

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTAGROSSA  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANIDADE

TÂNIA EIDAM

GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES E ORGANOGÊNESE INDIRETA DO  
MORANGUEIRO

PONTA GROSSA  
2012

TÂNIA EIDAM

GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES E ORGANOGÊNESE INDIRETA DO  
MORANGUEIRO

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Mestrado em Agronomia, Área de concentração Agricultura.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Ricardo Antonio Ayub

PONTA GROSSA  
2012

**Ficha Catalográfica**  
**Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG**

Eidam, Tânia  
E34      Germinação in vitro de sementes e organogênese indireta do morangueiro/  
Tânia Eidam. Ponta Grossa, 2012.  
47f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia - Área de Concentração: Agricultura), Universidade Estadual de Ponta Grossa.  
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub.

1.Fragaria x ananassa. 2.Germinação. 3.Organogênese. 4.Micropropagação. 5.Aclimatação. I.Ayub, Ricardo Antonio. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Agronomia. III. T.

CDD: 634.75



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

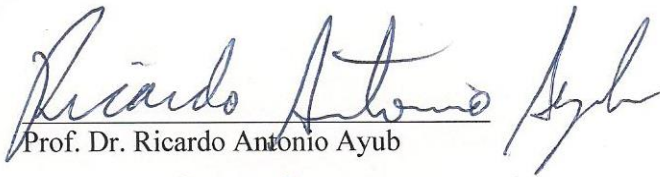
## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


Título da Dissertação: “**Germinação *In vitro* de sementes e organogênese indireta do morangueiro**”.

Nome: Tania Eidam

Orientador: Ricardo Antonio Ayub

Aprovado pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub

  
Profª Drª Rosana Fernandes Otto

  
Profª Drª Amanda Regina Godoy Baptista

Data da Realização: 09 de novembro de 2012.

## RESUMO

Juntamente com a amora e a framboesa, o morango (*Fragaria x ananassa*) faz parte do grupo dos pequenos frutos vermelhos. Pertencente a família Rosaceae, o morango destaca-se pelo valor nutricional e pela importância econômica. Nos últimos anos tem se observado um crescimento na produção brasileira de morangos, no entanto, a participação do Brasil na produção mundial ainda é reduzida. Visando o aumento da produção e a melhoria da qualidade dos frutos produzidos têm se buscado alternativas, tais como cultivares melhor adaptadas as regiões de produção e mudas de melhor qualidade. Considerando que a cultura de tecidos vegetais pode ser uma técnica para introdução de melhorias neste sistema de produção, o trabalho foi desenvolvido com os objetivos de avaliar as condições de germinação de sementes de morangueiro cv. Camiño Real e estabelecer os protocolos de regeneração por meio de organogênese, para as linhagens genéticas obtidas a partir das cultivares Camiño Real e Festival. Para avaliação das condições de germinação, foram utilizados aquênios frescos e armazenados por 2 e 12 meses. Estes foram submetidos à diferentes tratamentos para germinação *in vitro* e fotoperíodo de 16 horas e de 0 horas. A partir das avaliações da porcentagem de germinação e da massa fresca das plântulas obtidas, concluiu-se que o armazenamento dos aquênios reduz significativamente a viabilidade dos mesmos, para aquênios frescos os tratamentos de escarificação com lixa comercial e com ácido sulfúrico foram os que apresentaram melhores resultados. Concluiu-se ainda que as sementes de morango apresentam comportamento fotoblástico positivo. Para a regeneração, por meio de organogênese indireta, das linhagens genéticas obtidas a partir das sementes foram utilizados explantes foliares e peciolares acondicionados em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de reguladores de crescimento. As variáveis avaliadas foram: porcentagem de explantes com calos, com gemas e com brotos, número de gemas e de brotos por explante, porcentagem de plântulas enraizadas, massa fresca das plântulas e porcentagem de sobrevivência das plantas após a aclimação. Por meio destas avaliações foi possível concluir que os explantes foliares apresentaram melhores resultados para os genótipos testados. Os reguladores de crescimento recomendados foram TDZ e AIB, nas concentrações de 2,0 mg L<sup>-1</sup> e 0,1 mg L<sup>-1</sup> respectivamente, para a linhagem obtida a partir da cultivar Camiño Real, e 1,5 mg L<sup>-1</sup> e 0,1 mg L<sup>-1</sup> respectivamente, para a linhagem obtida a partir da cultivar Festival. Os resultados obtidos de germinação de sementes e de regeneração de plantas, mostraram que é possível aplicar a técnica de cultura de tecidos vegetais para o morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch).

**Palavras chave:** *Fragaria x ananassa*, germinação, organogênese, micropropagação, aclimação

## ABSTRACT

Along with blackberry and raspberry, strawberry (*Fragaria x ananassa*) is part of the group of small red fruits, belonging to the family Rosaceae, the strawberry stands out for the nutritional value and economic importance. Recent years have seen a growth in the Brazilian production of strawberries, however, the participation of Brazil in world production is still low. Aiming to increase production and improve the quality of fruits produced alternatives have been sought, such as better adapted cultivars to the production regions and best seedlings. Considering that the plant tissue culture can be a technique for improvements in this production system, the work was developed aiming to assess the conditions of seed germination of strawberry cv. Camiño Real and to establish protocols for regeneration through organogenesis, to the genetic lineages derived from cultivars Camiño Real and Festival. To assess the conditions of germination, it was used fresh seeds and stored for 2 and 12 months. These were submitted to different treatments of break dormancy and the presence or absence of light during germination. Based on the evaluations of germination rate and fresh weight of the plants obtained, it was concluded that the seed storage significantly reduces the viability thereof, for fresh seeds the treatments of scarification with sandpaper commercial and with sulfuric acid and commercial presented the best results. It was also concluded that the strawberry seeds showed positive photoblastic behavior. For regeneration through organogenesis of genetic lineages obtained from seeds it was used leaf and petiole explants conditioned in culture medium supplemented with different concentrations of growth regulators. The variables evaluated were: percentage of explants with calluses, with buds and shoots, number of buds and shoots per explants, percentage of rooted plants, fresh weight of plants and percentage of plant survival after acclimatization. Through these assessments it was possible to conclude that the leaf explants showed better results for the genotypes tested. The growth regulators recommended are TDZ and AIB, at concentrations of 2,0 mg L<sup>-1</sup> and 0,1 mg L<sup>-1</sup> respectively, for the lineage obtained from cultivating Camiño Real, and 1,5 mg L<sup>-1</sup> and 0,1 mg L<sup>-1</sup> respectively, for the lineage derived from the cultivar Festival. The results of seed germination and plant regeneration have shown that it is possible to apply the technique of plant tissue culture for strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch).

**Keywords:** *Fragaria x ananassa*, germination, organogenesis, micropropagation, acclimatization

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Esquema das etapas e avaliações realizadas nos experimentos II e III. Ponta Grossa, PR. 2012.....	32
----------	--	----

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Porcentagem de germinação de aquênios frescos de morangueiro, submetidos à diferentes tratamentos para a germinação <i>in vitro</i> e germinados sob fotoperíodo de 16 horas ou de 0 horas. Ponta Grossa, PR, 2012.....	22
TABELA 2	Porcentagem de germinação de aquênios de morangueiro armazenados sob refrigeração por 2 meses, submetidas à diferentes tratamentos para a germinação <i>in vitro</i> e germinados sob fotoperíodo de 16 horas ou de 0 horas. Ponta Grossa, PR, 2012.....	23
TABELA 3	Massa fresca média de plântulas de morangueiro obtidas a partir de aquênios frescos e armazenados por 2 meses, submetidos a fotoperíodo de 16 horas ou de 0 horas. Ponta Grossa, PR, 2012.....	25
TABELA 4	Concentração dos reguladores de crescimento ANA, BAP e AIB utilizados nos meios de indução e de regeneração de morangueiro, obtidos a partir da cultivar Camiño Real. Ponta Grossa, PR, 2012.....	31
TABELA 5	Concentração dos reguladores de crescimento TDZ e AIB utilizados na regeneração de morangueiro obtidos a partir da cultivar Camiño Real. Ponta Grossa, PR, 2012.....	32
TABELA 6	Concentração dos reguladores de crescimento TDZ e AIB utilizados na regeneração de morangueiros obtidos a partir da cultivar Festival. Ponta Grossa, PR, 2012.....	33
TABELA 7	Porcentagem de explantes provenientes de plântulas de morangueiro obtidas a partir da cv. Camiño Real, que apresentaram formação de calos, em função do tecido de constituição dos explantes. Ponta Grossa, PR, 2012.....	34
TABELA 8	Porcentagem de explantes provenientes de plântulas de morangueiro obtidas a partir da cv. Camiño Real, que apresentaram formação de gemas, em função do tecido de constituição do explante. Ponta Grossa, PR, 2012.....	35
TABELA 9	Porcentagem de explantes provenientes de plântulas de morangueiro obtidas a partir da cv. Camiño Real, que apresentaram formação de gemas, em função das concentração dos reguladores de crescimento. Ponta Grossa, PR, 2012.....	35
TABELA 10	Porcentagem de explantes provenientes de plântulas de morangueiro obtidas a partir da cv. Camiño Real, que apresentaram formação de brotos, em função de explantes foliares e peciolares e da concentração dos reguladores de crescimento. Ponta Grossa, PR, 2012.....	36
TABELA 11	Média do número de gemas formadas por explante, provenientes de	



	plântulas de morangueiro obtidas a partir da cv. Camiño Real, em função do tecido de constituição do explante. Ponta Grossa, PR, 2012.....	37
TABELA 12	Média do número de gemas formadas por explante, provenientes de plântulas de morangueiro obtidas a partir da cv. Camiño Real, em função das concentrações de reguladores de crescimento. Ponta Grossa, PR, 2012.....	37
TABELA 13	Média do número de brotos formados por explante, provenientes de plântulas de morangueiro obtidas a partir da cv. Camiño Real, em função de explante foliares e peciolares, e das concentrações de reguladores de crescimento. Ponta Grossa, PR, 2012.....	37
TABELA 14	Média da massa fresca de plântulas provenientes da regeneração de explantes obtidos a partir da cv. Camiño Real, após 60 dias em meio de enraizamento, em função de explantes foliares e peciolares e das concentrações de reguladores de crescimento. Ponta Grossa, PR, 2012.....	38
TABELA 15	Porcentagem de plântulas de morangueiro enraizadas provenientes de explantes obtidos a partir da cv. Camiño Real, após 60 dias em meio de enraizamento, em função das concentrações de reguladores de crescimento. Ponta Grossa, PR, 2012.....	38
TABELA 16	Porcentagem de plantas aclimatadas provenientes da regeneração de explantes obtidos a partir da cv. Camiño Real, após 30 dias em substrato em relação ao número de plantas enraizadas e transferidas para o substrato, considerando o tipo de explante empregado para a organogênese. Ponta Grossa, PR, 2012.....	39
TABELA 17	Porcentagem de plantas aclimatadas provenientes da regeneração de explantes obtidos a partir da planta cv. Camiño Real, após 30 dias em substrato em relação ao número de plantas enraizadas e transferidas para o substrato, considerando as concentrações de reguladores de crescimento utilizadas na organogênese. Ponta Grossa, PR, 2012.....	39
TABELA 18	Porcentagem de explantes com brotos, provenientes de plântulas de morangueiro obtidas a partir da cv. Festival, em função de explantes foliares e peciolares e da concentração de reguladores de crescimento. Ponta Grossa, PR, 2012.....	40
TABELA 19	Porcentagem de explantes que formaram calos e gemas, número médio de gemas e brotos por explante, massa fresca média de plantas, porcentagem de plantas enraizadas e porcentagem de plantas aclimatadas obtidas a partir da regeneração de explantes foliares e peciolares de plântulas provenientes da cv. Festival. Ponta Grossa, PR, 2012.....	40

## LISTA DE SIGLAS

AIA	Ácido indol-3-acético
AIB	Ácido indol butírico
AIP	Ácido indol propiónico
ANA	Ácido naftalenoacético
BA	Benziladenina
BAP	Benzilaminopurina
BSAA	Ácido 3 benzil selenienyl acético
2,4-D	Ácido 2,4 – diclorofenoxiacético
GA <sub>3</sub>	Ácido giberélico
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
iP	Isopenteniladenina
MCPA	Ácido 2-metil, 4-clorofenoxiacético
MS	Meio de cultura Murashige e Skoog
2,4,5-T	Ácido 2,4,5 – tricloro – fenoxiacético
TDZ	Thidiazuron

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
2.1 DESCRIÇÃO BOTÂNICA.....	12
2.2 EMPREGO DA TÉCNICA DE CULTURA DE TECIDOS NO MORANGUEIRO..	13
2.3 PROPAGAÇÃO DE PLANTAS.....	14
2.4 PROPAGAÇÃO DE PLANTAS <i>IN VITRO</i> .....	15
2.4.1 Fonte e tipos de explantes.....	15
2.4.2 Regeneração de plantas.....	16
2.4.3 Enraizamento das brotações.....	17
2.4.4 Aclimação de plantas micropropagadas.....	17
<b>3 DIFERENTES TRATAMENTOS PARA GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE SEMENTES DE MORANGUEIRO, NO MOMENTO DA COLHEITA E ARMAZENADAS</b> .....	19
<b>RESUMO/ABSTRACT</b> .....	19
3.1 INTRODUÇÃO.....	20
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
3.4 CONCLUSÃO.....	25
<b>4 ORGANOGÊNESE INDIRETA A PARTIR DE EXPLANTE FOLIAR E PECÍOLAR DE LINHAGENS DE MORANGUEIRO (<i>Fragaria ananassa</i> Duch) PROVENIENTES DAS CULTIVARES CAMIÑO REAL E FESTIVAL</b> .....	26
<b>RESUMO/ABSTRACT</b> .....	26
4.1 INTRODUÇÃO.....	27
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.2.1 Experimento I.....	30
4.2.2 Experimento II.....	31
4.2.3 Experimento III.....	33
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.3.1 Experimento I.....	34
4.3.2 Experimento II: Genótipo obtido a partir da cv. Camiño Real .....	34
4.3.3 Experimento III: Genótipo obtido a partir da cv. Festival.....	40
4.4 CONCLUSÃO.....	41
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	42
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	43



## 1 INTRODUÇÃO

A cultura do morangueiro, por ser essencialmente familiar e absorver elevado contingente de mão de obra em todas as fases, adquire grande importância sócio econômica. Embora, geralmente, restrita a pequenas áreas, é uma atividade agrícola de significativa importância.

O morango (*Fragaria x ananassa*), juntamente com a amora e framboesa constituem o grupo de frutos caracterizados como pequenos frutos vermelhos (MADAIL, 2008), cuja importância nacional e mundial vem crescendo. Dados da FAO (2008) indicam um crescimento expressivo na produção mundial de morangos, evidenciado pelo incremento de produção entre os anos de 1997 e 2006, que foi da ordem de 29% enquanto a área plantada aumentou apenas 18%. Os principais continentes produtores de morango são a Europa e a América, responsáveis por 75% da produção mundial, sendo que a América do Norte responde por 81% da produção do continente (FAO, 2008).

No mercado das importações e exportações de morango fresco para o período entre 2005/2006 foram movimentadas, no mercado internacional, cerca de 413.000 toneladas em exportações e 186.000 toneladas em importações. Entre os maiores exportadores destacam-se a Espanha, os Estados Unidos e o México. E os maiores importadores são Canadá, Estados Unidos, Itália e México (AGRIANUAL, 2008). De acordo com o Anuário Brasileiro de Fruticultura (2012), as exportações brasileiras de morango em 2010 foram de aproximadamente 3.000 kg, movimentando cerca de US\$ 9.600,00. E as importações, no mesmo ano, totalizaram 7.951 ton, somando a importância de aproximadamente 8 milhões de dólares (AGRIANUAL, 2012).

No cenário produtivo mundial, o Brasil ocupa o 54º lugar. A produção brasileira de morangos concentra-se em oito estados: Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Espírito Santo, Santa Catarina, Goiás e Rio de Janeiro (SPECHT; BLUME, 2009), sendo que no Paraná, foi cultivada uma área de 435,6 ha de morango produzindo, 11 mil toneladas de frutos, para a safra 2002/2003. (SEAB-PR, 2007).

Devido à importância comercial da cultura, os produtores têm buscado novas tecnologias, visando o aumento da produtividade, entre elas a utilização de mudas de elevada qualidade genética e a introdução de novas cultivares (VIDAL et al., 2006). Uma das alternativas para o desenvolvimento de mudas com composição genética diferenciada, bem como, para a incorporação de melhorias no sistema de produção é a cultura de tecidos, que tem apresentado avanços e significativo êxito nos resultados (CID, 2010). Dentre as técnicas

englobadas pela cultura de tecidos, pode-se destacar a micropropagação por meio de segmentos nodais, a organogênese e a embriogênese somática (SOUZA et al., 2006).

Estas técnicas de cultura de tecidos são empregadas para otimizar processos biotecnológicos que possibilitem a regeneração de plantas (RANCE et al., 1994), a qual é altamente dependente do genótipo utilizado (GRAY et al., 1993). Desta forma, existe a necessidade do desenvolvimento de protocolos de regeneração específicos para cada cultivar (PINHO et al., 2010).

A organogênese de algumas cultivares de morango, a partir de explantes foliares, de pecíolos e de estolões é relatada por vários autores (BISWAS et al., 2010; FOLTA et al., 2006; FLORES et al., 1998). Com as devidas adaptações, esta, pode ser uma técnica viável tanto para a propagação vegetativa da espécie como para a obtenção de novas linhagens genéticas, as quais podem ser utilizadas para o desenvolvimento de novas cultivares (FOLTA et al., 2006).

A produtividade de morangueiros tem sido favorecida pelo emprego de mudas livres de vírus. O emprego da cultura de meristemas e a rápida propagação *in vitro* possibilitou a produção, em larga escala, de plantas isentas de patógenos para uso em pesquisas e para o fornecimento a viveiristas e a produtores de morango (BRAGA et al., 2009).

Considerando a importância da adaptação de protocolos de propagação para cultivares de morangueiro e a necessidade de busca por novas linhagens genéticas para introdução de melhorias no sistema, o presente trabalho foi desenvolvido com os objetivos de avaliar as condições de germinação de sementes de morango da cultivar Camiño Real; e as condições para organogênese indireta das linhagens obtidas a partir das cultivares Camiño Real e Festival.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 DESCRIÇÃO BOTÂNICA

O morangueiro pertence à família Rosaceae, cujas espécies encontram-se distribuídas dos trópicos aos polos. Estima-se que esta família seja composta por aproximadamente 100 gêneros e 2000 espécies (GRAHAM, 2005). Do gênero *Fragaria*, a espécie cultivada comercialmente do morangueiro é *Fragaria x ananassa* Duch., obtida a partir do cruzamento das espécies originárias da América (*Fragaria virginiana* x *Fragaria chiloensis*), obtida há mais de 300 anos na Europa. Atualmente algumas cultivares também incluem genes de *Fragaria ovalis* (BRAHM; OLIVEIRA, 2004).

As plantas que compõe o gênero *Fragaria* são herbáceas, atingem de 15 a 30 cm de altura, formam pequenas touceiras (hábito de crescimento em roseta) que aumentam de tamanho à medida que a planta envelhece. É uma planta perene cultivada como anual, por questões fitossanitárias (RONQUE, 1998).

A folha do morangueiro normalmente é constituída por pecíolo longo e três folíolos. Os folíolos são denteados e apresentam grande número de estômatos, o que confere ao morangueiro maior sensibilidade à falta de água, à baixa umidade relativa do ar e às altas temperaturas (SILVA et al., 2007).

As flores do morangueiro estão agrupadas em inflorescências, cujo número por planta é variável dependendo da cultivar. A primeira flor normalmente origina o primeiro pseudofruto, em geral o mais desenvolvido de cada inflorescência. Os frutos verdadeiros, do tipo aquênio, são pequenos de coloração vermelho amarronzados, duros e superficiais, que normalmente é confundido com a semente. A parte carnosa e doce de formato variável, geralmente chamado de fruto é o receptáculo floral da planta (SILVA et al., 2007).

Os estolões são caules verdadeiros, muito flexíveis, que se desenvolvem em contato com o solo (RONQUE, 1998). As plantas produzem estolões, os quais apresentam algumas gemas, estas, quando em contato com o solo são estimuladas a produzir brotações e raízes, dando origem a novas plantas capazes de produzir flores e pseudofrutos (GRAHAM, 2005). O estolão é a forma mais utilizada de multiplicação vegetativa do morangueiro (SILVA et al., 2007).

A propagação vegetativa apresenta como principal vantagem a possibilidade de manutenção das características genéticas da planta matriz. Mudanças produzidas via propagação vegetativa apresentam grande uniformidade (GRAÇA et al., 1990).

A propagação vegetativa ou clonagem consiste em multiplicar assexuadamente partes das plantas (células, tecidos, órgãos ou propágulos), de modo a gerar indivíduos geneticamente idênticos à planta matriz (FERRARI et al., 2004). Baseia-se na capacidade que certas estruturas vegetativas possuem de formar um novo indivíduo completo (WENDLING et al., 2005).

Biswas et al. (2008) enfatizam as limitações da propagação vegetativa convencional de plantas, especialmente o morangueiro, principalmente quanto a presença de patógenos no material a ser propagado, cuja infecção é mantida através dos ciclos de cultivo, tendendo a acentuar e degenerar gradualmente a performance das cultivares.

As cultivares de morangueiro, mais antigas, resultaram da seleção de fenótipos superiores obtidos a partir de cruzamentos ao acaso. Em 1817 Thomas Knight, na Inglaterra, obteve mudas a partir de cruzamentos controlados que resultaram nas cultivares “Downton” e “Elton”. Estas cultivares foram utilizadas posteriormente para o desenvolvimento de outras (GRAHAM, 2005).

As principais cultivares utilizadas, no Brasil, provêm dos Estados Unidos, destacando-se Aromas, Camarosa, Dover, Milsei-Tudla, Oso Grande, Camiño Real e Sweet Charlie ou dos programas de melhoramento genético da Embrapa Clima Temperado (Bürkley, Santa Clara e Vila Nova) e do Instituto Agrônomo de Campinas – IAC (Campinas) (BRAHM; OLIVEIRA, 2004).

A cultivar Camiño Real foi desenvolvida na Universidade da Califórnia em 2001 e introduzida no Brasil a partir de 2006. Mostra-se tão produtiva quanto as cultivares Camarosa e Aromas, com até 1 kg de frutas comerciais por planta, sendo a colheita concentrada no período de agosto a dezembro (OLIVEIRA et al., 2007).

Proveniente do cruzamento entre as cultivares Rosa Linda e Oso Grande, a cultivar Festival foi obtida na Universidade da Flórida em 1995. Trata-se de cultivar de dias curtos, cuja planta é vigorosa e produtiva. Os frutos desta cultivar apresentam formato cônico, tamanho médio, coloração vermelha uniforme, textura firme e boas características de aroma (OLIVEIRA et al., 2007).

## 2.2 EMPREGO DA TÉCNICA DE CULTURA DE TECIDOS NO MORANGUEIRO

Um dos aspectos mais importantes para o sucesso da produção de morangos é a utilização de mudas de qualidade, principalmente no aspecto fitossanitário, cuja produção deve ser feita em viveiros telados, a partir de matrizeiros provenientes da cultura de meristemas realizada em laboratórios de micropropagação (BRAHM; OLIVEIRA, 2004). A



propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação por causa do tamanho dos propágulos utilizados, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e aquela de maior impacto para a agricultura (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

De acordo com Pereira et al. (1999) as primeiras pesquisas com micropropagação de morangueiro foram desenvolvidas na década de 60 e o principal objetivo era obter plantas com melhor qualidade fitossanitária.

No Brasil, existem atualmente cerca de uma dezena de empresas atuando na micropropagação de morangueiros (EMBRAPA, 2005). Porém a quantidade de matrizes de morangueiro produzidas é insuficiente para atender à demanda nacional (BRAHM; OLIVEIRA, 2004).

De acordo com Embrapa (2005) já estão disponíveis protocolos eficientes para a regeneração de morangueiros, porém as respostas obtidas para os diferentes genótipos são muito variáveis, portanto, são fundamentais adaptações de acordo com o genótipo que se deseja trabalhar.

Existem poucos relatos da aplicação de ferramentas biotecnológicas na cultura do morangueiro. Vários autores descrevem experimentos de transformação genética de morangueiros octoplóides, destacando a variação na eficiência de regeneração entre as cultivares. Além do potencial genético de cada cultivar, há também, interferência da formulação do meio de cultura utilizado (FOLTA et al., 2006).

### 2.3 PROPAGAÇÃO DE PLANTAS

Os organismos vegetais podem se reproduzir de forma sexuada ou assexuada. A propagação de plantas de forma sexuada favorece a variabilidade genética e a evolução da espécie, enquanto a propagação assexuada favorece a uniformidade das plantas que serão obtidas (CID; TEIXEIRA, 2010).

A propagação sexuada de plantas ocorre por meio da germinação de sementes, já para a propagação assexuada existem vários métodos, dentre os quais se destaca a estaquia, a miniestaquia, a mergulhia, a enxertia e a micropropagação (DALAGNOL, 2010).

Do ponto de vista comercial, é interessante que cultivares de importância agrônômica sejam propagadas assexuadamente, pois esse tipo de propagação resulta em plantas uniformes quanto ao fenótipo. Por via sexual, a conservação dessas características poderia ser obtida por endogamia, ou seja, pelo cruzamento entre indivíduos relacionados pela ascendência (CID; TEIXEIRA, 2010).

A propagação de plantas por meio da germinação de sementes é importante ferramenta para a obtenção de materiais com características genéticas diferenciadas, os quais poderão ser empregados no desenvolvimento de novas cultivares (CID, 2010). A germinação de sementes está relacionada com condições ambientais, como disponibilidade de água e temperatura adequada e com aspectos endógenos da semente (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A propagação vegetativa de plantas apresenta as vantagens da uniformidade dos indivíduos produzidos, além de antecipar a produção de algumas espécies, porém, de acordo com Biswas et al. (2008) a propagação vegetativa convencional pode causar acúmulo de patógenos em espécies como o morangueiro, resultando em produção de mudas de baixa qualidade. Neste caso, a micropropagação pode ser uma alternativa para minimizar o problema.

Com crescente aplicação na agricultura, a micropropagação tem proporcionado muitos benefícios na propagação de plantas. Para iniciar a propagação de plantas utilizando esta técnica é necessário um explante, o qual pode ser composto por diferentes tecidos vegetais capazes de regenerar novas plantas em condições adequadas (KERBAUY, 1997). A micropropagação de espécies anuais ou perenes possibilitou significativos avanços no campo do melhoramento por meio da transformação genética (CID, 2010).

## 2.4 PROPAGAÇÃO DE PLANTAS *IN VITRO*

### 2.4.1 Fontes e tipos de explantes

O explante é definido como o segmento de tecido ou órgão vegetal utilizado para iniciar a cultura *in vitro* (JUNGHANS; SANTOS-SEREJO, 2006). Dentre os explantes que podem ser utilizados estão os fragmentos de raízes, hipocótilos, epicótilos, cotilédones, flores, folhas, embriões, óvulos, gemas axilares, entre outros (CID; TEIXEIRA, 2010).

A escolha do explante é realizada de acordo com a disponibilidade de material, nível de contaminação, juvenilidade do tecido e estação do ano em que será coletado (CID; TEIXEIRA, 2010). Estudos desenvolvidos por Folta et al. (2006) mostraram que para a linhagem de morango “Laboratory Festival 9”, explantes provenientes de folhas e pecíolos mais jovens apresentam melhores resultados com relação a porcentagem de regeneração de plantas e explantes originados de estolões apresentaram significativos problemas de contaminação.

Quando a planta utilizada como fonte de explante é cultivada em condições de campo ou em casa de vegetação, este deverá ser submetido ao processo de assepsia que consiste na

desinfestação ou remoção de contaminantes existentes na superfície do explante. Estes contaminantes podem ser abióticos (restos de solo, pedregulhos, etc.) ou bióticos (fungos ou bactérias). A assepsia é realizada, principalmente, por meio de alvejantes comerciais à base de cloro, mas outras substâncias também podem ser utilizadas, tais como álcool e detergentes (CID; TEIXEIRA, 2010).

#### 2.4.2 Regeneração de plantas

Baseado na totipotência das células vegetais, isto é, na capacidade de uma única célula se diferenciar e formar uma planta, a cultura de tecidos possibilita a regeneração de indivíduos idênticos à planta matriz, contendo todas as informações genéticas num processo caracterizado como clonagem de fragmentos de tecidos e órgãos vegetais. Portanto, a morfogênese *in vitro* se refere ao desenvolvimento de qualquer órgão (parte aérea, flor, raiz) a partir de células ou tecidos que originalmente não possuem essa forma ou estrutura (COSTA et al., 2006).

O processo de diferenciação celular reflete o efeito de três grupos de fatores. O primeiro se refere ao fator genético, que incorpora o estoque de potencialidades que pode ser expresso durante o desenvolvimento do vegetal; o segundo está relacionado com as características originadas durante a morfogênese; e, por fim, existem as características cuja expressão depende do ambiente (KERBAUY, 1998).

Novos órgãos vegetais, tais como brotos e raízes, podem ser induzidos em tecidos nos quais antes eles não existiam. Tais órgãos assim originados são chamados de “adventícios”. A criação de uma nova organização celular nos tecidos e o desenvolvimento de novos órgãos, onde antes eles não existiam, é chamada de morfogênese ou organogênese. Muitos trabalhos têm apresentado a possibilidade de se obterem brotos (cauligênese), raízes (rizogênese), embriões somáticos e flores de forma adventícia. A cauligênese, a rizogênese e a embriogênese somática são os tipos de organogênese mais importantes para a multiplicação vegetal (LEMOS, 2010).

De acordo com Landi e Mezzetti (2006) níveis satisfatórios de regeneração de plantas de morango podem ser obtidos a partir de cuidadosos estudos para determinação do balanço ideal de reguladores de crescimento para cada cultivar, bem como de avaliação da resposta do tecido utilizado como explante.

Biswas et al. (2010) trabalharam com as variedades de morango Rabi-01, Rabi-02 e Rabi-03, avaliando a regeneração de plantas a partir de explantes foliares, segmentos nodais e estolões. Meios de cultura com diferentes concentrações de reguladores de crescimento foram

testados para indução do desenvolvimento de calos e na sequência, foram testados meios de cultura para regeneração e enraizamento das plantas. Foi possível regenerar plantas a partir das três fontes de explantes e dos três genótipos avaliados. O explante que apresentou melhor resposta, em termos de regeneração, foi aquele obtido a partir de estolões.

Já, em experimentos desenvolvidos por Folta et al. (2006), as melhores porcentagens de regeneração de plantas foram obtidas a partir de pecíolos e as porcentagens mais baixas foram obtidas a partir de estolões. Evidencia-se, assim, a necessidade de determinações específicas para o genótipo que se está trabalhando.

#### 2.4.3 Enraizamento das brotações

O enraizamento de brotações obtidas a partir da organogênese é feita por subcultivo em meio de cultura específico, o qual geralmente é suplementado com auxina. A indução de raízes por auxinas ainda não está muito bem compreendida nos seus diversos aspectos. Na presença de auxina no meio de cultura, é comum o aparecimento de calos, a partir dos quais serão desenvolvidas raízes (LEMOS, 2010).

No entanto, a resposta ao enraizamento varia de acordo com o genótipo. Folta et al. (2006) testaram o enraizamento de brotações adventícias de morangueiro, obtido a partir da cultivar mãe Festival, em meio de cultura com e sem auxina, obtendo melhores resultados para aquelas brotações subcultivadas em meio de cultura sem adição do regulador de crescimento.

#### 2.4.4 Aclimação da plantas micropropagadas

A aclimação de plantas é o processo de adaptação gradual da muda ou de outras estruturas de propagação obtidas por meio de cultura de tecidos vegetais, provenientes de ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro* (BRASIL, 2012).

Para a continuidade do processo de propagação de plantas, por meio da micropropagação, é fundamental a etapa de aclimação das mesmas, pois neste estágio são produzidas novas raízes, capazes de garantir o desenvolvimento da planta em condições *in vivo* (PEDROTTI; VOLTOLINI, 2001).

Ao término do processo de micropropagação, as plantas são muito tenras e sensíveis a alterações ambientais, pois, durante o desenvolvimento *in vitro*, não desenvolvem a cutícula, as paredes celulares não apresentam rigidez para sustentação; as folhas são delgadas e fotossinteticamente pouca ativas, conferindo à planta condição de heterotrofismo e os estômatos não operam eficientemente (BRAINERD; FUCHIGAMI, 1981).

Durante a aclimação, a planta passa da condição heterotrófica para autotrófica. Após o transplante, as plantas micropropagadas necessitam de ambientes com elevada umidade, e ao longo deste estágio estas plantas são expostas gradativamente à ambientes com umidade mais baixa. A condição autotrófica da planta é fundamental para o desenvolvimento em condições *ex vitro* (HARTMANN et al., 1990).

### 3 DIFERENTES TRATAMENTOS PARA A GERMINAÇÃO *IN VITRO* DE SEMENTES DE MORANGUEIRO, NO MOMENTO DA COLHEITA E ARMAZENADAS

#### RESUMO

Nos últimos anos tem sido observado significativo incremento na produção de morangos, evidenciando a necessidade de busca por novas tecnologias que possibilitem melhorias para o setor. O trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a germinação de sementes de morangueiro no momento da colheita e armazenadas por 2 e 12 meses, submetidas à: T<sub>1</sub> - escarificação com uma lixa comercial, T<sub>2</sub> - imersão em solução de ácido sulfúrico 10% por 10 minutos, T<sub>3</sub> - imersão por 5 minutos em água à temperatura de 60°C, T<sub>4</sub> - incubação em meio de cultura contendo 1,5 mg L<sup>-1</sup> de bezilaminopurina (BAP), T<sub>5</sub> - incubação em meio de cultura contendo 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e T<sub>6</sub> - testemunha (aquênios submetidos apenas a assepsia) e submetidas à fotoperíodo de 16 horas e de 0 horas. O delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado em esquema fatorial 2x6. As variáveis avaliadas foram a porcentagem de germinação e massa fresca de plântulas. Os tratamentos para a germinação *in vitro* que resultaram em maiores porcentagens de germinação de aquênios frescos (momento da colheita) foram a escarificação com lixa comercial e escarificação com ácido sulfúrico. Já para os aquênios armazenados por dois meses, os tratamentos que apresentaram os melhores resultados foram a escarificação com ácido sulfúrico e a adição de 0,5 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> no meio de cultura. Os aquênios armazenados por 12 meses, não germinaram. Com relação ao fotoperíodo as sementes apresentaram comportamento fotoblástico positivo.

**Palavras chave:** *Fragaria x ananassa*, fotoperíodo, viabilidade.

#### ABSTRACT

In the last years it has been observed a significant increase in strawberry production, evidencing the need to search for new technologies that enable improvements to the sector. Considering these aspects related to the strawberry crop, the work was to evaluate germination of fresh strawberries and stored for 2 and 12 months, subject to: T<sub>1</sub> - scarification with the sandpaper commercial, T<sub>2</sub> - immersion in 10% sulfuric acid for a 10 minutes, T<sub>3</sub> - immersion for 5 minutes in water at 60°C, T<sub>4</sub> - incubation in culture medium containing 1,5 mg L<sup>-1</sup> of benzylaminopurine (BAP), T<sub>5</sub> - incubation in culture medium containing 0,5 mg L<sup>-1</sup> of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) and T<sub>6</sub> - witness (achenes submitted only the asepsis) and submitted to photoperiod of 16 hours and of 0 hours. The experimental design was completely randomized in a 2x6 factorial. The variables were: germination tax and fresh weight of plants. The seeds strawberry significantly reduces the germination tax. The dormancy breaking treatments that resulted in higher germination tax of fresh seeds were scarified with sandpaper and trade with sulfuric acid. As for the seeds stored for two months, treatment which showed the best results were with sulfuric acid and adding 0,5 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> in the culture medium. The seeds stored for 12 months, are not viable. With respect to photoperiod the seeds showed positive photoblastic behavior.

**Keywords:** *Fragaria x ananassa*, photoperiod, viability

### 3.1 INTRODUÇÃO

O morangueiro pertence a família Rosaceae, ao gênero *Fragaria* e a espécie *Fragaria x ananassa* Duch. É um híbrido interespecífico das espécies *F. chiloensis* e *F. virginiana*. As plantas formam touceiras com altura que varia de 15 a 30 cm (GRAHAM, 2005). Os frutos são do tipo aquênio e comumente confundidos com sementes. A parte que geralmente é denominada fruto do morango corresponde ao receptáculo floral que desenvolve-se adquirindo característica carnosa e sabor variável (SILVA et al., 2007).

Devido à importância comercial da cultura, os produtores têm adotado novas tecnologias, visando principalmente o aumento da produtividade, entre elas a introdução de novas cultivares (VIDAL et al., 2006). A cultura de tecidos, juntamente com a biologia celular, têm apresentado avanços e significativo êxito nos resultados, devido às suas técnicas abrangentes. Dentre elas, podemos citar a germinação de sementes *in vitro* como sendo uma técnica pouco explorada, por meio da qual é possível obter mudas e material genético para o desenvolvimento de novas cultivares (CID, 2010).

A germinação de sementes *in vitro* é viabilizada pelos meios nutritivos, os quais fornecem as substâncias necessárias para este processo, bem como para o desenvolvimento das plantas. A sua composição deve ser baseada nas exigências de cada planta, sendo feitas as alterações necessárias para o cultivo *in vitro* da espécie e cultivar em questão (SOUZA; JUNGHANS, 2006). Diversas formulações de meios nutritivos têm sido utilizadas para o estabelecimento do cultivo *in vitro*, sendo que o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) tem se destacado por apresentar bons resultados para diversas espécies.

A concentração de sais minerais, no meio de cultura, é outro aspecto fundamental para o sucesso da germinação de sementes *in vitro*. Reis et al. (2008), verificaram que o percentual de germinação de sementes de *Melissa officinalis* em meio nutritivo com 25% da concentração de sais é maior quando comparado à meios mais concentrados. Resultados semelhantes foram obtidos por Nogueira et al. (2004), para sementes de murici pequeno (*Byrsonima intermedia*), onde as maiores taxas de germinação foram obtidas nos meios MS e WPM com 50% da concentração de sais minerais e vitaminas e sem suplementação de sacarose. De acordo com os autores este resultado justifica-se pelo adequado equilíbrio osmótico obtido nestas condições.

Além de condições extrínsecas, as sementes podem apresentar limitações intrínsecas à sua germinação denominadas dormência, a qual pode ser fisiológica, física ou química (TAIZ; ZEIGER, 2009). A germinação de sementes de mangabeira foi favorecida pela remoção do tegumento bem como pelo uso de meio nutritivo MS, em relação ao uso de água de coco e

água destilada (PINHEIRO et al., 2001). Já sementes de morango selvagem (*Fragaria vesca*) mostraram resposta satisfatória para tratamentos prévios de embebição em água à 30 °C por até 36 horas e com ácido giberélico (LOPES; SILVA, 2008).

De acordo com BRASIL (2009) a germinação de sementes das espécies *Fragaria spp* ocorre em temperaturas entre 20 e 30 °C. Não há informações de condições de armazenamento, tratamentos para a quebra de dormência, e exigência de luz para sementes destas espécies.

Considerando a carência de dados científicos sobre as condições de germinação de sementes de morangueiro, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a viabilidade das sementes e identificar as condições de fotoperíodo e tratamentos para a germinação *in vitro* que apresentam resultados satisfatórios na germinação de sementes de morangueiro, visando a obtenção de materiais para trabalhos posteriores de cultura de tecidos e transgenia.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados aquênios retirados de pseudofrutos de morangueiro da cultivar Camiño Real. Os aquênios foram retirados dos pseudofrutos maduros no mesmo dia que estes foram colhidos. Os pseudofrutos foram obtidos de um produtor local. Os aquênios foram submetidos a diferentes períodos de armazenamento sob refrigeração (aproximadamente 5 °C).

Para avaliar a viabilidade dos aquênios ao longo do tempo, foram realizados experimentos com aquênios armazenados em 3 períodos de tempo: aquênios frescos, aquênios armazenados a 5 °C, por 2 meses e por 12 meses. Em cada período de armazenamento foi avaliado a influência do fotoperíodo e de tratamentos para a germinação *in vitro*. As avaliações dos períodos de armazenamento foram realizadas de forma independente.

Os aquênios foram submetidos a germinação em meio de cultura MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962) com 25% da concentração de sais minerais, acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1 g L<sup>-1</sup> de myo-inositol e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 e em seguida os meios foram esterilizados em autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

A assepsia dos aquênios foi realizada por meio de imersão por 40 segundos em álcool 70%, em seguida as sementes permaneceram por 30 minutos em hipoclorito de sódio 2,0% com duas gotas de Tween 20 e agitação, então foram realizadas 3 lavagens em água autoclavada e com cisteína.



Após a desinfestação, os aquênios foram acondicionadas em placas de Petri e incubados em sala de crescimento. Para cada um dos tratamentos foram preparadas 8 placas, contendo 8 aquênios por placa. Destas, 4 placas foram incubadas em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura controlada de 25 °C. E as outras 4 placas permaneceram na mesma condição de temperatura porém em ausência de luz por 30 dias. Após este período foi avaliada a porcentagem de germinação e a massa das plântulas.

A testemunha constou de aquênios desinfetados e acondicionados em placas de Petri contendo o meio de cultura. Os tratamentos aplicados para facilitar a germinação *in vitro* foram: T<sub>1</sub> - escarificação com uma lixa comercial, T<sub>2</sub> – imersão em solução de ácido sulfúrico 10% por 10 minutos, T<sub>3</sub> - imersão por 5 minutos em água à temperatura de 60 °C, T<sub>4</sub> – incubação em meio de cultura contendo 1,5 mg L<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BAP), T<sub>5</sub> - incubação em meio de cultura contendo 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e T<sub>6</sub> - testemunha.

O delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado, em esquema fatorial 2 x 6, sendo 2 condições de fotoperíodo e 6 tratamentos para germinação *in vitro*; com transformação de dados por meio da equação  $\arcsin(\sqrt{x + a}/100)$ . Os resultados foram avaliados, com auxílio do programa ESTAT, por meio de análise de variância e teste de Tukey à 5% de probabilidade.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostraram interação significativa entre os fatores tratamentos para a germinação *in vitro* e fotoperíodo, testados em aquênios frescos e armazenados por 2 meses (Tabelas 1 e 2). Os aquênios armazenados por 12 meses não germinaram, independente do tratamento para germinação e fotoperíodo empregados.

Tabela 1 – Porcentagem de germinação de aquênios frescos de morangueiro, submetidos à diferentes tratamentos para germinação *in vitro* e germinados sob fotoperíodo de 16 horas ou de 0 hora. Ponta Grossa, PR, 2012.

Tratamentos para germinação	Fotoperíodo	
	16 horas (%)	0 hora (%)
Testemunha	32,5 ABCa*	2,5 Ab
Embebição em água quente	33,2 BCa	0 Aa
Adição de BAP no meio de cultura	5 Ca	0 Aa
Escarificação química (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	62,6 AB a	9,3 Ab
Escarificação mecânica	84,3 A a	8,2 Ab
Adição de GA <sub>3</sub> no meio de cultura	35 ABCa	12,5 Aa
	CV 6,47%	

\* Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, P ≤ 0,05.

Tabela 2 – Porcentagem de germinação de aquênios de morangueiro armazenados sob refrigeração por 2 meses, submetidos à diferentes tratamentos para germinação *in vitro* e germinados sob fotoperíodo de 16 horas ou de 0 hora. Ponta Grossa, PR, 2012.

Tratamentos para germinação	Fotoperíodo		
	16 horas (%)		0 hora (%)
Testemunha	25	Ba*	0 Aa
Embebição em água quente	7,5	Ba	0 Aa
Adição de BAP no meio de cultura	5	Ba	0 Aa
Escarificação química (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	53,1	A a	0 A b
Escarificação mecânica	7,5	Ba	2,5 Aa
Adição de GA <sub>3</sub> no meio de cultura	42,5	A a	16,6 A b
CV 4,65%			

\* Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey,  $P \leq 0,05$ .

Na Tabela 1 são apresentados os dados referentes a porcentagem de germinação de sementes obtidas a partir de aquênios frescos de acordo com os tratamentos para germinação *in vitro* e as condições de fotoperíodo. A escarificação mecânica foi o tratamento que resultou na maior porcentagem de germinação, não diferindo estatisticamente da escarificação química.

De acordo com BRASIL (2009) não há recomendação de tratamentos para a germinação de sementes de morango, porém os resultados obtidos mostram que a remoção das camadas externas dos aquênios facilita a germinação das sementes desta espécie.

Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira et al. (2003), que verificaram que a escarificação química com ácido sulfúrico, e a escarificação mecânica foram eficientes na quebra de dormência de sementes de canafistula.

Os tratamentos de adição de GA<sub>3</sub> no meio de cultura, embebição em água quente e testemunha apresentaram taxas de germinação estatisticamente iguais, mas inferiores aos citados acima (Tabela 1).

Lopes e Silva (2008) obtiveram resultados semelhantes, trabalhando com sementes de espécie do gênero *Fragaria*, onde a porcentagem de germinação foi semelhante para sementes embebidas em água à 30 °C, para aquelas submetidas a germinação em substrato adicionado de GA<sub>3</sub> e para a testemunha. Os mesmos autores verificaram redução na porcentagem de germinação das sementes que foram submetidas a embebição em água à 45 °C.

Passos et al. (2004), avaliaram a germinação de sementes de maracujá submetidas a diferentes concentrações de GA<sub>3</sub> e a presença e ausência de luz e concluíram que a adição 1000 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> ao meio de cultura melhorou a germinação, diferindo dos resultados obtidos no trabalho.

Os aquênios submetidos a germinação em meio de cultura adicionado de BAP apresentaram baixa taxa de germinação (Tabela 1), indicando que a presença desta citocinina

influencia negativamente na germinação de sementes de morangueiro. Esta influência negativa, constatada também em murici pequeno, pode estar associada ao desbalanço hormonal desencadeado pela elevada concentração de citocinina exógena (NOGUEIRA et al., 2004).

Com relação ao fotoperíodo, este mostrou-se indispensável para germinação de sementes de morangueiro, pois, com fotoperíodo de 0 horas, a germinação foi praticamente nula, tanto para os aquênios frescos (Tabela 1), quanto para os armazenados por 2 meses (Tabela 2). Costa e Ayub (2001) também observaram que a germinação de sementes de Calêndula na ausência de luz é inviável, indicando que as sementes das duas espécies são fotoblásticas positivas.

Para os aquênios armazenados por 2 meses observou-se baixa porcentagem de germinação. Quanto aos tratamentos empregados para a germinação *in vitro*, a escarificação química e a adição de GA<sub>3</sub> no meio de cultura mostraram-se estatisticamente superiores aos demais tratamentos (Tabela 2). Esta resposta a GA<sub>3</sub> indica que a semente de morango fresca apresenta quantidade de GA<sub>3</sub> endógena suficiente para desencadear a germinação e que durante o armazenamento ocorre a degradação de GA<sub>3</sub> (SCALON et al., 2006).

O armazenamento, sob refrigeração, dos aquênios pode ter ocasionado as alterações nos níveis de GA<sub>3</sub> endógena, e/ou a redução da sensibilidade dos tecidos (CÂMARA; SERAPHIN, 2002) favorecendo a resposta à suplementação com GA<sub>3</sub> exógena. Câmara e Seraphin (2002) também observaram que a germinação de sementes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, armazenadas por 5 meses, foi favorecida pelo uso de 0,35 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub>. Alves et al. (2006) trabalhando com a germinação de sementes de maracujá doce concluíram que o armazenamento das sementes em baixas temperaturas e o efeito de GA<sub>3</sub> são semelhantes para a espécie.

Para os aquênios armazenados, a embebição em água quente, adição de BAP no meio de cultura e escarificação mecânica apresentaram resultados semelhantes à testemunha (Tabela 2), evidenciando a ineficiência destes tratamentos.

Com relação à massa fresca média das plântulas, não houve interação significativa entre os fatores. Dentre os tratamentos para germinação *in vitro* não foi observada diferença estatística significativa, sendo que o valor médio para as plântulas provenientes de aquênios frescos foi de 0,0020 g. e para as plântulas obtidas a partir de aquênios armazenados por 2 meses foi de 0,0018 g.

Quanto ao fotoperíodo foi observado comportamento semelhante para os aquênios frescos ou armazenados por 2 meses, sendo que as plântulas obtidas a partir da germinação

sob fotoperíodo de 16 horas apresentaram maior massa média em relação aquelas que permaneceram em fotoperíodo de 0 horas (Tabela 3).

Tabela 3 – Massa fresca média de plântulas de morangueiro obtidas a partir de aquênios frescos e armazenados por 2 meses, submetidos a fotoperíodo de 16 horas ou de 0 horas. Ponta Grossa, PR, 2012.

<b>Aquênios Frescos</b>	
<b>Fotoperíodo de 16 horas</b>	<b>Fotoperíodo de 0 horas</b>
0,0027 A*	0,0013 B
CV 0%	
<b>Aquênios Armazenados por 2 meses</b>	
0,0030 A*	0,0006 B
CV 0%	

\*Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si, pelo teste de Tukey,  $P < 0,05$ .

Estes resultados estão relacionados, possivelmente, com a capacidade fotossintética das plântulas que germinaram sob a incidência de luz, a qual possibilitou maior acúmulo de massa fresca (TAIZ; ZEIGER, 2009).

### 3.4 CONCLUSÃO

Para a germinação de sementes de morango *in vitro* deve-se retirar as camadas externas do aquênio por meio de métodos de escarificação química ou mecânica. Aquênios armazenados sob refrigeração por até 2 meses podem ser tratados com GA<sub>3</sub>, em substituição aos métodos de escarificação. A semente do morangueiro é fotoblástica positiva.

#### 4 ORGANOGÊNESE INDIRETA A PARTIR DE EXPLANTE FOLIAR E PECIOLAR DE LINHAGENS DE MORANGUEIRO (*Fragaria x ananassa* Duch.) PROVENIENTES DAS CULTIVARES CAMIÑO REAL E FESTIVAL

##### RESUMO

Considerando a importância da cultura do morangueiro e a variação de resposta dos genótipos de uma mesma espécie quando submetidos à organogênese *in vitro*, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar as condições de regeneração de plantas de morangueiro cultivadas *in vitro*. Foram utilizadas plantas obtidas a partir das cultivares Camiño Real e Festival. Os experimentos foram realizados a partir de folhas e pecíolos provenientes dos respectivos genótipos. Foram realizados três experimentos com combinações específicas de reguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura com os sais minerais e vitaminas do meio básico MS. Foi avaliada a influência das combinações de reguladores de crescimento e do tipo de explante nas variáveis: porcentagem de explantes com calos, com gemas e com brotos, número de gemas e brotos por explante, porcentagem de plântulas enraizadas, massa fresca de plântulas e porcentagem de sobrevivência após a aclimação. O delineamento experimental dos três experimentos foi inteiramente aleatorizado, sendo que o primeiro foi em esquema fatorial 2 x 3 x 2 (2 fontes de explante, 3 meios de indução e 2 meios de regeneração), o segundo foi em esquema fatorial 2 x 9 (2 fontes de explante e 9 meios de regeneração) e o terceiro em esquema fatorial 2 x 4 (fontes de explante e 4 meios de regeneração). As combinações dos reguladores de crescimento ANA, BAP e AIB utilizadas no experimento I mostraram-se ineficientes independentemente da fonte de explante utilizada. Os reguladores de crescimento utilizados no experimento II, nas concentrações entre 1,5 mg L<sup>-1</sup> e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de TDZ combinados com 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AIB apresentaram resultados satisfatórios para o genótipo obtido a partir da cultivar Camiño Real. No experimento III, realizado com o genótipo obtido a partir da cv. Festival não foi observada diferença estatística significativa entre as concentrações de reguladores de crescimento empregadas. Os explantes peciolares apresentaram resultados inferiores em relação aos explantes foliares para os dois genótipos avaliados (experimentos II e III).

**Palavras chave:** regeneração, cultivo *in vitro*, reguladores de crescimento

##### ABSTRACT

Considering the importance of the strawberry culture and the variation of response of genotypes of the same species when submitted to the organogenesis *in vitro* this work was developed with the goal of establishing the protocol for regeneration of strawberry plants obtained from seed germination and cultured *in vitro*. It was used fruits of plants of the cultivars Camiño Real and Festival. The experiments were performed from leaves and petioles from the respective genotypes. Two experiments were performed with specific combinations of plant growth regulators added to the culture medium with mineral salts and vitamins of MS basal medium. It was evaluated the influence of combinations of growth regulators and explant type in variables: percentage of explants with calluses, with buds and shoots, number of buds and shoots per explant, percentage of rooted plants, fresh weight of the plants and the percentage of survival after acclimation. The experimental design of the two experiments was completely randomized, and the first one was in a factorial 2 x 3 x 2 (2 explant sources, 3 means of induction and 2 means of regeneration) and the second was in a factorial 2 x 9 (2 explant sources and 9 means for regeneration of plants). The combinations of growth regulators NAA, BAP and IBA used in experiment I proved inefficient regardless of

the source of explant used. The growth regulators used in the experiment II, at concentrations between  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  and  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ combined with  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  IBA showed satisfactory results for genotypes obtained from the Camino Real Festival and cultivars when leaf explants were used. The petiole explants showed inferior results for the genotypes. The combinations of growth regulators NAA and BAP and IBA used in experiment I proved to be inefficient independent of the source of explant used. The Growth regulators used in experiment II, at concentrations between  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  and  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  of TDZ combined with  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  of IBA showed satisfactory results for genotypes obtained from the cultivars Camiño and Real Festival when leaf explants were used. The petiole explants showed inferior results for the evaluated genotypes.

**Keywords:** regeneration, in vitro cultivation, growth regulators

#### 4.1 INTRODUÇÃO

O morangueiro pertence ao gênero *Fragaria* e a família Rosaceae (GRAHAM, 2005). As espécies pertencentes a este gênero podem ser propagadas por sementes e por estolões. A propagação por sementes não é adotada comercialmente, devido ao maior período juvenil em relação às mudas propagadas por estolão (BHATT; DHAR, 2000). Outra limitação da propagação por meio de sementes é a variabilidade dos genótipos obtidos, característica indesejável para a maioria das frutíferas, incluindo o morangueiro (DALAGNOL, 2010).

Há 19 espécies de *Fragaria* selvagem, nas quais observa-se a ocorrência de plantas com números diferentes de cromossomos: diplóide, tetraplóide, hexaplóide e octoplóide (GRAHAM, 2005). O morango cultivado comercialmente faz parte do grupo de plantas octoplóides, denominado *Fragaria x ananassa* Duch., obtido a partir do cruzamento entre as espécies originárias da América (*Fragaria virginiana* x *Fragaria chiloensis*) (BRAHM; OLIVEIRA, 2004).

A cultivar Camiño Real, desenvolvida na Universidade da Califórnia em 2001 e introduzida no Brasil a partir de 2006, é considerada uma cultivar produtiva, podendo produzir até 1 kg de frutas comerciais por planta e possibilita a colheita no período de agosto a dezembro para a maioria das regiões produtoras (OLIVEIRA et al., 2007).

Obtida do cruzamento entre as cultivares Rosa Linda e Oso Grande, a cultivar Festival é proveniente da Universidade da Flórida em 1995, sendo cultivar de dias curtos, com planta vigorosa e produtiva. Os frutos apresentam formato cônico, tamanho médio, coloração vermelha uniforme, textura firme e boas características de aroma (OLIVEIRA et al., 2007).

Visando principalmente o aumento de produtividade, os produtores têm buscado novas tecnologias, como a introdução de novas cultivares. Uma das alternativas para o desenvolvimento de novas cultivares e para a incorporação de melhorias no sistema de produção é a cultura de tecidos (CID, 2010). Dentre as técnicas englobadas pela cultura de

tecidos, destaca-se a micropropagação por segmentos nodais, a organogênese e a embriogênese somática (SOUZA et al., 2006).

A organogênese corresponde a reorganização celular em tecidos vegetais e o consequente desenvolvimento de novos órgãos, os quais são denominados adventícios. A possibilidade de se obter brotos, raízes, embriões somáticos e flores adventícios é comprovada por diversos trabalhos. Porém, existem espécies que apresentam limitações para a regeneração de órgãos *in vitro* (LEMOS, 2010).

O processo de organogênese está diretamente relacionado com o balanço de fitohormônios exógenos (LEMOS, 2010). Os fitohormônios são substâncias orgânicas naturais, biologicamente ativas a concentrações muito baixas. Caracterizam-se como moléculas relativamente pequenas que desencadeiam grande quantidade de sinais intracelulares, permitindo uma amplificação dos efeitos e produzindo respostas de grande magnitude em relação à pequena quantidade utilizada (HINOJOSA, 2005).

De acordo com Taiz e Zeiger (2009) o desenvolvimento vegetal é regulado por seis tipos principais de fitohormônios: auxinas, giberilinas, citocininas, etileno, ácido abscísico e brassinosteróides. Embora existam variações de acordo com o genótipo que está sendo trabalhado, as auxinas e citocininas são fundamentais para o processo de organogênese (LEMOS, 2010).

A auxina mais comum de ocorrência natural é o ácido indol-3-acético (AIA) (TAIZ; ZEIGER, 2009). Experimentos com diferentes espécies indicam também a presença de ácido indol butírico (AIB), porém não está claro se esta auxina é sintetizada ou se é resultante da conversão de AIA em AIB (HINOJOSA, 2005).

A partir de 1955, iniciou-se a produção de diferentes auxinas sintéticas, sendo as mais importantes: ácido indol-propiónico (AIP); ácido naftalenoacético (ANA); ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético (2,4-D); ácido 2,4,5-tricloro-fenoxiacético (2,4,5-T); ácido 2,metil,4-cloro-fenoxiacético (MCPA); ácido 2 metoxi-3,6 diclorobenzoico (dicamba); ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram) (HINOJOSA, 2005).

Estudos desenvolvidos, a partir do cultivo *in vitro*, identificaram que bases púricas eram altamente ativas na divisão celular e que esta atividade não era promovida pela ação do AIA; posteriormente, o composto responsável pela divisão celular foi identificado e denominado cinetina (CID, 2010). Atualmente a ação das citocininas é diretamente relacionada a viabilidade de processos biotecnológicos como a cultura de tecidos vegetais (PERES; KERBAUY, 1998).

As primeiras citocininas naturais isoladas foram a zeatina e a cinetina, ambas derivadas da base púrica adenina, além destas, este grupo de fitohormônios é composto também por benzilaminopurina (BAP), isopenteniladenina (iP), dentre outros. Alguns compostos não derivados de adenina também apresentam atividade citocinínica, como é o caso do Thidiazuron (TDZ) (PERES; KERBAUY, 1998).

Técnicas de cultura de tecidos, como a organogênese são utilizadas para otimizar processos biotecnológicos que possibilitem a regeneração de plantas (RANCE et al., 1994), a qual é altamente dependente do genótipo utilizado (GRAY et al., 1993). Desta forma, existe a necessidade do desenvolvimento de protocolos de regeneração específicos para cada cultivar (PINHO et al., 2010).

Embora a cultura do morango caracterize-se pelo elevado valor agregado, existem relativamente poucos relatos de aplicação da biotecnologia nas investigações relacionadas à propagação da cultura. O fato do morango cultivado comercialmente ser octoplóide também representa uma limitação para o desenvolvimento de estudos nesta área (FOLTA et al., 2006).

No entanto, alguns estudos mostram que é possível regenerar plantas de morango a partir de organogênese, utilizando explantes foliares, de pecíolo e de estolões (BISWAS et al., 2010; FOLTA et al., 2006; FLORES et al., 1998), sendo que esta pode ser uma técnica eficiente tanto para a propagação vegetativa da espécie como para o desenvolvimento de novas cultivares (FOLTA et al., 2006).

O sucesso da produção de morangos está relacionado à utilização de mudas de qualidade, principalmente fitossanitária, cuja produção deve ser feita em viveiros telados, a partir de matrizeiros provenientes da cultura de meristemas realizada em laboratórios de micropropagação. No Brasil, existem diversos laboratórios atuando neste ramo, porém a quantidade de matrizes produzidas é insuficiente para atender à demanda nacional. Em consequência mais de 80% das mudas de morangueiro utilizadas no Rio Grande do Sul são provenientes do Chile e da Argentina (BRAHM; OLIVEIRA, 2004).

Considerando a variação de resposta dos genótipos de uma mesma espécie quando submetidos à organogênese *in vitro* e a necessidade de estabelecimento dos protocolos de regeneração específicos, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a resposta dos genótipos obtidos a partir das cultivares Camiño Real e Festival quando submetidas a regeneração *in vitro* em meios de cultura com diferentes combinações de reguladores de crescimento.



## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de organogênese de morangueiro foram realizados a partir de folhas e pecíolos provenientes de plântulas de morangueiro cultivadas *in vitro*, obtidas a partir da germinação sementes das cultivares Camiño Real e Festival. Foram realizados 3 experimentos. Nos experimentos I e II foram utilizados explantes obtidos a partir da cultivar Camiño Real e no Experimento III foram utilizados explantes obtidos a partir da cultivar Festival.

Para os 3 experimentos, os explantes pecíolares foram separados do restante da planta e cortados em segmentos de aproximadamente 1 cm, e os explantes foliares foram separados em fragmentos com cerca de 1 cm<sup>2</sup>. O manuseio dos explantes foi realizado em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas.

Os explantes, devidamente preparados, foram acondicionados em placas de Petri contendo o meio de cultura com os sais minerais e vitaminas do meio básico MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962), enriquecido com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,01 g L<sup>-1</sup> de mio inositol e solidificado com 6 g L<sup>-1</sup> de ágar para cultura de tecidos. Os meios de cultura foram suplementados com diferentes combinações de reguladores de crescimento, sendo que cada combinação constituiu um tratamento.

No experimento I, os reguladores de crescimento utilizados foram: ácido naftalenoacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB), benzilaminopurina (BAP). O ANA e o BAP foram utilizados para indução de divisão celular dos explantes, e na sequência, os explantes foram transferidos para o meio de regeneração contendo AIB, conforme apresentado na Tabela 4.

Nos experimentos II e III foram utilizados: Thidiazuron (TDZ) e ácido indolbutírico (AIB). As concentrações dos reguladores de crescimento utilizadas para as plantas obtidas a partir da cultivar Camiño Real são apresentadas na Tabela 5 e para as plantas obtidas a partir da cultivar Festival na Tabela 6.

### 4.2.1 Experimento I

O delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado, em esquema fatorial 2 x 3 x 2, sendo duas fontes de explantes (folhas e pecíolos), 3 concentrações de reguladores de crescimento para indução e 2 concentrações de reguladores para regeneração de plantas. Cada tratamento foi composto por 4 repetições, sendo que cada repetição foi composta por 6 explantes.

Para a indução da desdiferenciação e divisão celular os explantes foram acondicionados em placas de Petri contendo o meio de cultura com os sais minerais e vitaminas do meio básico MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962), enriquecido com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,01 g L<sup>-1</sup> de myo inositol, solidificado com 6 g L<sup>-1</sup> de ágar para cultura de tecidos e suplementado com as concentrações de ANA e de BAP apresentadas na Tabela 4.

Os explantes acondicionados nas placas de Petri com os respectivos meios de cultivo foram acondicionados em sala de crescimento com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 16 horas, onde permaneceram por 21 dias. Após este período, foi realizada a avaliação do número de explantes que formaram calos, e na sequência estes foram transferidos para o meio de regeneração.

Para a regeneração de brotações, os explantes foram transferidos para meio de cultura MS contendo apenas auxina – ácido indolbutírico (AIB). As concentrações de AIB utilizadas são apresentadas na Tabela 4. Os explantes transferidos para o meio de regeneração, foram acondicionados em sala de crescimento com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 16 horas, onde permaneceram por 84 dias.

Tabela 4 – Concentração dos reguladores de crescimento ANA, BAP e AIB utilizados nos meios de indução e de regeneração de morangueiro, obtidos a partir da cultivar Camiño Real. Ponta Grossa, PR, 2012.

<b>Meios de Indução</b>		
<b>Tratamento</b>	<b>Concentração de ANA</b>	<b>Concentração de BAP</b>
1	2 mg L <sup>-1</sup>	1,5 mg L <sup>-1</sup>
2	4 mg L <sup>-1</sup>	1,0 mg L <sup>-1</sup>
3	4 mg L <sup>-1</sup>	1,5 mg L <sup>-1</sup>
<b>Meios de Regeneração</b>		
<b>Tratamento</b>	<b>Concentração de AIB</b>	
1	2 mg L <sup>-1</sup>	
2	3 mg L <sup>-1</sup>	

Após 84 dias foi realizada a contagem do número de explantes com gemas e número de explantes com brotações.

#### 4.2.2 Experimento II

O delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado, em esquema fatorial 2 x 9, sendo dois explantes (folha e pecíolo) e 9 concentrações de reguladores de crescimento (Tabela 5). Cada tratamento foi composto por 4 repetições, sendo que cada repetição foi composta por 6 explantes.

Os reguladores de crescimento utilizados neste experimento foram ácido indolbutírico (AIB) e Thidiazuron (TDZ), as concentrações utilizadas para a organogênese das plantas obtidas a partir da cultivar Camiño Real são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Concentração dos reguladores de crescimento TDZ e AIB utilizados na regeneração de morangueiro obtidos a partir da cultivar Camiño Real. Ponta Grossa, PR, 2012.

Concentração TDZ	Concentração AIB
1,0 mg L <sup>-1</sup>	0,1 mg L <sup>-1</sup>
	0,3 mg L <sup>-1</sup>
	0,5 mg L <sup>-1</sup>
1,5 mg L <sup>-1</sup>	0,1 mg L <sup>-1</sup>
	0,3 mg L <sup>-1</sup>
	0,5 mg L <sup>-1</sup>
2,0 mg L <sup>-1</sup>	0,1 mg L <sup>-1</sup>
	0,3 mg L <sup>-1</sup>
	0,5 mg L <sup>-1</sup>

O esquema de avaliações utilizado para os Experimentos II e III é apresentado na Figura 1.

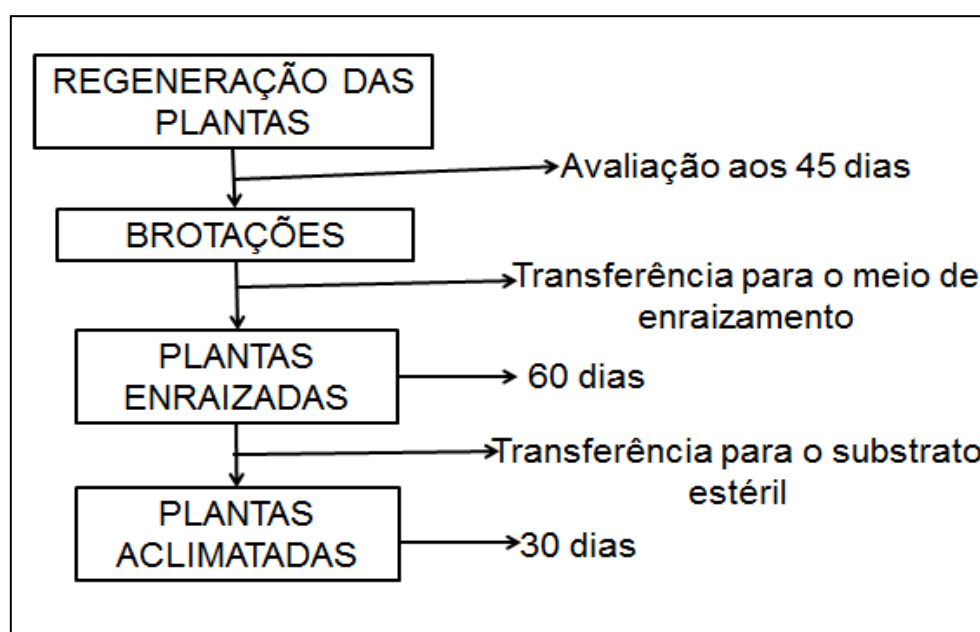


Figura 1 – Esquema das etapas e avaliações realizadas nos experimentos II e III.

As placas de Petri com os respectivos meios de cultura foram acondicionados em sala de crescimento com temperatura de  $25\text{ °C} \pm 2$  e fotoperíodo de 16 horas. Após 45 dias foi realizada a contagem do número de explantes com calos, com gemas e com brotações. Nos explantes com gemas e brotações foi feita a determinação do número de gemas e brotações. As brotações obtidas foram transferidas para frascos contendo o meio de enraizamento com a

metade da concentração de sais minerais e vitaminas do meio básico MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962), enriquecido com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 0,01 g L<sup>-1</sup> de myo inositol, solidificado com 6 g L<sup>-1</sup> de ágar para cultura de tecidos.

As brotações foram incubadas por 60 dias em sala de crescimento com temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 16 horas. Após este período foi realizada a avaliação do número de plantas enraizadas e a determinação da massa das plantas obtidas, as quais foram transferidas para copos plásticos de 300 ml contendo substrato estéril e coberto com saco plástico para manutenção da umidade.

A aclimação das plantas foi realizada por meio da abertura gradativa do saco plástico de modo que a umidade da atmosfera próxima à planta diminuísse até que a planta pudesse ser exposta as condições ambientais. O processo de aclimação das plantas durou 30 dias. Após este período foi feita a contagem do número de plantas sobreviventes e determinada a porcentagem em relação ao número de plantas transferidas para o substrato.

#### 4.2.3 Experimento III

Para o experimento com as plantas obtidas a partir da cultivar Festival foram selecionadas 4 concentrações de reguladores de crescimento, as quais são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Concentração dos reguladores de crescimento TDZ e AIB utilizados na regeneração de morangueiros obtidos a partir da cultivar Festival. Ponta Grossa, PR, 2012.

Concentração TDZ	Concentração AIB
1,5 mg L <sup>-1</sup>	0,1 mg L <sup>-1</sup>
	0,3 mg L <sup>-1</sup>
2,0 mg L <sup>-1</sup>	0,1 mg L <sup>-1</sup>
	0,3 mg L <sup>-1</sup>

Os procedimentos empregados no experimento III foram os mesmos já descritos para o Experimento II.

Os resultados obtidos foram avaliados de forma independente para os experimentos I, II e III. O delineamento foi inteiramente aleatorizado, e a análise utilizada foi ANOVA, em esquema fatorial, com transformação de dados por meio da equação  $\arcsin(\sqrt{x + a} / 100)$ . Todos os resultados foram analisados com auxílio do programa ESTAT, utilizando o teste de Tukey à 5% de probabilidade.

## 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.3.1 Experimento I

As concentrações de reguladores de crescimento utilizadas no Experimento I mostraram-se ineficientes para a regeneração de plantas de morango cv. Camiño Real. Os explantes submetidos à indução de desdiferenciação e divisão celular em meios de cultura contendo os reguladores de crescimento ANA e BAP formaram calos em todos os tratamentos. Porém, após a transferência para o meio contendo AIB, a massa celular formada anteriormente não apresentou continuidade no processo de regeneração das plantas.

Folta et al. (2006) observaram que grande parte dos protocolos de regeneração publicados anteriormente para diferentes cultivares de morangueiro mostraram-se ineficientes para a linhagem genética obtida a partir da cv. Festival. A necessidade de adaptação dos protocolos de regeneração de acordo com a cultivar que será trabalhada foi evidenciada, também, com os dados obtidos no primeiro experimento realizado com as plantas obtidas a partir da cv. Camiño Real.

De acordo com Câmara e Seraphin (2002) as diferentes respostas fisiológicas observadas por tecidos vegetais à aplicação de reguladores de crescimento, podem ser relacionadas à sensibilidade do tecido ao respectivo regulador. A sensibilidade dos tecidos é influenciada pela idade fisiológica do tecido e pelas condições ambientais.

### 4.3.2 Experimento II: Genótipo obtido a partir da cv. Camiño Real

As concentrações de reguladores de crescimento utilizadas no Experimento II apresentaram resultados satisfatórios para a regeneração de plantas de morango obtidas a partir da cv Camiño Real. Para a porcentagem de explantes que formaram calos, foram observadas diferenças significativas com relação ao tipo de explante utilizado (Tabela 7).

Tabela 7 – Porcentagem de explantes, provenientes de plântulas de morangueiro obtidas a partir da cv Camiño Real, que apresentaram formação de calo, em função do tecido de constituição dos explantes. Ponta Grossa, PR, 2012.

<b>Tipo de explante</b>	<b>Porcentagem de explante com calos (%)</b>
Folha	97,3 A*
Pecíolo	85,9 B
CV 13,8%	

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey,  $P < 0,05$ .

Trabalhando com a calogênese de morangueiro, cvs. Konvoy-Cascata e Chandler, Flores et al. (1998) observaram a formação de calos em todos os tratamentos com auxina, já com relação intensidade de formação de calos foram observadas respostas diferentes para os genótipos avaliados.

Biswas et al. (2010) avaliaram a formação de calos em diferentes fontes de explantes provenientes de plantas de morangueiro cv. Rabi-01, Rabi-02 e Rabi-03 e observaram significativa influência do tipo de explante utilizado na formação de calos, destacando que explantes provenientes de segmentos nodais e estolões apresentaram resultados melhores em relação aos explantes obtidos a partir de tecidos foliares. Os autores destacam ainda a influencia da idade dos tecidos utilizados e a variação da sensibilidade dos tecidos aos reguladores de crescimento.

Plantas obtidas a partir da germinação de sementes apresentam maior período juvenil (HARTMANN et al., 1990), fato que pode ter influenciado os resultados obtidos no trabalho, pois, de acordo com Biswas et al. (2010) explantes mais jovens apresentam melhores respostas de regeneração in vitro.

Parte das células que formaram os calos se desenvolveram dando origem a gemas e brotações. O número de explantes que apresentaram a formação de gemas diferiu significativamente quanto ao tecido de constituição do explante e as concentrações de reguladores de crescimento utilizadas (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8 - Porcentagem de explantes, provenientes de plântulas de morangueiro obtidas a partir da cv Camiño Real, que apresentaram formação de gemas, em função do tecido de constituição do explante. Ponta Grossa, PR, 2012.

<b>Tipo de explante</b>	<b>Porcentagem de explante com gemas (%)</b>
Folha	81,7 A*
Pecíolo	59,2 B
CV 23,2%	

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de *Tukey*,  $P < 0,05$ .

Tabela 9 - Porcentagem de explantes provenientes de plântulas de morangueiro obtidas a partir da cv Camiño Real, que apresentaram formação de gemas, em função das concentrações de reguladores de crescimento. Ponta Grossa, PR, 2012.

<b>Concentrações dos reguladores de crescimento</b>	<b>Porcentagem de explantes com gemas (%)</b>
1,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg L <sup>-1</sup> de AIB	87,6 A*
1,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,3 mg L <sup>-1</sup> de AIB	77,5 A
1,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de AIB	71,0 A
1,5 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg L <sup>-1</sup> de AIB	88,0 A
1,5 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,3 mg L <sup>-1</sup> de AIB	85,7 A
1,5 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de AIB	58,7 B
2,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg L <sup>-1</sup> de AIB	79,5 A
2,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,3 mg L <sup>-1</sup> de AIB	64,7 A
2,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de AIB	25,1 B
CV 23,2%	

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de *Tukey*,  $P < 0,05$ .

Qin et al. (2011) trabalhando com a regeneração de morango, cv. Toyonaka, a partir de explantes foliares jovens obtiveram, em meio de cultura MS suplementado com 1,5 mg L<sup>-1</sup> de TDZ + 0,4 mg L<sup>-1</sup> de AIB, 100% dos explantes com formação de calos e 77,78% com formação de gemas. No trabalho, com a concentração de 1,5 mg L<sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AIB foi obtido 88% dos explantes com gemas (Tabela 9), porém, estatisticamente apenas a concentração 2,0 mg L<sup>-1</sup> de TDZ + 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB mostrou-se inferior as demais.

Para o número de explantes que apresentaram a formação de brotos foi observada diferença significativa para o tipo de tecido do explante, para as concentrações de reguladores de crescimento utilizadas, bem como interação entre estes fatores (Tabela 10).

Tabela 10 – Porcentagem de explantes provenientes de plântulas de morangueiro obtidas a partir da cv Camiño Real, que apresentaram formação de brotos, em função de explantes foliares e peciulares e da concentração dos reguladores de crescimento. Ponta Grossa, PR, 2012.

Concentrações dos reguladores de crescimento	Porcentagem de explantes com brotos	
	Folha (%)	Peciolo (%)
1,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg L <sup>-1</sup> de AIB	37,7 BCa*	8,5 ABa
1,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,3 mg L <sup>-1</sup> de AIB	71,2 AB a	25,2 AB b
1,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de AIB	37,5 BCa	25,5 ABa
1,5 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg L <sup>-1</sup> de AIB	79,5 AB a	37,7 AB b
1,5 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,3 mg L <sup>-1</sup> de AIB	71,0 AB a	42,0 ABa
1,5 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de AIB	58,7 ABCa	4,2 B b
2,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg L <sup>-1</sup> de AIB	91,7 A a	17,0 AB b
2,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,3 mg L <sup>-1</sup> de AIB	50,2 ABCa	58,7 A a
2,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de AIB	12,7 Ca	00,0 Ba
CV 32,2%		

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, P < 0,05.

Mais de 90% dos explantes foliares apresentaram a formação de brotos quando incubados em meio de cultura suplementado com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AIB. Folta et al. (2006) obtiveram os melhores resultados de regeneração de explantes de morangueiro com linhagem genética obtida a partir da cv. Festival com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de BA (Benziladenina). Estes resultados podem ser indicativos da diferença de adaptação ao cultivo in vitro existente entre os genótipos.

Nos explantes que apresentaram a formação de gemas e de brotos foi avaliado o número destes. Os resultados revelaram diferença significativa tanto para o tipo de explante utilizado como para as concentrações de reguladores de crescimento (Tabelas 11 e 12). Para o número de brotos por explante observou-se, também, interação significativa entre o tipo de explante e as concentrações de reguladores de crescimento (Tabela 13).

Tabela 11 – Média do número de gemas formadas por explante, provenientes de plântulas de morangueiro obtidas a partir da cv Camiño Real, em função do tecido de constituição do explante. Ponta Grossa, PR, 2012.

<b>Tipo de explante</b>	<b>Número de gemas por explante</b>
Folha	2,86 A*
Pecíolo	1,64 B
CV 4,3%	

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de *Tukey*,  $P < 0,05$ .

Tabela 12 – Média do número de gemas formadas por explante, provenientes de plântulas de morangueiro obtidas a partir da cv Camiño Real, em função das concentrações de reguladores de crescimento. Ponta Grossa, PR, 2012.

<b>Concentrações dos reguladores de crescimento</b>	<b>Número de gemas por explante</b>
1,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg L <sup>-1</sup> de AIB	2,42 AB*
1,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,3 mg L <sup>-1</sup> de AIB	2,31 AB
1,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de AIB	2,35 AB
1,5 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg L <sup>-1</sup> de AIB	2,27 AB
1,5 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,3 mg L <sup>-1</sup> de AIB	3,19 A
1,5 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de AIB	1,92 AB
2,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg L <sup>-1</sup> de AIB	2,44 AB
2,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,3 mg L <sup>-1</sup> de AIB	2,44 AB
2,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de AIB	0,92 B
CV 4,3%	

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de *Tukey*,  $P < 0,05$ .

Tabela 13 – Média do número de brotos formados por explante, provenientes de plântulas de morangueiro obtidas a partir da cv Camiño Real, em função de explantes foliares e peciolares, e das concentrações de reguladores de crescimento. Ponta Grossa, PR, 2012.

<b>Concentrações dos reguladores de crescimento</b>	<b>Número médio de brotos por explante</b>	
	<b>Folha</b>	<b>Pecíolo</b>
1,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg L <sup>-1</sup> de AIB	0,71 BCa*	0 Aa
1,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,3 mg L <sup>-1</sup> de AIB	1,16 ABCa	0,33 A b
1,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de AIB	0,75 BCa	0,16 Aa
1,5 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg L <sup>-1</sup> de AIB	1,46 AB a	0,71 Aa
1,5 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,3 mg L <sup>-1</sup> de AIB	1,41 AB a	0,58 A b
1,5 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de AIB	1,04 ABCa	0,08 A b
2,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg L <sup>-1</sup> de AIB	2,29 A a	0,21 A b
2,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,3 mg L <sup>-1</sup> de AIB	1,17 ABCa	1,21 Aa
2,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de AIB	0,17 Ca	0 Aa
CV 2,5%		

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si, pelo teste de *Tukey*,  $P < 0,05$ .

Landi e Mezzetti (2006) observaram as maiores quantidades de brotações em explantes incubados em meio de cultura contendo TDZ e BSAA (3-benzo selenienyl acetic acid). As combinações de TDZ com AIB e de TDZ com 2,4-D apresentaram resultados iguais entre si e inferiores à combinação anterior. Os piores resultados foram obtidos no meio de cultura adicionado apenas de TDZ.

Bhatt e Dhar (2000) trabalhando com a micropropagação da espécie *Fragaria indica* concluíram que o meio de cultura adicionado de BA foi o que apresentou os melhores resultados com relação ao número de brotações produzidas a partir dos explantes. Em



experimentos de regeneração de diferentes genótipos de morangueiros da espécie *Fragaria x ananassa* Duch. os melhores resultados foram obtidos com a utilização de TDZ (FOLTA et al., 2006).

Os brotos obtidos foram transferidos para o meio de enraizamento onde permaneceram por 60 dias. Após este período foi determinada a massa média de plantas e a porcentagem de plantas enraizadas em relação ao número de brotos obtidos. Para massa de plantas foi observada diferença significativa com relação ao tipo de explante utilizado e às concentrações de reguladores de crescimento (Tabela 14). Para esta variável observou-se também interação significativa entre os fatores (Tabela 14).

Tabela 14 – Média da massa fresca de plântulas provenientes da regeneração de explantes obtidos a partir da cv Camiño Real, após 60 dias em meio de enraizamento, em função de explantes foliares e peciolares e das concentrações de reguladores de crescimento. Ponta Grossa, PR, 2012.

Concentrações dos reguladores de crescimento	Massa fresca média por planta (g)	
	Folha	Pecíolo
1,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg L <sup>-1</sup> de AIB	0,22 Ba*	0 Aa
1,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,3 mg L <sup>-1</sup> de AIB	1,40 A a	0,26 A b
1,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de AIB	0,16 Ba	0,20 Aa
1,5 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg L <sup>-1</sup> de AIB	0,58 Ba	0,26 Aa
1,5 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,3 mg L <sup>-1</sup> de AIB	0,23 Ba	0,30 Aa
1,5 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de AIB	0,29 Ba	0 Aa
2,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg L <sup>-1</sup> de AIB	0,43 Ba	0,14 Aa
2,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,3 mg L <sup>-1</sup> de AIB	0,41 Ba	0,48 Aa
2,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de AIB	0 Ba	0 Aa
CV 1,7%		

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, P < 0,05.

Com relação a porcentagem de plantas enraizadas obtidas foi observada diferença significativa apenas em função das concentrações de reguladores de crescimento (Tabela 15).

Tabela 15 – Porcentagem de plântulas de morangueiro enraizadas provenientes regeneração de explantes obtidos a partir da cv Camiño Real, após 60 dias em meio de enraizamento, em função das concentrações de reguladores de crescimento. Ponta Grossa, PR, 2012.

Concentrações dos reguladores de crescimento	Porcentagem de plantas enraizadas (%)
1,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg L <sup>-1</sup> de AIB	2,5 B*
1,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,3 mg L <sup>-1</sup> de AIB	47 AB
1,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de AIB	41,6 AB
1,5 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg L <sup>-1</sup> de AIB	42,2 AB
1,5 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,3 mg L <sup>-1</sup> de AIB	80,7 A
1,5 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de AIB	26,5 AB
2,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg L <sup>-1</sup> de AIB	39 AB
2,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,3 mg L <sup>-1</sup> de AIB	37,8 AB
2,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de AIB	0 B
CV 57,3%	

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, P < 0,05.

Em trabalho desenvolvido com a cultivar de morango Festival foi observado o desenvolvimento de raízes em brotações nos meios de regeneração, para estas plantas foi obtido 100% de enraizamento (FOLTA et al., 2006), diferindo dos resultados obtidos no trabalho, cuja porcentagem máxima de enraizamento foi de aproximadamente 80% (Tabela 15).

Bhatt e Dhar (2000) obtiveram 96,6% de plantas da espécie *Fragaria indica* enraizadas em meio de cultura adicionado de ANA, indicando que a adição de uma auxina no meio de enraizamento pode ser uma alternativa para otimizar o enraizamento de explantes de morangueiro. Já Pereira et al. (1999) destacam a influencia da concentração de sais minerais do meio de cultura para o enraizamento, sendo que, para o morangueiro da cultivar Hofla, os autores obtiveram 99,17% de explantes enraizados em meio de cultura com a metade da concentração de sais do meio MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962) e sem suplementação de reguladores de crescimento.

As plantas enraizadas foram transferidas para o substrato e após 30 dias da transferência foi avaliada a porcentagem de sobrevivências em relação ao número de plantas transferidas para o substrato. A taxa de sobrevivência das plantas foi influenciada significativamente pelo tipo explante utilizado e pelas concentrações de reguladores de crescimento empregados na etapa de organogênese (Tabelas 16 e 17).

Tabela 16 – Porcentagem de plantas aclimatadas provenientes da regeneração de explantes obtidos a partir da cv. Camiño Real, após 30 dias em substrato em relação ao número de plantas enraizadas e transferidas para o substrato, considerando o tipo de explante empregado para a organogênese. Ponta Grossa, PR, 2012.

Tipo de explante	Porcentagem de plantas aclimatadas (%)
Folha	30,9 A*
Pecíolo	16 B
CV 50,1%	

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey,  $P < 0,05$ .

Tabela 17 – Porcentagem de plantas aclimatadas provenientes da regeneração de explantes obtidos a partir da cv Camiño Real, após 30 dias em substrato em relação ao número de plantas enraizadas e transferidas para o substrato, considerando as concentrações de reguladores de crescimento utilizadas na organogênese. Ponta Grossa, PR, 2012.

Concentrações dos reguladores de crescimento	Porcentagem de plantas aclimatadas (%)
1,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg L <sup>-1</sup> de AIB	0 B*
1,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,3 mg L <sup>-1</sup> de AIB	38,1 AB
1,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de AIB	26,2 AB
1,5 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg L <sup>-1</sup> de AIB	47,9 A
1,5 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,3 mg L <sup>-1</sup> de AIB	45,7 A
1,5 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de AIB	11,2 AB
2,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg L <sup>-1</sup> de AIB	18,9 AB
2,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,3 mg L <sup>-1</sup> de AIB	23 AB
2,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,5 mg L <sup>-1</sup> de AIB	0 B
CV 50,1%	

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey,  $P < 0,05$ .

Sobrevivência de até 70% de plantas da espécie *Fragaria indica* foi obtida por Bhatt e Dhar (2000) no processo de aclimatização, após a micropropagação das mesmas. As taxas inferiores observadas no trabalho podem estar relacionadas às condições a que as plantas foram submetidas durante a etapa de aclimatização.

#### 4.3.3 Experimento III: Genótipo obtido a partir da cv. Festival

Para as plantas obtidas a partir da cv. Festival, foi observado, maior influência do tipo de explante utilizado em relação às concentrações de reguladores de crescimento.

Foram observadas diferenças significativas com relação às concentrações de reguladores de crescimento, ao tipo de explante utilizado e interação entre os dois fatores apenas para o número de explantes com brotos (Tabela 18). As variáveis: número de explantes com calos e com gemas, número de gemas e de brotos por explante, massa fresca média de plantas, plantas enraizadas e aclimatadas apresentaram diferença significativa apenas em função do tecido de constituição do explante (Tabela 19).

Tabela 18 – Porcentagem de explantes com brotos, provenientes de plântulas de morangueiro obtidos a partir da cv. Festival, em função de explantes foliares e peciolares e da concentração dos reguladores de crescimento. Ponta Grossa, PR, 2012.

Concentrações dos reguladores de crescimento	Porcentagem de explantes com brotos	
	Folha (%)	Pecíolo (%)
1,5 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg L <sup>-1</sup> de AIB	12,7 Ba*	4,2 Aa
1,5 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,3 mg L <sup>-1</sup> de AIB	38,0 Ba	4,2 A b
2,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg L <sup>-1</sup> de AIB	33,7 Ba	4,2 A b
2,0 mg L <sup>-1</sup> de TDZ + 0,3 mg L <sup>-1</sup> de AIB	67,0 A a	12,7 A b
CV 28,1%		

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, P < 0,05.

Tabela 19 – Porcentagem de explantes que formaram calos e gemas, número médio de gemas e brotos por explante, massa fresca média de plantas, porcentagem de plantas enraizadas e porcentagem de plantas aclimatadas obtidas a partir da regeneração de explantes foliares e peciolares de plântulas provenientes da cv. Festival. Ponta Grossa, PR, 2012.

Tipo de explante	% de explantes com calos	% de explantes com gemas	Número de gemas	Número de brotos	Massa fresca média (g)	% de plantas enraizadas	% de plantas aclimatadas
<b>Folha</b>	95,9 A*	54,5 A	2,21 A	0,80 A	0,33 A	25,8 A	34,3 A
<b>Pecíolo</b>	68,1 B	24,2 B	0,69 B	0,15 B	0,09 B	7,0 B	6,1 B
<b>CV</b>	<b>19,6%</b>	<b>36,8%</b>	<b>3,8%</b>	<b>2,1%</b>	<b>1,3%</b>	<b>45,9%</b>	<b>56,6%</b>

\*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, P < 0,05.

Diversos trabalhos realizados com a espécie *Fragaria x ananassa* evidenciam a necessidade de adaptação dos protocolos de organogênese de acordo com o genótipo que está sendo trabalhado (FLORES et al., 1998; FOLTA et al., 2006; BISWAS et al., 2010). Os

resultados obtidos no trabalho confirmam esta necessidade, por meio das diferentes respostas observadas para os genótipos testados.

Folta et al. (2006) obtiveram resultados satisfatórios com a regeneração de linhagem obtida a partir da cv. Festival utilizando  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de TDZ combinado com  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de 2,4-D e  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de BA. Estes resultados mostram que há necessidade de realização de testes com maior amplitude de concentrações de reguladores de crescimento para melhoria de eficiência do protocolo de regeneração para este genótipo.

#### 4. 4 CONCLUSÃO

Para os dois genótipos avaliados o explante foliar foi aquele que apresentou melhor regeneração das plantas *in vitro*.

As concentrações de  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de TDZ +  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB destacaram-se no processo de organogênese das plantas obtidas a partir da cv. Camiño Real. As maiores porcentagens de enraizamento e aclimatização foram obtidas com as plantas provenientes da organogênese com as concentrações de  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  de TDZ +  $0,3 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB.

As concentrações utilizadas na organogênese do genótipo obtido a partir da cv. Festival não apresentaram diferença estatística significativa, podendo ser recomendada as menores concentrações.

## 5 CONCLUSÃO

É possível obter plantas de morangueiro a partir da germinação *in vitro* de sementes, desde que sejam empregados tratamentos de escarificação mecânica ou química para facilitar a germinação *in vitro*. O armazenamento sob refrigeração de aquênios de morango, inviabiliza a utilização das mesmas.

As linhagens genéticas obtidas a partir das cultivares Camiño Real e Festival, mostraram-se aptas para a regeneração por meio de organogênese indireta, com as concentrações de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de TDZ + 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AIB. Os resultados obtidos indicam a viabilidade de organogênese com os reguladores de crescimento testados.

## REFERÊNCIAS

AGRIANUAL. Instituto FNP. São Paulo: 2008.

AGRIANUAL. Instituto FNP. São Paulo: 2012.

ANUARIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, Editora Gazeta, Santa Cruz do Sul, 2012.

ALVES, C. Z.; et al. Efeito da temperatura de armazenamento e de fitoreguladores na germinação de sementes de maracujá doce e desenvolvimento inicial de mudas. **Acta Scientiarum**. Maringá. v.28, n. 3, p. 441 – 448, 2006.

BHATT, I. D.; DHAR, U. Micropropagation of Indian wild strawberry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. India. v.60, p. 83 – 88, 2000.

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

BISWAS, M. K.; ISLAM, R.; HOSSAN, M. Micropropagation and field evaluation of strawberry in Bangladesh. **Journal of Agricultural Technology**. v. 4, n. 1, p. 167 – 182, 2008.

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

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

BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. H. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. **Journal of American Society for Horticultural Science**. Alexandria. v. 106, n. 4, p. 515 – 518, 1981.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análises de sementes**, Brasília, 2009, 398 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Normas para produção e comercialização de mudas e de outras estruturas de propagação obtidas por meio de Cultura de Tecidos de plantas**. Instrução Normativa nº 22/2012 de 27 de agosto de 2012. Brasília, 2012.

CÂMARA, H. H. L. L.; SERAPHIN, E. S. Germinação de sementes de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu sob diferentes períodos de armazenamento e tratamento hormonal. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. v. 32, n. 1, p. 21 -18, 2002.

CID, L. P., **Cultivo In Vitro de Plantas**. Brasília, DF: Embrapa, 2010.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: BARRUETO CID, L. P., **Cultivo In Vitro de Plantas**, Brasília, DF. Embrapa 2010.

COSTA, C. M.; AYUB, R. A. Desenvolvimento inicial de plântulas de *Calendula officinalis* germinadas in vitro com substrato de algodão ou de meio MS. **Revista Ceres**. v. 48, p. 609 – 613, 2001.

COSTA, M. A. P. de C. et al. Morfogênese in vitro. In: SOUZA, A. S., JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropopagação de plantas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006.

DALAGNOL, G. L. **Caracterização da variação genética e epigenética em plantas de macieira e morangueiro obtidas por meio de propagação vegetativa convencional e micropropagação**. 2010, 156 p. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Produção de Matrizes de Morangueiro por meio de cultura de tecidos**. Novembro de 2005.

ESTAT – Sistema para análises estatísticas, versão 2.0, Unesp – Jaboticabal, 1992.

FERRARI, M. P.; GROSSI, F.; WENDLING, I. **Propagação vegetativa de espécies florestais**. Embrapa Florestas. Colombo – PR, 2004.

FLORES, R. et al. Calogênese in vitro de duas cultivares de morangueiro (*Fragaria x ananassa*) a partir de discos foliares. **Revista Brasileira de Agrociência**. v. 4, nº. 1, p. 9 – 14, 1998.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **FAOSTAT: Agricultural Production/strawberry**, 2008. Disponível em: < <http://faostat.fao.org>>. Acessado em: 11 de maio de 2011.

GRAÇA, M. E.C.; et al. **Produção de mudas de erva-mate por estaquia**. Embrapa Florestas: Curitiba, 1990.

GRAHAM, J. *Fragaria Strawberry*. In: LITZ, R. E. **Biotechnology of fruit and nut crops**. CABI Publishing. USA. n. 29, 2005, cap. 18, p. 455 – 468.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. ; BUSO, J.A. (Eds). **Cultura de tecidos e transformação de genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998, v.1, p.183-260.

GRAY, D. J.; et al. High frequency somatic embryogenesis from quiescent seed cotyledons of *Cucumis melo* L. **Journal American Society for Horticultural Science**. v. 118, p. 425 – 432, 1993.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T. Principles of Tissue Culture for Micropropagation. **Plant Propagation – Principles and practices**. 5ª ed. 1990. Cap. 16, p. 459 – 495.

HINOJOSA, G. F. Auxinas em plantas superiores: síntese e propriedades fisiológicas. In: CID, L. P. B. **Hormônios Vegetais em Plantas Superiores**. 1ª ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005, p. 15 – 51.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal**: culturas temporárias e permanentes, Rio de Janeiro, v.33, p.1-133, 2006.

JUNGHANS, T. G.; SANTOS-SEREJO, J. A. Obtenção e manuseio de explantes. In: SOUZA, A. S., JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropopagação de plantas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006.

KERBAUY, G. B. Clonagem de plantas in vitro. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Brasília. v. 1, n. 1, p. 21 – 43, 1997.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. E.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-CNPq, 1998. v.2, p. 519 – 531.

LANDI, L.; MEZZETTI, B. TDZ auxin and genotype effects on leaf organogenesis in *Fragaria*. **Plant Cell Report**. v. 25, p. 281 – 288, 2006.

LEMOS, E. E. P. Organogênese. In: BARRUETO CID, L. P., **Cultivo In Vitro de Plantas**, Brasília, DF. Embrapa 2010.

LOPES, J. C.; SILVA, M. V. da. Efeito de pré tratamentos com água e GA<sub>3</sub> na germinação e vigor de sementes de morango silvestre (*Fragaria vesca*). XX Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2008.

MADAIL. J. C. M. A Economia do Morango. Embrapa Clima Temperado. **Anais de Palestras e Resumos do IV Simpósio Nacional do Morango e III Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio-assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, Compenhagen, v.15, p. 437-496, 1962.

NOGUEIRA, R. C.; et al. Germinação in vitro de Murici pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência Agrotecnologia**, Lavras. v. 28, n.5, p.1053 – 1059, set/out. 2004.



OLIVEIRA, L. M.; DAVIDE, A. C.; CARVALHO, M. L. M. Avaliação de métodos para quebra de dormência e para desinfestação de sementes de canafístula (*Peltophorum dubin*). **Revista Árvore**. Viçosa, MG. v. 27, n. 5, p. 597 – 603, 2003.

OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B.; FERREIRA, L.V. **Camino real: nova cultivar de morangueiro recomendada para o Rio Grande do Sul**. Pelotas: Embrapa clima temperado. Comunicado técnico 161, 4p. 2007.

PASSOS, I. R. da S.; et al. Utilização de ácido giberélico para a quebra de dormência de sementes de *Passiflora nítida* Kunth germinadas in vitro. **Revista Brasileira de Fruticultura**. V. 26, n. 2, p. 380 – 381, 2004.

PEDROTTI, E. L.; VOLTOLINI, J. A. Enraizamento ex vitro e aclimatização dos porta-enxertos de macieira Marubakaido e M9. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal. v. 23, n. 2, p. 234 – 239, 2001.

PEREIRA, J. E. S.; et al. Enraizamento in vitro de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duchesne) em diferentes concentrações do meio MS. **Ciência Rural**. Santa Maria. v. 29, n. 1, p. 17 -20, 1999.

PERES, L. E. P.; KERBAUY, G. B. Citocininas. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004, p. 213 – 234.

PINHEIRO, C. S. R.; MEDEIROS, D. N. de; MACÊDO, C. E. C. de; ALLOUFA, M. A. I. Germinação in vitro de Mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez). In: **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 23, n. 2, p. 413 – 416, Agosto, 2001.

PINHO, D. S. de.; et al. Regeneração in vitro de melão, cv. Gaúcho. **Ciência Rural**. Santa Maria. v. 40, n. 5, p. 1083 – 1089, mai. 2010.

QIN, Y. H.; et al. Response of in vitro strawberry to antibiotics. **Plant growth Regul**. v. 65, p. 183 – 193, 2011.

RANCE, I. M.; TIAN, W.; MATHEWS, H.; KOCHKO, A.; BEACHY, R. N.; FAUQUET, C. Partial desiccation of mature embryo-derived calli, a simple treatment, that dramatically enhances the regeneration ability of indica rice. **Plant Cell Report**, n.13, p. 647-651, 1994.

REIS, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; CORRÊA, R. M. Influência do meio de cultura na germinação de sementes in vitro e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Revista Ceres**. v. 55, n. 3, p. 160 – 167, 2008.

RONQUE, E. R. V. **Cultura do Morangueiro, revisão e prática**. Curitiba. EMATER, 206p., 1998.

SCALON, S. de P. Q.; et al. Armazenamento e tratamentos pré germinativos em sementes de jacarandá (*Jacaranda cuspidifolia* Mart.). **Revista Árvore**. v. 30, n. 002, p. 179 – 185, 2006.

SEAB/PR - Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná - 2007, 23 de julho. **Estimativa da área e da produção de frutas, no Paraná - Safras 00/01 02/03**. Disponível em <http://www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/deral/efpr.xls>.

SILVA, A. F.; DIAS, M. S. C.; MARO, L. A. C. Botânica e Fisiologia do morangueiro. **Informe agropecuário**. v. 28, nº 236, p. 7 – 13, 2007.

SOUZA, A. S., JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropopagação de plantas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 152 p.

SOUZA, A. S. et al. Introdução à cultura de tecidos de plantas. In: SOUZA, A. S., JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropopagação de plantas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006.

SPECHT, S.; BLUME, R. Competitividade e segmento de mercado à Cadeia do Morango: algumas evidências sobre o panorama mundial e brasileiro. Porto Alegre: 2009. Disponível em: [www.sober.org.br/palestra/13/1245.pdf](http://www.sober.org.br/palestra/13/1245.pdf). Acessado em: 11 de maio de 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. São Paulo, 4<sup>a</sup> ed., 2009, Ed. Artmed.

VIDAL, H.R., CORSO, F., OLIVEIRA, A.E., NIESING, P., OTTO, R.F., Caracterização morfológica de quatro cultivares de morangueiro para a região de Ponta Grossa, PR – RESUMOS, III Simpósio nacional do morango. II Encontro de pequenas frutas e frutas nativas do Mercosul, 2006.

WENDLING, I.; PAIVA, H.N.; GONÇALVES, W. Técnicas de produção de mudas de plantas ornamentais. **Aprenda Fácil**. Viçosa – MG. v. 3, 223p. 2005.