudas durante o período de aclimação, descartando plantas anormais. Mais estudos necessitam ser realizados com este genótipo, podendo ainda se avaliar inúmeros fatores, que podem estar influenciando a ocorrência de variação somaclonal para este genótipo, como protocolos para assepsia, tempo entre as repicagens, temperatura e luminosidade durante a incubação.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, A. N. Elimination of viruses of hop (*Humulus lupulus*) by heat therapy and meristem culture. **Journal of Horticultural Science**, Maidstone, v. 58, n. 2, p. 151-160, 1975.
- AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, v. 19, n. 6, p. 716-723, dec. 1974.
- ALDINGER, C. et al. **Modification of the synthesis of bioactive flavonoids in transgenic hop *Humulus lupulus* L. by PAP1/MYB75 from *Arabidopsis thaliana* L.** In: SEIGNER, E.: Proceedings of the Scientific Commission. International Hop Growers Convention. Spain: Scientific Commission, 2009. p. 56-59.
- ALMEIDA, C. B. De et al. Existe variabilidade para o caráter tempo de cocção em feijão? Depende do erro! **Bioscience Journal**, v. 27, n. 6, p. 915-923, nov./dec. 2011.
- AMOO, S. O.; FINNIE, J. F.; STANDEN, J. V. *In vitro* propagation of *Huernia hystrix*: an endangered medicinal and ornamental succulent. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, v. 96, n. 3, p. 273-278, jan. 2009.
- ANDERSEN, C. M.; BRO, R. Variable selection in regression — a tutorial. **Journal of Chemometrics**, v. 24, p. 728-737, 2010.
- AVERSANO, R. et al. Genetic stability at nuclear and plastid DNA level in regenerated plants of *Solanum* species and hybrids. **Euphytica**, v. 165, n. 2, p. 353-361, 2009.
- AZEVEDO, H.; HOULLOU-KIDO, L.; BENKO-ISEPPON, A. M. Análise do potencial regenerativo *in vitro* de diferentes cultivares de Feijão-Caupi. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 528-530, jul. 2007.
- BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; VAN STADEN, J. Somaclonal variation in plants: Causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, v. 63, n. 2, p. 147-173, dec. 2011.
- BAJAJ, Y. P. S.; FURMANOWA, M.; OLSZOWSKA, O. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v. 4, p. 60-103, 1988.
- BARBOZA, S. B. S. C.; CALDAS, L. S. Estiolamento e regeneração na multiplicação *in vitro* do abacaxizeiro híbrido PE x SC-52. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 1, p. 417-423, mar. 2001.
- BARRUETO-CID, L. P. **Cultivo *in vitro* de plantas**. 3. ed. Brasília: Embrapa, 2014. 325 p.
- BASTOW, R. et al. Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. **Nature**, v. 427, n. 6970, p. 164-167, 2004.
- BERTOZZO, F.; MACHADO, I. S. Culture media on *in vitro* development of castor bean (*Ricinus communis* L.) stem tips. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 6, p. 1477-1482, nov./dez. 2010.

- BORDALLO, P. N. et al. Somaclonal variation on *in vitro* callus culture potato cultivars. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 300-304, 2004.
- BOYKO, A.; KOVALCHUK, I. Genome instability and epigenetic modification-heritable responses to environmental stress? **Current Opinion Plant Biology**, v. 14, n. 3, p. 260-266, mar. 2011.
- BRAHM, R. U.; OLIVEIRA, R. P. Potencial de multiplicação *in vitro* de cultivares de morangueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 3, p. 507-510, dec. 2004.
- BRAVO FILHO, E. S. et al. Multiplicação *in vitro* e aclimatização de *Melocactus sergipensis*. **Lilloa**, v. 55, n. 1, p. 26-36, jun. 2018.
- BRAVO, C. D. V. et al. Controle genético da regeneração *in vitro* em progênies de *Eucalyptus grandis*. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2181-2185, nov. 2008.
- BRETTELL, R. I. S. et al. Molecular analysis of a somaclonal mutant of maize alcohol dehydrogenase. **MGG Molecular e General Genetics**, v. 202, n. 2, p. 235-239, 1986.
- BRUCE, T. J. A. et al. Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms. **Plant Science**, v. 173, n. 6, p. 603-608, sept. 2007.
- BURNHAM, K. P.; ANDERSON, D. R. **Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach**. 2nd. ed. New York: Springer, 2002. 488 p.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. **Meios nutritivos**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH, 1998. p. 87-132.
- CALVETE, E. O. et al. Desempenho *in vitro* e agrônômico de cultivares micropropagadas de morangueiro em vários subcultivos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 4, p. 943-949, dez. 2009.
- CARDELLINO, R. A.; SIEWERDT, F. Utilização adequada e inadequada dos testes de comparação de médias. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 21, n. 6, p. 985-995, 1992.
- CERVECEROS DE MÉXICO. **Mitos Cervceros: En México no se cultiva el lúpulo**. Cámara de la cerveza. abr. 2017.
- CHINNUSAMY, V.; ZHU, J. K. Epigenetic regulation of stress responses in plants. **Current Opinion Plant Biology**, v. 12, n. 2, p. 133-139, jan. 2009.
- COIMBRA, J. L. M. et al. Consequências da multicolinearidade sobre a análise de trilha em canola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 347-352, mar./abr. 2005.
- COIMBRA, J. L. M. et al. Técnicas multivariadas aplicadas ao estudo da fauna do solo: contrastes multivariados e análise canônica discriminante. **Ceres**, v. 54, n. 313, p. 270-277, mai./jun. 2007.

- CONAB – **Companhia Nacional de Abastecimento** (2019) Portal de informações agropecuárias. Disponível em: <<https://portaldeinformacoes.conab.gov.br>>. Acessado em: 25 abr. 2019.
- COPATTI, A. S. et al. BAP no cultivo *in vitro* de lúpulo Cascade. **ENPOS, XXI encontro de pós-graduação – UFPEL**. 2019.
- CRUZ, C. D. **Programa GENES** – Versão Windows, aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2001. 648 p.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 1997. 390 p.
- CRUZ-CASTILLO, J. G. et al. Applications of Canonical Discriminant Analysis in Horticultural Research. **HortScience**, v. 29, n. 10, p. 1115-1119, oct. 1994.
- DANILOVA, T. V.; KARLOV, G. I. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism for detection of sex-specific molecular markers in hop (*Humulus lupulus* L.). **Euphytica**, v. 151, n. 1, p. 15-21, 2006.
- DAY, A.; ELLIS, T. H. N. Chloroplast DNA deletions associated with wheat plants regenerated from pollen: possible basis for maternal inheritance of chloroplasts. **Cell**, v. 39, n. 2, p. 359-368, dec. 1984.
- DUCAN, D. R.; WILDHOLM, J. M. Improved plant regeneration from maize callus cultures using 6-benzylaminopurine. **Plant Cell Reports**, v. 7, p. 452-455, 1988.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 18 dez. 2019.
- FARAGÓ, J.; PŠENÁKOVÁ, I.; FARAGOVÁ, N. The use of biotechnology in hop (*Humulus lupulus* L.) improvement. **Nova Biotechnologica**, v. 9, n. 3, p. 279-293, 2009.
- FARAGÓ, J.; PŠENÁKOVÁ, I.; FARAGOVÁ, N. Use of tissue culture techniques to hop improvement. **International Hop Growers` Convention (I.H.G.C.)**. Lublin, Poland: Scientific commission. p. 28-32. June 2011.
- FARIA, G. A. et al. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. **Bragantia**, v. 66, n. 4, p. 535-543, 2007.
- FERNANDES, M. I. B. de M. Perspectivas da biotecnologia para o melhoramento de plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 22, n. 9/10, p. 881-896, set./out. 1987.
- FERREIRA, D. F. **Estatística multivariada**. 1ª. ed. Lavras: UFLA, 2008. 662 p.
- FERREIRA, M. A.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. **Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa SPI: Embrapa CNPH, 1998. p. 21-43.

- FISHER, J.; FISHER, D. **The homebrewer's garden: How to easily grow, prepare, and use your own, hops, malts, brewing herbs.** United States: Storey Publishing, 1998. 187 p.
- FRELLO, S.; STUMMANN, B. M.; SEREK, M. Shoot regeneration of *Campanula carpatica* Jacq. (Campanulacea) via callus phase. **Scientia Horticulturae**, v. 93, p. 85-90, 2002.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, n. 1, p. 151-158, 1968.
- GAMBORG, O. L.; PHILLIPS, G. C. **Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: fundamental methods.** New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1995. 359 p.
- GAUCHI, J. P.; CHAGNON, P. Comparison of selection methods of explanatory variables in PLS regression with application to manufacturing process data. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 58, n. 2, p. 171-193, 2001.
- GEORGE, E. F. **Plant Propagation by Tissue Culture.** 2 ed. England: Exegetics Ltd., 1993. p. 67-85.
- GOLENIOWSKI, M. E.; FLAMARIQUE, C.; BIMA, P. Micropropagation of oregano (*Origanum vulgare x applii*) from meristem tips. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 39, n. 2, p. 125-128, mar./apr. 2003.
- GONTIJO, G. M. **Cultivo do maracujá: informações básicas.** Brasília: Emater- DF, 2017. 39 p.
- GRIFFIN, M. J.; COLEY-SMITH, J. R. The establishment of hop tissue cultures and their infection by downy mildew *Pseudoperonospora humuli* (Miy. & Tak.) Wilson under aseptic conditions. **Journal of General Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 231-236, 1968.
- GURRIARÁN, M. J.; REVILLA, M. A.; TAMÉS, R. S. Adventitious shoot regeneration in cultures of *Humulus lupulus* L. (hop) cvs. Brewers Gold and Nugget. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 1007-1011, 1999.
- HAESBAERT, F. M. **Testes de multicolinearidade em variáveis morfológicas e produtivas de tomateiro.** 2016. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016.
- HAIR, J. F. et al. **Análise Multivariada de dados.** 6. ed. São Paulo: Bookmam, 2009. 593 p.
- HE, Y. H.; AMASINO, R. M. Role of chromatin modification in flowering-time control. **Trends Plant Science**, v. 10, n. 1, p. 30-35, 2005.
- HEALE, J. B.; LEGG, T.; CONNELL, S. *Humulus lupulus* L. (Hop): *In vitro* culture; Attempted production of bittering components and novel disease resistance. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v. 7, p. 26-285, 1989.
- HORLEMANN, C. et al. Regeneration and Agrobacterium-mediated transformation of hop (*Humulus lupulus* L.). **Plant Cell Reports**, v. 22, n. 3, p. 210-217, aug. 2003.



ISRAELI, Y.; LAHAV, E.; REUVENI, O. ***In vitro* culture of bananas**. In: GOWEN, S. Bananas and Plantains. Chatham: Springer, 1995. p. 147-178.

JAIN, S. M. Somaclonal variation in *Begonia* × *elatior* and *Saintpaulia ionantha* L. **Scientia Horticulturae**, v. 54, n. 3, p. 221-231, 1993.

JARDIM, L. S. et al. Efeito de diferentes reguladores de crescimento na regeneração *in vitro* e pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). **Acta Amazonica**, v. 40, n. 2, p. 275-280, 2010.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal** (3ª edição). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019. 430 p.

KIDWELL, K. K.; OSBORN, T. C. Variation among alfalfa somaclones in copy number of repeated DNA sequences. **Genome**, v. 36, n. 5, p. 906-912, 1993.

KLEINMAN, R.; FELGER, R. ***Humulus lupulus* Linnaeus var. *neomexicanus* Nelson & Cockerell** - close up de flor estaminada. Pinos Altos Faixa, Little Cherry Creek Ranch Road. July 2010.

KRAFTCHICK, J. F. et al. Understanding beer tourist motivation. **Tourism Management Perspectives**, v. 12, p. 41-47, 2014.

KRIKORIAN, A. D. **Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación**. In: ROCA, W. M.; MROGINSKY, L. A. Cultivo de tejidos em la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT, 1991. p. 41-77.

KUNERT, K. J.; BAAZIZ, M.; CULLIS, C. A. Techniques for determination of true-to-type date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plants: a literature review. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 15, n. 1, p. 1-16, 2003.

LAPITAN, N. L. V.; SEARS, R. G.; GILL, B. S. Amplification of repeated DNA sequences in wheat X rye hybrids regenerated from tissue culture. **Theoretical Applied Genetics**, v. 75, n. 3, p. 381-388, 1988.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 214, p. 197-214, 1981.

LATTUADA, D. S. et al. Tipos de explante para o estabelecimento *in vitro* de orégano e hortelã. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 25, n. 3, p. 91-103, set. 2019.

LAVINSCKY, M. da C. Trajetória e sentidos da cerveja: das origens europeias à formação do Brasil moderno. **Revista Mosaico**, v. 10, p. 48-66, jan./dez. 2017.

LEE, Y. I.; LEE, I. S.; LIM, Y. P. Variations in sweetpotato regenerates from gamma-ray irradiated embryogenic callus. **Journal Plant Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 163-170, 2002.

LI, X. Q. et al. Regeneration of cytoplasmic male sterile protoclones of *Nicotiana glauca* with mitochondrial variations. **Current Genetics**, v. 13, n. 3, p. 261-266, 1988.

- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagators**, v. 30, p. 421-427, 1980.
- LOSKUTOV, I. G. **Vavilov and his institute**: A history of the world collection of plant genetic resources in Russia. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1999. 188 p.
- MACHADO, M. P. et al. Micropropagation and establishment of *Humulus lupulus* L. plantlets under field conditions at southern Brazil. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n. 7, p. 275-281, June 2018.
- MANTELL, S. H.; MATTHEWS, J. A.; McKEE, R. A. **Princípios de biotecnologia em plantas**: uma introdução a engenharia genética em plantas. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994. 344 p.
- MAPA – **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento** (2020) Registro Nacional de Cultivares – RNC. Brasília – DF. Disponível em: <[http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares\\_registradas.php](http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php)>. Acesso em: 25 fev. 2020.
- MARCOS, A. M. et al. **Guia del Cultivo del Lúpulo**. Galícia: S. A. E. Fomento del Lúpulo 2011. 33 p.
- MARTIN, C.; UBERHUAGA, E.; PEREZ, C. Application of RAPD markers in the characterization of Chrysanthemum varieties and assessment of somaclonal variation. **Euphytica**, v. 127, n. 2, p. 247-253, 2002.
- MARTÍNEZ, D.; TAMÉS, R. S.; REVILLA, M. A. Cryopreservation of in vitro-grown shoot-tips of hop (*Humulus lupulus* L.) using encapsulation/dehydration. **Plant Cell Reports**, v. 19, n. 1, p. 59-63, 1999.
- MARTINS, P. S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação “in situ”. **IPEF**, n. 35, p. 71-78, 1987.
- MERCIER, H. **Auxinas**. In: KERBAUY, G. B. Fisiologia vegetal. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019. p. 175-198.
- MEUSSDOERFFER, F. **A comprehensive history of beer brewing**. In: ELINGER, H. M. Handbook of Brewing: process, technology, markets. Weinheim: Wiley, 2009.
- MIELE, A.; MANDELLI, F. **Uvas viníferas para processamento em regiões de clima temperado**. Embrapa Uva e Vinho. 2003.
- MINANO, J. et al. Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). **Plant Cell Reports**, v. 21, n. 5, p. 408-414, 2003.

- MIRANDA, N. A. et al. Meio de cultura, reguladores de crescimento e formas de vedação de tubos de ensaio na multiplicação *in vitro* de candeia (*Eremanthus incanus* (Less.) Less). **Scientia Forestalis**, v. 44, n. 112, p. 1009-1018, dez. 2016.
- MONFORT, L. E. F. et al. Efeito do BAP no cultivo *in vitro* de *Ocimum selloi* Benth.. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 458-463, 2012.
- MONTGOMERY, D. C.; PECK, E. A. **Introduction to linear regression analysis**. New York: Wiley, 1981.
- MORAIS, T. P.; ASMAR, S. A.; LUZ, J. M. Q. Reguladores de crescimento vegetal no cultivo *in vitro* de *Mentha x Piperita* L.. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 1, p. 350-355, 2014.
- MÜLLER, C. V.; MARCUSSO, E. F. **MAPA informa**: as cervejarias continuam a crescer. 2018. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pasta-publicacoes-DIPOV/as-cervejas-continuam-a-crescer-pdf.pdf/view>>. Acesso em: 18 dez. 2019.
- MÜLLER, E. et al. DNA variation in tissue-culture-derived rice plants. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 80, n. 5, p. 673-679, 1990.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- MUSTAFA, N. R. et al. Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. **Nature Protocols**, v. 6, p. 715-742, June 2011.
- NIEDZ, R. P.; BAUSHER, M. G. Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse- and field-grown trees. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, Heidelberg, v. 38, n. 5, p. 468-471, 2002.
- ORBOVIĆ, V. et al. Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry. **Euphytica**, v. 161, n. 3, p. 329-335, Sept. 2008.
- PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O. **Cultura de tecidos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 97 p.
- PEARSON, B. J. **Florida Edible Garden Plants**: Hops (*Humulus lupulus*). UF/IFAS s.n.: 1-3, 2013.
- PEREDO, E. L.; ARROYO-GARCÍA, R.; REVILLA, M. Á. Epigenetic changes detected in micropropagated hop plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, n. 10, p. 1101-1111, 2009.
- PEREDO, E. L.; REVILLA, M. Á.; ARROYO-GARCÍA, R. Assessment of genetic and epigenetic variation in hop plants regenerated from sequential subcultures of organogenic calli. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 1071-1079, 2006.
- PERES, L. E. P.; KERBAUY, G. B. **Citocininas**. In: KERBAUY, G. B. Fisiologia vegetal. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019. p. 199-220.

PÉREZ, J. L. P.; AREVICH, M. B.; PUPO, J. J. S. Efecto del tipo de explante y la desinfección em el establecimiento *in vitro* de Morera variedade criolla. **Revista Granmense de Desarrollo Local**, v. 3, n. 4, p. 177-187. oct./dec. 2019.

PIERNA, J. A. F. et al. A Backward Variable Selection method for PLS regression (BVSPLS). **Analytica Chimica Acta**, v. 642, n. 1/2, p. 89-93, dec. 2009.

PODWYSZYNSKA, M. Somaclonal variation in micropropagated tulips based on phenotype observation. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, v. 13, p. 109-122, 2005.

POSTMAN, J. D.; DENOMA, J. S.; REED, B. M. Detection and elimination of viruses in USDA hop (*Humulus lupulus*) germplasm collection. **Acta Horticulturae**, v. 668, p. 143-148, 2005.

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. S. Manual de procedimentos do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, Documentos 61, 2008. 44 p.

RAMALHO, M. A. P.; FERREIRA, D. F.; OLIVEIRA, A. C. **Experimentação em Genética e Melhoramento de Plantas**. Lavras: UFLA, 2000. 326 p.

RASHEED, S. et al. Agronomical and physiochemical characterization of somaclonal variants in indica Basmati rice. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 6, n. 9, p. 844-848, 2003.

REED, B. M. et al. Cold storage and cryopreservation of hops (*Humulus L.*) shoot cultures through application of standard protocols. **CryoLetters**, Londres, v. 24, n. 6, p. 389-396, 2003.

RENCHE, A. C. **Methods of Multivariate Analysis**. 2nd ed, New York: Wiley-Interscience, 2002. 715 p.

REVILLA, M. A.; MARTINEZ, D. **Cryopreservation of *Humulus lupulus L.* (Hop)**. In: TOWILL, L. E.; BAJAJ, Y. P. S. Cryopreservation of Plant Germplasm II (Series: Biotechnology in Agriculture and Forestry). Berlin: Springer, 2002. p. 136-150.

REZENDE, J. C. et al. Influência de auxina e citocinina no desenvolvimento de embriões somáticos de *Coffea arábica L.* **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2011.

RICHARDS, E. J. Natural epigenetic variation in plant species: A view from the field. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 2, p. 204-209, 2011.

ROCHA, F. A. dos S. **Distribuição e ecologia do lúpulo (*Humulus lupulus L.* subsp. *lupulus*) em Portugal**. 2005. Tese (Doutorado em Ciências do Ambiente) – Universidade do Minho, Portugal, 2005.

RODRIGUES, M. Â.; MORAIS, J. S. **A cultura do lúpulo em Bragança: Aspectos agronômicos inovadores e potencial e expansão**. In: RODRIGUES, M. Â.; MORAIS, J. S.; CASTRO, J. P. M. Jornadas de lúpulo e cerveja: novas oportunidades de negócio. Bogotá: Livro de Atas, Instituto Politécnico de Bragança, 2015. p. 63-70.

RODRIGUES, P. H. V. Somaclonal variation in micropropagated *Heliconia bihai* cv. Lobster Claw I plantlets (Heliconiaceae). **Scientia Agricola**, v. 65, n. 6, p. 681-684, nov./dec. 2008.

RODRIGUES, P. H. V. et al. Variação somaclonal em mudas micropropagadas de abacaxizeiro ornamental, *Ananas bracteatus* Schultes var. *striatus* (Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 12, n. 2, p. 122-125, 2007.

ROUT, G. R.; MOHAPATRA, A.; MOHAN, J. S. Tissue culture of ornamental pot plant: a critical review on present scenario and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 6, p. 531-560, 2006.

ROY, A. T.; LEGGETT, G.; KOUTOULIS, A. Development of a shoot multiplication system for hop (*Humulus lupulus* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 37, n. 1, p. 79-83, jan./feb. 2001.

RUBIN, S. et al. Reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de *Thymus vulgaris* L.. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 480-482, jul. 2007.

SAHIJRAM, L.; SONEJI, J. R.; BOLLAMMA, K. T. Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 39, n. 6, p. 551-556, nov./dec. 2003.

SANTIAGO, G. et al. Variação somaclonal nos descritores mínimos de tubérculo em batata. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 42, n. 2, p. 197-202, 2012.

SANTOS, C. C. C. dos; RODRIGUES, P. H. V. Variação somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira, cultivar Pacovan. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 2, p. 201-205, 2004.

SELEZNOV, A.; KUZMENKO, M., 2013. **Petiole**. Disponível em: <<http://petioleapp.com/>> Acesso em: 24 jun. 2019.

SERENO, M. J. C. M.; WIETHÖLTER, P.; TERRA, T. F. **Domesticação das plantas**. In: BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T. Origem e evolução de plantas cultivadas. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2008. p. 37-58.

SHEN, X. et al. Assessment of somaclonal variation in Dieffenbachia plants regenerated through indirect shoot organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 91, n. 1, p. 21-27, aug. 2007.

SHEPHARD, H. L. et al. Sexual development and sex chromosomes in hop. **New Phytologist**, v. 148, n. 3, p. 397-411, 2000.

SHIRZADEGAN, M. et al. Rearrangement, amplification, and assortment of mitochondrial DNA molecules in cultured cells of *Brassica campestris*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 77, n. 1, p. 17-25, 1989.

SILVA, J. G. C.; MACHADO, A. A. **Análise Multivariada: Extensões de Métodos Univariados**. Pelotas, 2001. 662 p.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 11, p. 118-130, 1957.

SPÓSITO, M. B. et al. **A cultura do lúpulo**. Piracicaba: ESALQ – Divisão de Biblioteca, 2019. 81 p.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H.; DICKEY, D. A. **Principles and procedures of statistics: a biometrical approach**. New York: McGraw-Hil, 1997. 666 p.

SWINNEN, J. **The economics of beer**. Oxford: Oxford University Press, 2011. 400 p.

SYMILLIDES, Y.; HENRY, Y.; De BUYSER, J. Analysis of Chinese Spring regenerants obtained from short- and long-term wheat somatic embryogenesis. **Euphytica**, v. 82, n. 3, p. 263-268, 1995.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 786 p.

THORPE, T. A. **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 1-16.

TORRES, A. C. et al. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128 p.

VASCONCELOS, Y. Inovações cervejeiras. **Pesquisa Fapesp**, v. 251, p. 19-25, 2017.

VASQUEZ, A.; CAVECHIA, M. **O Brasil pode se transformar em exportador de lúpulo**. Metrôpoles, Lago Sul, DF, 2017. Disponível em: <<https://www.metropoles.com/colunas-blogs/alta-fermentacao/o-brasil-pode-se-transformar-em-exportador-de-lupulo>>. Acesso em: 15 abr. 2018.

VILARINHO, V. B. Ciência e tecnologia no século XX - GMO. **Cadernos do CEIS** 20. n. 15, 2009.

VINE, S. J.; JONES, O. P. The culture of shoot tips of hop (*Humulus lupulus* L.) to eliminate viruses. **Journal of Horticultural Science**, v. 44, n. 3, p. 181-284, 1969.

WANG, Y. et al. Production of a useful mutant by chronic irradiation in sweetpotato. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 111, n. 2, p. 173-178, 2007.

WATT, M. P. et al. *In vitro* field collection techniques for Eucalyptus micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 75, n. 3, p. 233-240, 2003.

WHITELAW, N. C.; WHITELAW, E. How lifetimes shape epigenotype within and across generations. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. 2, p. 131-137, 2006.

ZIMMER, J.; ANZANELLO, M. J. Um novo método para seleção de variáveis preditivas com base em índices de importância. **Production**, v. 24, n. 1, p. 84-93, jan./mar. 2014.

## ANEXOS

Anexo A – Lista de genótipos de lúpulo que possuem Registro Nacional de Cultivares, no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, com seu respectivo mantenedor e número do registro

<b>Cultivar</b>	<b>Mantenedor</b>	<b>Nº do Registro</b>
AlphAroma	Alini Akemi Atsumi	39903
Brewers Gold	Natanael Moschen Lahnel	39819
Bullion	Alini Akemi Atsumi	39905
Cascade	Felipe Wigman Vpa - Viveiro Porto Amazonas Eireli - Me	38295
Centennial	Vpa - Viveiro Porto Amazonas Eireli - Me	38296
Chinook	Alini Akemi Atsumi	39906
Cluster	Max Vincent Raffaele	41856
Columbus	Felipe Francisco	39466
Comet	Alini Akemi Atsumi	39907
Crystal	Alini Akemi Atsumi	39908
Dr Rudi	Alini Akemi Atsumi	39918
East Kent Goldings	Alini Akemi Atsumi	39909
Fuggle	Vpa - Viveiro Porto Amazonas Eireli - Me	38297
Galena	Alini Akemi Atsumi	39910
Golding	Vpa - Viveiro Porto Amazonas Eireli - Me	41050
H7 Leonés	Alini Akemi Atsumi	39911
Hallertauer Magnum	Vpa - Viveiro Porto Amazonas Eireli - Me	38300
Hallertauer Mitterlfrueh	Alini Akemi Atsumi	39912
Hallertauer Tradition	Felipe Wigman	40302
Hersbrucker	Felipe Wigman	40299
Mapuche	Alini Akemi Atsumi	39913
Mount Hood	Vpa - Viveiro Porto Amazonas Eireli - Me	41051
Neo1	Alini Akemi Atsumi	39914
Northern Brewer	Felipe Wigman Vpa - Viveiro Porto Amazonas Eireli - Me	38299

Nugget	Felipe Wigman Vpa - Viveiro Porto Amazonas Eireli - Me	38298
Pacific Gem	Max Vincent Raffaele	42805
Perle	Felipe Wigman	40297
Pocket Talisman	Max Vincent Raffaele	42806
Polaris	Alini Akemi Atsumi	41899
Saaz	Alini Akemi Atsumi	39916
Saazer	Felipe Wigman	40305
Smooth Cone	Max Vincent Raffaele	42807
Sorachi Ace	Alini Akemi Atsumi	39917
Southern Brewer	Max Vincent Raffaele	42808
Southern Cross	Alini Akemi Atsumi	40409
Spalt Spalter	Felipe Wigman	40296
Spalterselect	Felipe Wigman	40295
Sterling	Alini Akemi Atsumi	39919
Sunbeam	Max Vincent Raffaele	42809
Tahoma	Max Vincent Raffaele	41884
Teamaker	Alini Akemi Atsumi	39920
Tettnanger	Alini Akemi Atsumi	39921
Triple Pearl	Max Vincent Raffaele	41860
Usda 19058m	Max Vincent Raffaele	42813
Willamette	Alini Akemi Atsumi	39922
Yakima Gold	Alini Akemi Atsumi	39923
Zeus	Max Vincent Raffaele	41883

Fonte: MAPA, 2020.