



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL
CURSO DE GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

EDENILSON ZAROWNI

**INTRODUÇÃO *IN VITRO* DE MORANGUEIRO (*Fragaria x ananassa* Duch) E
ACCLIMATIZAÇÃO**

**LARANJEIRAS DO SUL
2017**

EDENILSON ZAROWNI

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

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II do curso de Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito para obtenção de título de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Prof. Dr. Roberson Dibax.

LARANJEIRAS DO SUL

2017

PROGRAD/DBIB - Divisão de Bibliotecas

Zarowni, Edenilson

INTRODUÇÃO IN VITRO DE MORANGUEIRO (Fragaria x ananassa Duch) E ACLIMATIZAÇÃO/ Edenilson Zarowni. -- 2017.

31 f.:il.

Orientador: Roberson Dibax.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Agronomia , Laranjeiras do Sul, PR, 2017.

1. Desinfestação de sementes. 2. Assepsia de sementes. 3. Cultura de tecidos in vitro. 4. Propagação vegetal. 5. Aquênios. I. Dibax, Roberson, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

EDENILSON ZAROWNI

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

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Agronomia com Ênfase em Agroecologia da Universidade Federal da Fronteira Sul- Campus Laranjeiras do Sul (PR)

Orientador: Prof. Dr. Roberson Dibax

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:

21 / 06 / 2014

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Roberson Dibax

UFFS



Prof. Dr. Ricardo Key Yamazaki

UFFS



Doutoranda Ana Paula de Azevedo Pasqualini

Doutoranda em Produção Vegetal UFPR

RESUMO

A cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) apresenta notável importância para o setor olerícola brasileiro, sendo a região sul do Brasil ideal para o seu cultivo devido às condições climáticas favoráveis para a produção. Neste contexto, estudos de cultura de tecidos são fundamentais para auxiliar o melhoramento vegetal desta espécie. O presente trabalho tem como objetivo estabelecer um protocolo de introdução *in vitro* e aclimatização de plantas de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch). Esse trabalho foi dividido em três etapas sendo a primeira voltada à assepsia dos aquênios que foram submetidas a um pré-tratamento com etanol 70% por 2 minutos, seguido de tratamentos em soluções de hipoclorito de sódio com concentrações variando de 0 a 8% por 20 minutos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 repetições por tratamento e 12 aquênios por unidade experimental. A segunda etapa foi a introdução *in vitro* de plantas de morangueiro, desenvolvimento das mudas e a terceira etapa a aclimatização em diferentes composições de substratos T1 Testemunha (100% substrato comercial); T2 70 % substrato comercial + 15% areia +15% fibra de coco triturada; T3 50 % substrato comercial + 25% areia +25% fibra de coco triturada. Para o experimento de aclimatização, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 3 tratamentos e 12 repetições com uma planta por unidade experimental. Na primeira etapa o melhor resultado para a assepsia dos aquênios foi obtido com a concentração de 8% de hipoclorito de sódio, onde foram observados 10% de contaminação de aquênios. Para obtenção de um número maior de plântulas foi realizado um tratamento de quebra de dormência com ácido sulfúrico na concentração de 80% durante 10 minutos e após a lavagem em água deionizada autoclavada, os aquênios foram inoculados em placas de petri contendo o meio MS, dispostos em BOD durante 160 dias. Com relação ao experimento de aclimatização o substrato com a formulação contendo 70 % de substrato comercial + 15% areia +15% fibra de coco triturada resultou em 83% de plantas aclimatizadas, sendo o indicado para este objetivo.

Palavras-chave: Desinfestação de sementes. Assepsia de sementes. Cultura de tecidos *in vitro*. Propagação vegetal. Aquênios

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem de contaminação <i>Fragaria x ananassa</i> Duch em função das concentrações de hipoclorito de sódio.	22
Tabela 2 Resultado do teste de Tukey para comparação de medias de plantas de <i>Fragaria x ananassa</i> Duch sobreviventes a aclimatização, altura de parte aérea e número de folhas em função dos substratos.....	24

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Placas com aquênios de <i>Fragaria x ananassa</i> Duch incubadas em meio de cultivo MS em câmara de germinação tipo BOD.....	19
Figura 2. a) Plântulas de <i>Fragaria x ananassa</i> Duch germinadas <i>in vitro</i> após 160 dias de cultivo. b) Tratamentos de aclimatização: T1 Testemunha (100% substrato comercial); T2 70 % substrato comercial + 15% areia +15% fibra de coco triturada; T3 50 % substrato comercial + 25% areia +25% fibra de coco triturada; previamente umedecidos dispostos aleatoriamente.	20
Figura 3. (a, b) Plantas de <i>Fragaria x ananassa</i> Duch aclimatizadas após 30 dias de cultivo em casa de vegetação em tratamentos com diferentes substratos - apresentando bom desenvolvimento de parte aérea, sem presença de doenças ou necroses.....	25

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 TEMA	9
2.1 PROBLEMA DE PESQUISA	9
3 OBJETIVOS	9
3.1 OBJETIVO GERAL	9
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
4 JUSTIFICATIVA	10
5 REFERENCIAL TEÓRICO	11
5.1 MORANGO	11
5.1.1 Características gerais	11
5.1.2 Cultivo do morango	11
5.2 ASPECTOS GERAIS DO CULTIVO <i>IN VITRO</i>	12
5.3 REGULADORES VEGETAIS	13
5.4 ASSEPSIA DAS SEMENTES	14
5.5 INTRODUÇÃO E CULTIVO DO MORANGUEIRO <i>IN VITRO</i>	14
5.6 ACLIMATIZAÇÃO	16
6 MATERIAL E MÉTODOS	16
6.1 LOCAL DA REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS	16
6.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	16
6.3 CONDIÇÕES GERAIS DE CULTURA <i>IN VITRO</i>	17
6.4 DESINFESTAÇÃO DOS AQUÊNIOS E QUEBRA DE DORMÊNCIA	17
6.5 INTRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> E DESENVOLVIMENTO DAS MUDAS	18
6.6 ACLIMATIZAÇÃO DAS MUDAS	19
6.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
7.1 ASSEPSIA DAS SEMENTES	21
7.2 INTRODUÇÃO <i>IN VITRO</i>	22
7.3 ACLIMATIZAÇÃO DAS MUDAS	23
8 CONCLUSÕES	25
REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) é uma planta que origina um pseudofruto muito apreciado nacional e internacionalmente. Os frutos apresentam qualidades nutricionais e medicinais importantes, o que faz com que essa cultura olerícola apresente relevância no setor nacional. A produção nacional do morango vem crescendo muito nas últimas décadas, no censo agropecuário feito em 1996 pelo IBGE, a produção foi de 37,6 mil toneladas, já no último censo feito em 2006 esses números dobraram chegando a 72,245 mil toneladas. Segundo dados do Anuário Brasileiro de Hortaliças (2016) o Brasil não supre toda a demanda interna de produção de morango para o consumo sendo que no ano de 2015, importou 6,884 mil toneladas de morango.

A produção de morango muitas vezes sofre com o ataque de fitopatógenos e esse é um dos principais motivos para sua expansão produtiva ser limitada no Brasil. Com a micropropagação ou cultura de tecidos a partir de meristemas podemos garantir matrizes livres de fitopatógenos e com isso reduzir a incidência de doenças a campo, pois uma muda sadia é um indicador de um fruto sadio (SILVA, 2005; DUTRA, 2012).

A cultura de tecidos é definida como o conjunto de técnicas capazes de tornar possível o cultivo de células, tecidos ou órgãos vegetais mediante a utilização de substratos nutritivos e cultivo em um ambiente controlado. Este tipo de cultura necessita de condições assépticas para seu cultivo após isolamento dos explantes oriundos da planta-mãe, sendo que a assepsia adequada do explante e o controle ambiental artificial promoverá o desenvolvimento adequado dos explantes e minimizará as chances de contaminação (BRANDÃO, 2014). Para que esse objetivo seja alcançado é preciso criar um protocolo para implantação da cultura *in vitro*, isso inclui obtenção das plantas matrizes, protocolo adequado de desinfecção dos explantes, estudos acerca dos meios de cultura adequados e procedimentos de manipulações que garantirão melhores resultados no desenvolvimento dos protocolos (OLIVEIRA, 2005).

Nesse ambiente, as células, tecidos e órgãos podem se multiplicar ou continuar a crescer de modo não organizado ou se regenerar em uma planta inteira. O uso das técnicas de cultura de tecidos vegetais permite reduzir o tempo de produção de

cultivares, auxiliar no melhoramento genético convencional e pode ser considerada uma ferramenta biotecnológica para o estudo do metabolismo, fisiologia, desenvolvimento e reprodução de plantas de interesse comercial ou farmacológico (BRANDÃO, 2014).

O presente trabalho tem como objetivo a otimização de um protocolo de introdução *in vitro* para a cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) mediante a utilização de meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) e a aclimatização das plântulas de morangueiro.

2 TEMA

2.1 PROBLEMA DE PESQUISA

A cultura do morangueiro apresenta grande relevância para o setor olerícola brasileiro. A região sul do país se destaca devido as suas condições edafoclimáticas com temperaturas amenas diurnas e noturnas, que influenciam diretamente na obtenção do aroma e sabor do morango. Porém é preciso encontrar um protocolo de introdução de cultivo *in vitro* do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch), contribuindo dessa maneira como uma alternativa técnica para a propagação assexuada, para técnicas de melhoramento vegetal *in vitro* e possibilidade de manutenção de um banco de germoplasma com menores custos e melhor aproveitamento de espaço desta cultura.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer protocolos de introdução *in vitro*, desenvolvimento *in vitro* de mudas e aclimatização de plantas de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um protocolo de desinfestação dos aquênios;
- Estabelecimento de um protocolo de germinação *in vitro* e desenvolvimento de plantas de morangueiro;
- Realizar quebra de dormência para obter maior porcentagem de germinação;
- Comparar substratos para aclimatização das plântulas de morangueiro obtidas *in vitro*;

4 JUSTIFICATIVA

Um requisito para obtenção de frutos sadios de boa qualidade é a escolha das mudas onde uma muda sadia tem grande chance de gerar um fruto sadio com seu máximo vigor. A obtenção das mudas de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) pelos produtores, é feita através de estolões coletados de matrizes de identidade genética reconhecida, muitas vezes, plantas infectadas que carregam consigo uma carga de fitopatógenos que já tiveram contato na área em que foram submetidos. Com a obtenção de um protocolo de desinfestação, germinação e introdução *in vitro* poderá ser utilizado esses protocolos para futuras pesquisas e testes com meios de cultivo alternativos, onde meristemas de plantas de morangueiro possam ser utilizadas como fontes de explantes, ressaltando a importância deste tipo de explante para a obtenção de plantas livres de vírus e principalmente para o desenvolvimento de futuros trabalhos de melhoramento genético da cultura e futura utilização de meios alternativos de menor custo para a produção *in vitro* da cultura.

O trabalho é um marco inicial para a micropropagação na Universidade Federal da Fronteira Sul, sendo que a partir dele podem ser propostos novos projetos e assim novas pesquisas a fim de incrementar e evoluir esta área do conhecimento para a cultura do morangueiro e outras espécies.

5 REFERENCIAL TEÓRICO

5.1 MORANGO

5.1.1 Características gerais

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) é pertencente à Família Rosaceae e de origem Europeia, seu pseudofruto é muito saboroso e apreciado mundialmente. É uma planta perene, rasteira, herbácea pertencente ao gênero *Fragaria* (ROCHA et al., 2008). Esta cultura é propagada vegetativamente por meio de estolão, sendo a área de produção de frutos renovada anualmente (PRESENTE et al., 2013).

Botanicamente, a parte comestível é um pseudofruto, originário do receptáculo floral que se torna carnoso e suculento (SCHWARZ, 2012). Os frutos verdadeiros são pequenos aquênios, vulgarmente denominados “sementes”. A parte comestível, que erroneamente é chamada fruto, é rica em vitamina C e o ácido elágico nela presente pode ter efeito medicinal como um forte agente antioxidante (QUINATO; DEGÁSPARI; VILELA, 2007).

5.1.2 Cultivo do morango

O início do cultivo do morangueiro no Brasil é pouco conhecido; entretanto, a cultura começou a expandir-se de 1960 e desde então, ela continuou se expandindo sobre os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais, e regiões de diferentes solos e climas, como Goiás, Santa Catarina, Espírito Santo e Distrito Federal (ANTUNES; REISSER JÚNIOR, 2007). A cultura é muito praticada por pequenos produtores rurais que utilizam a mão-de-obra familiar, durante todo o ciclo da cultura, sendo a maior parte da produção destinada ao mercado "in natura".

A sua produção nacional dobrou entre os anos de 1996 e 2006, quando comparado os dois censos agropecuários realizados pelo IBGE nos respectivos anos.

Um dos principais problemas na produção de morango é o ataque de fitopatógenos que podem arruinar a colheita e diminuir o valor de mercado (GIOWANELLA, 2013.). A obtenção de mudas saudias é essencial para que esta situação seja amenizada. (OLIVEIRA; BRAHM; SCIVITTARO, 2007). Assim o cultivo *in vitro* é o mais seguro meio para que as mudas cheguem saudias nas mãos do produtor e para que isso ocorra é importante um protocolo de introdução *in vitro* buscando realizar etapas para que haja uma boa desinfecção e germinação de sementes *in vitro* (IBGE, 2006).

5.2 ASPECTOS GERAIS DO CULTIVO *IN VITRO*

A cultura de tecido é um conjunto de técnicas onde um explante é isolado e cultivado em condições assépticas em meio nutritivo artificial, isso permite que diversas partes da planta como as extremidades das raízes, segmentos de caule, embriões, meristemas apicais e gemas, sejam cultivadas *in vitro* em meio nutritivo artificial (HANDA, 2005).

A cultura *in vitro* tradicional conta com meios de culturas prontos com quantidades conhecidas de micronutrientes, macronutrientes, vitaminas e reguladores de crescimento, o que eleva os custos na hora do requerimento desses produtos e se torna trabalhoso na pesagem e mistura desses nutrientes para que estejam na quantidade exata (UNEMOTO 2005).

Em relação a fitossanidade Calvete (2009) afirma que para a limpeza clonal *in vitro*, os propágulos devem ser oriundos de meristemas multiplicados pela técnica de micropropagação, para isso é feita a coleta do material vegetal, desinfestação e inoculação dos explantes em meio próprio para a regeneração das partes aéreas, com posterior multiplicação, enraizamento e aclimatização, sendo a fase de multiplicação caracterizada pela proliferação de brotos axilares ou adventícios em número variável, conforme o genótipo utilizado, determinando a capacidade deste em formar folhas e novos meristemas, sendo que nessa etapa, vários cuidados são necessários para manter a homogeneidade do cultivo, onde leva-se em conta o número e intervalos dos subcultivos, a estabilidade genética e a taxa de multiplicação, para evitar a variação somaclonal.

5.3 REGULADORES VEGETAIS

O conceito de regulador de crescimento é utilizado para compostos naturais como fitohormônios e substâncias naturais de crescimento ou sintético como hormônios sintéticos e reguladores sintéticos que apresentam atividades no controle de crescimento e desenvolvimento de plantas, sendo que são divididos em grupos como auxinas, giberelinas, citocininas, etileno, ácido abscísico; onde as auxinas são consideradas responsáveis pelo crescimento, sendo que a principal auxina nos vegetais é o ácido indol-3-acético (AIA), sendo que naturalmente o AIA é sintetizado nos meristemas, nas folhas jovens e sementes em desenvolvimento, ele constitui o mais abundante e de maior relevância fisiológica, devido a sua estrutura relativamente simples os laboratórios e indústrias foram capazes de elaborar uma grande quantidade de moléculas com a atividade da auxina (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As giberelinas induzem o alongamento de entrenós em algumas plantas anãs, sendo que tem outros efeitos como a alteração da juvenilidade, crescimento de frutos e germinação de sementes, sua função comercial é no aumento do tamanho de uvas sem sementes (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As citocininas que são responsáveis principalmente pela divisão celular, sendo que a proporção entre auxina e citocinina é o que determina a diferenciação de tecidos vegetais em raiz ou gema no cultivo de tecidos vegetais no meio de cultura, onde uma alta razão de auxina:citocinina estimula a formação de raízes e uma baixa razão induz a formação de parte aérea e, em níveis intermediários o tecido cresce como calo indiferenciado (TAIZ; ZEIGER, 2004).

O etileno conhecido como o hormônio gasoso, que é formado em vários órgãos dos vegetais, sendo sua principal função o amadurecimento de fruto e processos associados à senescência de flores e folhas, desenvolvimento de pelos radiculares (TAIZ; ZEIGER, 2004).

O ácido abscísico tem como principal papel fazer o controle do início e a manutenção da dormência de sementes e gemas e a respostas ao estresse hídrico e

apresenta grande importância para promover a tolerância a dessecação do embrião na semente (TAIZ; ZEIGER, 2004).

5.4 ASSEPSIA DAS SEMENTES

A utilização de mudas sadias de morangueiro para a implantação de lavouras é de grande importância para sua produção, devido a várias doenças causadas por fungos, bactérias e vírus. Quando ocorre a presença de muitos contaminantes torna-se necessário a utilização de métodos para realizar a assepsia ou a desinfestação das sementes (LUCCA FILHO, 2006). Pois a presença de fungos e bactérias nas sementes podem vir a diminuir a capacidade de germinação e o vigor das sementes (SILVA; SILVA; FARIAS, 2013), sendo que uma maneira de evitar a presença desses contaminantes é a utilização de desinfetantes tais como o hipoclorito de sódio (RIBEIRO et al., 2009).

O álcool também é de grande importância para evitar a presença de contaminantes, sendo que o álcool ajuda na quebra da tensão superficial e remoção da cutícula presente no tecido vegetal permitindo que na próxima etapa o agente desinfestante tenha maior contato com a superfície do explante (CARVALHO; RODRIGUES; SANTOS, 2012).

Sua utilização pode ser feita através da multiplicação *in vitro*, embora a metodologia de micropropagação do morangueiro seja conhecida existem poucas informações sobre a multiplicação *in vitro* de mudas assépticas de morangueiro (BRAHM; OLIVEIRA, 2004).

5.5 INTRODUÇÃO E CULTIVO DO MORANGUEIRO *IN VITRO*

A produção de mudas de morangueiro livre de patógenos deve ser em viveiros a partir de mudas que foram obtidas por meio de culturas de tecidos em laboratório (BRAHM; OLIVEIRA, 2004).

Dados da pesquisa de Calvete; Kämpf; Suzin, (2002) com concentrações de sacarose acrescidos no meio MS (Murashige e Skoog, 1962) para desenvolvimento de plantas de morangueiro, demonstram a necessidade do acréscimo de sacarose onde observou-se que sem a presença de sacarose, não ocorre o desenvolvimento da plântula, também foi constatado que ocorria aumento da biomassa de raiz até a dosagem de 45g.l⁻¹.

Em estudo sobre o enraizamento *in vitro* do morangueiro sob diferentes concentrações do meio MS Pereira, et al (1999) demonstram que para a rizogênese de explantes de morangueiro a diminuição da concentração dos sais de meio MS aumenta a porcentagem de enraizamento de explantes, onde o maior percentual de explantes enraizados foi com a concentração de ½ do MS que apresentou 99,17% de enraizamento, a concentração de ¾ apresentou 98,09% de enraizamento e a concentração plena de meio MS apresentou 62,50% de enraizamento para a cultivar Hofla.

Segundo Dutra (2012) o protocolo para produção de plantas isentas de patógenos deve-se coletar porções terminais de brotação com aproximadamente 5 cm de comprimento, retira-se as folhas e o segmentos são colocados em recipiente com água destilada, em seguida é realizado o processo de desinfestação em laboratório, onde permanecem por 10 segundos em álcool 70%, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio 1%, adicionando 3 gotas de detergente comercial onde permanecem por 10 minutos com agitação constante, posteriormente é realizada triplíce lavagem com água destilada autoclavada em câmara de fluxo laminar.

O ápice caulinar com 0,1 a 0,3 mm é removido com bisturi e pinça utilizando lupa estereoscópica, posteriormente, é inoculado em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com 1 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina); 0,01 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético); 0,1 mg L⁻¹ GA3 (ácido giberélico); 0,8 g L⁻¹ de carvão ativado; 30 g L⁻¹ de sacarose e 7,5 g L⁻¹ de ágar, sob condições de escuro durante 30 dias. O pH do meio de cultura é ajustado em 6,2 antes da autoclavagem, depois do tempo de desenvolvimento no escuro, os meristemas são mantidos em intensidade luminosa de 45 a 55 μmol m⁻² s⁻¹, 25±3 °C e fotoperíodo de 16 horas (DUTRA 2012).

5.6 ACLIMATIZAÇÃO

A técnica de aclimatização de plantas micropropagadas é o processo de retirar a planta das condições ideais *in vitro* e coloca-las em um ambiente externo, geralmente casa de vegetação, tendo como principal objetivo, fazer as plantas superar as adversidades pelas quais passam quando ocorre essa mudança brusca de ambiente (MOREIRA, et al.). A fase de aclimatização é crítica, pois no meio *in vitro* a transpiração é quase nula, o meio é asséptico e possui elevada disponibilidade de nutrientes (RITTER, 2009). O substrato é fundamental na fase de aclimatização influenciando no desenvolvimento e crescimento das plantas micropropagadas (LIMA, 2007).

Com a etapa de micropropagação concluída, as plantulas são lavadas em água corrente para total remoção do meio de cultura, a aclimatização deve ser realizada em casa de vegetação onde as plantulas são transplantadas para bandejas de isopropileno com 72 células, onde o tempo de aclimatização é de 30 dias com umidade relativa do ambiente cuidadosamente controlada (DUTRA 2012).

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 LOCAL DA REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

As pesquisas foram realizadas nos Laboratórios de Bioquímica e Genética, Fitopatologia, Germinação de sementes e na casa de vegetação do *Campus* da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, de Laranjeiras do Sul - PR.

6.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Os aquênios de *Fragaria x ananassa* Duch foram adquiridos de um produtor do município de Laranjeiras do Sul, os pseudofrutos foram higienizados com água corrente durante 5 minutos, posteriormente foram processados em um liquidificador juntamente com 1 litro de água, em baixa velocidade por 2 minutos. Os aquênios foram coados em uma peneira e lavados em água corrente, finalmente foram dispostos em papel toalha e colocados para secar em temperatura ambiente por 24 horas.

6.3 CONDIÇÕES GERAIS DE CULTURA *IN VITRO*

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 de Policloreto de Vinila (PVC). 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°C .

6.4 DESINFESTAÇÃO DOS AQUÊNIOS E QUEBRA DE DORMÊNCIA

Para a desinfestação dos aquênios primeiramente foi realizado um pré-tratamento em etanol 70% durante 2 minutos e em seguida um tratamento com hipoclorito de sódio durante 20 minutos e triplo enxágue com água deionizada autoclavada.

Os tratamentos de desinfestação comparados foram os seguintes:

- T1. Testemunha (sem hipoclorito de sódio).
- T2. 1% de hipoclorito de sódio.
- T3. 2% de hipoclorito de sódio.

T4. 4% de hipoclorito de sódio.

T5. 8% de hipoclorito de sódio.

Após os procedimentos de desinfestação, os aquênios foram inoculados em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) acrescidos de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol e 10 g.L⁻¹ de ágar. O pH foi ajustado em 5,8 antes de esterilização dos meios a 120°C por 20 minutos. O material vegetal foi incubado em câmara de germinação tipo BOD, mantido a temperatura de 25±2°C, sob luz fluorescente com fotoperíodo de 16 horas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 5 repetições e 12 aquênios por unidade experimental. Após 28 dias de cultivo, o experimento foi avaliado de acordo com as seguintes variáveis: Porcentagem de plântulas normais, porcentagem de plântulas anormais e porcentagem de plântulas mortas.

6.5 INTRODUÇÃO *IN VITRO* E DESENVOLVIMENTO DAS MUDAS

Aquênios de *Fragaria x ananassa* Duch foram desinfestados e isoladas em câmara de fluxo laminar e inoculados em placas de petri contendo 30 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) acrescidos de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol e 10 g.L⁻¹ de ágar com pH ajustado em 5,8 antes da adição do ágar. Os meios foram autoclavados à temperatura de 121°C a 1,5 atm, durante 20 minutos.

Após a inoculação os aquênios foram levados para câmara de germinação tipo BOD (Figura 1) mantidas a temperatura de 25±2°C, sob luz fluorescente com fotoperíodo de 16 horas.

Figura 1. Placas com aquênios de *Fragaria x ananassa* Duch incubadas em meio de cultivo MS em câmara de germinação tipo BOD



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a obtenção de um número maior de plantas de morangueiro foi realizada uma segunda inoculação na qual não foi realizada a assepsia, porém, os aquênios passaram por um processo de quebra de dormência o qual consiste na escarificação química com o ácido sulfúrico, onde os aquênios foram imergidos em ácido sulfúrico durante 10 min na concentração de 80% e posteriormente realizada tríplex lavagem em água destilada autoclavada em câmara de fluxo laminar para retirar completamente os resíduos (Chapieski, 2017).

Os aquênios foram inoculados em placas de petri contendo 30 mL de meio de cultura. Os aquênios permaneceram incubadas durante um período de 160 dias na qual foi realizada duas trocas de meio de cultivo, as quais foram realizadas em capela de fluxo laminar previamente desinfestada, sendo que a primeira troca ocorreu após 30 dias, para isolar somente as plântulas asépticas. A segunda troca de meio foi realizada após 90 dias de incubação.

6.6 ACLIMATIZAÇÃO DAS MUDAS

Após o período de 160 dias de incubação as plantas foram removidas das placas, lavadas em água corrente até total remoção do meio de cultura das raízes e alocadas em uma bandeja com papel toalha umedecido (Figura 2. a), após esse procedimento, foram selecionadas plantas com 3 ± 1 cm de comprimento (raiz + parte aérea) e transplantadas em copos descartáveis de 180 ml com 5 furos cada, para escoamento do excesso de água, contendo substrato previamente umedecido (Figura 2. b).

Figura 2. a) Plântulas de *Fragaria x ananassa* Duch germinadas *in vitro* após 160 dias de cultivo. b) Tratamentos de aclimatização: T1 Testemunha (100% substrato comercial); T2 70 % substrato comercial + 15% areia +15% fibra de coco triturada; T3 50 % substrato comercial + 25% areia +25% fibra de coco triturada; previamente umedecidos dispostos aleatoriamente.



Fonte: Elaborado pelo autor

Os copos foram dispostos no interior de casa de vegetação com temperatura aproximada de 25 a 30°C, sob sombrite escuro com capacidade de interceptação luminosa de 50% por 7 dias. O substrato base utilizado foi o substrato comercial para hortaliças acrescido de quantidades de areia grossa e fibra de coco triturada, formando três diferentes tratamentos;

- T1 Testemunha (100% substrato comercial);
- T2 70 % substrato comercial + 15% areia +15% fibra de coco triturada;
- T3 50 % substrato comercial + 25% areia +25% fibra de coco triturada;

Após 28 dias foi realizada a avaliação da porcentagem de plantas sobreviventes, número de folhas e altura de parte aérea de plantas aferidas com o auxílio de régua graduada.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 12 repetições por tratamento e 1 planta por unidade experimental.

6.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos referentes a porcentagem de plantas sobreviventes foram transformados, utilizando a formula $Sen(x) + 1$ antes de serem submetidos a análise de variância, quando significativo 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.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 ASSEPSIA DAS SEMENTES

A concentração de hipoclorito de sódio não demonstrou diferença significativa para o número de plantas germinadas, porém apresentou diferença significativa entre os tratamentos com relação a contaminação fúngica, onde foi possível observar que o tratamento com 8% de hipoclorito de sódio teve maior eficiência para desinfestação dos aquênios, apresentando 90% dos aquênios sem contaminação, porém não se diferenciou estatisticamente aos tratamentos com 1 e 4 % de hipoclorito de sódio; a testemunha, que não teve presença de hipoclorito de sódio teve 99,33% de contaminação, resultados semelhantes foram encontrados por Souza (2011) em sementes de guabijuzeiro (*Myrcianthes pungens*) embebidas em hipoclorito de sódio por 20 minutos, onde obteve 100 % de contaminação na testemunha (0% de

hipoclorito de sódio) e nos tratamentos com 2, 4, 6 e 8 % de hipoclorito não houve diferença estatística e ficaram com porcentagem de contaminação entre 2 e 14.

Tabela 1. Porcentagem de contaminação *Fragaria x ananassa* Duch em função das concentrações de hipoclorito de sódio.

Concentração de hipoclorito de sódio (%)	Contaminação (%)**
0	99,33 a
1	26,67 bc
2	40,00 b
4	28,33 bc
8	10,00 c
Coefficiente de variação CV (%)	38,28

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade. (**) significativo ao nível de 1% de probabilidade.

Moraes et al. (2010) encontrou resultados similares de desinfestação com hipoclorito de sódio na concentração de 2%, em experimentos com germinação *in vitro* de *Cynara cardunculus* L., porém a desinfestação das sementes apresentou resultado de 16,7% de contaminação para um período de 7 dias, o qual aumentou para uma amplitude de 60 a 100% com 25 dias de cultivo.

Brahm e Oliveira (2004) em trabalho de introdução *in vitro* com diferentes cultivares demorangueiro, onde a desinfestação de estolões foi realizada mergulhando ponteiros em soluções compostas por álcool 70%, por 10 a 15 segundos, e em hipoclorito de sódio a 1%, por 10 minutos obteve contaminação inferior a 1% o qual é explicado pelos explantes terem sido coletados de plantas cultivadas sobre plástico em época de pouca umidade e pelo nível de assepsia empregado durante a micropropagação.

7.2 INTRODUÇÃO IN VITRO

Primeiramente para a introdução *in vitro* não foi realizada a quebra de dormência o que acarretou uma germinação muito baixa, na qual foi possível fazer

análise somente da porcentagem de infestação dos aquênios com relação ao teste de assepsia, onde foi obtido resultado satisfatório quanto a porcentagem de contaminação, o qual apresentou 10% de contaminação em tratamento com 8% hipoclorito de sódio.

Segundo BRASIL (2009) não existe nenhum protocolo estabelecido para germinação de sementes de morangueiro, Eidam (2012) afirma que a remoção das camadas superficiais dos aquênios facilita para a germinação das sementes de morangueiro.

O ácido sulfúrico na concentração de 80% durante 10 minutos foi eficiente para promover a quebra de dormência dos aquênios para a germinação *in vitro*, como resultados obtidos por Chapieski (2017) onde obteve 48% de plantas normais com essa concentração de ácido sulfúrico para quebra de dormência de aquênios de morango germinadas em gerbox.

Somente o ácido sulfúrico em concentração de 80% por 10 minutos não foi suficiente para a desinfecção dos aquênios, tornando necessário a utilização de assepsia com álcool 70% e hipoclorito de sódio, mesmo quando realizado o procedimento de quebra de dormência com ácido sulfúrico.

Em experimento para obtenção de plantas de morango *in vitro* a partir de aquênios Trindade, et al. (2007) utilizou quebra de dormência com a imersão dos aquênios em ácido sulfúrico por diferentes períodos de tempo, nas concentrações de 5, 10 e 15%, com posterior tratamento de assepsia com imersão em etanol 70% por 2 minutos e em hipoclorito de sódio a 10% por 5 minutos, seguida por três enxagues com água destilada e autoclavada, onde a maior média de germinação foi de 22%.

7.3 ACLIMATIZAÇÃO DAS MUDAS

Após o período de 28 dias de aclimatização em casa-de-vegetação, foi avaliada a porcentagem de plantas sobreviventes (Figura 3), altura de plantas e número de folhas. Os dados foram submetidos a análise da variância e quando apresentaram diferenças significativas, a 5% de probabilidade. 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 2.

Tabela 2 Resultado do teste de Tukey para comparação de médias de plantas de *Fragaria x ananassa* Duch sobreviventes a aclimatização, altura de parte aérea e número de folhas em função dos 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
Coeficiente de variação CV (%)	69,91	74,58	88,45

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). Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. (ns) não significativo ao nível de 5% de probabilidade. (*) significativo ao nível de 5% de probabilidade.

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.

Ritter et al. (2009) encontrou resultados de sobrevivência inferiores em aclimatização de morango 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 estatisticamente significativas, apresentando médias entre 2,08 e 3,08 cm, como pode ser observado na Tabela 2. Com relação a avaliação de altura de plantas Ritter et al. (2009) também não encontrou diferenças estatisticamente significativas, obtendo médias de altura de plantas de morango as quais apresentaram valores médios de 4,81 e 5,55 cm, sendo estas superiores as encontradas nesse trabalho; também não obtiveram diferenças estatisticamente significativa para o número de folhas onde foram observadas médias de 8,06 e 7,86 aproximando-se aos resultados encontrados nesse trabalho como podem ser observados na Tabela 2.

Para a variável número de folhas os tratamentos não demonstraram diferenças estatisticamente significativas, apresentando médias variando 7,33 a 8 folhas.

Figura 3. (a, b) Plantas de *Fragaria x ananassa* Duch aclimatizadas após 30 dias de cultivo em casa de vegetação em tratamentos com diferentes substratos - apresentando bom desenvolvimento de parte aérea, sem presença de doenças ou necroses.



Fonte: Elaborada pelo autor

8 CONCLUSÕES

A desinfestação de aquênios de morangueiro com hipoclorito de sódio a 8 % por 20 minutos é eficiente.

É necessário a utilização de uma técnica de quebra de dormência dos aquênios do morango para auxiliar o protocolo de desinfestação, com imersão em ácido

sulfúrico durante 10 minutos na concentração de 80% para se fazer a inoculação *in vitro*.

O meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) acrescidos de 30g.l⁻¹ de sacarose, mio-inositol a 100mg/l e ágar a 10 g.l⁻¹ com pH ajustado em 5,8 antes da adição do ágar foi eficiente para introdução e desenvolvimento *in vitro* da cultura.

Para a aclimatização de plantas de morangueiro, o substrato composto por 70% substrato comercial de hortaliças + 15% areia +15% fibra de coco triturado demonstrou se eficiente na aclimatização de mudas de morangueiro em relação a porcentagem de plantas sobreviventes porém não se diferenciou do substrato com 50 % substrato comercial + 25% areia +25% fibra de coco triturada.

REFERÊNCIAS

ANTUNES, L. E. C.; REISSER JÚNIOR, C. F. CARACTERIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MORANGOS NO BRASIL. **Fruticultura (Bologna)**, v. 69, p. 60-65, 2007.

Disponível em

<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Morango_situa%25E7%25E3o_Import%25E2ncia_000fn2g4bkj02wyiv8065610dpqk1par.pdf>. Acesso em: 24 mai. 2016.

ANUÁRIO BRASILEIRO DAS HORTALIÇAS 2016 – santa Cruz do sul : **editora Gazeta** santa Cruz, 2016. 64 p.

BRAHM, R. U.; OLIVEIRA, R. P. Potencial de Multiplicação *in vitro* de Cultivares de Morangueiro. **Revista Brasileira de fruticultura**, v26, 3p. 2004. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/rbf/v26n3/23156.pdf>>. Acesso em: 24 mai. 2016.

BRANDÃO, W. R. O.; **Avaliação de Processo de Desinfestação de Explantes Foliares in vitro de Híbridos de Morango para Aquisição de Protocolo**, 2014.

Disponível em:

<http://www.fepeg.unimontes.br/sites/default/files/resumos/arquivo_pdf_anais/resumo_expandido_morango_ii_corrigido.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2016.

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

CALVETE, E. O.; Desempenho *in vitro* e agrônômico de cultivares micropropagadas de morangueiro em vários subcultivos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v31n4/v31n4a05.pdf>>. Acesso em: 01 abr.2017.

CALVETE, E. O. et al. Avaliação do crescimento de plantas de morangueiro, durante a aclimatização *ex vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 3, p.188-192, novembro 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/hb/v18n3/v18n3a09>>. Acesso em: 02 abr.2017.

CALVETE, E. O.; KÄMPF, A. N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 186-191, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/hb/v20n2/14445.pdf>>. Acesso em: 01 abr.2017.

CARVALHO, A. C. P. P.; RODRIGUES, A. A. J.; SANTOS, E. de O. Produção de mudas micropropagadas de bananeira. Fortaleza CE. **Embrapa Agroindústria Tropical**-Circular Técnica, 2012. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/942959/1/CIT12001.pdf>>. Acesso em: 25 jun.2017.

CHAPIESKI, Paulo Cesar Queiroz. **Concetrações de ácido sulfúrico na superação de dormência de sementes de *Fragaria x ananassa* Duch.** 2017. 27 p. Trabalho de Conclusão de curso (bacharelado em agronomia) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, 2017.

DUTRA, L. F. et al. Protocolos de micropropagação de plantas IV: morangueiro. Pelotas: **Embrapa Clima Temperado**-Documentos, 2012. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/952704/1/documento345.pdf>> Acesso em: 27 jun. 2017

EIDAM Tânia, Germinação in vitro de sementes e organogênese indireta de morangueir. 2012. 47 p. Dicteração: (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2012.

GIOWANELLA, Melissa. **Monitoramento microbiológico visando alimento seguro no PIMO.** 2013. Disponível em: <<http://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/30269/Monografia%20Melissa%20Giowanella.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 01 abr.2017.

HANDA, L.; **Cultura in vitro de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke).** 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aa/v35n1/v35n1a04.pdf>>. Acesso em 06/04/2015.

IBGE, **Censo agropecuário 2006.** Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/51/agro_2006.pdf>. Acesso em 18 mai. 2016.

LIMA, C. S. M. et al. Substratos para Aclimatização de Plantas Micropropagadas de *Mentha viridis* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, 2, p. 2007. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/viewFile/578/488>>. Acesso em 02 mai. 2017.

LUCCA FILHO, O. A. Patologia de sementes. In: PESKE, S. T.; LUCCA FILHO, O. A.; BARROS, A. C. S. A. **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. 2 ed. Pelotas: Editora Universitária/UFPel, 2006. p. 259-330.

MORAES, C. F. et al. Germinação in vitro de sementes de alcachofra. **Hortic. bras**, v. 28, n. 1, 2010. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/hb/v28n1/a12v28n1>>. Acesso em 27 mai. 2017.

MOREIRA, M. A. et al., **Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola**. Ciênc. agrotec., Lavras, v. 30, n. 5, p. 875-879, set./out., 2006. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/30155/S1413-70542006000500008.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em 02 mai. 2017.

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

OLIVEIRA, R. P. et al., Produção de Matrizes de Morangueiro por meio de Cultura de Tecidos. **Embrapa clima temperado**. 2005.

OLIVEIRA, R. P.; BRAHM, R. U.; SCIVITTARO, W. B. Produção de mudas de morangueiro em casa-de-vegetação utilizando recipientes suspensos. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 107-109, 2007. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/hb/v25n1/a21v25n1>>. Acesso em 10 mai. 2017.

PEREIRA, J. E. S.; et al. Enraizamento in vitro do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duchesne) em diferentes concentrações do meio MS. **Ciência Rural**, v. 29, n. 1, p. 17-20, 1999. Disponível em: < <http://revistas.bvs-vet.org.br/crural/article/view/15051/15916>> Acesso em 10 mai. 2017.

PRESENTE, P. J.; et al. Produção de pseudofrutos de morangueiro (*Fragaria ananassa* var. Oso grande) com a aplicação de reguladores vegetais. Faculdade Integral Cantareira – SP. p. 93-107, 2013. Disponível em: <http://www.cantareira.br/thesis2/ed_20/7_adriel.pdf> Acesso em 10 mai. 2016.

QUINATO, É. E.; DEGÁSPARI, C. H.; VILELA, R. M. **Aspectos nutricionais e funcionais do morango**, Universidade Tuiuti do Paraná, 2007. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs/index.php/academica/article/viewFile/11660/8219>>. Acesso em 20 mai. 2016.

RIBEIRO, M.F. et al. Influência do hipoclorito de sódio na germinação e vigor de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) In: **XVIII CIC e XI ENPOS**. Pelotas: Rio Grande do Sul, 2009.

RITTER, Carlos Evandro Leite. et al. **Micropropagação e Aclimatização de Plântulas de Morangueiro do Clone Ivahé**. Universidade Federal de Santa Maria, 2009, 38 p. Tese (Mestrado) Santa Maria, 2009.

ROCHA, D. A.; et al. Análise comparativa de nutrientes funcionais em morangos de diferentes cultivares da região de Lavras-MG. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 4, p. 1124-1128, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452008000400046>. Acesso em: 20 mai. 2016.

RONQUE, E. R. V. Cultura do morangueiro: revisão e prática. EMATER/PR, 1998.

SILVA, Maryluce Albuquerque. **Aplicação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) na aclimatização de duas plantas ornamentais tropicais micropropagadas, visando tolerância ao parasitismo de *Meloidogyne arenaria***. Dissertação (Pós-graduação em Biologia) 2005.

SILVA, R. O.; SILVA, M. R.; FARIAS, P. M. Influência da assepsia na germinação de sementes de *Physalis angulata*. **Revista Técnico Científica do IFSC**, v. 1, n. 5, p. 693, 2013. Disponível em: <<http://periodicos.ifsc.edu.br/index.php/rtc/article/view/1160/705>>. Acesso em: 20 mai. 2016.

SCHWARZ, K. **Adubação potássica na produtividade e qualidade do morangueiro cv. Camarosa**. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Centro-Oeste - Guarapuava, 2012.

SOUZA, Luana dos Santos de et al. Desinfestação de sementes e multiplicação in vitro de guabijuzeiro a partir de segmentos apicais juvenis (*Myrcianthes pungens* O. Berg) D. Legrand. **Revista Brasileira de Fruticultura. Cruz das Almas, Ba.** Vol. 33, n. 3 (set. 2011), p. 691-697, 2011. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/129122>>. Acesso em: 20 mai. 2017.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal 3 ed. **Porto Alegre: Artmed**, v. 719, 2004.

TRINDADE B. G. UBER S. C. MORAES L. K. A. FARIA M. V. Germinação de aquênios de morangos e obtenção de seedlings *in vitro*. 2007 Disponível em: <http://www.unicentro.br/pesquisa/anais/proic/2007/pdf/artigo_197.pdf>. Acesso em: 28 mai. 2017.

UNEMOTO, L. K. **Propagação in vitro de orquídeas brasileiras em meio de cultura simplificado**. Revista Brasileira de Agrociência, Pelotas, v.13, n.2, p. 267-269, 2007. Disponível em: <<http://www2.ufpel.edu.br/faem/agrociencia/v13n2/artigo20.pdf>>. Acesso em 26 abr. 2016.