



INTRODUÇÃO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS DE MORANGUEIRO (*Fragaria x ananassa* Duch.)

IN VITRO INTRODUCTION AND ACCLIMATIZATION OF STRAWBERRY PLANTS (*Fragaria x ananassa* Duch.)

Roberson Dibax¹; Ednilson Zarowni²; Jean Carlos Zocche³; Diogo José Siqueira⁴; Ana Cristina Martins Vaz⁵; Sueli Campagnin⁶; Luiz Eduardo Babaresco⁷; Maycon Rodrigo Petrechen⁸

¹Eng. Agrônomo professor pesquisador da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Laranjeiras do Sul. Rodovia BR 158 - Km 405, CEP 85301-970. E mail: roberson.dibax@uffrs.edu.br Apresentador do trabalho; ²Eng. Agrônomo egresso da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Laranjeiras do Sul; ³Eng. Agrônomo doutorando em Produção Vegetal pelo Programa de Pós Graduação da Universidade Estadual do Centro Oeste - Unicentro; ⁴Biólogo da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Laranjeiras do Sul; ^{5, 6, 7, 8} Acadêmicos (as) do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Laranjeiras do Sul.

INTRODUÇÃO

O morangueiro é uma planta que nos últimos anos ganhou muito destaque em todos os segmentos de sua produção. O Brasil produz anualmente aproximadamente 5.084 ha de morangueiro e cerca de 200.000 toneladas da fruta (FAOSTAT, 2023). O cultivo *in vitro* representa uma importante estratégia para o desenvolvimento de mudas de qualidade e isentas de doenças. De acordo com Fontes (2003) as biofábricas expandiram seu trabalho na clonagem de variedades melhoradas de morangueiro. O cultivo *in vitro* desta cultura é uma rotina em inúmeros laboratórios comerciais de pesquisas e distribuição de mudas certificadas em diversos países do mundo. O primeiro registro da micropropagação do morangueiro foi publicado em 1974 pelo pesquisador belga P. Boxus. Nesta época o objetivo da pesquisa concentrou-se na redução do tempo para a obtenção de plantas por multiplicação massal a partir de brotações axilares (DEBNATH, 2008). No final da mesma década, pesquisadores da Embrapa Clima Temperado em Pelotas/RS, publicaram as primeiras pesquisas de cultivo *in vitro* do morangueiro no Brasil (FORTES, 2003). O estabelecimento de protocolos de produção de mudas *in vitro* é uma ferramenta de fundamental importância para o melhoramento utilizando a biotecnologia (transformação genética e edição genômica), uma vez que estas modificações necessitam dos protocolos de produção de plantas *in vitro* para o desenvolvimento dos materiais modificados geneticamente. O presente trabalho tem como objetivo disponibilizar um protocolo de produção de mudas *in vitro* do morangueiro e aclimatização das mudas.

MATERIAL E MÉTODOS

As pesquisas foram realizadas nos Laboratórios didáticos e na casa de vegetação do Campus da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, de Laranjeiras do Sul - PR. Foram utilizados nesta pesquisa aquênios de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) oriundos de plantas estabelecidas em casa de vegetação. As culturas foram realizadas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro e 2 cm de altura, contendo 30 mL de meio de cultura e vedadas com filme plástico ou em tubos de ensaio contendo 5 mL do mesmo meio. Todas as culturas *in vitro* respectivas a cada experimento foram mantidas em

câmara de germinação do tipo BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio), sob luz fluorescente branca fria com densidade de fluxo fotossintético de 40 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$, fotoperíodo de 16 h e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. O meio de cultura teve o pH ajustado em 5,8 e foi autoclavado durante 20 min a 120° .

SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA E DESINFESTAÇÃO DOS AQUÊNIOS

O processo de superação de dormência utilizado foi adaptado de Chapieski et al 2017 e consistiu na escarificação química dos aquênios com ácido sulfúrico (80%), durante 10 min e posterior tríplice lavagem em água destilada autoclavada. Para o experimento de desinfestação, os aquênios preparados na etapa anterior receberam um pré-tratamento em etanol 70% durante 2 minutos e em seguida um tratamento com hipoclorito de sódio 4%. Após os procedimentos de desinfestação, os aquênios foram inoculados em meio de cultura MS e incubados por 45 dias em câmara de germinação do tipo BOD.

INTRODUÇÃO *IN VITRO*, DESENVOLVIMENTO DAS MUDAS E ACLIMATIZAÇÃO

As plantas germinadas na etapa anterior foram isoladas em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura MS e subcultivadas por mais 2 períodos de 28 dias para completar o crescimento *in vitro*. Após o período de crescimento, as plantas foram removidas dos tubos de ensaio, lavadas em água corrente. Após este procedimento, foram selecionadas plantas com 3 ± 1 cm de comprimento (raiz + parte aérea) e transplantadas em copos descartáveis de 180 ml com 5 perfurações na base de cada, para escoamento do excesso de água e preenchidos com o tratamento de substrato previamente umedecido. Os tratamentos de aclimatização foram os seguintes: T1. Testemunha (100% substrato para hortaliças); T2. 70 % substrato para hortaliças + 15% areia +15% fibra de coco triturada, T3. 50 % substrato para hortaliças + 25% areia +25% fibra de coco triturada. Este experimento foi conduzido em casa de vegetação com temperatura aproximada de 25 a 30°C , sob sombrite escuro com capacidade de interceptação luminosa de 50% por 7 dias. Após 28 dias do cultivo em casa de vegetação, foi realizada a avaliação da porcentagem de plantas sobreviventes, número de folhas e altura de parte aérea de plantas. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 12 repetições por tratamento e 1 planta por unidade experimental. Os dados obtidos referentes à porcentagem de plantas sobreviventes foram transformados, utilizando a fórmula $\text{Sen}(x) + 1$ antes de serem submetidos à análise de variância, quando significativos, os dados foram submetidos ao teste de Tukey ao nível de 5% de significância para a comparação das médias dos tratamentos utilizando o programa estatístico Assistat 7.7 beta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Introdução in vitro

O protocolo de germinação e introdução *in vitro* foi eficiente e a metodologia descrita e utilizada nesta pesquisa permitiu uma taxa de germinação de plantas de 85% isentas de contaminações. O comprimento médio das plantas analisadas (parte aérea + parte radicular) foi de 8 mm após 45 dias de cultivo *in vitro*. Após o cultivo individual das plantas em tubos de ensaio, 94 % responderam delas

responderam ao crescimento no final de 2 períodos de 28 dias de cultivo. O comprimento médio das plantas (parte aérea + parte radicular) foi de 5 cm.

Aclimatização das mudas

Após o período de 28 dias de aclimatização em casa-de-vegetação, foi avaliada a porcentagem de plantas sobreviventes, altura de plantas e número de folhas. Os dados foram submetidos a análise da variância, o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade foi utilizado para a comparação das médias. O tratamento que proporcionou maior porcentagem de sobrevivência foi o T2, (70 % substrato comercial + 15% areia +15% fibra de coco triturada) apresentando 83,33% de sobrevivência, diferindo-se estatisticamente da testemunha T1 (substrato comercial de hortaliças), que apresentou 66,67% de sobrevivência, porém o T2 não se diferiu estatisticamente do T3 (50 % substrato comercial + 25% areia +25% fibra de coco triturada) que apresentou uma porcentagem de sobrevivência de 75%, como pode ser observado na **Tabela 1**.

Com relação a porcentagem de plantas sobreviventes foi obtido para o tratamento com maior desempenho um resultado semelhante a Calvete et al. (2000) que em estudo com morangueiro obtiveram porcentagens de 82 a 56 % de plantas sobreviventes durante o período de aclimatização em bandejas de isopor com 72 células com mistura de 45% de turfa preta moída, 22,5% de casca de arroz queimada, 22,5% de casca de acácia-negra e 10% de vermiculita, em plantas obtidas com diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura *in vitro*, porém na sua metodologia de aclimatização, as mudas permaneceram em uma câmara úmida com nebulização durante as 3 primeiras semanas de aclimatização.

Tabela 1. Resultados para plantas vivas (%), parte aérea (cm) e número de folhas de plantas de *Fragaria x ananassa* Duch. após 28 dias de aclimatização, em função dos diferentes substratos.

Substratos	Plantas vivas (%) [*]	Altura de parte aérea (cm) ^{ns}	Número de folhas ^{ns}
T1	66,67 b	3,08 a	7,67 a
T2	83,33 a	2,90 a	7,33 a
T3	75,00 ab	2,08 a	8,00 a
CV (%)	69,91	74,58	88,45

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. T1 (substrato comercial de hortaliças), T2 (70 % substrato comercial + 15% areia +15% fibra de coco triturada), T3 (50 % substrato comercial + 25% areia +25% fibra de coco triturada). (ns) não significativo ao nível de 5% de probabilidade. (*) significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Ritter et al. (2009) encontrou resultados de sobrevivência inferiores na aclimatização de morangueiro em sistema de bandejas alveoladas de isopor de 128 células com substrato orgânico Plantmax[®] PXT e bandejas não alveoladas de polietileno com areia, onde obteve um índice de

sobrevivência de 65% e no mesmo trabalho em um sistema com uma placa de poliestireno flutuante em solução nutritiva obteve 100% de mortalidade.

Para a altura de parte aérea os tratamentos não demonstraram diferenças estatísticas significativas, apresentando médias entre 2,08 e 3,08 cm, como pode ser observado na **Tabela 1**. Com relação a avaliação de altura de plantas Ritter et al. (2009) também não encontrou diferenças estatísticas significativas, obtendo médias de altura de plantas de morango as quais apresentaram valores de 4,81 e 5,55 cm, sendo estas superiores às encontradas neste trabalho. Os mesmos autores também não obtiveram diferenças estatísticas significativas para o número de folhas, onde foram observadas médias de 8,06 e 7,86, aproximando-se dos resultados encontrados nesse trabalho como podem ser observados na **Tabela 1**.

A folha desempenha papel fundamental para os processos fotossintéticos da planta e consequente produção de biomassa. Além disso, o desenvolvimento de folhas pode ser resultado positivo do processo de aclimatização. Em nosso trabalho, o número médio de folhas foi de 7,33 a 8 folhas aos 28 dias de aclimatização. Estes valores estão próximos aos encontrados por Bien et al. (2023) nas mesmas condições de aclimatização, obtendo valor médio de 6,33 folhas por explante e não diferenciando dos demais tratamentos. Portanto, o efeito de diferentes substratos tem pouca influência para emissão de folhas.

CONCLUSÕES

A superação da dormência utilizando ácido sulfúrico, seguido de desinfestação de aquênios de morangueiro com hipoclorito de sódio a 8 % por 20 minutos foi satisfatória para a introdução *in vitro* do morangueiro. O meio de cultura MS foi eficiente para o cultivo e desenvolvimento das plantas. O substrato composto por 70% de substrato comercial para hortaliças + 15% areia +15% fibra de coco triturado demonstrou ser eficiente na aclimatização de mudas de morangueiro em relação à porcentagem de plantas sobreviventes. Porém, não se diferenciou do substrato com 50 % substrato comercial + 25% areia +25% fibra de coco triturada.

REFERÊNCIAS

BIEN, L. T.; TUNG, H.T.; MAI, N.T.N.; PHONG, T.H.; CUONG, D.M.; KHAI, H.D.; LUAN, V.Q.; NAM, N.B.; TRA, T.T.H.; VINH, B.V.T.; NHUT, D.T. Morphogenesis of *in vitro* strawberry leaf cultured under clinostat 2D condition. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 153, n. 3, p. 499–510, 1 jun. 2023.

CALVETE, E. O.; KAMPF, A.N.; BERGAMASCHI, H.; DAUDT, R.H.S. Avaliação do crescimento de plantas de morangueiro, durante a aclimatização *ex vitro*. **Horticultura Brasileira**, v. 18, p. 188–192, nov. 2000.

CHAPIESKI, P. C. Q. **Concentrações de ácido sulfúrico na superação de dormência de sementes de fragaria x ananassa duch**. Universidade Federal da Fronteira Sul, 16 fev. 2017. Disponível em: <<https://rd.uffs.edu.br/handle/prefix/375>>. Acesso em: 27 jun. 2023

DEBNATH, S. C. Developing a scale-up system for the in vitro multiplication of thidiazuron-induced strawberry shoots using a bioreactor. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 88, n. 4, p. 737–746, jul. 2008.

FAOSTAT. **Crops and livestock products**. Disponível em:
<<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>>. Acesso em: 26 jun. 2023.

MURASHIGE T.; SKOOG F. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures**. v. 15, p. 473–497, 23 out. 1978.

RITTER, C. E. L. **Micropropagação e aclimatização de plântulas de morangueiro do clone Ivahé**. Universidade Federal de Santa Maria, 27 fev. 2009. Disponível em:
<<http://repositorio.ufsm.br/handle/1/5002>>. Acesso em: 27 jun. 2023