

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Instituto de Biologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal**



Tese

**Conservação in vitro de morangueiro via crescimento lento e criopreservação**

**Liana Viviam Ferreira**

**Pelotas, 2017**

**Liana Viviam Ferreira**

**Conservação in vitro de morangueiro via crescimento lento e criopreservação**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Fisiologia Vegetal.

Orientador: Dr. Leonardo Ferreira Dutra

Coorientadores: Prof. Dr<sup>a</sup>. Eugenia Jacira Bolacel Braga

Dr<sup>a</sup>. Daiane Peixoto Vargas

Dr. Sandro Bonow

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

F384c Ferreira, Liana Viviam

Conservação in vitro de morangueiro via crescimento lento e criopreservação / Liana Viviam Ferreira ; Leonardo Ferreira Dutra, orientador ; Eugenia Jacira Bolacel Braga, Sandro Bonow, coorientadores. — Pelotas, 2017.

143 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Fragaria x ananassa duch.. 2. Redução do crescimento. 3. Baixa temperatura. 4. Nitrogênio líquido. I. Dutra, Leonardo Ferreira, orient. II. Braga, Eugenia Jacira Bolacel, coorient. III. Bonow, Sandro, coorient. IV. Título.

CDD : 634.75

Liana Viviam Ferreira

Conservação in vitro de morangueiro via crescimento lento e criopreservação

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutora em Fisiologia Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 30 de junho de 2017.

Banca examinadora:

Dr. Leonardo Ferreira Dutra (Orientador)

Doutor em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Luciano do Amarante

Doutor em Biologia Vegetal pela Universidade Estadual de Campinas

Dr<sup>a</sup>. Márcia Wulff Schuch

Doutora em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Luis Eduardo Corrêa Antunes

Doutor em Agronomia pela Universidade Federal de Lavras

A meus pais, Flávio e Liliane,

**Dedico.**

E minha irmã, Gabriele,

**Ofereço.**

## **Agradecimentos**

A uma força, inexplicável e imensurável, ao qual se mostrou cada vez maior a cada etapa vencida, acreditando que dias melhores virão.

A Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realizar o Curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, meu grande sonho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, em especial ao prof. Peters e Luciano do Amarante pelos ensinamentos, sempre prestativos.

Aos meus pais Flávio e Liliane, ao amor incondicional, apoio e incentivo. Por nunca desistirem de mim, mesmo quando eu desistia. E, com toda a dificuldade que passam nunca perderem a fé, meus exemplos de humildade, persistência e força. Por serem minha base, meu eterno amor e gratidão.

A minha irmã Gabriele, pela preocupação com meu cansaço e sanidade, que mesmo nos meus momentos de estresse sempre esteve do meu lado, tornando meus dias melhores, por todo seu amor.

As minhas tias Tina e Débora por acreditarem no meu potencial e me incentivarem, pela ajuda tanto emocional quanto financeira para que eu pudesse defender este sonho, por fazerem do seu lar o meu. Ao primo Chico por me acompanhar durante a escrita e mostrar que em seu coraçãozinho sempre cabe mais um.

Ao meu orientador Leonardo Ferreira Dutra pela confiança, profissionalismo e seu otimismo, sempre me fazendo acreditar que tudo daria certo.

Aos meus coorientadores Eugenia Braga e Sandro Bonow por sempre estarem dispostos a ajudar. A Daiane Vargas, com suas inúmeras ideias de experimentos, sempre além do tempo querendo mudar o mundo da pesquisa e estreitando nossa amizade fez da sua casa a minha, oferecendo seu próprio teto para que eu pudesse terminar esta etapa.

A mestranda Daniele Masiero que se tornou peça fundamental na condução dos meus experimentos, a melhor estagiaria que já tive no doutorado e por ser a única, a escravizei um pouco. Amiga e parceira para todas as horas nos

identificamos por compartilharmos das mesmas angústias e quando as coisas não iam bem, sempre uma incentivava a outra para seguirmos, sempre em frente.

Aos funcionários do laboratório, Nino e Ju, pela confiança, hospitalidade e amizade.

As colegas de laboratório Carol, Gabriela, Letícia e Raquel pela amizade e por tornarem meus dias alegres, com elas não havia tempo ruim. Em especial a Letícia, pelo incentivo e ajuda de extrema importância, principalmente nas correções da tese.

Aos colegas da fisiologia, pelos momentos de aprendizado e descontração, em especial a amiga Angelita (Angel) por não só abrir as portas do laboratório de bioquímica, mas me ensinar e ajudar nas análises, pelos perrengues que enfrentamos juntas em outras ocasiões.

As amigas que a fisiologia me deu e aproximou Natalia e Fernanda, pelo apoio, carinho e conversas sempre regadas de um bom chimarrão.

A amiga e irmã do coração Tamiris pelos anos dividindo o mesmo teto, por acompanhar todos os momentos desta caminhada, tanto bons quanto ruins, sempre me alertando e direcionando para o melhor caminho.

As amigas bageenses de longa data pelos momentos de descontração e incentivo. A Rose pelo abrigo, por abraçar as minhas dores e diminuí-las, sempre mostrando que o melhor caminho é o do amor e da compaixão pelo próximo.

A todos que realmente acreditaram e torceram para que esta etapa fosse vencida e concluída com êxito.

**Muito Obrigada.**

*“A maior recompensa pelo esforço de uma pessoa não é o que ela ganha com isso, mas o que ela se torna através dele”.*

*(John Ruskinz)*

## Resumo

FERREIRA, Liana Viviam. **Conservação in vitro de morangueiro via crescimento lento e criopreservação**. 2017. 143f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

A conservação in vitro proporciona opções de armazenamento a curto e médio prazo mediante a redução do metabolismo da planta (chamado crescimento lento) ou a longo prazo pela inibição das reações metabólicas (chamado criopreservação) ao qual, ambos aumentam ao máximo o intervalo entre os subcultivos, evitando a variação somaclonal, como ocorre no morangueiro após sucessivos subcultivos. Neste contexto, avaliou-se o efeito de diferentes reguladores osmóticos, temperaturas, tipos de explante e períodos de avaliação na conservação in vitro de morangueiro 'Benícia' via crescimento lento e a adaptação de protocolos de criopreservação por diferentes métodos em diferentes cultivares. Foram utilizados explantes oriundos de plantas de morangueiro 'Benícia' pré-estabelecidos in vitro e mantidos em meio MS de multiplicação. O meio usado nos experimentos foi o MS básico suplementado com 20g L<sup>-1</sup> ou 40g L<sup>-1</sup> de manitol ou sorbitol. No tratamento controle não houve adição de regulador osmótico. Dois tipos de explantes foram inoculados nos meios: explante somente com a parte aérea formada (PA) e planta inteira (PI), mantidos por 6 meses a 24±2°C em sala de crescimento e 12 meses em B.O.D com temperatura de 4±2°C, ambos com fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 45-55µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 5x2x5 (meio de cultura, tipo de explante e períodos de avaliação), com três repetições de 10 explantes, totalizando 30 explantes por tratamento. Parâmetros de crescimento, bioquímicos e fisiológicos foram avaliados. De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que a temperatura de 4°C, a planta inteira e o uso do sorbitol proporcionam redução do crescimento de explantes de morangueiro 'Benícia' durante 12 meses de conservação in vitro sem afetar os parâmetros de crescimento, fisiológicos e bioquímicos da espécie. Em todos os protocolos testados de criopreservação as gemas de morangueiro não sobreviveram ao nitrogênio líquido, porém foi significativa a temperatura de 4°C durante o período de pré-aclimatação por 2-8 semanas. A solução de sacarose a 0,75M ocasionou maior taxa de sobrevivência. Os tempos de dessecação não foram eficientes e o uso da prolina aumentou a tolerância das gemas a dessecação.

**Palavras-chave:** *Fragaria X ananassa* Duch.; redução do crescimento; baixa temperatura; nitrogênio líquido.

## Abstract

FERREIRA, Liana Viviam. **In vitro conservation of strawberry via slow growth and cryopreservation.** 2017. 143f. Thesis (Doctoral in Plant Physiology) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

In vitro conservation provides short and medium term storage options by reducing plant metabolism (called slow growth) or long-term inhibition of metabolic reactions (called cryopreservation), both of which maximize the interval between subcultures, avoiding the somaclonal variation, as occurs in the strawberry after successive subcultures. In this context, the effect of different osmotic regulators, temperatures, explant types and evaluation periods on the in vitro conservation of 'Benicia' strawberry by slow growth and the adaptation of cryopreservation protocols by different methods in different cultivars were evaluated. Explants from 'Benicia' strawberry plants were used in vitro and maintained in MS medium of multiplication. The medium used in the experiments was the basic MS supplemented with 20g L<sup>-1</sup> or 40g L<sup>-1</sup> of mannitol or sorbitol. In the control treatment there was no addition of osmotic regulator. Two types of explants were inoculated in the media: explant only with aerial part (PA) and whole plant (PI), maintained for 6 months at 24±2°C in growth room and 12 months in BOD with temperature of 4±2°C, both with photoperiod of 16 hours and luminous intensity of 45-55 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. The experimental design was completely randomized in a 5x2x5 factorial scheme (culture medium, explant type and evaluation periods), with three replicates of 10 explants, totaling 30 explants per treatment. Growth parameters, biochemical and physiological parameters were evaluated. According to the results obtained, it can be concluded that the temperature of 4°C, the whole plant and the use of sorbitol provide a reduction in the growth of 'Benicia' strawberry explants during 12 months of in vitro conservation without affecting growth parameters, physiological and biochemical characteristics of the species. In all tested cryopreservation protocols the strawberry buds did not survive liquid nitrogen, but the temperature of 4°C during the pre-acclimation period for 2-8 weeks was significant. The sucrose solution at 0.75M resulted in a higher survival rate. The desiccation times were not efficient and the use of proline increased the tolerance of the egg yolks.

**Keywords:** *Fragaria X ananassa* Duch.; growth reduction; low temperature; liquid nitrogen.

## Lista de Figuras

### Capítulo 1

- Figura 1. Curva de padronização de prolina livre. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....47
- Figura 2. Explantes (PA- parte aérea, PI- planta inteira) de morangueiro ‘Benícia’ conservados in vitro durante 6 meses a 4°C e 24°C. Tratamentos: 0- MS controle; 1- MS + 20g L<sup>-1</sup> de manitol; 2- MS + 40g L<sup>-1</sup> de manitol; 3- MS + 20g L<sup>-1</sup> de sorbitol; 4- MS + 40g L<sup>-1</sup> de sorbitol. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....49
- Figura 3. Explantes de morangueiro ‘Benícia’ conservados in vitro durante 12 meses. Tratamentos: 0- MS; 1- MS + 20g L<sup>-1</sup> de manitol; 2- MS + 40g L<sup>-1</sup> de manitol; 3- MS + 20g L<sup>-1</sup> de sorbitol; 4- MS + 40g L<sup>-1</sup> de sorbitol. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....58
- Figura 4. Retomada do crescimento dos explantes de morangueiro ‘Benícia’, após 12 meses em crescimento lento a 4 °C. Tratamentos: 0- MS controle; 1- MS + 20 g L<sup>-1</sup> de manitol; 2- MS + 40 g L<sup>-1</sup> de manitol; 3- MS + 20 g L<sup>-1</sup> de sorbitol; 4- MS + 40 g L<sup>-1</sup> de sorbitol (PA- parte aérea, PI- planta inteira). Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....61
- Figura 5. Explantes de morangueiro ‘Benícia’ após 30 dias de enraizamento in vitro (oriundos do crescimento lento durante 12 meses a 4 °C). Tratamentos: 0- MS; 1- MS + 20g L<sup>-1</sup> de manitol; 2- MS + 40g L<sup>-1</sup> de manitol; 3- MS + 20g L<sup>-1</sup> de sorbitol; 4- MS + 40g L<sup>-1</sup> de sorbitol. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.....65
- Figura 6. Explantes de morangueiro ‘Benícia’ após 60 dias de aclimatização. Tratamentos: 0- MS; 1- MS + 20g L<sup>-1</sup> de manitol; 2- MS + 40g L<sup>-1</sup> de manitol; 3- MS + 20g L<sup>-1</sup> de sorbitol; 4- MS + 40g L<sup>-1</sup> de sorbitol. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....67
- Figura 7. Teor de prolina livre nos explantes de morangueiro ‘Benícia’, aos 0 e 60 dias de aclimatização. UFPel, Pelotas-RS, 2017. ....69

## Capítulo 2

- Figura 1. Rebrotas das gemas de morangueiro 'Benícia' pré-tratadas em B.O.D (4°C) e 30 minutos de exposição ao PVS2 antes (A) e depois da exposição ao NL (gemas oxidadas) (B), após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....79
- Figura 2. Gemas de morangueiro após cultivo em B.O.D (meio MS com carvão ativado) antes da padronização do tamanho (A) e cápsulas em meio de recultivo após criopreservação (pré-tratamento de 16 horas de fotoperíodo e duas horas de imersão em solução de PVS2 a 24 °C) (B). Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....84
- Figura 3. Porcentagem de umidade de gemas encapsuladas das cultivares de morangueiro nos diferentes fotoperíodos (A) e temperaturas (B) durante os tempos de desidratação em PVS2, antes da exposição ao NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....87
- Figura 4. Porcentagem de umidade de gemas encapsuladas das cultivares de morangueiro nos diferentes tempos de desidratação em fluxo, antes da exposição ao NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....91
- Figura 5. Porcentagem de umidade das gemas encapsuladas de cada cultivar de morangueiro em diferentes concentrações de sacarose e tempos de desidratação em fluxo, antes da exposição ao NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....96
- Figura 6. Porcentagem de sobrevivência das cultivares de morangueiro nos diferentes pré-tratamentos (21 e 28 dias) (A) e tempos de pré-cultivo (0, 24 e 48 horas) (B), antes da exposição ao NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....97
- Figura 7. Porcentagem de sobrevivência de cada cultivar de morangueiro nos diferentes pré-tratamentos (21 e 28 dias) e duração de pré-cultivo (0, 24 e 48 horas), antes da exposição ao NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....98
- Figura 8. Complexação das cápsulas sobre as placas de alumínio (A) e recultivo das gemas após a criopreservação (28 dias de pré-tratamento e 48 horas de pré-cultivo). Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....99

### Capítulo 3

Figura 1. Esquema representativo das etapas do protocolo de criopreservação pelo método de encapsulamento-desidratação de gemas apicais de morangueiro, cultivar Sugyeong. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	105
Figura 2. Brotações de morangueiro 'Sugyeong' mantidas in vitro em meio MS semissólido de multiplicação (A), gemas apicais com aproximadamente 5 mm inoculadas em placas contendo meio MS semissólido, em B.O.D a 4 °C (B), limpeza das gemas sob placas refrigeradas antes da inoculação nos meios de pré-tratamentos (C). Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.....	106
Figura 3. Encapsulamento de gemas apicais de morangueiro, em destaque uma gema encapsulada (A), cápsulas em solução de desidratação (B), desidratação das cápsulas em câmara de fluxo laminar (C). Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	107
Figura 4. Criotubos de 4 mL contendo 10 cápsulas, cada criotubo representando uma repetição (A), criotubos submersos em NL (B), reidratação das cápsulas em câmara de plástico selado (C). Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.....	108
Figura 6. Porcentagem de umidade de gemas de morangueiro 'Sugyeong' nos diferentes tempos de desidratação em fluxo, antes da imersão em NL. Tratamentos: 1- MS controle + MS controle; 2- MS controle + MS 2,15 mM Pro; 3- MS controle + MS 4,30 mM Pro; 4- MS 2,15 mM Pro + MS controle; 5- MS 2,15 mM Pro + MS 2,15 mM Pro; 6- MS 2,15 mM Pro + MS 4,30 mM Pro; 7- MS 4,30 mM Pro + MS controle; 8- MS 4,30 mM Pro + MS 2,15 mM Pro; 9- MS 4,30 mM Pro + MS 4,30 mM Pro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	113
Figura 7. Teor de prolina livre ( $\text{mmol g}^{-1}$ Prolina MF) em gemas de morangueiro 'Sugyeong' nos diferentes tempos de desidratação em fluxo, antes (A) e depois da imersão em NL (B). Tratamentos: 1- MS controle + MS controle; 2- MS controle + MS 2,15 mM Pro; 3- MS controle + MS 4,30 mM Pro; 4- MS 2,15 mM Pro + MS controle; 5- MS 2,15 mM Pro + MS 2,15 mM Pro; 6- MS 2,15 mM Pro + MS 4,30 mM Pro; 7- MS 4,30 mM Pro + MS controle; 8- MS 4,30 mM Pro + MS 2,15 mM Pro; 9- MS 4,30 mM Pro + MS 4,30 mM Pro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	114

## Lista de Tabelas

### Capítulo 1

Tabela 1. Preparação das soluções de prolina para a construção da curva de calibração. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	47
Tabela 2. Porcentagem de sobrevivência, comprimento da parte aérea e número de folhas de explantes de morangueiro ‘Benícia’ em diferentes tipos de meio aos 0, 3, 6, 9 e 12 meses de conservação in vitro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	49
Tabela 3. Comprimento de raízes, número de raízes e número de brotações de explantes de morangueiro ‘Benícia’ em diferentes tipos de meio aos 0, 3, 6, 9 e 12 meses de conservação in vitro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	52
Tabela 4. Massa fresca (MF), massa seca (MS) e porcentagem de umidade de morangueiro ‘Benícia’ em diferentes tipos de meios e tipos de explantes aos 12 meses de conservação in vitro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	56
Tabela 5. Teor de prolina livre em explantes de morangueiro ‘Benícia’ nos diferentes tipos de meios e tipos de explantes aos 12 meses de conservação in vitro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	57
Tabela 6. Porcentagem de sobrevivência, número de brotações (NB), comprimento de brotações (cm) e número de folhas (NF) na retomada do crescimento dos explantes de morangueiro ‘Benícia’, após 12 meses de crescimento lento a 4°C. PA: parte aérea e PI: planta inteira. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	61
Tabela 7. Comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas (NF), comprimento de raízes (CR), número de raízes (NR), massa fresca (MF), massa seca (MS) e porcentagem de umidade dos explantes de morangueiro ‘Benícia’ após 30 dias de enraizamento in vitro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	62
Tabela 8. Índices de clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b), clorofila total (Chl total), balanço do nitrogênio (NBI), flavonoides (Flv) e antocianinas (Ant) em explantes de morangueiro ‘Benícia’ após 30 dias de enraizamento in vitro, oriundos do crescimento lento durante 12 meses a 4 °C. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	64

Tabela 9. Teor de prolina livre nos explantes de morangueiro ‘Benícia’ após 30 dias de enraizamento in vitro, oriundos do crescimento lento durante 12 meses a 4 °C. UFPel, Pelotas-RS, 2017. ....	64
Tabela 10. Porcentagem de sobrevivência, número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento de raízes (CR), massa fresca (MF), massa seca (MS) e porcentagem de umidade dos explantes de morangueiro ‘Benícia’ após 60 dias de aclimatização. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	66
Tabela 11. Índices de clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b), clorofila total (Chl total), balanço do nitrogênio (NBI), flavonoides (Flv) e antocianinas (Ant) em explantes de morangueiro ‘Benícia’ após 60 dias de aclimatização. Embrapa Clima Temperado, Pelotas- RS, 2017. ....	68

## Capítulo 2

Tabela 1. Porcentagem de sobrevivência de cada cultivar de morangueiro nas temperaturas de pré-aclimação e nos tempos de desidratação em solução de PVS2 antes da imersão em NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	80
Tabela 2. Porcentagem de sobrevivência entre as cultivares de morangueiro nas temperaturas de pré-aclimação em cada tempo de desidratação em solução de PVS2 antes da imersão em NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	81
Tabela 3. Porcentagem de sobrevivência entre as cultivares de morangueiro nos tempos de desidratação em solução de PVS2 em cada temperatura de pré-aclimação antes da imersão em NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	82
Tabela 4. Porcentagem de sobrevivência de cada cultivar de morangueiro nos fotoperíodos da pré-aclimação e temperaturas da solução de PVS2 antes da imersão em NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	84
Tabela 5. Porcentagem de sobrevivência de cada cultivar de morangueiro nos fotoperíodos da pré-aclimação e tempos de desidratação em solução de PVS2	

antes da imersão em NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	85
Tabela 6. Porcentagem de sobrevivência de cada cultivar de morangueiro nas temperaturas da solução de PVS2 e tempos de desidratação em solução de PVS2 antes da imersão em NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	86
Tabela 7. Porcentagem de umidade de cada cultivar de morangueiro nos fotoperíodos de pré-aclimatação e temperaturas da solução de PVS2 antes da imersão em NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	87
Tabela 8. Porcentagem de sobrevivência das cultivares de morangueiro durante a desidratação em fluxo, antes da imersão em NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	90
Tabela 9. Porcentagem de sobrevivência das cultivares de morangueiro nas concentrações de sacarose, antes da imersão em NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	93
Tabela 10. Porcentagem de sobrevivência das cultivares de morangueiro durante a desidratação em fluxo, antes da imersão em NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	94
Tabela 11. Porcentagem de sobrevivência de cada cultivar de morangueiro durante a desidratação em fluxo, antes da imersão em NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	94

### Capítulo 3

Tabela 1. Porcentagem de sobrevivência, número de brotações (NB) e comprimento da parte aérea (CPA) de gemas de morangueiro ‘Sugyeong’ encapsuladas e desidratadas em solução de sacarose (0 e 0,75 M) antes da desidratação em fluxo e imersão em NL. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	110
Tabela 2. Número de folhas (NF), comprimento de raízes (CR) e número de raízes (NR) de gemas de morangueiro ‘Sugyeong’ encapsuladas e desidratadas em	

solução de sacarose (0 e 0,75 M) antes da desidratação em fluxo e imersão em NL. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	111
Tabela 3. Massa fresca, massa seca e porcentagem de umidade de gemas de morangueiro ‘Sugyeong’ encapsuladas e desidratadas em solução de sacarose (0 e 0,75 M) antes da desidratação em fluxo e imersão em NL. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	111
Tabela 4. Porcentagem de sobrevivência de gemas encapsuladas de morangueiro ‘Sugyeong’ durante a desidratação em fluxo, antes da imersão em NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	112
Tabela 5. Porcentagem de sobrevivência e número de brotações de gemas de morangueiro ‘Sugyeong’ encapsuladas e desidratadas em fluxo (0, 4 e 8 horas) sem imersão em NL, após 56 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	116
Tabela 6. Comprimento da parte aérea (CPA) e número de folhas de gemas de morangueiro ‘Sugyeong’ encapsuladas e desidratadas em fluxo (0, 4 e 8 horas) sem imersão em NL, após 56 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	116
Tabela 7. Comprimento de raiz (CR) e número de raízes de gemas de morangueiro ‘Sugyeong’ encapsuladas e desidratadas em fluxo (0, 4 e 8 horas) antes da imersão em NL, após 56 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.	117
Tabela 8. Massa fresca e massa seca de gemas de morangueiro ‘Sugyeong’ encapsuladas e desidratadas em fluxo (0, 4 e 8 horas) antes da imersão em NL, após 56 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	118
Tabela 9. Porcentagem de umidade das gemas de morangueiro ‘Sugyeong’ encapsuladas e desidratadas em fluxo (0, 4 e 8 horas) antes da imersão em NL, após 56 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017. ....	119

## Sumário

1	Introdução .....	20
2	Revisão da Literatura .....	21
2.1	Aspectos botânicos e fisiológicos.....	21
2.2	Importância do morangueiro e produção de mudas .....	22
2.3	Cultivares .....	23
2.4	Propagação do morangueiro.....	25
2.4.1	Micropropagação .....	26
2.5	Conservação de germoplasma vegetal .....	28
2.5.1	Unidades encapsuláveis .....	30
2.5.2	Crescimento lento .....	31
2.5.3	Criopreservação.....	33
2.5.3.1	Congelamento e armazenamento .....	34
2.5.3.2	Descongelo .....	36
2.5.3.3	Restabelecimento do crescimento e determinação da viabilidade dos explantes .....	37
2.5.3.4	Técnicas de criopreservação do morangueiro .....	37
2.5.3.5	Prolina na resposta ao estresse por desidratação celular .....	38
Capítulo 1		
	Conservação in vitro de morangueiro 'Benícia' via crescimento lento.....	40
1	Introdução .....	40
2	Material e Métodos .....	43
3	Resultados e Discussão .....	48
4	Conclusões.....	69

## Capítulo 2

Técnicas de encapsulamento-vitrificação, encapsulamento-desidratação e crio lâmina para a criopreservação de gemas de morangueiro.....70

1 Introdução .....70

2 Material e Métodos .....72

3 Resultados e Discussão .....79

4 Conclusões..... 100

## Capítulo 3

Prolina na criopreservação de gemas de morangueiro pela técnica de encapsulamento-desidratação ..... 101

1 Introdução ..... 101

2 Metodologia ..... 103

3 Resultados e Discussão ..... 109

4 Conclusão ..... 119

Considerações Finais..... 119

Referências ..... 121

Apêndices..... 136

## 1 Introdução

A cultura do morangueiro tem grande destaque no grupo das pequenas frutas por despertar a atenção dos produtores e do mercado consumidor, tanto em escala nacional quanto mundial, pelas opções de comercialização e transformação industrial da fruta (FACHINELLO et al., 2011; PORTELA; PEIL; ROMBALDI, 2012).

A produção brasileira está concentrada nos estados de São Paulo (30%), Rio Grande do Sul (29%), Minas Gerais (22%) e Paraná (19%) (REISSER JÚNIOR et al., 2014), em torno de 130 mil toneladas (FAGHERAZZI et al., 2014), o que torna o Brasil o segundo maior produtor da América Latina (ROSA et al., 2013). Em escala mundial, diversos países tem grande apreciação pelas frutas e seus subprodutos, estando os Estados Unidos no topo da produção mundial (GONÇALVES; VIGNOLO; ANTUNES, 2016).

O morangueiro é propagado assexuadamente por meio de estolões, sendo essa a forma de propagação vegetativa mais utilizada comercialmente (BEYENE et al., 2012). Porém para que se tenham mudas com qualidade fisiológica e fitossanitária garantidas, é necessário a aquisição de plantas matrizes oriundas da micropropagação (ANTUNES; DUARTE FILHO, 2005). Contudo, quando o cultivo in vitro do morangueiro é utilizado de forma continuada, ou seja, quando são realizados sucessivos subcultivos, ocorre perda de vigor dos explantes (PASA, 2012), podendo levar o material a alterações genéticas.

Desta forma, com o desenvolvimento de métodos de conservação in vitro, estes subcultivos poderão ser realizados em maiores intervalos de tempo, refletindo diretamente na redução da necessidade de mão de obra, de custos e da ocorrência de variações somaclonais.

A conservação in vitro de espécies vegetais pode ser realizada, de maneira geral, a partir da técnica de crescimento lento para períodos curtos e intermediários, em que o metabolismo das plantas é reduzido por modificações do ambiente e das condições químicas do meio de cultivo, ou a partir da criopreservação, a única técnica disponível para a conservação em longo prazo de germoplasma de plantas que são propagadas vegetativamente (SANTOS; SALOMÃO, 2010).

Poucos trabalhos foram relatados na literatura sobre a conservação in vitro de morangueiro. Reed (1992) reportou a redução da temperatura e recipientes para

armazenamento dos explantes como alternativa de cultivo em bancos de germoplasma. Höfer e Reed (2011) testaram quatro protocolos de criopreservação por vitrificação, obtendo taxas de 80 a 100% de sobrevivência e Yamamoto et al. (2012) com 70 a 97% de sobrevivência entre as cultivares testadas pelo método de criopreservação em placas de alumínio.

Assim, o presente estudo teve como objetivos conservar explantes de morangueiro, mantendo suas características fisiológicas, por meio da redução da temperatura e uso de reguladores osmóticos em dois tipos de explantes durante 12 meses, e, otimizar o protocolo de criopreservação de morangueiro com o intuito de conservar o material vegetal em longo prazo, aplicando as técnicas de encapsulamento-vitrificação, encapsulamento-desidratação e crio lâmina.

Neste contexto, os dados gerados servirão de base para o uso em bancos de germoplasma de morangueiro e por melhoristas a qualquer momento, sem a necessidade de reprodução constante do material, e desta maneira, a produção poderá ser escalonada, melhor planejada, com menores custos de manutenção e possibilidade de variação genética reduzida.

## **2 Revisão da Literatura**

### **2.1 Aspectos botânicos e fisiológicos**

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) pertence à família Rosaceae e gênero *Fragaria* (CALVETE et al., 2008), sendo que a variedade atualmente utilizada na alimentação humana é resultante do cruzamento das espécies americanas *Fragaria virginiana* e *Fragaria chiloensis* (ANTUNES et al., 2010).

A planta é do tipo herbácea e perene, porém é cultivada como planta anual (MOLINA, 2016) sendo classificada como uma hortaliça (GONÇALVES; VIGNOLO; ANTUNES, 2016). É constituída por sistema radicular, coroa, folhas, estolões, flores e frutas (GIMÉNEZ, 2008).

O sistema radicular é composto por raízes adventícias e fasciculadas. As primeiras também são conhecidas como raízes primárias, e são as que se desenvolvem a partir da coroa, são perenes e a sua função principal é a reserva de carboidratos. As raízes fasciculadas ou secundárias se originam a partir das

adventícias e são as responsáveis pela absorção de água e nutrientes; estas têm vida curta (de dias a semanas) quando são substituídas rapidamente por outras que surgem acima das velhas (BUCCI; FAEDI; BARUZZI, 2010).

A coroa é o principal órgão de reserva da planta de morangueiro e trata-se de um caule modificado de aparência reduzida que aumenta lentamente. O caule é um rizoma estolhoso, cilíndrico e retorcido, com entrenós curtos, cujas gemas terminais surgem as folhas, estolhos e inflorescências (CARVALHO, 2013).

Os estolhões são caules verdadeiros com movimento bidirecional de água e nutrientes. Apresentam-se flexíveis e a cada dois nós, a partir da roseta foliar originam novas plantas independentes (RONQUE, 1998).

As folhas são trifoliadas, cada uma com um próprio pecíolo, unidas a um pecíolo principal. Na base das folhas podem ser encontradas folhas modificadas chamadas de estípulas. As folhas variam em forma, espessura, textura e pilosidade segundo cada cultivar (CARVALHO, 2013). Tem grande número de estômatos (300 a 400 por  $\text{mm}^2$ ) (SANHUEZA et al., 2005). Portanto, esta espécie é bastante vulnerável à falta de água, baixa umidade relativa e altas temperaturas (TIMM et al., 2009).

As flores, em geral, são hermafroditas, agrupadas em inflorescências do tipo cimeira, ou seja, depois de aberta a primeira flor, os botões laterais vão se abrindo um a um, acompanhando o desenvolvimento da inflorescência, que é formada a partir das gemas existentes nas axilas das folhas. A primeira flor normalmente origina o primeiro fruto, em geral o mais desenvolvido de cada inflorescência (SILVA; DIAS; MARO, 2007).

Os frutos, assim popularmente conhecidos, são, na realidade, pseudofrutos, oriundos do crescimento do receptáculo das flores, enquanto o fruto verdadeiro são os aquênios, popularmente conhecidos como sementes (SANHUEZA et al., 2005).

## **2.2 Importância do morangueiro e produção de mudas**

O morangueiro é uma cultura de grande importância econômica e social em diversos países, especialmente nos Estados Unidos, o qual detém 28,2% da produção mundial (GONÇALVES; VIGNOLO; ANTUNES, 2016). No período de 2000

a 2010 foi registrado um aumento na produção mundial, superando quatro milhões de toneladas, em uma área equivalente a 241 mil hectares (FAO, 2017).

A produção do morangueiro ganhou espaço no Brasil a partir dos anos 1960, com o surgimento das primeiras cultivares nacionais adaptadas, produtivas e com frutas de qualidade (ANTUNES; PERES, 2013). A Embrapa Clima Temperado, na Estação Experimental de Pelotas, RS, deu origem a estas cultivares em parceria com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) e o programa do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), em parceria com a Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (GONÇALVES; VIGNOLO; ANTUNES, 2016).

O Brasil é o segundo maior produtor da América Latina (ROSA et al., 2013). Atualmente, a produção está concentrada principalmente nos estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul e São Paulo, gerando uma produção em torno de 130 mil toneladas (FAGHERAZZI et al., 2014).

O interesse no consumo do morango e o aumento nas áreas cultivadas estão associados ao seu sabor agradável, aroma, coloração e textura como também aos seus nutrientes, minerais, vitaminas e compostos antioxidantes (GALLI et al., 2015).

A produção de mudas com comprovada origem genética e com estado fisiológico e fitossanitário adequado é fundamental para atingir elevadas produtividades de frutas de alta qualidade, tanto para o consumo in natura quanto para a indústria (BISOGNIN, 2007).

Para obter plantas matrizes de qualidade é preciso adquirir plantas básicas que devem ser formadas e mantidas por entidades governamentais em ambiente protegido (OLIVEIRA et al., 2005). A Embrapa além de ter sido a pioneira na produção de mudas de morangueiro micropropagadas é a única empresa que mantém o programa de melhoramento do morangueiro atualmente no Brasil, e, conseqüentemente plantas básicas (GONÇALVES; VIGNOLO; ANTUNES, 2016).

### 2.3 Cultivares

Um dos fatores que determina o sucesso de uma cultura de morangueiro é a escolha da cultivar a ser utilizada (MOLINA, 2016). Algumas variáveis como produtividade, vigor, resistência ou tolerância a pragas e doenças, fotoperíodo,

exigência em frio e resposta a altas temperaturas são aspectos fundamentais a serem considerados (ALMEIDA et al., 2009).

As cultivares de morango podem ser classificadas em três grupos: dia longo (DL), dia curto (DC) e dia neutro (DN). As cultivares DL e DC são induzidas pelo fotoperíodo, DC precisam de períodos luminosos diários menores que o período de escuridão para induzir a floração; já DL precisam de um longo fotoperíodo; DN tem comportamento indiferente ao fotoperíodo, sendo mais sensível à temperatura (FAGHERAZZI, 2013). As cultivares DC e DN são as mais utilizadas atualmente (STRASSBURGER et al., 2010; FAGHERAZZI, 2013).

Embora existam diferentes cultivares utilizadas no Brasil, as mais empregadas são Oso Grande (50%), Camarosa (30%), Albion (6%) e Aromas (4%) (ANTUNES; PERES, 2013). Porém estudos com outras cultivares, tanto já lançadas no mercado quanto, as que estão em testes atualmente no Brasil são imprescindíveis para a formação de um banco de dados e a inserção destas futuramente no mercado.

Dentre elas estão Aromas, Monterey e Portola classificadas como cultivares de dia neutro, Benícia e Camino Real de dia curto, ambas lançadas pela Universidade da Califórnia (GONÇALVES; COCCO; ANTUNES, 2015) e a Sugyeong, uma cultivar coreana, cuja principal característica é o elevado teor de açúcares, o que a torna objeto de estudo pelo programa de melhoramento genético da Embrapa (dados não publicados).

Aromas foi desenvolvida em 1997, produz frutas grandes, com coloração vermelho-escura, usada tanto para o consumo in natura quanto para industrialização, especialmente pelo fato de apresentar sabor agradável. Apresenta uma alta produtividade, além de ser considerada resistente às variações climáticas (BORDIGNON JR, 2008).

Camino Real, lançada em 2002, produz uniformemente, com poucas frutas e qualidade inferior, porém sua produção é mais lenta. As frutas possuem forma cônica e aquênios bem sobressaídos, sobre sua coloração vermelho viva (TEIXEIRA, 2011).

A cultivar Monterey, lançada em 2009, apresenta frutas grandes, mas de polpa menos firme que os demais e bom perfil de resistência a doenças (NORCAL

NURSERY, 2013). Suas frutas apresentam um sabor diferenciado, adocicado e único entre as cultivares californianas (GONÇALVES; COCCO; ANTUNES, 2015).

As frutas da cultivar Portola apresentam-se de cor um pouco mais clara e brilhante, com excelente sabor e crescimento vegetativo vigoroso (NORCAL NURSERY, 2013).

Lançada em 2010, Benícia está em testes, cujo primeiro ano agrícola de cultivo comercial foi em 2013 no Brasil. Com frutas atraentes, grandes e boa firmeza (GONÇALVES; COCCO; ANTUNES, 2015).

Várias cultivares foram importadas de outros países em 2013 para o banco de germoplasma da Embrapa Clima Temperado, entre elas, a coreana Sugyeong, ao qual faz parte do banco ativo de germoplasma da Embrapa Clima Temperado e está sendo testada no programa de melhoramento genético que visa o desenvolvimento de variedades brasileiras.

#### **2.4 Propagação do morangueiro**

A propagação do morangueiro pode ocorrer de duas formas: sexuada e assexuada. A propagação sexuada se dá por meio de sementes e é utilizada por programas de melhoramento genético visando obter variabilidade genética no material vegetal em estudo (OLIVEIRA; BONOW, 2012).

A propagação assexuada ocorre por meio de estolões emitidos pela planta, enraizados no solo ou em substratos, podendo ser comercializados como mudas de raiz nua ou com torrão (BEYENE et al., 2012), sendo essa a forma de propagação vegetativa e a mais utilizada comercialmente (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

O principal sistema de produção de mudas é no solo, onde são produzidas mudas de raízes nuas, sendo este denominado como sistema de produção de mudas convencional (OLIVEIRA et al., 2010). As mudas produzidas nesse sistema são amplamente utilizadas em todas as regiões produtoras de morango do país (VERDIAL et al., 2009). No entanto, a produção diretamente no solo aumenta a exposição a doenças, principalmente causadas por fungos de solo e nematóides (GONÇALVES; VIGNOLO; ANTUNES, 2016).

Devido à baixa qualidade das mudas nacionais, a região Sul do Brasil tradicionalmente faz importação das mudas da Argentina e Chile (OLIVEIRA; NINO;

SCIVITTARO, 2005), porém, em função da necessidade de um número determinado de horas de frio ( $< 7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a colheita é realizada nos meses de abril e maio, assim os agricultores recebem estas mudas com atraso, prejudicando o desenvolvimento, o potencial produtivo destas mudas e o retorno econômico para o agricultor (GONÇALVES; VIGNOLO; ANTUNES, 2016).

Aliado ao atraso no recebimento das mudas no Sul do Brasil, dependendo da região, a aquisição de mudas para a implantação da lavoura pode representar até 24% do custo anual de produção do morangueiro (ANTUNES; PERES, 2013). Em função disto, a Embrapa Clima Temperado vem incentivando o desenvolvimento no País em relação à produção de matrizes e de mudas de morangueiro de alta qualidade, sendo esta uma atividade necessária e economicamente viável (OLIVEIRA et al., 2005).

As plantas matrizes de morangueiro a serem adquiridas devem ser originadas por meio da micropropagação, garantindo a qualidade fisiológica e fitossanitária do material de propagação (ANTUNES; DUARTE FILHO, 2005).

#### 2.4.1 Micropropagação

A micropropagação é um método de propagação vegetativa bem difundido e estudado, com muitas vantagens como a produção de várias plantas a partir de um explante, independentemente da estação do ano, utilizando pequeno espaço físico em um curto período de tempo necessário a propagação da espécie (ERIG; SCHUCH, 2005). É um método de regeneração ao qual se faz uso de pequenos pedaços de plantas (explantes), que proliferam em meio artificial sob condições estéreis (BADONI; CHAUHAN, 2010).

O explante mais adequado, em função de suas características fisiológicas e morfológicas, é o meristema. É um tecido formado por células tronco pluripotentes e não diferenciadas, envolvido na síntese protoplasmática e formação de novas células por divisão mitótica (CARVALHO et al., 2011). Além disso, a região meristemática não apresenta ligação direta com os feixes vasculares da planta-matriz, o que possibilita a obtenção de plantas livres de doenças, principalmente viroses (SASTRY; ZITTER, 2014).

A micropropagação convencional consiste em um processo dividido basicamente por quatro etapas: estabelecimento *in vitro*, multiplicação das

brotações, enraizamento in vitro de microestacas, e aclimatização (GEORGE; DEBERGH, 2008).

Durante o estabelecimento, explantes são coletados e transferidos para o cultivo in vitro após desinfestação superficial. Fatores como: tipos e condições de desinfestação, época de coleta, estado nutricional da planta matriz, meio de cultura, ocorrência de oxidação dos explantes e exposição à luz/escuro são cruciais para o sucesso desta etapa (GEORGE; DEBERGH, 2008; DOBRÁNSKI; SILVA, 2010).

Na segunda etapa se obtém um maior número possível de brotações por meio da multiplicação dos explantes em subcultivos sucessivos. O uso eficiente de protocolos quanto à composição mineral do meio, conteúdo e concentração de reguladores de crescimento, principalmente de citocininas e suas relações com as auxinas, intensidade luminosa, temperatura ou umidade relativa são necessários (BHATTI; JHA, 2010).

A multiplicação do morangueiro é feita somente com a adição de BAP na concentração de  $1\text{mg L}^{-1}$  em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), otimizando assim o número de brotações por explante (BRAHM; OLIVEIRA, 2004; DUTRA et al., 2012). Quanto ao número de subcultivos para o morangueiro, é recomendado que seja realizado apenas cinco ciclos de subcultivos com intervalos de 20-30 dias (OLIVEIRA et al., 2005). Com o aumento do número de subcultivos podem ocorrer variações nas características fenotípicas, como altura e vigor das plantas, tamanho e formato de frutas (FONSECA et al., 2013).

Nas plantas propagadas de forma clonal são esperadas constituir réplicas exatas da planta mãe, pois o crescimento de células in vitro e sua regeneração em plantas completas é um processo assexual, envolvendo somente divisão mitótica que, teoricamente, não causaria nenhuma variação (BAIRU; AREMU; VAN STADEN, 2011). Entretanto, frequentemente, tem sido observada variação nas plantas cultivadas in vitro.

A variação somaclonal é um termo amplo, que compreende qualquer fenômeno que cause variação genética ou epigenética, que pode ser refletida em mudanças fenotípicas nas plantas regeneradas, cujo fenótipo é herdável somática e, com frequência, meioticamente (RHEE; SEKHON; KAEPLER, 2010). As mudanças epigenéticas são causadas por modificações na expressão do DNA, que podem ser decorrentes de alteração na metilação do DNA, modificações em histonas e

remodelagem da cromatina; essas alterações podem influenciar a transcrição de genes (SMULDERS; DE KLERK, 2011).

Variações somaclonais são indesejáveis em mudas comerciais e a escolha de fitorreguladores adequados é essencial para o estabelecimento de protocolos de micropropagação (AMOO; FINNIE; VAN STADEN, 2011). Assim, cada vez mais são estudadas citocininas que apresentem menor influência nas anormalidades, visando a otimização de protocolos de micropropagação (AREMU et al., 2012).

Na etapa de enraizamento, a formação de um sistema radicular adequado nas brotações é uma condição essencial, a fim de permitir maior adaptação ao ambiente externo. Sua eficiência se relaciona com a redução nos teores de citocininas e adição de auxinas ou carvão ativado ao meio de cultura (DOBRÁNSKI; SILVA, 2010).

O enraizamento do morangueiro se dá pela utilização de BAP em baixas concentrações de  $0,05\text{mg L}^{-1}$  no meio MS (DUTRA et al., 2012) induzindo, assim, a formação de raízes sem a necessidade do uso de auxina ou carvão ativado no meio de cultura.

A última etapa, chamada de aclimatização, é necessária porque as plantas são cultivadas in vitro em condições heterotróficas (HAZARIKA, 2003). Vários distúrbios morfológicos e fisiológicos podem ocorrer durante o cultivo in vitro, dentre eles, a ocorrência de folhas com estômatos não funcionais e diminuição na fotossíntese podem interferir na sobrevivência das plantas em estufa ou no campo. Portanto, aclimatização é crítica para a transição de plantas micropropagadas do cultivo in vitro para o cultivo ex vitro (MUNIZ et al., 2013).

Assim, durante a aclimatização é necessário manter uma diminuição gradual da umidade e aumento concomitante da intensidade da luz, a fim de evitar perdas significativas de material devido a dificuldades de adaptação das plantas (DOBRÁNSKI; SILVA, 2010). Além disso, o tipo de substrato utilizado nessa fase também deve ser observado, pois é o suporte para o crescimento da planta e tem grande influência no crescimento e desenvolvimento das plantas aclimatizadas (COUTO; WAGNER JÚNIOR; QUEZADA, 2003).

## **2.5 Conservação de germoplasma vegetal**

A matéria prima do melhoramento de plantas é a diversidade biológica, e a conservação desta se faz importante por vários fatores. Além do potencial de uso econômico, a diversidade biológica é responsável pelo equilíbrio e estabilidade de qualquer ecossistema. Também se destaca o fato dela encontrar-se em fase de contínua degradação devido à atividade antrópica (BRASIL, 2016).

O papel dos bancos de germoplasma é reduzir esta perda com a conservação de espécies silvestres, cultivares locais tradicionais, assim como variedades melhoradas (WANG et al., 2005) para posterior regeneração deste material ao qual mitiguem suas perdas ao longo do tempo. Assim, os recursos genéticos de plantas são a base da segurança alimentar global. Por isso, é de extrema importância manter a diversidade genética (RAO, 2004).

A conservação de germoplasma vegetal pode ser realizada *in situ* e *ex situ*. A via *in situ* busca conservar populações de espécies em seu estado natural de ocorrência na natureza, e objetiva a manutenção das interações entre os organismos e os processos evolutivos associados. No entanto, possui algumas desvantagens, tais como baixo nível de controle e conhecimento sobre o que se está conservando; risco de declínio da população causado por estocasticidade demográfica, patógenos e doenças, catástrofes naturais (incêndios, secas prolongadas, enchentes), desmatamento e exploração desordenada; dificuldades para o rápido acesso e a utilização de materiais, além do custo elevado na caracterização e no monitoramento da reserva genética (SIMON, 2010).

Já a via *ex situ* é utilizada para a manutenção de espécies fora do habitat natural, visando, principalmente a formação de coleções (bancos de germoplasma), com a finalidade de integrá-lo a um conjunto de atividades e/ou técnicas direcionadas ao manejo e uso de recursos genéticos (BENELLI et al., 2013). Os métodos de conservação *ex situ* incluem o armazenamento de sementes, bancos de genes em campo e coleções *in vitro* (SOENGAS et al., 2009).

A conservação *in vitro* apresenta diversas vantagens sobre o processo de conservação de germoplasma no campo, dentre elas destacam-se: a manutenção de um grande número de acessos num pequeno espaço físico, material vegetal asséptico, livre de patógenos e, portanto, mais produtivo; material livre das intempéries e riscos que existem no campo, como ataque de pragas e doenças,

enchentes, secas ou perda de identificação, além da redução dos custos financeiros, entre outros (CID, 2014).

Praticamente todas as espécies podem ser conservadas *ex situ*, desde que seja possível manter a frequência alélica, geração após geração. A principal crítica feita a este tipo de conservação é que desta forma a seleção natural fica impossibilitada de atuar, pois os genótipos não sofrem o processo de evolução normal em função das alterações das condições ambientais (NICK et al., 2010). Por isso, as plantas também devem ser mantidas em campo para multiplicação/regeneração e caracterização dos acessos armazenados (JOSÉ, 2010).

Uma das maneiras mais eficientes de conservação da biodiversidade é a que ocorre sob a forma de bancos de sementes. No entanto, podem ocorrer alguns entraves na utilização desse tipo de armazenamento, já que algumas plantas não produzem sementes (sendo propagadas vegetativamente), outras espécies têm sementes que se deterioram rapidamente devido à ação de patógenos e outras produzem sementes não ortodoxas (ENGELMANN, 2011).

Técnicas de cultura de tecidos têm sido desenvolvidas e aplicadas com sucesso na preservação de diversas espécies (PILATTI et al., 2011), no entanto é de suma importância o desenvolvimento de estratégias para a multiplicação e armazenamento de cada espécie em estudo (ENGELMANN, 2011).

Para conservação em curto ou médio prazo, tem-se utilizado as técnicas de produção de unidades encapsuláveis e crescimento lento (PAUNESCU, 2009; ENGELMANN, 2011; PILATTI et al., 2011). Para a conservação de material vegetal em longo prazo, a única alternativa atualmente é a criopreservação (ENGELMANN, 2011).

#### 2.5.1 Unidades encapsuláveis

A produção de unidades encapsuláveis é uma técnica dentro da cultura de tecidos usada na propagação e conservação de materiais vegetais (SHARMA et al., 2013). É considerada uma forma simples, eficaz e barata de preservação de germoplasma (HUNG; TRUEMAN, 2012) sendo especialmente empregada em espécies que produzem sementes não viáveis ou que apresentam alguma

dificuldade de propagação e conservação (DAUD; TAHA; HASBULLAH, 2008; PAUNESCU, 2009).

Inicialmente conhecida como “semente sintética”, a técnica consiste no encapsulamento de explantes (embriões somáticos e zigóticos, ápices caulinares e gemas laterais) em matriz de alginato (HUNG; TRUEMAN, 2012). Essa matriz protege os explantes contra danos físicos e ambientais e minimiza processos de desidratação (IKHLAQ et al., 2010).

Como agente encapsulante, o alginato de sódio tem sido o mais utilizado, devido à sua capacidade de gel permeável com o cloreto de cálcio, boa propriedade gelificante, baixo custo, facilidade de uso e ausência de toxicidade (GUERRA et al., 2001).

Vários são os elementos utilizados durante a produção da cápsula, como macro e micronutrientes, vitaminas, fungicidas e sacarose (SANDOVAL; GUERRA, 2002; MARTIN, 2003; LISEK; ORLIKOWSKA, 2004). Outros compostos também têm sido introduzidos na matriz de alginato com o objetivo de melhorar a conversão das unidades encapsuladas em plantas, entre os quais, citam-se osmorreguladores como sorbitol e manitol e fitorreguladores como BAP, ABA e GA<sub>3</sub> (INOCENTE, 2002).

Cada explante permanece dentro da estrutura gelatinosa em forma de cápsula, sendo armazenada geralmente no escuro e a baixas temperaturas (4°C) (LISEK; ORLIKOWSKA, 2004).

Essa técnica tem tido especial atenção devido ao potencial de aplicação na conservação de germoplasma em médio e longo prazo e por facilitar a troca de material genético entre diferentes instituições de pesquisas do país e entre outros países (HUNG; TRUEMAN, 2012; SHARMA et al., 2013), além de permitir o estabelecimento de propágulos diretamente no campo (RECH FILHO, 2004).

### 2.5.2 Crescimento lento

O crescimento lento, também chamado de cultivo mínimo, tem sido utilizado principalmente para a conservação de ápices meristemáticos de muitas espécies. O objetivo é desacelerar o crescimento e aumentar ao máximo o intervalo entre os subcultivos, pois desta forma se reduz a mão de obra e o espaço necessário, além

de proporcionar ao melhorista acesso imediato a todo o germoplasma da coleção (KOVALCHUK et al., 2009; SANTOS et al., 2011).

No crescimento lento, o metabolismo das plantas pode ser reduzido pela modificação nas condições físicas e químicas do meio de cultivo (sem afetar sua viabilidade), pela redução da temperatura ou intensidade da luz, redução da concentração dos componentes salinos e orgânicos do meio de cultura, acréscimo de reguladores de crescimento e indução de estresse osmótico (FARIA et al., 2006; SÁ; LÉDO; LÉDO, 2011).

A redução da atividade metabólica e, conseqüentemente, no crescimento do explante, se dá pela redução da temperatura de cultivo, qual depende dos requisitos de cada espécie. Geralmente é utilizada temperatura de 4°C para culturas de clima temperado e entre 10 a 15°C para culturas tropicais (KELLER et al., 2006). O controle da temperatura pode ser combinado com outros fatores como a redução da intensidade luminosa ou sua supressão e/ou a redução dos nutrientes disponíveis no meio de cultivo (SÁNCHEZ-CHIANG; JIMÉNEZ, 2010).

A redução da concentração dos elementos minerais e/ou carboidratos metabolizados (por exemplo, sacarose) no meio de cultivo pode ser um estratégia importante para a redução do crescimento dos explantes (RAO, 2004).

Outra estratégia de crescimento lento amplamente usada é a adição de reguladores osmóticos na composição do meio de cultura. As substâncias osmorreguladoras mais conhecidas por serem eficazes na cultura de tecidos são o manitol e o sorbitol (SIQUEIRA, 2010). Explantes cultivados em meio contendo manitol são sujeitos à desaceleração no seu crescimento, devido ao estresse osmótico causado pela redução na absorção de água e nutrientes do meio (FORTES; SCHERWINSKI-PEREIRA, 2001).

Além disso, o uso de concentrações maiores de gelificantes, a adição de certos reguladores de crescimento, como o ABA ou outras substâncias podem reduzir os danos nos explantes. Como consequência destas medidas, o explante absorve os nutrientes mais lentamente e ocorre redução do crescimento (ENGELMANN, 2011).

A conservação *in vitro* via crescimento lento ainda necessita de trabalho intenso e não se pode descartar o risco de perder o material vegetal devido à contaminação, tanto na introdução do material *in vitro*, como nos subcultivos. Além

disso, materiais in vitro de algumas espécies estão sujeitos a mutações, cuja frequência aumenta durante o cultivo in vitro (KAVIANI, 2011). Assim, a criopreservação foi desenvolvida para evitar as alterações genéticas que podem ocorrer durante a estocagem de culturas in vitro por longos períodos (ENGELMANN, 2004).

### 2.5.3 Criopreservação

A criopreservação é a conservação do material biológico a temperaturas ultrabaixas, geralmente em nitrogênio líquido (NL) a  $-196^{\circ}\text{C}$ , ou em sua fase de vapor a  $-150^{\circ}\text{C}$ , na presença ou ausência de substâncias crioprotetoras (ENGELMANN, 2004). A esta temperatura, a divisão celular, o metabolismo e as atividades bioquímicas permanecem suspensas (KAVIANI, 2011). Assim, a estabilidade genética e as características fenotípicas do material são mantidas (ENGELMANN et al., 2008).

Nestas condições, teoricamente, a criopreservação permite conservar materiais vegetais por um período ilimitado de tempo, com a vantagem adicional de requerer pouco espaço físico e as culturas são protegidas contra a contaminação microbiana. Além disso, o trabalho e custos com a manutenção são mínimos (SHIBLI et al., 2006).

O custo anual de manutenção de um acesso de uma fruteira temperada é da ordem de 900 dólares, se mantida a campo; 23 dólares, quando armazenada in vitro sob condições de crescimento lento; e de apenas um dólar, quando criopreservada. Deve-se, entretanto, adicionar um custo inicial de 50 a 60 dólares para criopreservar o material. O custo de manutenção anual da coleção de mandioca do CIAT que possui cerca de 5.000 acessos é de 5.000 dólares para os acessos criopreservados, contra 30.000 dólares dos acessos mantidos em crescimento lento in vitro (ENGELMANN, 2004).

O armazenamento mais adequado em longo prazo de espécies vegetativamente propagadas ocorre mediante técnicas de criopreservação (KACZMARCZYK et al., 2008). Nestas espécies, os melhores órgãos são ápices, pois contém os meristemas, cujo pequeno tamanho reduz a entrada de vírus, com elevada recuperação do crescimento e menor variação somaclonal (KAVIANI, 2011).

Além disso, depois dos embriões, as células meristemáticas apicais possuem maior capacidade de regenerar a planta inteira do que qualquer outro tecido (REED et al., 2011).

A criopreservação pode ser utilizada com sucesso na conservação de germoplasma de um amplo número de culturas comercialmente importantes, como a mandioca, o arroz, a cana-de-açúcar, a banana e o morango (RAZDAN, 2003).

Independente da técnica utilizada, de modo geral, o processo de criopreservação é constituído basicamente de cinco fases distintas: congelamento, armazenamento, descongelamento, restabelecimento dos explantes criopreservados e determinação da viabilidade (VETTORAZZI, 2016).

#### 2.5.3.1 Congelamento e armazenamento

O estado da água e o equilíbrio osmótico relacionado com os movimentos da água dentro e fora das células são parâmetros de grande importância para a criopreservação. A desidratação dos explantes desempenha papel central na prevenção de lesões que podem ocorrer durante o congelamento e conseqüentemente na viabilidade pós-descongelamento (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008).

A maioria dos explantes apresenta grande quantidade de água intracelular, e uma das etapas críticas do processo de criopreservação é a determinação do teor ótimo de água antes do congelamento. Conforme Lopes (2005), teores elevados propiciam a formação de cristais de gelo no interior da célula. A formação de gelo no meio intracelular causa ruptura do sistema de membranas celulares, resultando em perda da permeabilidade e da compartimentação celular, com conseqüente morte celular (SANTOS, 2001). Em contraste, teores muito baixos de água intracelular levam à dessecação excessiva, que pode ocasionar morte celular, devido à exposição aos efeitos nocivos da alta concentração de eletrólitos celulares (WOWK, 2010).

Segundo Mansur et al. (2009) a remoção da água intracelular pode ser induzida pelo congelamento, pela exposição a substâncias altamente concentradas, por dessecação através de correntes de ar ou exposição a sílica gel.

Um bom nível de sobrevivência geralmente é obtido quando as amostras são congeladas a um grau de umidade de 10% a 20% (WOWK, 2010).

O congelamento pode ocorrer rapidamente ou lentamente (ENGELMANN, 2004). No congelamento rápido, a desidratação do explante ocorre antes da sua exposição ao NL por meio da utilização das técnicas de vitrificação e essa desidratação normalmente acontece mediante a exposição da amostra a um meio com alta concentração de soluções crioprotetoras ou a métodos físicos de desidratação. Assim a maior parte da água intracelular é retirada antes do congelamento da amostra. Após a desidratação é feito o congelamento rápido do material pela imersão em NL induzindo a vitrificação dos solutos internos (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008).

Já o congelamento lento requer o controle da velocidade do congelamento, usando um congelador programável que ocorre lentamente até a temperatura pré-definida ( $0,5-2,0^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$  para valores próximos de  $-40^{\circ}\text{C}$ ) seguido pela imersão em NL (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008).

A progressão das etapas do congelamento lento permite a difusão da água do interior da célula supercongelada para o meio extracelular, devido à diferença de pressão de vapor de água, que é maior dentro da célula do que nos espaços intercelulares, onde então, a água é convertida em gelo na superfície das células ou entre o protoplasto e a parede celular. Dessa maneira a célula desidrata-se, reduzindo os teores de água a um mínimo ou removendo completamente a água, evitando assim a formação de cristais de gelo em seu interior (MOLINA et al., 2006).

Entretanto durante o congelamento lento deve-se evitar a desidratação celular excessiva, uma vez que, se o congelamento ocorrer rapidamente, a desidratação por congelamento pode não ocorrer. Nesta condição o conteúdo celular continua a se super-resfriar e a água contida no interior da célula congela-se, levando ao aparecimento de cristais de gelo, os quais podem causar injúrias mecânicas às células, principalmente ao sistema de membranas (ENGELMANN, 1997).

As técnicas de criopreservação utilizadas atualmente fazem o uso do congelamento rápido com protocolos adaptados para cada espécie como em macieira (LI et al., 2014), morangueiro (SOLOV'EVA; VYSOTSKAYA; DOLGIKH, 2016) e batata doce (VETTORAZZI, 2016).

O armazenamento do material vegetal é realizado em criotubos e imersos em NL pelo período mínimo de uma hora (LI et al., 2014).

### 2.5.3.2 Descongelamento

Processos inadequados de descongelamento causam na maioria das vezes, danos às células e tecidos criopreservados (KARLSSON, 2001).

No processo de descongelamento cristais de gelo podem ser formados. Com o aumento da temperatura, a água que não foi congelada durante a redução da temperatura, tornado-se vitrificada, começa a ser liberada podendo ocorrer o congelamento antes que a temperatura ambiente seja atingida. Além disso, com o aumento da temperatura pequenos cristais de gelo que foram formados na fase do congelamento podem crescer formando cristais de gelo maiores causando o rompimento e morte das células (SANTOS, 2000).

Para evitar a formação de cristais de gelo, os explantes são expostos ao descongelamento rápido, realizado em banho-maria com temperaturas de 37 a 40°C por 1 a 3 minutos e, posteriormente lavados em meio de cultura suplementado com altas concentrações de sacarose (0,4-1,2M) a fim de reidratar os tecidos (DIXIT et al., 2004; WANG; FAN; LIAW, 2005; SANT et al., 2008).

Durante a reidratação podem ocorrer danos às membranas capazes de causar a morte dos explantes ou impedir a formação de plantas normais. Isso ocorre porque no processo de vitrificação há o enrijecimento da membrana plasmática, e após o descongelamento muitas vezes a membrana encontra-se desorganizada em razão do estresse causado no congelamento. Devido a esses fatores, quando a água penetra novamente na célula durante a reidratação rapidamente e com muita pressão podem ocorrer danos à membrana plasmática das células levando-a à morte. A utilização de soluções osmorreguladoras após o descongelamento pode prevenir tais danos. Normalmente são utilizadas durante a reidratação soluções de concentrações decrescentes de açúcares, permitindo que a água retorne lentamente ao interior das células e só então após a reidratação os explantes são inoculados no meio de restabelecimento (DUSSERT et al., 2003).

### 2.5.3.3 Restabelecimento do crescimento e determinação da viabilidade dos explantes

O restabelecimento do crescimento ou recultivo dos explantes reidratados após o descongelamento geralmente é realizado em meio MS suplementado com ágar (SOLOV'EVA; VYSOTSKAYA; DOLGIKH, 2016), porém dependendo da espécie o meio pode ser suplementado com gelrite (HERINGER et al., 2013) ou agarose e Phytigel® (FRAGA et al., 2016). Mantidos em sala de crescimento (24°C ±2°C) no escuro de 3 a 7 dias para evitar a oxidação (SOLOV'EVA; VYSOTSKAYA; DOLGIKH, 2016).

Para o monitoramento e escolha dos protocolos mais eficientes de criopreservação é importante ter disponíveis testes eficientes de viabilidade que possam de maneira rápida e exata determinar a eficiência da criopreservação e a probabilidade de regeneração dos explantes criopreservados (VERLEYSSEN et al., 2004).

Os testes de Tetrazólio e de diacetato de fluoresceína são métodos de avaliação por coloração que têm sido utilizados para avaliar a viabilidade de sementes, tecidos e células congeladas. Entretanto, deve-se ter cautela na utilização desses métodos, uma vez que podem fornecer informações incorretas sobre a viabilidade, pois as células podem apresentar coloração positiva imediatamente após o descongelamento, mas eventualmente morrerem durante o recultivo (SANTOS, 2000).

### 2.5.3.4 Técnicas de criopreservação do morangueiro

A criopreservação do morangueiro tem sido reportada ao longo dos anos por diversos autores e técnicas. Kartha, Leung e Pahl (1980) relataram a criopreservação de meristemas de morangueiro usando o método convencional de congelamento lento. Caswell e Kartha (2009) indicaram claramente que é possível a criopreservação de meristemas de morangueiro em NL por 28 anos.

Diferentes fontes de explantes de morangueiro são usados na criopreservação como meristemas (KARTHA; LEUNG; PAHL, 1980; HIRAI et al., 1998; CASWELL; KARTHA, 2009), brotações (HALMAGYI; DELIU, 2006; ZHAO et

al., 2006; YAMAMOTO et al., 2012), ápices (NIINO et al., 2003; CLAVERO-RAMÍREZ et al., 2005; SOLOV'EVA; VYSOTSKAYA; DOLGIKH, 2016) e gemas axilares (NAVATEL; CAPRON, 1997).

Várias técnicas de criopreservação de morangueiro têm sido aplicadas com sucesso como a vitrificação (NIINO et al., 2003; ZHAO et al., 2006), desidratação (SOLOV'EVA; VYSOTSKAYA; DOLGIKH, 2016), encapsulamento-vitrificação (HIRAI et al., 1998), encapsulamento-desidratação (NAVATEL; CAPRON, 1997; CLAVERO-RAMÍREZ et al., 2005; HALMAGYI; DELIU, 2006), crio lâmina (YAMAMOTO et al., 2012a).

Uma etapa extra tem sido realizada nos explantes de morangueiro, chamada de pré-tratamento, feita antes da desidratação. No pré-tratamento os explantes são expostos a baixa temperatura, geralmente a 4°C de 1-4 semanas (HIRAI et al., 1998; YAMAMOTO et al., 2012a) até 2 meses no escuro para adaptação ao frio. Posteriormente, é realizado o pré-cultivo em meio com crioprotetores, desidratação, congelamento, armazenamento criogênico, descongelamento, reidratação e recuperação do crescimento (SOLOV'EVA; VYSOTSKAYA; DOLGIKH, 2016).

#### 2.5.3.5 Prolina na resposta ao estresse por desidratação celular

O nível de prolina que se acumula nas plantas em resposta ao estresse varia muito e é altamente dependente da espécie vegetal, com aumento de até 100 vezes em relação aos controles relatados na literatura (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008).

Em plantas sob desidratação como a seca ou a alta salinidade, a prolina é um dos mais comuns osmólitos e enquanto vários aminoácidos são conhecidos por se acumularem em resposta a estresses osmóticos, a prolina parece ter um papel protetor específico na adaptação das células vegetais à desidratação em muitas plantas. A prolina acumula-se normalmente no citosol, onde contribui para o ajuste osmótico citoplasmático em resposta à perda de água sem interferir nos processos celulares e reações bioquímicas (ASHRAF; FOOLAD, 2007).

Durante a criopreservação, as células vegetais encontram problemas semelhantes às condições de congelamento no campo. Mudanças na organização espacial das membranas biológicas, reações bioquímicas e químicas podem ser retardadas, e, o status e a disponibilidade de água podem ser alterados. Por estas

razões, a prolina é suscetível de ser um crioprotetor para células e tecidos criopreservados de plantas (BURRITT, 2012).

Devido à sua capacidade de agir como um osmoprotetor, a prolina tem sido utilizada em diferentes protocolos de criopreservação tanto para células e tecidos de animais quanto de plantas, o modo de proteção é ainda um assunto de debate considerável na literatura. A prolina poderia atuar como reserva de armazenamento de carbono e nitrogênio, osmólito compatível, um tampão para o pH citosólico, um eliminador de espécies reativas de oxigênio e auxiliar no equilíbrio do estado redox celular (HARE; CRESS, 1997).

Também foi proposto que a prolina poderia atuar como uma chaperona molecular, ajudando a estabilizar a estrutura de proteínas, e como parte da cadeia de transdução de sinal que alerta as células vegetais na presença de um estressor e, portanto, desencadeia respostas adaptativas (MAGGIO; MIYAZAKI; VERONESE, 2002).

Os protocolos de criopreservação compreendem uma série de etapas, cada uma tem potencial de causar um estresse que poderia aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Estudos recentes demonstraram que a desidratação e o congelamento podem levar ao aumento da produção de EROs e do estresse (FLECK et al., 2000; ROACH et al., 2008).

Devido às suas propriedades químicas, a prolina tem uma elevada capacidade para radicais hidroxila. A pirrolidina, que forma o anel de 5 membros de prolina, tem um IP baixo e assim a prolina é capaz de formar um complexo de transferência de carga, permitindo que ele seque efetivamente o oxigênio singlete. A prolina também pode reagir com radicais hidroxila sob a captação de hidrogênio formando um radical estável (MATYLSIK, 2002).

Portanto, o acúmulo de prolina em células vegetais sob tensão ou tratadas com prolina exógena como parte de um protocolo de criopreservação poderia aumentar a capacidade de remoção de EROs das células, reduzir o potencial de danos oxidativos às macromoléculas celulares vitais e assim estabilizar as proteínas, o DNA e as membranas lipídicas (ANJUM; RISHI; AHMAD, 2000).

As moléculas de prolina podem intercalar entre os grupos cabeça de fosfolipídios de membrana durante a desidratação e congelamento ajudando a reduzir as tensões mecânicas nas membranas ou alterar as propriedades físicas das

membranas tornando-as menos propensas a uma transição de cristal líquido para gel (HOEKSTRA; GOLOVINA; BUITINK, 2001).

Embora numerosos estudos tenham demonstrado que a prolina pode ser utilizada na sobrevivência das células e órgãos das plantas após a criopreservação, há pouca evidência quanto ao seu modo de ação. Sendo necessário mais estudos para determinar como a prolina protege as células vegetais ao nível celular e como outros tratamentos que conferem criotolerância, tais como os pré-tratamentos com outros compostos, interagem com o metabolismo da prolina e poderiam, assim, melhorar a tolerância das células vegetais durante a conservação *in vitro*.

## Capítulo 1

### **Conservação *in vitro* de morangueiro 'Benícia' via crescimento lento**

#### **1 Introdução**

Os recursos genéticos vegetais constituem a base da cadeia alimentar do homem, além de atender em inúmeras de suas necessidades como combustível, vestuário, medicamentos e habitação. Conservar estes recursos em condições ideais, mantendo sua integridade física e genética, é garantir os genes para a sustentabilidade de trabalhos de melhoramento de plantas e assegurar o alimento das próximas gerações (VETTORAZZI, 2016).

Uma das culturas de grande interesse econômico e alimentar é a do morangueiro (FAO, 2013), o interesse no consumo está associado ao seu sabor agradável, aroma, coloração e textura como também aos seus nutrientes, minerais, vitaminas e compostos antioxidantes (GALLI et al., 2015).

Por ser uma cultura tratada como anual (GONÇALVES; VIGNOLO; ANTUNES, 2016) cuja principal forma de propagação comercial é a vegetativa por meio de estolões que enraizam diretamente no solo (BEYENE et al., 2012) faz-se necessário a aquisição anual de mudas devido a perdas por contaminações e redução da produtividade (ANTUNES; PERES, 2013).

Assim, faz-se necessário a obtenção de plantas matrizes de morangueiro com garantida qualidade fisiológica e fitossanitária, oriundas da cultura de tecidos por meio da micropropagação (ANTUNES; DUARTE FILHO, 2005). Porém o morangueiro pode ser multiplicado pela micropropagação até cinco ciclos de subcultivos com intervalos de 20-30 dias (OLIVEIRA et al., 2005), pois com o aumento do número de subcultivos pode ocorrer variação somaclonal (FONSECA et al., 2013).

Variações somaclonais são indesejáveis em mudas comerciais, sendo importante o estabelecimento de protocolos de micropropagação (AMOO; FINNIE; VAN STADEN, 2011) que visem o aumento nos intervalos de subcultivos, desacelerando o crescimento, através da conservação in vitro por meio do crescimento lento, pois desta forma se reduz o manuseio entre os subcultivos, a mão de obra e o espaço necessário (KOVALCHUK et al., 2009; SANTOS et al., 2011).

O sucesso da conservação in vitro se dá pelo desenvolvimento de protocolos de micropropagação, uma vez que a propagação e regeneração quando bem estabelecida é determinante para a posterior valorização, utilização e troca de germoplasma conservado (SCHERWINSKI-PEREIRA; COSTA, 2010).

O crescimento lento, também chamado de cultivo mínimo (KOVALCHUK et al., 2009; SANTOS et al., 2011) visa o armazenamento do material vegetal a curto e médio prazo (SANTOS; SALOMÃO, 2010; ENGELMANN, 2011).

No crescimento lento, o metabolismo das plantas é reduzido pela modificação nas condições físicas e químicas do meio de cultivo (sem afetar sua viabilidade), pela redução da temperatura ou intensidade da luz, redução da concentração dos componentes salinos e orgânicos do meio de cultura, acréscimo de reguladores de crescimento e indução de estresse osmótico (SÁ; LÉDO; LÉDO, 2011).

O decréscimo da temperatura é uma das estratégias mais utilizadas para manter as plantas em crescimento lento por reduzir o metabolismo da planta, incluindo alterações no conteúdo e ação das enzimas e na composição e funcionamento das membranas celulares (LÉDO; SILVA JÚNIOR; BARBOZA, 2007). Essa técnica tem sido utilizada para a conservação de diversas espécies vegetais, com respostas que variam em função da sensibilidade à baixa temperatura (LEMONS et al., 2002; FARIA et al., 2006).

A combinação de baixas temperaturas com a adição de reguladores vegetais ou agentes osmóticos no meio de cultura tem sido apontada como uma alternativa eficiente para a conservação de germoplasma in vitro. Os agentes osmóticos como a sacarose, o manitol e o sorbitol, agem sobre o crescimento reduzindo o potencial hídrico do meio de cultura e conseqüentemente inibindo a absorção de água e nutrientes pelo explante (LÉDO; SILVA JÚNIOR; BARBOZA, 2007).

Alguns compostos orgânicos são acumulados em plantas sob condições de estresse osmótico e por baixas temperaturas, dentre estes, encontra-se a prolina, um aminoácido que possui função osmoprotetora, auxiliando na manutenção da integridade celular de proteínas, enzimas e membranas (AHANGER et al., 2013).

A prolina parece ter um papel protetor específico na adaptação das células vegetais à desidratação em muitas espécies de plantas. Acumula-se normalmente no citosol, onde contribui para o ajuste osmótico citoplasmático em resposta à perda de água sem interferir nos processos celulares e reações bioquímicas (ASHRAF; FOOLAD, 2007). Quantificar o teor deste aminoácido em plantas submetidas à baixa temperatura e a diferentes reguladores osmóticos no meio de cultura é de extrema importância para relacionar estes fatores estressantes ao desenvolvimento das plantas.

Plantas cultivadas in vitro são pobres em conteúdo de clorofila ou a enzima responsável pela fotossíntese, ou seja, a ribulose bifosfato carboxilase (RuBPCase) é inativa ou ausente. A baixa atividade desta enzima pode ser devido à presença de sacarose no meio de cultura durante o desenvolvimento das folhas (HAZARIKA, 2006).

A baixa eficiência fotossintética, o mau funcionamento dos estômatos e a redução acentuada na cera epicuticular (HAZARIKA, 2006) ocorrem devido ao espaço limitado, baixa irradiação, alta umidade relativa do ar no interior dos frascos e trocas gasosas ineficientes ao qual caracterizam o ambiente de cultivo in vitro (CALVETE et al., 2002).

Portanto, conhecendo as alterações fisiológicas das plantas desenvolvidas in vitro, pode-se manipular o ambiente, tanto in vitro, quanto durante a aclimatização. Assim, o presente estudo objetivou conservar in vitro dois tipos de explantes de morangueiro 'Benícia' sob crescimento lento com reguladores osmóticos em temperatura reduzida por um período 12 meses.

## 2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de cultura de tecidos e em casa de vegetação da Embrapa Clima Temperado. A extração e quantificação de prolina foi realizada no Laboratório de Bioquímica Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, campus Capão do Leão.

### 2.1 Material vegetal

Foi utilizado neste experimento explantes de morangueiro da cultivar Benícia, coletados do matrizeiro mantido em casa de vegetação.

### 2.2 Coleta, assepsia e estabelecimento in vitro dos explantes

Para a excisão de meristemas, porções terminais de brotações com aproximadamente 5cm de comprimento foram coletadas do matrizeiro em casa de vegetação, as folhas foram retiradas e as brotações acondicionadas em recipiente com água deionizada. Em seguida, foram levados ao laboratório para passar pelo processo de assepsia.

Inicialmente, o material coletado foi imerso em álcool 70% por 10 segundos; seguido de imersão por 10 minutos em solução de hipoclorito de sódio 1% e 3 gotas de detergente comercial sob agitação. Os explantes foram lavados em câmara de fluxo laminar, por três vezes, em água deionizada estéril para a extração dos meristemas.

O meristema foi excisado com auxílio de pinça e bisturi, utilizando lupa estereoscópica e inoculado em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10mL de meio de cultura estéril.

O meio de cultura usado para o isolamento dos ápices de morangueiro foi composto pelos sais e vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com mio-inositol ( $100\text{mg L}^{-1}$ ), BAP ( $1\text{mg L}^{-1}$ ); ANA ( $0,01\text{mg L}^{-1}$ );  $\text{GA}_3$  ( $0,1\text{mg L}^{-1}$ ); sacarose ( $30\text{g L}^{-1}$ ) e ágar ( $7\text{g L}^{-1}$ ), com pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem.

Os meristemas foram mantidos em sala de crescimento no escuro por 3 dias, e, posteriormente em fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa  $45-55\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e temperatura de  $24\pm 2^\circ\text{C}$  por aproximadamente 60 dias.

### 2.3 Multiplicação e enraizamento dos explantes

Os explantes estabelecidos na etapa anterior foram transferidos para frascos com aproximadamente 30mL de meio de multiplicação, contendo os sais do meio MS suplementado com mio-inositol ( $100\text{mg L}^{-1}$ ); BAP ( $1\text{mg L}^{-1}$ ); sacarose ( $30\text{g L}^{-1}$ ) e ágar ( $7\text{g L}^{-1}$ ), com pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. Os explantes com tamanho entre 1 e 3cm, contendo de 2 a 3 gemas foram mantidos em ambiente controlado por 30 dias. Os explantes foram repicados neste meio por 3 subcultivos até atingir o número desejado de material vegetal para instalação dos experimentos. Concomitantemente, parte dos explantes multiplicados foram transferidos para frascos com aproximadamente 40mL de meio MS de enraizamento suplementado com  $0,005\text{mg L}^{-1}$  de BAP,  $30\text{g L}^{-1}$  de sacarose e  $7\text{g L}^{-1}$  de ágar, com pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem, e mantidos em sala de crescimento por 30 dias.

### 2.4 Indução do crescimento lento in vitro

Explantes oriundos da etapa anterior foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10mL de meio MS suplementado com mio-inositol ( $100\text{mg L}^{-1}$ ), sacarose ( $30\text{g L}^{-1}$ ) e ágar ( $7\text{g L}^{-1}$ ). Mantidos em B.O.D ( $4\pm 2^\circ\text{C}$ ) e em sala de crescimento ( $24\pm 2^\circ\text{C}$ ), ambos com fotoperíodo de 16 horas.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial  $5\times 2\times 5$  [cinco tipos de meio de cultura (T0- MS, T1- MS +  $20\text{g L}^{-1}$  de manitol, T2- MS +  $40\text{g L}^{-1}$  de manitol, T3- MS +  $20\text{g L}^{-1}$  de sorbitol, T4- MS +  $40\text{g L}^{-1}$  de sorbitol), dois tipos de explante (PA- parte aérea e PI- planta inteira) e cinco períodos de avaliação (aos 0, 3, 6, 9 e 12 meses)], com três repetições de 10 explantes, totalizando 30 explantes por tratamento.

Foram realizadas as seguintes avaliações: porcentagem de sobrevivência; comprimento da parte aérea (cm); número de folhas; comprimento de raízes (cm);

número de raízes e número de brotações. Além destas variáveis, aos 12 meses foram aferidas a massa fresca (g), seca (g) e porcentagem de umidade (10 explantes por tratamento) em balança determinadora de umidade Shimadzu® (Precisão 0,001g), assim como, a extração e quantificação de prolina (análise detalhada no item 2.7).

## 2.5 Retomada do crescimento dos explantes

### 2.5.1 Multiplicação

Após 12 meses de cultivo em crescimento lento a 4°C, PA e PI oriundos dos cinco meios de cultura foram inoculados em meio MS de multiplicação (meio descrito no item 2.3). O material vegetal foi mantido por 30 dias em sala de crescimento. Aos trinta dias avaliou-se: porcentagem de sobrevivência; comprimento de brotações (cm); número de brotações e número de folhas.

### 2.5.2 Enraizamento

Explantes multiplicados in vitro foram inoculados em meio MS de enraizamento (meio descrito no item 2.3). O material vegetal foi mantido por 30 dias em sala de crescimento. Aos trinta dias avaliou-se: porcentagem de sobrevivência; comprimento da parte aérea (cm); número de folhas; comprimento de raízes (cm); número de raízes; massa fresca (g), seca (g) e porcentagem de umidade foram aferidas em balança determinadora de umidade (10 plantas por tratamento); prolina (descrita no item 2.7); e, os índices de clorofila [Chl (Chl a, Chl b e Chl total)], flavonoides (flv), antocianinas (Ant) e de balanço do nitrogênio (NBI) descritos no item 2.8.

## 2.6 Aclimatização

Mudas enraizadas da etapa anterior foram transplantadas para bandejas de poliestireno de 72 células com vermiculita autoclavada, mantidas por 30 dias em câmara de crescimento, cuja primeira semana estabeleceu-se a temperatura de

24°C, 16 horas de fotoperíodo, 90% de umidade relativa, com irradiação luminosa chegando na cultura em torno de  $50\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$ . A partir da segunda semana reduziu-se a temperatura para 22°C, 80% de umidade relativa, 16 horas de fotoperíodo e aumentou-se gradualmente a irradiação, chegando ao final dos 30 dias a  $250\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$ .

Aos 30 dias as mudas foram levadas para casa de vegetação, as raízes foram lavadas e transplantadas para novas bandejas com substrato comercial, mantidas por mais um mês, onde foram então avaliadas. Foi realizada irrigação manual sempre que necessário, com água deionizada e duas vezes por semana foram irrigadas com solução nutritiva.

A solução nutritiva utilizada foi baseada na solução proposta por Sonneveld; Straver (1994) e utilizada por Marques (2016).

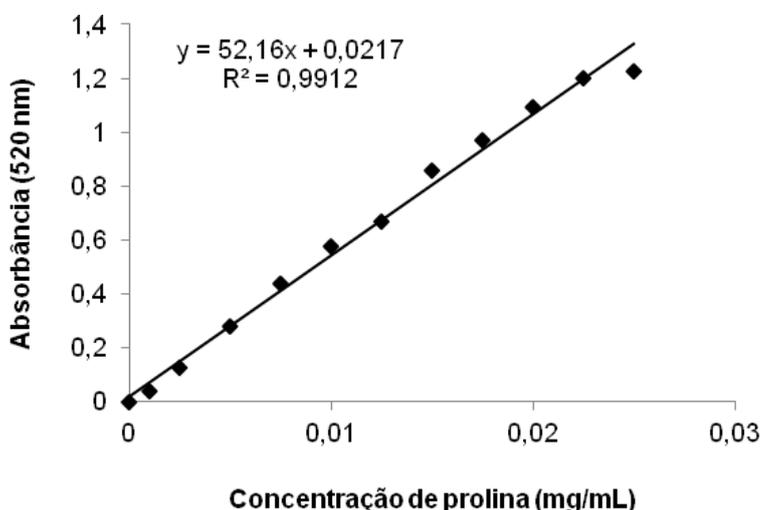
Aos 60 dias avaliou-se: porcentagem de sobrevivência; comprimento da parte aérea (cm); número de folhas; comprimento de raízes (cm); número de raízes (20 plantas por tratamento); massa fresca (g), seca (g) e porcentagem de umidade (10 plantas por tratamento) realizada em balança determinadora de umidade; prolina (descrita no item 2.7); e, os índices de clorofila [Chl (Chl a, Chl b e Chl total)], flavonoides (flv), antocianinas (Ant) e de balanço do nitrogênio (NBI) descritos no item 2.8.

## 2.7 Extração e quantificação de prolina

A metodologia utilizada para a determinação de prolina livre foi proposta por Bates; Waldren; Teare (1973), modificada por Bezerra Neto e Barreto (2011). Amostras com 200mg de folhas, caules e raízes frescas (três repetições, totalizando 9 amostras por tratamento) foram maceradas em nitrogênio líquido, com adição de 2mL de ácido sulfossalicílico a 3% em almofariz. O extrato obtido foi centrifugado por 15 minutos a 1.000g. Após a centrifugação, as amostras foram duplicadas e em cada tubo de ensaio foi adicionado 1mL do sobrenadante, 2mL de ninhidrina ácida, 2mL de ácido acético glacial e 2mL de água destilada. Posteriormente, as amostras foram levadas ao banho-maria a 100°C por 1 hora. Em seguida, os tubos foram submetidos ao choque térmico em banho de gelo e permaneceram no escuro até chegarem a temperatura ambiente. Sequencialmente, 4mL de tolueno foram

adicionados a cada amostra, sendo elas agitadas vigorosamente por 20 segundos, para a separação das fases. O sobrenadante foi aspirado da fase aquosa, e a leitura procedida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 520nm.

A concentração de prolina foi determinada através da curva padrão, preparada com concentrações conhecidas de prolina (Tabela 1). A curva de padronização foi usada para quantificar a prolina utilizando solução estoque na concentração de 1µmol de prolina P.A. e diluições em água destilada (sempre completando para o volume de 2mL), o restante do procedimento foi realizado com as mesmas soluções usadas para a extração e da mesma forma (Figura 1). Os valores obtidos foram expressos em mmol prolina g<sup>-1</sup> MF.



**Figura 1.** Curva de padronização de prolina livre. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Tabela 1. Preparação das soluções de prolina para a construção da curva de calibração. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Tubo	Solução mãe (mL)	Água destilada (mL)	[ ] (mg/mL)
1	0,02	1,98	0,0005
2	0,04	1,96	0,0010
3	0,10	1,90	0,0025
4	0,20	1,80	0,0050
5	0,30	1,70	0,0075
6	0,40	1,60	0,0100
7	0,50	1,50	0,0125
8	0,60	1,40	0,0150
9	0,70	1,30	0,0175

10	0,80	1,20	0,0200
11	0,90	1,10	0,0225
12	1,00	1,00	0,0250

## 2.8 Índice de clorofila, flavonoides, antocianinas e índice de balanço do nitrogênio

Os índices de clorofila total (Chl), flavonoides (Flv), antocianinas (Ant) e de balanço de nitrogênio (NBI) foram aferidos com auxílio de clorofilômetro (modelo Dualex FORCE-A, Orsay, France) a partir da média das leituras de duas folhas por planta de 15 plantas por tratamento (5 por repetição) no início e final da aclimatização (aos 0 e 60 dias). A medição do índice de clorofila foi substituída pela medição em outro clorofilômetro (modelo CFL 1030, clorofiLOG, FALKER), pois neste aparelho é aferido não só clorofila total, mas também as clorofilas a e b.

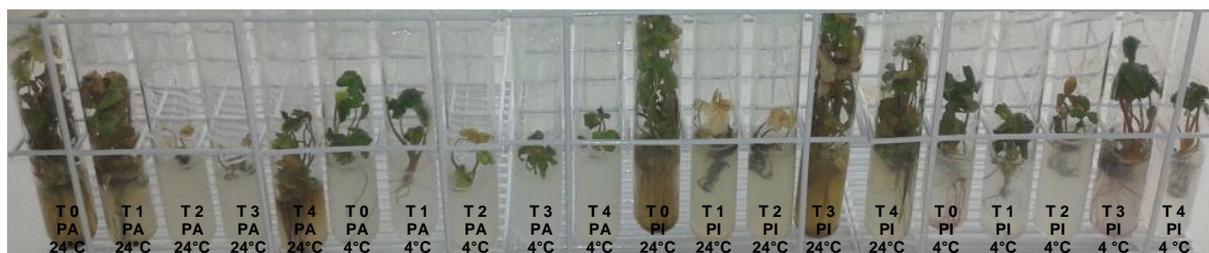
## 2.9 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo programa estatístico Sisvar<sup>®</sup> versão 5.6 (FERREIRA, 2014), sendo as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

# 3 Resultados e Discussão

## 3.1 Indução do crescimento lento in vitro

A partir dos resultados obtidos em 6 meses, foi possível constatar que a conservação in vitro por meio do crescimento lento a 24°C não é viável devido à baixa taxa de sobrevivência, menor redução no crescimento e alta oxidação apresentada. Portanto, adotou-se a temperatura de 4°C para a continuidade do experimento e avaliações, sendo descartadas as plantas mantidas em 24°C (Apêndice A, B e C; Figura 2).



**Figura 2.** Explantes (PA- parte aérea, PI- planta inteira) de morangueiro 'Benícia' conservados in vitro durante 6 meses a 4°C e 24°C. Tratamentos: 0- MS controle; 1- MS + 20g L<sup>-1</sup> de manitol; 2- MS + 40g L<sup>-1</sup> de manitol; 3- MS + 20g L<sup>-1</sup> de sorbitol; 4- MS + 40g L<sup>-1</sup> de sorbitol. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

A sobrevivência dos explantes foi influenciada pelas concentrações dos reguladores osmóticos adicionados ao meio de cultura, tipos de explante e períodos de avaliação (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de sobrevivência, comprimento da parte aérea e número de folhas de explantes de morangueiro 'Benícia' em diferentes tipos de meio aos 0, 3, 6, 9 e 12 meses de conservação in vitro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Sobrevivência (%)						
Tipos de meio	Explante	0 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
<b>MS</b>	Parte aérea	100AaA*	96,7AaA	96,2AaA	96,4AaA	79,4AaA
	Planta inteira	100AaA	100AaA	99,6AaA	98,6AaA	93,4AaA
<b>MS + 20g L<sup>-1</sup> Manitol</b>	Parte aérea	100AaA	97AaA	88,7AaAB	96,6AaA	65,6ABaB
	Planta inteira	100AaA	97,6AaA	96,3AaA	94,6AaA	85,1AaA
<b>MS + 40g L<sup>-1</sup> Manitol</b>	Parte aérea	100AaA	57,8BaB	38BbBC	10,4BbCD	0,0CbD
	Planta inteira	100AaA	70,5BaB	66,2BaB	59,6BaB	46,5BaB
<b>MS + 20g L<sup>-1</sup> Sorbitol</b>	Parte aérea	100AaA	96,3AaA	92,5AaA	91,3AaA	84,6AaA
	Planta inteira	100AaA	100AaA	98,7AaA	96,5AaA	91,9AaA
<b>MS + 40g L<sup>-1</sup> Sorbitol</b>	Parte aérea	100AaA	93,2AaAB	83,2AaAB	70,6AbBC	48,3BbC
	Planta inteira	100AaA	100AaA	99,3AaA	98,9AaA	93,5AaA
<b>C.V. (%)</b>				<b>14,31</b>		
Comprimento da parte aérea (cm)						
Tipos de meio	Explante	0 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
<b>MS</b>	Parte aérea	1,6AbC	1,7AbC	2,5AbBC	3,6AaAB	4,6AaA
	Planta inteira	3,1AaA	3,2AaA	3,9AaA	4,2AaA	4,6BaA
<b>MS + 20g L<sup>-1</sup> Manitol</b>	Parte aérea	1,9AaA	1,9AaA	2,0AaA	2,7ABaA	3,5ABaA
	Planta inteira	1,6AaA	1,6AaA	1,7BaA	1,8BaA	1,8CbA
<b>MS + 40g L<sup>-1</sup> Manitol</b>	Parte aérea	1,2AaA	1,3AaA	1,3AaA	1,3BaA	1,3CaA
	Planta inteira	1,9AaA	2,0AaA	2,0BaA	2,1BaA	2,1CaA
<b>MS + 20g L<sup>-1</sup> Sorbitol</b>	Parte aérea	1,3AbA	1,4AbA	1,4AbA	1,5BbA	1,6CbA
	Planta inteira	2,8AaC	2,9AaC	3,3ABaC	5,4AaB	7,7AaA
<b>MS + 40g L<sup>-1</sup> Sorbitol</b>	Parte aérea	1,5AaA	1,6AaA	1,6AaA	1,8ABbA	1,8BCbA
	Planta inteira	2,4AaB	2,5AaB	2,6ABaB	4,1AaAB	5,6BaA

C.V. (%)		32,5				
		Número de folhas				
Tipos de meio	Explante	0 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
<b>MS</b>	Parte aérea	3,0AaC	5,4AaBC	6,5AbBC	9,4AbAB	12,4AbA
	Planta inteira	3,0AaD	8,3AaC	10,3AaC	14,9AaB	21AaA
<b>MS + 20g L<sup>-1</sup> Manitol</b>	Parte aérea	3,0AaC	5,1AaBC	6,4AaBC	8,7AaAB	11,5AbA
	Planta inteira	3,0AaD	5,7AaCD	7,2ABaC	11,4ABCaB	16,8BaA
<b>MS + 40g L<sup>-1</sup> Manitol</b>	Parte aérea	3,0AaA	3,6AaA	3,7AaA	3,8BbA	3,8BbA
	Planta inteira	3,0AaC	4,5AaBC	5,3BaBC	8,0CaAB	10,6CaA
<b>MS + 20g L<sup>-1</sup> Sorbitol</b>	Parte aérea	3,0AaC	4,4AaBC	5,5AbABC	7,2ABbAB	8,8AbA
	Planta inteira	3,0AaD	6,9AaCD	9,1ABaBC	12,8ABaAB	16,9ABaA
<b>MS + 40g L<sup>-1</sup> Sorbitol</b>	Parte aérea	3,0AaB	4,1AaB	5,1AaB	6,9ABbAB	9,3AbA
	Planta inteira	3,0AaC	5,2AaC	6,5ABaBC	10,3BCaAB	13,8BCaA
C.V. (%) <sup>1</sup>		24,89				

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (tipos de meio de cultura), médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma coluna (tipos de explante) e médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma linha (períodos de avaliação) diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

O meio com alta concentração de manitol (40g L<sup>-1</sup>) reduziu a porcentagem de sobrevivência dos explantes a medida que aumentou o tempo de conservação, com diferença aos 3, 6 e 9 meses, chegando a 0% em explantes PA (parte aérea) e 46,5% em explantes PI (planta inteira) aos 12 meses de conservação in vitro (Tabela 2).

A baixa porcentagem de sobrevivência dos explantes em meio contendo alta concentração de manitol corrobora com os dados encontrados por Formoso (2016) trabalhando com amoreira preta 'Guarani' observou que as maiores taxas de sobrevivência aos 10 meses em crescimento lento (a 24°C) ocorreu nos tratamentos com sacarose (88%) e manitol (80%) quando adicionados isoladamente ao meio de cultivo, 30 e 20g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Já nos tratamentos com 30g L<sup>-1</sup> de sacarose + 10g L<sup>-1</sup> de manitol; 30g L<sup>-1</sup> de sacarose + 20g L<sup>-1</sup> de manitol; 30g L<sup>-1</sup> de sacarose + 30g L<sup>-1</sup> de manitol, à medida que aumentou a concentração do manitol, reduziu a taxa de sobrevivência (65%, 25% e 5%, respectivamente).

Lemos et al. (2002) ao trabalharem com conservação in vitro de cana-de-açúcar observaram que o aumento conjunto da temperatura e da concentração de sacarose (de 20g L<sup>-1</sup> para 40g L<sup>-1</sup>) prejudicou a sobrevivência dos explantes, demonstrando que a sacarose foi rapidamente absorvida, traduzindo-se em rápido aumento da massa foliar e consequente senescência dos explantes.

A alta concentração de açúcares pode ocasionar efeitos nocivos tais como a diminuição da absorção de água, sais minerais, e assim afetar no crescimento e sobrevivência dos explantes (BESSON et al., 2010), pois concentrações excessivas de açúcares alteram o potencial hídrico do meio de cultura (PAIVA-NETO; OTONI, 2003). Lédo et al. (2007) e Sá et al. (2011) ao trabalharem com coqueiro e mangabeira, respectivamente, constataram que altas concentrações de reguladores osmóticos no meio resultou em efeitos tóxicos marcantes nos explantes.

Aos 12 meses de conservação, tanto o meio MS controle quanto o meio MS + 20g L<sup>-1</sup> de sorbitol promoveram taxas satisfatórias de sobrevivência, não diferindo nos períodos de avaliação e nem entre os tipos de explantes. Já o meio MS + 40g L<sup>-1</sup> de sorbitol resultou em diferença na sobrevivência em relação ao tipo de explante utilizado, apresentando-se mais eficiente para explantes inteiros inoculados neste meio, porém não diferindo ao meio MS controle, ambos apresentaram a melhor taxa de sobrevivência (93%) (Tabela 2).

Resultados similares foram encontrados por Perez-Molphe-Balch et al. (2012) após 12 meses de cultivo de 16 espécies e subespécies do gênero *Turbiniarpus* apresentaram 100% de sobrevivência em condições de crescimento mínimo estimulado pelos agentes osmóticos manitol, sorbitol ou baixas temperaturas (4°C), porém, para uma delas *T. schmiedickeanus* subsp. *schwarzii*, somente o manitol foi efetivo na inibição do crescimento.

Para *Pfaffia tuberosa*, os melhores resultados foram obtidos com 10g L<sup>-1</sup> de sorbitol (FLORES et al., 2013) e para a mangabeira 10 ou 20g L<sup>-1</sup> deste mesmo agente osmótico foi mais eficiente (SANTOS et al., 2011).

Já Lemos et al. (2002) encontraram resultados divergentes os estudar a conservação in vitro de cana-de-açúcar, observando que os explantes submetidos apenas a sacarose apresentaram maior viabilidade em relação aqueles tratamentos onde se misturou sacarose com manitol ou sorbitol.

O aumento do tempo de conservação resultou em maior comprimento da parte aérea e incremento no número de folhas, com interação entre os meios e o tipo de explante inoculado in vitro. A diferença foi observada no comprimento da parte aérea de explantes inteiros inoculados nos meios MS + 20g L<sup>-1</sup> de sorbitol (aumento de 4,9cm) e MS + 40g L<sup>-1</sup> de sorbitol (aumento de 3,2cm) aos 12 meses de conservação. Para a variável número de folhas, o meio MS controle promoveu

aumento de folhas ao longo do período de avaliações com diferença observada para explantes inteiros, chegando aos 12 meses com 21 folhas, ou seja, 19 folhas formadas durante a conservação (Tabela 2).

Não é desejável um grande número de folhas formadas no período proposto de conservação, visto que o espaço no interior dos tubos de ensaio é reduzido, assim quanto maior o número de folhas, mais chances de ocorrer oxidação foliar, resultando em explantes muito alongados e com caules quebradiços. Em contrapartida, a alta concentração de manitol minimizou o crescimento da parte aérea (comprimento e número de folhas) a ponto de causar extrema oxidação e consequente morte dos explantes.

O desenvolvimento in vitro de um sistema radicular funcional e com superfície de absorção compatível com a parte aérea é fundamental para a recuperação das plantas após o período proposto de conservação.

Tabela 3. Comprimento de raízes, número de raízes e número de brotações de explantes de morangueiro 'Benícia' em diferentes tipos de meio aos 0, 3, 6, 9 e 12 meses de conservação in vitro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Comprimento de raízes (cm)						
Tipos de meio	Explante	0 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
MS	Parte aérea	0,0AbD*	1,4AbCD	2,4AbC	4,8AbB	7,5AbA
	Planta inteira	2,6AaC	4,2AaC	4,6AaC	6,9AaB	9,2AaA
MS + 20g L <sup>-1</sup> Manitol	Parte aérea	0,0AbC	0,3AbC	1,2ABbBC	2,7ABaAB	4,3BaA
	Planta inteira	1,9AaB	2,5AaB	3,0AaAB	3,9BCaAB	5,1BCaA
MS + 40g L <sup>-1</sup> Manitol	Parte aérea	0,0AbA	0,0AbA	0,0BbA	0,1CbA	0,1CbA
	Planta inteira	2,0AaA	2,3AaA	2,4AaA	2,8CaA	3,0CaA
MS + 20g L <sup>-1</sup> Sorbitol	Parte aérea	0,0AbA	0,1AbA	0,4ABbA	0,8BCbA	1,1CbA
	Planta inteira	2,1AaC	3,2AaC	4,1AaBC	5,5ABaAB	7,0BaA
MS + 40g L <sup>-1</sup> Sorbitol	Parte aérea	0,0AbA	0,1AbA	0,3ABbA	1,1BCbA	1,8CbA
	Planta inteira	2,2AaB	2,6AaAB	2,6AaAB	3,6BCaAB	4,5CaA
C.V. (%)				38,56		
Número de raízes						
Tipos de meio	Explante	0 meses	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
MS	Parte aérea	0,0AbC	5,1AbB	6,5AbB	8,1AbAB	9,8AbA
	Planta inteira	3,7AaD	8,2AaC	10,4ABaBC	12,7AaAB	15,2AaA
MS + 20g L <sup>-1</sup> Manitol	Parte aérea	0,0AbC	0,8BbC	3,1BbBC	6,7ABbAB	8,4ABbA
	Planta inteira	3,0AaD	6,3AaCD	8,0ABCaBC	10,4ABaAB	12,6ABaA
MS + 40g L <sup>-1</sup> Manitol	Parte aérea	0,0AbA	0,0BbA	0,0BbA	0,3DbA	0,6DbA
	Planta inteira	2,7AaB	5,4AaAB	6,2CaA	7,3BaA	8,5CaA
MS + 20g L <sup>-1</sup> Sorbitol	Parte aérea	0,0AbB	0,2BbB	0,8BbAB	2,3CDBaB	4,0CbA
	Planta inteira	3,5AaC	8,3AaB	10,7AaAB	12,3AaA	13,9AaA
MS + 40g L <sup>-1</sup> Sorbitol	Parte aérea	0,0AbC	0,1BbC	1,5BbBC	3,8BCbAB	6,3BCbA

	Planta inteira	3,0AaC	6,2AaBC	7,3BCaAB	8,8BaAB	10,2BCaA
<b>C.V. (%)</b>				<b>26,93</b>		
<b>Número de brotações</b>						
<b>Tipos de meio</b>	<b>Explante</b>	<b>0 meses</b>	<b>3 meses</b>	<b>6 meses</b>	<b>9 meses</b>	<b>12 meses</b>
<b>MS</b>	Parte aérea	0,00AaA	0,07AbA	0,13AbA	0,37AbA	0,50AbA
	Planta inteira	0,00AaC	0,67AaBC	0,90AaB	1,87AaA	2,30AaA
<b>MS + 20g L<sup>-1</sup> Manitol</b>	Parte aérea	0,00AaA	0,13AaA	0,33AaA	0,63AbA	0,67AbA
	Planta inteira	0,00AaB	0,30AaB	0,37AaB	1,17BaA	1,53BaA
<b>MS + 40g L<sup>-1</sup> Manitol</b>	Parte aérea	0,00AaA	0,07AaA	0,23AaA	0,30AaA	0,33AbA
	Planta inteira	0,00AaC	0,13AaBC	0,27AaABC	0,77BaAB	0,90BaA
<b>MS + 20g L<sup>-1</sup> Sorbitol</b>	Parte aérea	0,00AaA	0,03AaA	0,20AbA	0,27AbA	0,30AbA
	Planta inteira	0,00AaD	0,33AaCD	0,77AaBC	1,33ABaAB	1,57BaA
<b>MS + 40g L<sup>-1</sup> Sorbitol</b>	Parte aérea	0,00AaA	0,00AaA	0,13AaA	0,33AbA	0,37AbA
	Planta inteira	0,00AaB	0,27AaAB	0,40AaAB	0,87BaA	0,90BaA
<b>C.V. (%)<sup>1</sup></b>				<b>65,71</b>		

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (tipos de meio de cultura), médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma coluna (tipos de explante) e médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma linha (períodos de avaliação) diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Os resultados divergiram entre os fatores estudados quanto ao comprimento de raízes. Explantes inoculados somente com a parte aérea, desenvolveram maiores comprimentos de raízes nos meios MS controle (7,5cm) e MS + 20g L<sup>-1</sup> de manitol (4,3cm), já explantes inoculados inteiros apresentaram melhores resultados nos meios contendo sorbitol (4,9cm em MS + 20g L<sup>-1</sup> de sorbitol e 2,3cm em MS + 40g L<sup>-1</sup> de sorbitol) ao final dos 12 meses de conservação (Tabela 3).

Para o número de raízes formadas, explantes PI (planta inteira) formaram mais raízes do que explantes PA em todos os períodos de avaliação, apresentando ao final do período de conservação mais raízes formadas no meio MS controle (11,5) seguido do meio MS + 20g L<sup>-1</sup> de sorbitol (10,4) (Tabela 3).

De acordo com Rolland et al. (2006) as fontes de carbono são essenciais para a produção de hormônios de crescimento, como as auxinas, que são capazes de induzir o desenvolvimento do sistema radicular. No entanto, a concentração de hidratos de carbono necessária para produzir auxinas varia conforme a espécie, sendo que altas concentrações de açúcares podem levar à redução do potencial osmótico do meio de cultura, resultando na diminuição da disponibilidade de água para as plantas, dificultando, assim, o seu crescimento (CALVETE et al., 2002).

Este trabalho demonstra claramente a importância da conservação in vitro de plantas com sistema radicular formado na tolerância as condições adversas

impostas tanto pelos reguladores osmóticos quanto pela baixa temperatura. Uma hipótese levantada seria o nível elevado de auxina endógena. Pinto e Lameira (2001) citam que há espécies que enraízam com facilidade e não necessitam de reguladores, o que pode ser explicado pelo elevado nível endógeno deste fitohormônio.

Alguns autores ressaltam que a ação dos carboidratos sobre o enraizamento podem estar intimamente ligados às auxinas. A auxina pode influenciar diretamente no acúmulo basal de carboidratos, como também no aumento de sua concentração. No entanto, a relação exata entre auxinas, carboidratos e enraizamento é bastante complexa e o seu completo entendimento ainda é desconhecido e exige estudos mais elaborados neste aspecto (ALOUFA, 2003).

Todavia os carboidratos em si não aumentam a resposta ao enraizamento, e sim são fonte de energia e de carbono para a síntese de substâncias essenciais para a formação de raízes, além de exercer função osmótica no meio (SOUZA; PEREIRA, 2007).

Para a variável número de brotações, todos os meios foram eficientes na redução da taxa de multiplicação nos períodos avaliados, apresentando pouca variação, porém o tipo de explante planta inteira resultou em mais brotações que explantes PA (Tabela 3).

DUTRA et al. (2012) citam que a taxa de multiplicação do morangueiro em cada subcultivo é de cinco a sete explantes em média, dependendo da cultivar, o que indica que os resultados foram satisfatórios. Sendo assim, o manitol e o sorbitol podem ser acrescentados ao meio de cultura para auxiliar na redução da taxa de multiplicados, visto que os mesmos em conjunto com a sacarose agem de forma a reduzir o potencial hídrico do meio de cultura alterando o crescimento dos explantes (LIMA-BRITO et al., 2011).

Lemos et al. (2002) relatam que o uso de temperaturas mais baixas no cultivo in vitro reduz a ação de enzimas e do metabolismo geral das plantas, em seus experimentos, a redução da temperatura de 25°C para 15°C provocou crescimento mais lento dos explantes sem, contudo, ocasionar-lhes danos fisiológicos.

Os efeitos da baixa temperatura, caracterizados pela senescência das folhas, que ocorre muitas vezes ainda durante as condições in vitro, indicam que as brotações, nestas condições, são induzidas à dormência pela ação da temperatura.

Este fato é normalmente observado sob condições naturais, principalmente no outono e inverno, quando os fatores ambientais restringem o crescimento das plantas. Uma diminuição da temperatura e/ou fotoperíodo pode conduzir, num primeiro momento, à parada de crescimento das brotações e, num segundo momento, a entrada em dormência das mesmas (PEREIRA; FORTES; SILVA, 2001).

Quanto à redução da temperatura, Faria (2008) cita que esta pode ser uma alternativa para a conservação *in vitro* de células e órgãos de plantas. A observação feita por este autor em seus estudos com crescimento lento em maracujá corrobora com os resultados encontrados neste experimento. Ficando evidente que a temperatura de 4°C além de promover maiores taxas de sobrevivência, reduz o crescimento da parte aérea e de raízes, o número de folhas e raízes, assim como o número de brotações formadas.

Embora os tratamentos somente com sacarose (controle) e sacarose com sorbitol tenham promovido menor redução no crescimento em comparação com os tratamentos com manitol, a aplicação destes promoveu melhor desenvolvimento sem ocasionar toxicidade nos explantes.

Machi (2016) cita que em alguns casos apenas o açúcar álcool é suficiente para reduzir o crescimento *in vitro* dos explantes e garantir a viabilidade do material após o armazenamento. No entanto, a capacidade em metabolizar açúcar-álcool parece ser espécie-dependente. Nadel et al. (1989) constataram que em culturas *Apium graveolens* o manitol não pode fornecer energia suficiente para crescimento contínuo e divisão celular e a sacarose deve ser utilizada para fornecer energia necessária ao desenvolvimento *in vitro*.

O manitol, assim como o sorbitol, é um açúcar-álcool utilizado frequentemente para reduzir o potencial hídrico do meio de cultura (GEORGE et al., 2008). Segundo Steinitz, (1999) eles comumente penetram nas células, se acumulam e podem ser translocados para ser metabolizado em vários graus.

O metabolismo do manitol ocorre através da via das hexoses onde é possível a sua utilização como substrato respiratório (THOMPSON, 1986). Além de serem metabolizados em graus variados em culturas heterotróficas, segundo George et al. (2008) o açúcar-álcool têm a função de estimular respostas fisiológicas específicas, por aparentemente atuar como sinais químicos.

Lédo et al. (2007), observaram que a adição de manitol a 24,65 e 32,87mg L<sup>-1</sup> induziu menor crescimento de explantes de coqueiro anão verde. Em hastes de batata (*Solanum tuberosum*), a presença de manitol reduziu efetivamente o crescimento das plantas, porém apenas 37% dos explantes sobreviveram após 90 dias de cultivo (FORTES; PEREIRA, 2001). Contudo, estes resultados diferem dos encontrados em mangabeira, cujo manitol não foi viável para a conservação in vitro de microestacas desta espécie, uma vez que apresentou efeito tóxico (SÁ et al., 2011).

Para a variável massa fresca não houve diferença entre os tipos de explantes, para ambos foi observado diferença para o meio com a maior concentração de sorbitol, este resultado está associado ao fato de que este tratamento proporcionou incremento positivo nos parâmetros de crescimento analisados (Tabela 4).

A diminuição da massa seca observada no meio com maior concentração de manitol para PI está relacionada com a falta de água para o metabolismo, o que reduz a velocidade das reações metabólicas e, conseqüentemente, diminui o acúmulo de matéria seca (MARUR et al., 1994).

Os tratamentos com manitol resultaram em menor porcentagem de umidade, reforçando a influencia deste regulador na diminuição do potencial hídrico, reduzindo a absorção de água e nutrientes pelos explantes, e, conseqüentemente removendo o excesso de água intracelular por gradiente osmótico (MARINO et al., 2010; SILVA; SCHERWINSKY-PEREIRA, 2011).

Tabela 4. Massa fresca (MF), massa seca (MS) e porcentagem de umidade de morangueiro 'Benícia' em diferentes tipos de meios e tipos de explantes aos 12 meses de conservação in vitro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Tipos de meio	MF (g)		MS (g)		Umidade (%)	
	PA	PI	PA	PI	PA	PI
MS	1,3 Bb*	1,9 ABa	0,42 Ba	0,78 Aa	82 Aa	85 Aa
MS + 20 g L <sup>-1</sup> Manitol	1,6 ABa	1,7 Ba	0,52 Aa	0,48 Ba	67 Ba	71 Ba
MS + 40 g L <sup>-1</sup> Manitol	-	1,9 AB	-	0,28 B	-	60 C
MS + 20 g L <sup>-1</sup> Sorbitol	1,8 ABa	1,6 Ba	0,34 Ba	0,29 Ba	80 Aa	82 Aa
MS + 40 g L <sup>-1</sup> Sorbitol	1,9 Aa	2,2 Aa	0,44 Ba	0,45 Ba	77 Aa	80 Aa
<b>C.V. (%)<sup>1</sup></b>	<b>10,68</b>		<b>22,3</b>		<b>4,22</b>	

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

-não houve sobreviventes no período ou as amostras foram insuficientes para esta análise destrutiva.  
\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (tipos de meio de cultura) e médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha (tipos de explantes) diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Sage e Kubien (2007) citam que em baixas temperaturas, todas as reações metabólicas são diminuídas, ocasionando um acúmulo de intermediários fosforilados e a não liberação de Pi, limitando a regeneração da Ribulose Bisfosfato (RuBP) e a fotossíntese. Além disso, ocorre um desequilíbrio do estado fotossintético aumentando a pressão de excitação no fotossistema II (FSII), ocasionando danos nesse fotossistema (HUNER; ÖQUIST; SARHAN, 1998).

Segundo Hannah et al. (2006), a transcrição de genes envolvidos no metabolismo de carboidratos e metabolismo secundário está correlacionada positivamente com a tolerância à baixa temperatura. Além disso, o metabolismo de compostos nitrogenados também é afetado pela baixa temperatura, com genes de enzimas envolvidas na síntese de aminoácidos sendo regulados positivamente, como é o caso do  $\Delta$ 1-pirrolina-5-carboxilato sintetase, envolvido na biossíntese de prolina, conhecida por suas funções osmoprotetoras (USADEL, 2008).

Quanto ao acúmulo de prolina nos diferentes órgãos da planta observou-se que níveis mais altos foram encontrados nos tratamentos com as maiores concentrações de manitol e sorbitol para explantes PA, localizada na parte aérea, principalmente nas folhas, exceto para o tratamento com 40 g L<sup>-1</sup> de sorbitol, onde foi encontrado 14 mmol e 5,5 mmol de prolina em explantes PA, no caule e raiz, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Teor de prolina livre em explantes de morangueiro 'Benícia' nos diferentes tipos de meios e tipos de explantes aos 12 meses de conservação in vitro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Tipos de meio	Prolina (mmol prolina g <sup>-1</sup> MF)					
	Folha		Caule		Raiz	
	PA	PI	PA	PI	PA	PI
MS	0,19 Da*	0,33 Ca	0,06 Ca	0,11 Aa	0,12 Ba	0,17 Ba
MS + 20 g L <sup>-1</sup> Manitol	0,78 Cb	1,17 Ba	0,6 Ca	0,34 Aa	-	0,6 A
MS + 40 g L <sup>-1</sup> Manitol	3,6 Ba	1,65 Ab	2,7 Ba	0,8 Ab	-	0,59 A
MS + 20 g L <sup>-1</sup> Sorbitol	0,69 Ca	0,54 Ca	0,3 Ca	0,42 Aa	0,4 Ba	0,45 ABa
MS + 40 g L <sup>-1</sup> Sorbitol	6,6 Aa	1,4 ABb	14 Aa	0,2 Ab	5,5 Aa	0,39 ABb
<b>C.V. (%)<sup>1</sup></b>	<b>6,41</b>		<b>18,49</b>		<b>15,07</b>	

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

-não houve sobreviventes no período ou as amostras foram insuficientes para esta análise destrutiva.  
\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (tipos de meio de cultura) e médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha (tipos de explantes) diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Estes resultados enfatizam a importância da prolina na manutenção das membranas celulares durante situações de estresse, como reportado no presente estudo, causados pela baixa temperatura e agentes osmóticos ao qual reduziram o potencial hídrico do meio. Na Figura 3 é destacado o aspecto visual apresentado pelos explantes submetidos ao estresse osmótico na temperatura de 4°C.

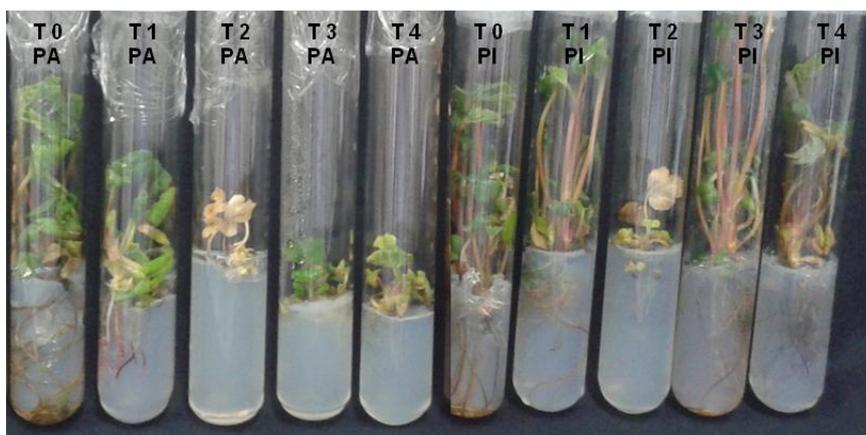


Figura 3. Explantes de morangueiro 'Benícia' conservados in vitro durante 12 meses. Tratamentos: 0- MS; 1- MS + 20g L<sup>-1</sup> de manitol; 2- MS + 40g L<sup>-1</sup> de manitol; 3- MS + 20g L<sup>-1</sup> de sorbitol; 4- MS + 40g L<sup>-1</sup> de sorbitol. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

O ajuste osmótico constitui-se em um dos mecanismos fisiológicos mais eficazes para a manutenção da turgescência celular, sob condições de baixo potencial hídrico (MARIJUAN; BOSCH, 2013). Este se estabelece mediante o acúmulo, no vacúolo ou no citosol, de solutos compatíveis, como a prolina, que contribui para a manutenção do equilíbrio hídrico e a preservação da integridade de proteínas, enzimas e membranas celulares (ASHRAF et al., 2011; MARIJUAN; BOSCH, 2013).

Além disso, o acúmulo de prolina ocorre devido ao aumento na expressão e atividade das enzimas de síntese (pirrolina-5-carboxilato sintetase, P5CS; pirrolina-5-carboxilato redutase, P5CR) ou pela diminuição das enzimas de degradação, prolina desidrogenase ou prolina oxidase (PDH ou POX), e P5C desidrogenase (P5CDH) (HUANG et al., 2013). Sendo que sua biossíntese ocorre no citosol e nos plastídios (como cloroplastos em tecidos verdes), enquanto que a degradação tem lugar nas mitocôndrias (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008).

Provavelmente o acúmulo de prolina encontrado nas partes aéreas está relacionado ao seu local de biossíntese.

Formoso (2016) trabalhando com crescimento lento em amoreira-preta 'Guarani', encontrou nas partes aéreas aumentos significativos no teor de prolina para os tratamentos com 15g L<sup>-1</sup> de sacarose + 20g L<sup>-1</sup> de manitol (37,84mM g<sup>-1</sup> de MF) estes níveis decresceram a medida que a concentração de manitol foi reduzida no meio (14,12mM de prolina g<sup>-1</sup> de MF em 15g L<sup>-1</sup> de sacarose + 0g L<sup>-1</sup> de manitol). Quando a sacarose foi aumentada para a concentração ideal de cultivo in vitro (30g L<sup>-1</sup>), o teor chegou a 2,07mM de prolina g<sup>-1</sup> de MF, porém não diferindo estatisticamente do meio contendo 30g L<sup>-1</sup> de sacarose + 10g L<sup>-1</sup> de manitol (2,95mM de prolina g<sup>-1</sup> de MF). Porém este estudo foi realizado durante 10 meses na temperatura de 24°C.

Não há relatos de trabalhos de conservação in vitro de morangueiro por meio do crescimento lento com o uso de agentes osmóticos e baixas temperaturas, portanto este estudo serve de base para elucidar o envolvimento da prolina no crescimento lento desta cultivar.

Luo; Tang e Zhang (2011) ao trabalharem com baixas temperaturas (0°C durante 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 e 72 horas) em duas cultivares de morangueiro ('Zoji' e 'Toyonoka') in vitro constataram que o nível de prolina aumentou acentuadamente logo após a indução dos explantes aos tratamentos e após 24 horas de estresse, a prolina em 'Zoji' atingiu o máximo (220µg g<sup>-1</sup> de MF), que foi 11 vezes maior do que o controle, enquanto em 'Toyonoka' continuou aumentando até o final do tratamento (400µg g<sup>-1</sup> de MF em 72 horas). Este estudo demonstra que o nível de prolina pode variar entre cultivares durante o estresse aplicado.

### 3.2 Retomada do crescimento dos explantes

O sucesso da conservação in vitro se dá pela manutenção da viabilidade dos explantes após o período de incubação, a fim de promover a redução do crescimento sem alterar as características fisiológicas do material vegetal durante a retomada do crescimento.

#### 3.2.1 Multiplicação

Considerando os resultados obtidos após o cultivo dos explantes de morangueiro em crescimento lento por um ano a 4°C, foi possível observar que altas concentrações de manitol adicionadas ao meio de cultivo foram tão prejudiciais aos explantes, principalmente aqueles oriundos de PA, que não retomaram seu crescimento em meio MS de multiplicação sob condições ideais de cultivo in vitro (Tabela 6, Figura 4).

A porcentagem de sobrevivência em explantes PI foi maior que em PA em todos os tipos de meios, comportamento semelhante ao observado em todos os períodos de avaliação durante o crescimento lento. Explantes PI oriundos de meio MS controle e MS + 40g L<sup>-1</sup> de sorbitol diferiram significativamente entre os outros tratamentos resultando em 100% e 97,3% de sobrevivência, porém explantes mantidos nos meios com as menores concentrações de manitol e sorbitol também apresentaram boas taxas de sobrevivência.

Quanto ao número de brotações formadas por explante, embora os resultados de PI não tenham diferido estatisticamente de PA (exceto para o meio MS + 20g L<sup>-1</sup> de sorbitol), foi observado que os tratamentos em PI foram eficientes para a retomada das taxas de multiplicações estabelecidas para a espécie. Evidenciando que o uso do manitol na menor concentração e do sorbitol em ambas concentrações foram eficientes para reduzir a taxa de crescimento, sem afetar a multiplicação durante a retomada do crescimento.

A menor concentração de sorbitol promoveu taxas intermediárias de crescimento, tanto no comprimento de brotações quanto no número de folhas em explantes PA, além de ter resultado em 89% de sobrevivência, este meio poderia ser indicado para a conservação in vitro, devido a sua função osmorreguladora, reduzindo o crescimento, porém sem inibi-lo, contudo pela análise visual este meio em explantes PA promoveu uma clorose acentuada nas folhas, não sendo adequado (Figura 4).

Explantes PA apresentaram o mesmo comportamento induzido pelos meios, assim, o maior comprimento das brotações refletiu no aumento do número de folhas. Para PI, os tratamentos com sorbitol proporcionaram incremento no comprimento das brotações. Já a variável número de folhas não apresentou diferença significativa, portanto os explantes não foram influenciados pelos tratamentos.

Tabela 6. Porcentagem de sobrevivência, número de brotações (NB), comprimento de brotações (cm) e número de folhas (NF) na retomada do crescimento dos explantes de morangueiro 'Benícia', após 12 meses de crescimento lento a 4°C. PA: parte aérea e PI: planta inteira. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Tipos de meio	Sobrevivência (%)		NB		CB (cm)		NF	
	PA	PI	PA	PI	PA	PI	PA	PI
MS	87,7 Ab*	100 Aa	5,8 Aa	7,4 Aa	2,3 Aa	2,9 Aba	4,5 Aa	5,2 Aa
MS + 20g L <sup>-1</sup> Manitol	76,3 Cb	90,8 Ca	4,7 Aa	5,4 Aa	1,9 Aa	2,3 Ba	4,1 Aa	5,3 Aa
MS + 40g L <sup>-1</sup> Manitol	0,0 Db	53,1 Da	0,0 Ca	1,1 Ba	0,0 Bb	0,8 Ca	0,0 Bb	3,2 Aa
MS + 20g L <sup>-1</sup> Sorbitol	89,0 Ab	94,3 Ba	2,0 BCB	5,8 Aa	0,5 Bb	3,7 Aa	2,2 Abb	5,8 Aa
MS + 40g L <sup>-1</sup> Sorbitol	84,1 Bb	97,3 Aa	4,4 Aba	6,1 Aa	1,7 Ab	3,6 Aa	3,9 Aa	5,8 Aa
<b>C.V. (%)<sup>1</sup></b>	<b>1,47</b>		<b>25,22</b>		<b>21,67</b>		<b>26,83</b>	

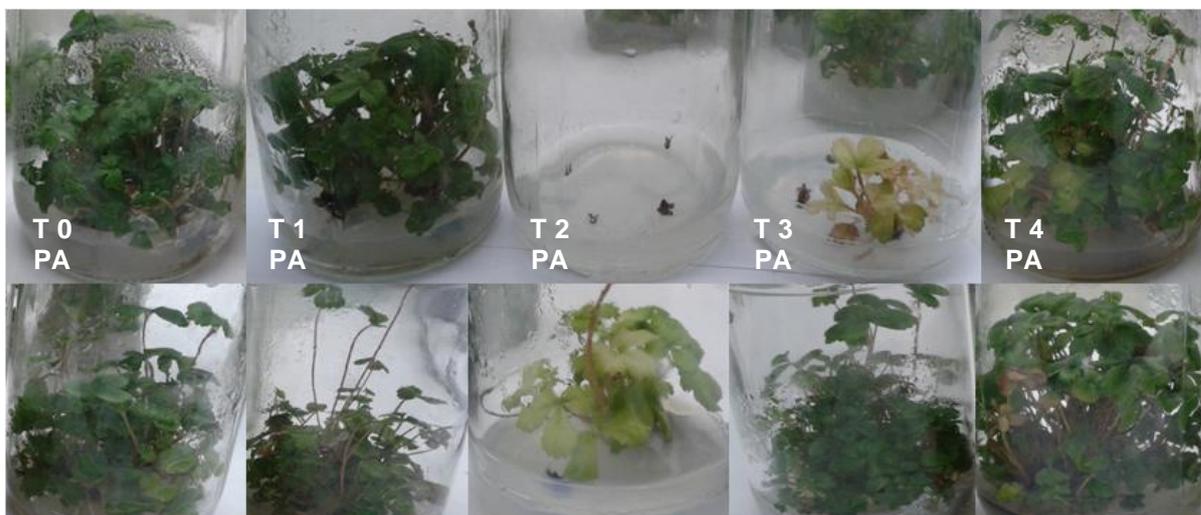
<sup>1</sup>C.V. (%) Coeficiente de variação.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (tipos de meio de cultura) e médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha (tipos de explantes) diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

O meio T2 para ambos tipos de explantes causou efeito negativo no cultivo, com elevada toxicidade (Figura 4).

Resultados semelhantes foram encontrados por Gopal; Chamail e Sarkar (2002) em estudos realizados com batata, os autores observaram que altas concentrações de manitol aliada a sacarose causaram reduzida taxa de sobrevivência após 12 meses de conservação, porém a 24°C. A sobrevivência máxima (55,5-77,8%) ocorreu no meio contendo com 20g L<sup>-1</sup> de sacarose + 40g L<sup>-1</sup> de sorbitol.

Devido a melhor adaptação dos explantes oriundos de PI aos meios, com elevada sobrevivência e retomada nas taxas de multiplicação normais para a espécie, convencionou-se o uso destes explantes para estudos posteriores nas fases de enraizamento e aclimatização.



**Figura 4.** Retomada do crescimento dos explantes de morangueiro 'Benícia', após 12 meses em crescimento lento a 4°C. Tratamentos: 0- MS controle; 1- MS + 20 g L<sup>-1</sup> de manitol; 2- MS + 40 g L<sup>-1</sup> de manitol; 3- MS + 20 g L<sup>-1</sup> de sorbitol; 4- MS + 40 g L<sup>-1</sup> de sorbitol (PA- parte aérea, PI- planta inteira). Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

### 3.2.2 Enraizamento

Todos os explantes submetidos ao meio de enraizamento sobreviveram (100%) demonstrando a eficácia dos tratamentos e a adaptação das plantas na retomada das condições normais de cultivo in vitro (Figura 5). O meio com a maior concentração de manitol promoveu maior comprimento da parte aérea (Tabela 7).

Altas concentrações de manitol reduziram a taxa de absorção de água e nutrientes pelas plantas, evidenciado pela redução da massa seca e da umidade (79,4%), pois quando foi estabelecido condições normais de enraizamento in vitro, as plantas oriundas deste meio retomaram seu crescimento e desenvolvimento normal.

Tanto o número de folhas quanto o comprimento de raízes das plantas não foram influenciados pelos meios, pois não apresentaram diferenças significativas. O meio MS + 20g L<sup>-1</sup> de sorbitol proporcionou o maior número de raízes e o meio MS + 40g L<sup>-1</sup> de sorbitol resultou no maior acúmulo de matéria fresca e seca. Calvete; Kämpf e Suzin (2002) relataram que plantas de morangueiro oriundas de meios com altas concentrações de açúcares resultaram em alto conteúdo de massa seca, o que refletiu em um maior acúmulo de fotossintetizados e absorção de minerais.

Não houve diferença significativa para a porcentagem de umidade nos meios MS controle e meios contendo sorbitol, constatando que estes meios não interferiram na absorção de água e nutrientes pelas plantas.

Tabela 7. Comprimento da parte aérea (CPA), número de folhas (NF), comprimento de raízes (CR), número de raízes (NR), massa fresca (MF), massa seca (MS) e porcentagem de umidade dos explantes de morangueiro 'Benícia' após 30 dias de enraizamento in vitro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Tipos de meio	CPA (cm)	NF	CR (cm)	NR	MF (g)	MS (g)	Umidade (%)
MS	5,4 D*	7,9 <sup>ns</sup>	4,8	6,3 C	2,5 AB	0,4 AB	86,1 A
MS + 20g L <sup>-1</sup> Manitol	6,5 BC	6,9	5,6	6,4 C	2,2 B	0,4 AB	81,3 B
MS + 40g L <sup>-1</sup> Manitol	7,7 A	7,3	5,4	7,2 BC	2,4 AB	0,3 B	79,4 C
MS + 20g L <sup>-1</sup> Sorbitol	5,9 CD	7,1	5,7	8,5 A	2,7 AB	0,4 AB	84,8 A
MS + 40g L <sup>-1</sup> Sorbitol	7,4 AB	7,5	5,7	8,3 AB	2,8 A	0,5 A	86,1 A
<b>C.V. (%)<sup>1</sup></b>	<b>5,75</b>	<b>4,8</b>	<b>6,59</b>	<b>6,1</b>	<b>8,15</b>	<b>10,1</b>	<b>0,63</b>

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

<sup>ns</sup> Não significativo pelo teste de Tukey a 5% de significância.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (tipos de meio de cultura) diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

O crescimento e a adaptação de plantas a diferentes condições ambientais relacionam-se a sua eficiência fotossintética que, por sua vez, está associada, entre outros fatores, tais como teores de clorofila foliar (BATAGIN, 2008). Assim, a determinação do conteúdo de pigmentos foliares, como ressaltam Lambers et al. (1998), representa importante ferramenta para a distinção entre tratamentos ou interação entre plantas e fatores ambientais.

Foi observado neste estudo pouca variação nos índices de clorofila (a, b e total), balanço de nitrogênio, flavonoides e antocianinas ao final do enraizamento in vitro, é provável que este resultado tenha ocorrido, pois os osmorreguladores utilizados durante o crescimento lento não ocasionaram efeito residual durante esta etapa e não interferiram na capacidade fotossintética das plantas (Tabela 8).

Cabe ressaltar que o índice de clorofila encontrado in vitro foi superior ao encontrado ao final da etapa de aclimatização, sendo maiores que os valores encontrados por Ávila (2015) ao trabalhar com plantas de quinoa em estufa sobre estresse salino, que encontrou um índice em torno de 32 para plantas não estressadas (Tabela 8 e 11). Demonstrando que mesmo sob alta disponibilidade de carboidratos no meio, as plantas já apresentavam atividade fotossintética.

A relação entre Chl/Flv permite a estimativa do NBI (ABDALLAH; GOFFART, 2012). O NBI é um parâmetro que considera a relação entre o índice de clorofila e de flavonoides, possibilitando estimativa do estado nutricional do nitrogênio na planta (RABIER et al., 2014). Além disso, 70% do N contido nas folhas está nos cloroplastos, participando da síntese e da estrutura das moléculas de clorofila (WOOD et al., 1993).

Os carboidratos quando não são utilizados no metabolismo do nitrogênio podem participar da síntese de antocianinas, fazendo com que este pigmento se acumule na planta e assim adquira cor arroxeada nas folhas de plantas deficientes em nitrogênio de algumas espécies (TAIZ; ZIEGER, 2013). O nitrogênio influencia significativamente na incidência de folhas vermelhas (RODAS, 2011). A deficiência de nitrogênio se expressa na forma de clorose das folhas mais velhas e, com o avanço dos sintomas, é substituído por uma coloração avermelhada, no cultivo convencional de morango (RODAS, 2008).

Algumas espécies de morangueiro apresentam coloração avermelhada, principalmente nos caules durante o cultivo in vitro, porém não foi observado para

esta espécie em estudo, mostrando que o nitrogênio estava presente na planta de forma balanceada.

**Tabela 8.** Índices de clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b), clorofila total (Chl total), balanço do nitrogênio (NBI), flavonoides (Flv) e antocianinas (Ant) em explantes de morangueiro 'Benícia' após 30 dias de enraizamento in vitro, oriundos do crescimento lento durante 12 meses a 4 °C. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

<b>Tipos de meio</b>	<b>Chl a</b>	<b>Chl b</b>	<b>Chl total</b>	<b>NBI</b>	<b>Flv</b>	<b>Ant</b>
MS	32,3 B*	11,1 B	43,3 B	66,5 B	0,51 B	0,027 C
MS + 20g L <sup>-1</sup> Manitol	32,4 B	10,5 B	42,5 B	69,2 AB	0,52 AB	0,078 A
MS + 40g L <sup>-1</sup> Manitol	35,3 A	13,2 A	48,4 A	72,2 A	0,54 A	0,024 C
MS + 20g L <sup>-1</sup> Sorbitol	32,3 B	10,9 B	43,3 B	62,0 C	0,52 AB	0,055 B
MS + 40g L <sup>-1</sup> Sorbitol	32,6 B	11,5 B	44,1 B	61,2 C	0,53 AB	0,052 B
<b>C.V. (%)<sup>1</sup></b>	<b>1,36</b>	<b>4,38</b>	<b>1,85</b>	<b>1,93</b>	<b>1,47</b>	<b>6,79</b>

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (tipos de meio de cultura) diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

De acordo com Reddy et al. (2015), a prolina é capaz de proteger as clorofilas a e b contra os danos induzidos pelos mais variados estresses. Esta hipótese foi confirmada pelos índices satisfatórios de clorofilas in vitro e pelo fato de que durante o crescimento lento a prolina se acumulou nos explantes mantidos com diferentes reguladores osmóticos na temperatura de 4°C.

Embora tenha ocorrido pouca variação nos teores de prolina nos diferentes órgãos da planta oriundos de diferentes tipos de explantes e meios, foi possível constatar que a prolina se acumula para proteger as membranas celulares em condições de baixas temperaturas e de estresse osmótico, pois em condições normais de enraizamento in vitro a prolina teve reduzida função.

Além disso, estudos demonstram que a prolina pode ser utilizada, após o término do período de estresse, como fonte de energia e de esqueletos de carbono e nitrogênio, para recuperação mais rápida do tecido vegetal (ASPINALL; PALEG, 1981).

**Tabela 9.** Teor de prolina livre nos explantes de morangueiro 'Benícia' após 30 dias de enraizamento in vitro, oriundos do crescimento lento durante 12 meses a 4 °C. UFPel, Pelotas-RS, 2017.

<b>Tipos de meio</b>	<b>Prolina (mmol prolina g<sup>-1</sup> MF)</b>			
	<b>Folha</b>		<b>Raiz</b>	
	<b>PA</b>	<b>PI</b>	<b>PA</b>	<b>PI</b>
MS	0,25 Aa	0,22 ABa	0,07 Bb	0,18 BCa
MS + 20g L <sup>-1</sup> Manitol	0,17 Aa	0,19 Ba	0,16 Bb	0,25 Ba

MS + 40g L <sup>-1</sup> Manitol	-	0,26 AB	-	0,13 C
MS + 20g L <sup>-1</sup> Sorbitol	0,19 Aa	0,15 Ba	0,43 Aa	0,12 Cb
MS + 40g L <sup>-1</sup> Sorbitol	0,18 Ab	0,34 Aa	0,12 Bb	0,37 Aa
<b>C.V. (%)<sup>1</sup></b>		<b>25,63</b>		<b>23,46</b>

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

-não houve sobreviventes no período ou as amostras foram insuficientes para esta análise destrutiva.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (tipos de meio de cultura) e médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha (tipos de explantes) diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.



**Figura 5.** Explantes de morangueiro ‘Benícia’ após 30 dias de enraizamento in vitro (oriundos do crescimento lento durante 12 meses a 4 °C). Tratamentos: 0- MS; 1- MS + 20g L<sup>-1</sup> de manitol; 2- MS + 40g L<sup>-1</sup> de manitol; 3- MS + 20g L<sup>-1</sup> de sorbitol; 4- MS + 40g L<sup>-1</sup> de sorbitol. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

### 3.3 Aclimatização

Segundo Correia et al. (2012), é justamente na etapa da aclimatização que se viabiliza a metodologia de produção in vitro de plantas, pois é nela que se obtém o número de plantas aptas ao plantio, ou seja, maior sobrevivência de mudas com qualidade. Hazarika (2006) compila as características morfoanatômicas e fisiológicas já identificadas, em várias espécies, de relevância para facilitar o desenvolvimento de protocolos eficientes para a transferência das plantas da condição in vitro para a condição ex vitro.

A perda excessiva de água pelas mudas produzidas in vitro é apontada como um dos principais fatores envolvidos na aclimatização, tendo em vista que a remoção das mudas das condições in vitro provoca um estresse crítico, sendo então necessário manter a umidade alta e a temperatura amena, pelo menos no início do processo (SOUZA et al., 2006).

A eficiência do uso do sorbitol durante o crescimento lento foi evidenciada na etapa de aclimatização, obtendo as melhores taxas, em torno de 81% em contraste com as mudas oriundas do meio MS controle ao qual obtiveram apenas 37,8% de sobrevivência (Tabela 10).

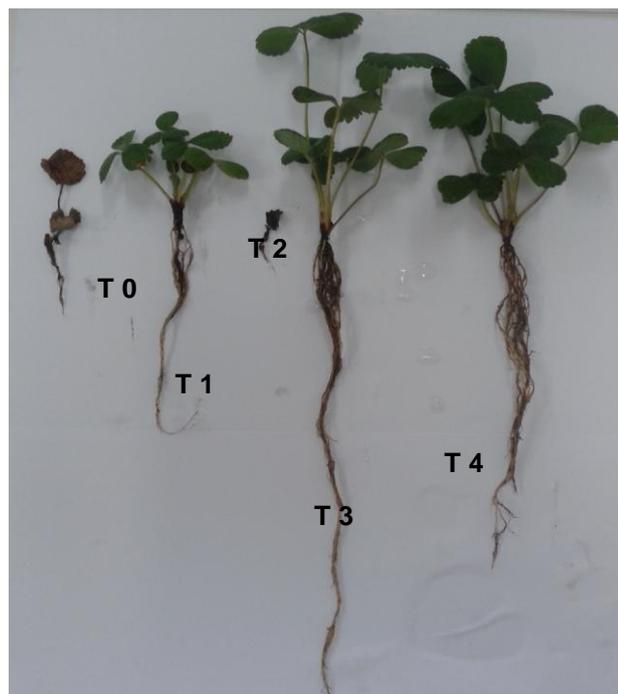
**Tabela 10.** Porcentagem de sobrevivência, número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), número de raízes (NR), comprimento de raízes (CR), massa fresca (MF), massa seca (MS) e porcentagem de umidade dos explantes de morangueiro 'Benícia' após 60 dias de aclimatização. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Tipos de meio	Sobrevivência (%)	NF	CPA (cm)	NR	CR (cm)	MF (g)	MS (g)	Umidade (%)
MS	37,8 D*	3,0 B	4,8 C	7,7 B	9,7 D	1,9 BC	0,25 C	86,9 B
MS + 20g L <sup>-1</sup> Manitol	52,5 B	4,3 B	4,2 C	7,5 B	12,8 C	2,0 B	0,30 BC	85,6 B
MS + 40g L <sup>-1</sup> Manitol	48,5 C	4,0 B	4,1 C	6,5 B	8,8 D	1,8 C	0,28 C	84,4 B
MS + 20g L <sup>-1</sup> Sorbitol	81,2 A	6,8 A	6,2 B	10,5 A	17,4 A	2,3 A	0,36 AB	87,3 AB
MS + 40g L <sup>-1</sup> Sorbitol	81,6 A	6,8 A	7,9 A	11,5 A	14,5 B	2,1 AB	0,39 A	90,3 A
<b>C.V. (%)<sup>1</sup></b>	<b>0,74</b>	<b>17,89</b>	<b>8,79</b>	<b>5,91</b>	<b>2,88</b>	<b>4,08</b>	<b>9,31</b>	<b>1,42</b>

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (tipos de meio de cultura) diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Este resultado demonstra a maior capacidade das plantas mantidas sob condições de reduzido potencial osmótico em tolerar as condições impostas durante o período de aclimatização. Resultados nitidamente mostrados pelo aspecto visual das plantas ao final da aclimatização (Figura 6).



**Figura 6.** Explantes de morangueiro 'Benícia' após 60 dias de aclimatização. Tratamentos: 0- MS; 1- MS + 20g L<sup>-1</sup> de manitol; 2- MS + 40g L<sup>-1</sup> de manitol; 3- MS + 20g L<sup>-1</sup> de sorbitol; 4- MS + 40g L<sup>-1</sup> de sorbitol. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Além da maior taxa de sobrevivência das plantas oriundas dos meios contendo sorbitol, melhores resultados foram encontrados para as demais variáveis analisadas como o número de folhas, comprimento da parte aérea, número e comprimento de raízes, massa fresca, seca e porcentagem de umidade.

É relatado que o maior conteúdo de açúcares no meio de cultivo corresponde à maior concentração de carboidratos (ou de reservas) no tecido foliar. Em consequência, as folhas têm capacidade de permanecer mais tempo na planta (CALVETE; KÄMPF; SUZIN, 2002).

De maneira geral, os índices de clorofila (a, b e total), balanço do nitrogênio, flavonoides e antocianinas permaneceram iguais a etapa de enraizamento nas plantas oriundas dos tratamentos com sorbitol durante a aclimatização. E, nesta etapa nestas mesmas plantas os índices foram superiores aos tratamentos MS controle e com manitol (Tabela 8 e 11).

**Tabela 11.** Índices de clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b), clorofila total (Chl total), balanço do nitrogênio (NBI), flavonoides (Flv) e antocianinas (Ant) em explantes de morangueiro 'Benícia' após 60 dias de aclimatização. Embrapa Clima Temperado, Pelotas- RS, 2017.

Tipos de meio	Chl a	Chl b	Chl total	NBI	Flv	Ant
MS	18,9 C*	6,8 D	25,7 C	35,1 BC	0,7 A	0,14 A
MS + 20g L <sup>-1</sup> Manitol	22,9 B	8,2 C	31,1 B	41,3 ABC	0,5 D	0,0 C
MS + 40g L <sup>-1</sup> Manitol	15,5 D	5,6 E	21,1 D	30,4 C	0,4 E	0,0 C
MS + 20g L <sup>-1</sup> Sorbitol	33,4 A	12,3 B	45,8 A	61,7 A	0,57 C	0,05 B
MS + 40g L <sup>-1</sup> Sorbitol	33,1 A	13,1 A	46,3 A	55,9 AB	0,6 B	0,0 C
<b>C.V. (%)<sup>1</sup></b>	<b>1,71</b>	<b>2,23</b>	<b>1,73</b>	<b>18,13</b>	<b>2,91</b>	<b>14,63</b>

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

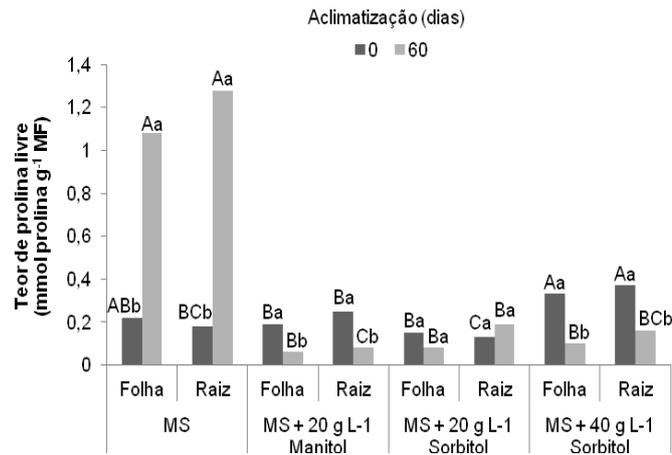
\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (tipos de meio de cultura) diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Os resultados mais baixos encontrados no final da etapa de aclimatização se devem ao fato de que as plantas não toleraram as condições ex vitro e entraram em senescência, e muito provavelmente não sobreviveriam se novas avaliações fossem realizadas, devido a baixa taxa de sobrevivência aos 60 dias.

O'Neill et al. (2006) cita que a degradação dos pigmentos fotossintéticos está relacionada com a degradação dos carotenoides, pois são pigmentos acessórios na absorção e transferência de energia radiante, e protetores da clorofila no processo de fotoxidação. Assim, as condições de déficit hídrico impostas durante a aclimatização induzem a degradação do  $\beta$ -caroteno e a redução na formação de zeaxantina, reduzindo os teores de carotenoides.

Portanto, é esperado que as plantas oriundas de tratamentos com sorbitol mantenham maiores conteúdos desses pigmentos e tenham melhor capacidade de tolerar as condições ex vitro, devido à estreita relação entre clorofilas, potencial fotossintético e produtividade.

Os teores de prolina encontrados no final da aclimatização validam os resultados encontrados, pois altos níveis de prolina foram observados em plantas oriundas do meio MS controle, onde se obteve os piores resultados de crescimento e sobrevivência. Neste tratamento a prolina estava presente tanto nas folhas quanto nas raízes, indicando claramente seu papel osmoprotetor nas membranas celulares (Figura 7).



**Figura 7.** Teor de prolina livre nos explantes de morangueiro 'Benícia', aos 0 e 60 dias de aclimatização. UFPel, Pelotas-RS, 2017.

#### 4 Conclusões

- A conservação in vitro de morangueiro 'Benícia' durante 12 meses, a 4°C, é recomendada com o uso de plantas inteiras inoculadas em meio MS ou MS + 40g L<sup>-1</sup> de sorbitol, obtendo-se taxas de sobrevivência de 93%.
- Plantas inteiras cultivadas em MS ou MS + 40g L<sup>-1</sup> de sorbitol exibiram maiores taxas de multiplicação e de sobrevivência.
- O uso de sorbitol no meio de cultura proporciona maiores taxas de sobrevivência na aclimatização das plantas.

## Capítulo 2

### **Técnicas de encapsulamento-vitrificação, encapsulamento-desidratação e crio lâmina para a criopreservação de gemas de morangueiro**

#### **1 Introdução**

As técnicas de cultura de tecidos vegetais são eficientes para preservar a diversidade genética, incluindo espécies ameaçadas e espécies agrícolas economicamente importantes. No entanto, o cultivo in vitro implica na transferência regular das espécies nos meios de cultura, com risco crescente de perdas por contaminação ou surgimento de variantes somaclonais (BAIRU; AREMU; VAN STADEN, 2011). Como ocorre no morangueiro após sucessivos subcultivos in vitro (PASA, 2012), embora seja uma das principais espécies trabalhadas no Brasil e no exterior (OLIVEIRA; SCIVITTARO, 2009) é subcultivado em até cinco vezes para evitar variações (OLIVEIRA et al., 2005).

Visando o armazenamento por longos períodos para reduzir os custos, a variação entre sucessivos subcultivos e a mão de obra, a Embrapa juntamente com outros órgãos financiadores vem dando suporte a pesquisas relacionadas à criopreservação de várias espécies para manter o banco de germoplasma ativo e auxiliar os programas de melhoramento genético.

Contudo, há a necessidade de adequar protocolos específicos de armazenamento para cada tipo de material vegetativo (SIQUEIRA, 2010) e os métodos empregados são diferentes dependendo do tempo de armazenamento requisitado (ENGELMANN, 2011).

A criopreservação é o armazenamento mais adequado em longo prazo de espécies vegetativamente propagadas (KACZMARCZYK et al., 2008). Nestas espécies, os melhores órgãos são ápices, pois contém os meristemas, cujo pequeno tamanho reduz a entrada de vírus (KAVIANI, 2011). Além disso, depois dos embriões, as células meristemáticas apicais possuem maior capacidade de regenerar a planta inteira do que qualquer outro tecido (REED et al., 2011). No entanto, estes tecidos contêm grande quantidade de água livre (SANTOS, 2001).

A remoção da água intracelular pode ser induzida pelo congelamento, pela exposição a substâncias altamente concentradas, por dessecação através de correntes de ar ou exposição a sílica gel (MANSUR et al., 2009).

Técnicas de criopreservação são usadas para o armazenamento de germoplasma de plantas em vários institutos em todo o mundo (NIINO, 2006; SAKAI; HIRAI; NIINO, 2008; YAMAMOTO et al., 2012a).

Alguns protocolos já foram desenvolvidos para o morangueiro fora do Brasil (REED, 2001), porém há muita variação nas taxas de sobrevivência entre as cultivares, além disso, são cultivares adaptadas a outras condições de cultivo. Em função disso, nenhum protocolo de criopreservação para o morangueiro foi estabelecido com sucesso no Brasil.

As novas técnicas de criopreservação utilizam o encapsulamento dos explantes em uma matriz de alginato (HUNG; TRUEMAN, 2012). Essa matriz de alginato protege os explantes contra danos físicos e minimiza processos da desidratação (IKHLAQ et al., 2010). Entre elas, incluem o encapsulamento-desidratação, o encapsulamento-vitrificação (ENGELMANN; DUSSERT, 2013) e a crio lâmina (YAMAMOTO et al., 2012a).

Em ambos métodos, devido à extrema dessecação dos explantes, a maior parte ou a totalidade da água congelável é removida das células e a vitrificação dos solutos internos ocorre durante a rápida exposição ao NL, evitando a cristalização intracelular letal do gelo (ENGELMANN, 2011). Como consequência, a totalidade ou uma grande parte dos explantes congelados são mantidos intactos após o descongelamento, o que resulta em alta sobrevivência, crescimento rápido e resultados reprodutíveis após a criopreservação (ENGELMANN, 2000).

Assim novos procedimentos criogênicos devem ser testados para esta espécie em cultivares adaptadas as condições de cultivo do Brasil. Como consequência, a conservação e posterior utilização sustentável dos recursos genéticos serão essenciais para atender a demanda de segurança alimentar no futuro.

Neste contexto esse trabalho objetivou adaptar as técnicas encapsulamento-vitrificação, encapsulamento-desidratação e crio lâmina para a criopreservação de gemas de cultivares de morangueiro a fim de criar um protocolo eficiente de criopreservação para ser utilizado em bancos de germoplasma.

## 2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido no laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Clima Temperado.

### 2.1 Material vegetal

Foi utilizado explantes de morangueiro de diferentes cultivares, os quais serão descritos em cada experimento, coletados do matrizeiro mantidos em casa de vegetação.

### 2.2 Coleta, assepsia e estabelecimento in vitro dos explantes

Para a excisão de meristemas, porções terminais de brotações com aproximadamente 5 cm de comprimento foram coletadas do matrizeiro em casa de vegetação, as folhas foram retiradas e as brotações acondicionadas em recipiente com água deionizada. Em seguida, foram levados ao laboratório para passar pelo processo de assepsia.

Inicialmente, o material coletado foi imerso em álcool 70% por 10 segundos; seguido de imersão por 10 minutos em solução de hipoclorito de sódio 1% e 3 gotas de detergente comercial sob agitação. Os explantes foram lavados em câmara de fluxo laminar, por três vezes, em água deionizada estéril para a extração dos meristemas.

O meristema foi excisado com auxílio de pinça e bisturi, utilizando lupa estereoscópica e inoculado em tubo de ensaio contendo aproximadamente 10 mL de meio de cultura estéril.

O meio de cultura usado para o isolamento dos ápices de morangueiro foi composto pelos sais e vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com mio-inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), BAP ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ); ANA ( $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ ); GA<sub>3</sub> ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ); sacarose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) e ágar ( $7,5 \text{ g L}^{-1}$ ). O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, assim como, o procedimento de autoclavagem de todos os meios

descritos nesta metodologia sempre foi realizado a 120 °C e 1,5 atm, durante 15 minutos.

Os meristemas foram mantidos em sala de crescimento (com intensidade luminosa 45-55  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e temperatura de  $24\pm 2$  °C) no escuro por 3 dias, e, posteriormente em fotoperíodo de 16 horas, por aproximadamente 60 dias.

### 2.3 Multiplicação dos explantes

Os explantes estabelecidos na etapa anterior foram transferidos para frascos com aproximadamente 30 mL de meio de multiplicação, contendo os sais do meio MS suplementado com mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>); BAP (1 mg L<sup>-1</sup>); sacarose (30 g L<sup>-1</sup>) e ágar (7 g L<sup>-1</sup>). Os explantes com tamanho entre 1 e 3 cm, contendo de 2 a 3 gemas foram mantidos em sala de crescimento por 30 dias. Os explantes foram repicados neste meio por 3 subcultivos até atingir o número desejado de material vegetal para instalação dos experimentos. Em ambos os experimentos padronizou-se o tamanho das gemas para 3 mm antes do encapsulamento.

Foram adaptados diferentes protocolos de criopreservação in vitro de gemas de morangueiro, totalizando cinco experimentos.

### 2.4 Experimento 1: Criopreservação de gemas apicais de morangueiro pelo método de encapsulamento-vitrificação

#### 2.4.1 Experimento 1.1:

Gemas apicais de morangueiro (cultivares: Benícia, Aromas, Camino Real, Monterey e Sugyeong) obtidas a partir de brotações in vitro, pré-aclimatadas por 2 semanas a 4 °C em B.O.D e em sala de crescimento, ambas com fotoperíodo de 16 horas, foram encapsuladas em matriz de alginato de sódio 5,0% (p/v) constituída de meio MS (sem cálcio) suplementada com mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (0,4 M) e glicerol (2 M), conforme protocolo adaptado de Hirai et al. (1998).

As unidades encapsuláveis foram individualmente resgatadas e gotejadas em solução de cloreto de cálcio (0,1 M), na qual permaneceram por 20 minutos para complexação. Após esta etapa, as cápsulas foram submetidas a três lavagens em

água deionizada e esterilizada e colocadas em criotubos de 4 mL (10 cápsulas por criotubo) preenchidos com solução de PVS2 (meio MS com 0,4 M de sacarose, 30% glicerol, 15% etileno glicol e 15% DMSO) a 0 °C por 0, 30, 60, 90 e 120 minutos, correspondendo aos tratamentos: controle (sem exposição ao PVS2), T1, T2, T3 e T4, respectivamente. No final de cada tempo de exposição ao PVS2 foi realizado o recultivo (em meio MS de recultivo, descrito a seguir, na última etapa deste protocolo) de 30 cápsulas por tratamento.

Logo após, os criotubos foram imediatamente imersos em nitrogênio líquido por uma hora. O descongelamento rápido foi realizado em banho-maria a 38 °C por 2 minutos, sendo a solução de PVS2 drenada dos criotubos e substituída 2 vezes com solução de sacarose a 1,2 M por 10 minutos, totalizando 20 minutos de exposição.

As cápsulas foram inoculadas em placas contendo 20 mL de meio MS de recultivo, sem regulador de crescimento, acrescido de mio-inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), ágar ( $7 \text{ g L}^{-1}$ ) e sacarose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ), mantidas em sala de crescimento (2 dias no escuro e 28 dias com fotoperíodo de 16 horas).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x5 (temperaturas de pré-aclimação e tempos de desidratação em solução de PVS2) com três repetições, cada repetição contendo 10 gemas. Foi analisado estes fatores para cada cultivar isoladamente, porém para verificar se ocorreu diferença entre cultivares também foi testado o fator cultivar com as temperaturas de pré-aclimação e cultivar com os tempos de desidratação em solução de PVS2. Avaliou-se aos 30 dias, o percentual de sobrevivência (avaliado através do rompimento das cápsulas com o crescimento das gemas = rebrota).

#### 2.4.2 Experimento 1.2:

Gemas apicais de morangueiro (cultivares: Benícia, Aromas, Portola, Camino Real, Monterey e Sugyeong) obtidas a partir de brotações in vitro foram pré-aclimatadas por 3 semanas em B.O.D a 4°C no escuro e com 16 horas de fotoperíodo em meio MS de multiplicação, posteriormente foram transferidas para placas contendo 20 mL de meio MS acrescido de mio-inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), sacarose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ), carvão ativado ( $2,5 \text{ g L}^{-1}$ ), ácido ascórbico ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido cítrico ( $150 \text{ mg}$

L<sup>-1</sup>) e ágar (7g L<sup>-1</sup>) mantidas em B.O.D por 48 horas nos mesmos fotoperíodos. As gemas foram encapsuladas em matriz de alginato de sódio 5,0% (p/v) constituída de meio MS (sem cálcio) suplementado com mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (0,4M) e glicerol (2M), conforme protocolo adaptado de Hirai et al. (1998).

As unidades encapsuláveis foram individualmente resgatadas e gotejadas em solução de cloreto de cálcio (0,1M), na qual permaneceram por 30 minutos para complexação. Após esta etapa, as cápsulas foram colocadas em criotubos de 4mL (10 cápsulas por criotubo) preenchidos com solução de PVS2 a 0°C e a 24°C (temperatura ambiente) por 0, 1, 2 e 3 horas (para cada tempo e temperatura da solução de desidratação foi realizado o recultivo de 30 cápsulas por tratamento de cada cultivar) e o teste de umidade. Logo após, os criotubos foram imediatamente imersos em nitrogênio líquido por uma hora.

O descongelamento rápido foi realizado em banho-maria a 38°C até 3 minutos, sendo a solução de PVS2 drenada dos criotubos e substituída 2 vezes com solução de sacarose a 1,2M por 10 minutos. As cápsulas foram inoculadas em placas contendo 20mL de meio MS de recultivo.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema bifatorial subdividido: 2x2 (fotoperíodos na pré-aclimação e temperaturas da solução de PVS2); 2x4 (fotoperíodos na pré-aclimação e tempos de desidratação em PVS2); 2x4 (temperaturas da solução de PVS2 e tempos de desidratação em PVS2) com três repetições, cada repetição contendo 10 gemas. Neste experimento as cultivares foram avaliadas separadamente. Avaliou-se aos 30 dias, o percentual de sobrevivência. O teste de umidade foi realizado em balança determinadora de umidade Shimadzu<sup>®</sup> (Precisão 0,001g), com a pesagem de 10 cápsulas por tratamento para as cultivares Aromas, Benícia e Sugyeong.

## 2.5 Experimento 2: Criopreservação de gemas apicais de morangueiro pelo método de encapsulamento-desidratação

### 2.5.1 Experimento 2.1:

Gemas apicais de morangueiro (cultivares: Benícia, Aromas, Camino Real, Monterey e Sugyeong) obtidas a partir de brotações in vitro, foram mantidas em

B.O.D a 4°C, no escuro durante 4 semanas. As gemas foram pré-cultivadas por 24 horas em meio MS líquido sem regulador de crescimento, acrescido de mio-inositol (100mg L<sup>-1</sup>) e sacarose (0,3M) em B.O.D a 4°C. Posteriormente, foram encapsuladas em matriz de alginato de sódio 5,0% (p/v) constituída de meio MS (sem cálcio) suplementado com mio-inositol (100mg L<sup>-1</sup>) e sacarose (0,4M) conforme protocolo adaptado de Clavero-Ramírez et al. (2005).

As unidades encapsuláveis foram individualmente resgatadas e gotejadas em solução de cloreto de cálcio (100mM) e sacarose (0,4M), na qual permaneceram por 30 minutos para complexação. Após esta etapa, as cápsulas foram agitadas por 19 horas em solução de sacarose (0,8M) a 130 rpm, o excesso da solução foi retirado com papel filtro autoclavado.

As cápsulas foram desidratadas em câmara de fluxo laminar por 0, 1, 2, 3 e 4 horas, correspondendo aos tratamentos: controle (sem desidratação em fluxo), T1, T2, T3 e T4, respectivamente. Em cada tempo de desidratação foi realizado o teste de umidade, assim como, o recultivo (em meio MS de recultivo) de 30 cápsulas por tratamento.

Logo após, as cápsulas foram imediatamente imersas em nitrogênio líquido dentro de criotubos por uma hora. O descongelamento rápido foi realizado em banho-maria a 40°C por 1 minuto. Após o descongelamento, as cápsulas foram imersas em solução de sacarose a 1,2M por 10 minutos, o excesso da solução foi retirado com papel filtro autoclavado e as cápsulas foram inoculadas em placas contendo 20mL de meio MS de recultivo como descrito no experimento 1.1.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5x5 (cultivares e tempos de desidratação em fluxo) com três repetições, cada repetição contendo 10 gemas.

Avaliou-se aos 30 dias, o percentual de sobrevivência e o teste de umidade como descrito no experimento 1.2.

### 2.5.2 Experimento 2.2:

Gemas apicais de morangueiro (cultivares: Aromas, Camino Real e Sugyeong) obtidas a partir de brotações in vitro, foram mantidas em B.O.D a 4°C, no escuro durante 4 semanas em meio MS de multiplicação. Posteriormente, as gemas

foram pré-cultivadas por 24 horas em placas contendo papel filtro umedecido com 2,5mL de meio MS líquido acrescido de mio-inositol ( $100\text{mg L}^{-1}$ ), BAP ( $1\text{mg L}^{-1}$ ), ANA ( $0,5\text{mg L}^{-1}$ ) e sacarose (0,08M). Posteriormente, foram encapsuladas em matriz de alginato de sódio 5,0% (p/v) constituída de meio MS (sem cálcio), mio-inositol ( $100\text{mg L}^{-1}$ ) glicerol (2M) e sacarose (0,4M) conforme protocolo adaptado de Halmagyi e Deliu (2006).

As unidades encapsuláveis foram individualmente resgatadas e gotejadas em solução de cloreto de cálcio (100mM), na qual permaneceram por 30 minutos para complexação. Após esta etapa, as cápsulas foram agitadas por 19 horas em meio MS líquido com diferentes concentrações de sacarose (0,5; 0,75 e 1M) a 98 rpm, o excesso da solução foi retirado com papel filtro autoclavado.

As cápsulas foram desidratadas em câmara de fluxo laminar por 0 a 5 horas. A cada uma hora foi realizado o recultivo de 30 cápsulas por cultivar, assim como, o teste de umidade com a pesagem de 10 cápsulas por cultivar em balança analítica para obtenção da massa fresca (MF) e logo após secas em estufa a  $65^{\circ}\text{C}$  por 48 horas ou até atingir a massa constante (MS). O cálculo da porcentagem de umidade (U%) foi obtido através da seguinte fórmula:  $U (\%) = [(MF-MS / MF) \times 100]$

Logo após, as cápsulas foram inoculadas em criotubos e imediatamente imersas em nitrogênio líquido por uma hora. O descongelamento rápido foi realizado em banho-maria a  $38^{\circ}\text{C}$  até 3 minutos. Após o descongelamento, as cápsulas foram imersas em solução de sacarose a 1,2M por 10 minutos, o excesso da solução foi retirado com papel filtro autoclavado e as cápsulas foram inoculadas em placas contendo 20mL de meio MS de recultivo como descrito no experimento 1.1.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema bifatorial subdividido 3x3 (cultivares e soluções de sacarose); 3x6 (cultivares e tempos de desidratação em fluxo); 3x6 (soluções de sacarose e tempos de desidratação em fluxo) isoladamente para cada cultivar, com três repetições, cada repetição contendo 10 gemas. Avaliou-se aos 30 dias, o percentual de sobrevivência e o teste de umidade.

2.6 Experimento 3: Criopreservação de gemas apicais de morangueiro pela técnica da crio lâmina

Gemas apicais de morangueiro (cultivares: Aromas, Portola, Camino Real e Sugyeong) obtidas a partir de brotações in vitro foram pré-aclimatadas em meio MS de multiplicação, por 3 e 4 semanas a 4°C em B.O.D com fotoperíodo de 16 horas. As gemas foram padronizadas para o tamanho de 3mm e pré-cultivadas por 0, 24 e 48 horas em meio MS suplementado com mio-inositol (100mg L<sup>-1</sup>), sacarose (0,3M), glicerol (2M) e ágar (7g L<sup>-1</sup>) em B.O.D na mesma temperatura e fotoperíodo.

Posteriormente, as gemas foram mergulhadas em gotas de alginato sobre as placas de alumínio (10 gemas por placa). A solução de alginato a 5% (p/v) foi constituída de meio MS (sem cálcio) e mio-inositol (100mg L<sup>-1</sup>). Sobre as gotas de alginato foi adicionada uma fina camada de solução de cloreto de cálcio (100mM) durante 15 minutos para complexação, logo após, o excesso de solução foi retirado com a inclinação das placas de alumínio. Em seguida as placas de alumínio foram mergulhadas em placas de petri contendo 20mL de meio MS líquido, acrescido de mio-inositol (100mg L<sup>-1</sup>), glicerol (2M) e sacarose (0,8M) durante 30 minutos, conforme protocolo adaptado de Yamamoto et al. (2012). Subsequentemente, as placas de alumínio foram imersas em placas de petri contendo 20mL de solução de PVS2 por 50 minutos a temperatura ambiente.

O congelamento se deu pela rápida imersão das placas de alumínio em NL, com o auxílio da pinça as placas de alumínio congeladas foram colocadas em criotubos (4mL) juntamente com o NL, onde permaneceram por uma hora.

O descongelamento rápido foi realizado em banho-maria a 38 °C por 2-3 minutos. Adicionou-se nos criotubos 4mL de solução de sacarose a 1M durante 15 minutos.

As cápsulas foram inoculadas em placas contendo meio de cultura MS sem regulador de crescimento, acrescido de mio-inositol (100mg L<sup>-1</sup>), ágar (7g L<sup>-1</sup>), sacarose (30g L<sup>-1</sup>), mantidas em sala de crescimento (2 dias no escuro e 28 dias com fotoperíodo de 16 horas).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x3 (tempos de pré-aclimatação e tempos de pré-cultivo) para cada cultivar isoladamente, com três repetições, cada repetição contendo 10 gemas. Avaliou-se aos 30 dias, o percentual de sobrevivência.

## 2.9 Análises estatísticas

Os dados de ambos os experimentos foram submetidos à Análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) através do programa SISVAR (FERREIRA, 2014).

## 3 Resultados e Discussão

### 3.1 Experimento 1: Criopreservação de gemas apicais de morangueiro pelo protocolo de encapsulamento-vitrificação

#### 3.1.1 Experimento 1.1:

Os tratamentos de pré-aclimatação e os tempos de desidratação em solução de PVS2 independente da cultivar não foram eficientes para induzir tolerância das gemas de morangueiro a temperatura do nitrogênio líquido, resultado em 0% de sobrevivência após a criopreservação (Figura 1B). Porém a taxa de sobrevivência das gemas recultivadas dos tratamentos controle (não imersos em NL) após 30 dias foram satisfatórias (Tabela 1, Figura 1A).

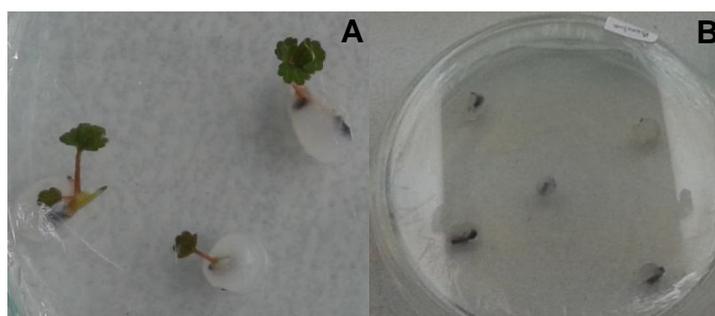


Figura 1 1. Rebrotas das gemas de morangueiro 'Benícia' pré-tratadas em B.O.D (4°C) e 30 minutos de exposição ao PVS2 antes (A) e depois da exposição ao NL (gemas oxidadas) (B), após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Como observado na tabela 1, houve interação significativa entre as temperaturas de pré-aclimatação e os tempos de desidratação em solução de PVS2 para cada cultivar. Para todas as cultivares a temperatura de pré-aclimatação de 4 °C se mostrou superior que a de 24 °C, exceto para 'Camino Real' aos 0 e 30 min, onde as temperaturas não tiveram influência significativa na taxa de sobrevivência.

Estes resultados comprovam a importância de se fazer uma adaptação ao frio (aclimatação) das gemas antes de iniciar os tratamentos de desidratação.

Tabela 1 1. Porcentagem de sobrevivência de cada cultivar de morangueiro nas temperaturas de pré-aclimatação e nos tempos de desidratação em solução de PVS2 antes da imersão em NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Desidratação em PVS2	Aromas		Benícia		Camino Real		Monterey		Sugyeong	
	4 °C	24 °C								
<b>0 min</b>	97Aa*	87Ba	100Aa	77Ba	97Aa	90Aa	96Aa	73Ba	100Aa	83Ba
<b>30 min</b>	93Aa	83Ba	97Aa	70Ba	93Aa	86Aab	93Aa	70Ba	97Aa	80Bab
<b>60 min</b>	97Aa	73Bab	100Aa	63Ba	96Aa	70Bbc	96Aa	63Ba	93Aa	67Babc
<b>90 min</b>	97Aa	73Bab	97Aa	67Ba	93Aa	66Bc	90Aa	60Ba	90Aa	63Bbc
<b>120 min</b>	93Aa	67Bb	97Aa	63Ba	93Aa	63Bc	86Aa	57Ba	93Aa	60Bc
<b>C.V.(%)<sup>1</sup></b>	<b>6,71</b>		<b>6,96</b>		<b>8,04</b>		<b>9,28</b>		<b>8,55</b>	

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma linha (temperaturas de pré-aclimatação) e médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma coluna (tempos de desidratação em solução de PVS2) diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Carvalho et al. (2011) citam que quando as plantas são expostas a baixa temperatura, ocorrem ajustamentos fisiológicos adaptativos, levando ao aumento da tolerância as contínuas ou repetitivas exposições às condições estressantes, essas respostas envolvem, por exemplo, a biossíntese de proteínas, membranas e metabólitos, protegendo o tecido do frio.

Em estudos realizados por Hirai et al. (1998) com ápices meristemáticos de morangueiro testando o protocolo de encapsulamento-vitrificação, observaram em testes preliminares que a aclimatação ao frio durante 2 semanas a 4 °C foi mais efetiva no aumento da taxa de brotações após a imersão em NL. Estes mesmos autores relataram em seus experimentos que a aclimatação ao frio aliada ao tratamento de osmoproteção com 0,4 M de sacarose + 2 M de glicerol uma hora antes de serem desidratados em solução de PVS2, obtiveram 88% de brotações, enquanto ápices não aclimatados ao frio e expostos a esta solução resultaram em apenas 62% de brotações.

As altas taxas de sobrevivência também mostraram que as gemas embora estivessem protegidas pela cápsula, toleraram aos tratamentos de desidratação em solução crioprotetora PVS2, em todos os tempos de imersão, evidenciando que a exposição de até 120 minutos ao PVS2 não causou toxicidade aos tecidos, sendo claramente observado pelo ótimo aspecto visual dos explantes durante o recultivo, como mostrado na figura 1A.

Quanto aos tempos de desidratação em solução de PVS2 pode-se observar que todos foram eficientes para a sobrevivência de ambas as cultivares, ocorrendo diferença significativa apenas no tratamento controle (0 minutos) na temperatura de 24 °C, com 'Camino Real' apresentando o melhor resultado (90%) (Tabela 2).

Tabela 1 2. Porcentagem de sobrevivência entre as cultivares de morangueiro nas temperaturas de pré-aclimação em cada tempo de desidratação em solução de PVS2 antes da imersão em NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Cultivar	0 min		30 min		60 min		90 min		120 min	
	4 °C	24 °C	4 °C	24 °C	4 °C	24 °C	4 °C	24 °C	4 °C	24 °C
<b>Aromas</b>	97Aa*	87ABb	93Aa	83Aa	97Aa	73Ab	97Aa	73Ab	93Aa	67Ab
<b>Benícia</b>	100Aa	76BCb	97Aa	70Ab	100Aa	63Ab	97Aa	67Ab	96Aa	63Ab
<b>Camino Real</b>	97Aa	90Aa	93Aa	87Aa	97Aa	70Ab	93Aa	67Ab	93Aa	63Ab
<b>Monterey</b>	97Aa	73Cb	93Aa	70Ab	97Aa	63Ab	90Aa	60Ab	87Aa	56Ab
<b>Sugyeong</b>	100Aa	83ABCb	97Aa	80Ab	93Aa	67Ab	90Aa	63Ab	93Aa	60Ab
<b>C.V.(%)<sup>1</sup></b>	<b>5,37</b>		<b>8,46</b>		<b>7,38</b>		<b>8,26</b>		<b>10,02</b>	

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (cultivares) e médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha (temperaturas de pré-aclimação) diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Embora não tenha ocorrido diferença significativa entre as cultivares testadas na porcentagem de sobrevivência durante os tempos de desidratação em PVS2 na temperatura de pré-aclimação de 4 °C, os resultados foram superiores aos mesmos tempos na temperatura de pré-aclimação de 24 °C (Tabela 3). Apenas a cultivar Monterey aos 120 minutos de exposição ao PVS2 apresentou taxa mais baixa de sobrevivência (87%), porém, mostrando superioridade, quando comparada a sobrevivência no mesmo tempo na temperatura de pré-aclimação de 24 °C (56%).

A baixa porcentagem de sobrevivência de 'Monterey' em relação às outras cultivares pode estar vinculada ao fato dela ser de dia neutro, com comportamento indiferente ao fotoperíodo, porém sensível a temperatura. Tendo prejudicado seu desenvolvimento a temperatura de 24 °C.

Estes resultados serviram de base para elencar a temperatura de 4 °C para pré-tratamentos durante a criopreservação, e como o tempo de desidratação em solução de PVS2 não causou toxicidade aos tecidos, novos experimentos foram realizados para testar tempos maiores de exposição.

Tabela 1 3. Porcentagem de sobrevivência entre as cultivares de morangueiro nos tempos de desidratação em solução de PVS2 em cada temperatura de pré-aclimatação antes da imersão em NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Cultivar	4 °C					24 °C				
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
<b>Aromas</b>	97 <sup>ns</sup>	93	97	96	93	86Aa*	83Aab	73Aab	73Aab	66Ab
<b>Benícia</b>	100	97	100	96	96	77Aa	70Aa	63Aa	66Aa	63Aa
<b>Camino Real</b>	97	93	97	93	93	90Aa	87Aab	70Abc	66Ac	63Ac
<b>Monterey</b>	97	93	97	90	87	73Aa	70Aa	63Aa	60Aa	56Aa
<b>Sugyeong</b>	100	97	93	90	93	83Aa	80Aab	67Aabc	63Aabc	60Ac
<b>C.V.(%)</b>	<b>5,83</b>					<b>10,53</b>				

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

<sup>ns</sup> Não significativo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, na mesma coluna (cultivares) não diferem entre si e médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha (tempos de desidratação em solução de PVS2) diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Duas hipóteses foram levantadas a respeito do insucesso deste protocolo após o congelamento em NL. A primeira seria o tempo de complexação das cápsulas em solução de cloreto de cálcio que foi de apenas 20 minutos, resultando em cápsulas de consistência amolecida, pouco resistentes ao manuseio e facilmente de serem rompidas, causando exposição direta das gemas as soluções de desidratação. Assim, o aumento no tempo de complexação para 30 minutos já seria o suficiente para solucionar este problema.

Na segunda hipótese está a tríplex lavagem realizada nas cápsulas após a complexação para a retirada do excesso da solução de cloreto de cálcio, visto que as gemas estavam contidas em um 'endosperma sintético' altamente concentrado pela sacarose e glicerol, o uso da água pode ter causado uma brusca reidratação dos tecidos, causando o rompimento destes quando as cápsulas foram imersas em solução de PVS2.

Os benefícios da sacarose são bem conhecidos, pois, além do efeito osmótico, ela é capaz de penetrar em grandes quantidades nas células, durante a pré-incubação. O acúmulo de açúcar nos tecidos está associado à tolerância ao congelamento, mas não é uma garantia de viabilidade dos tecidos após a criopreservação (ADELA; DELIU, 2006).

Resultados semelhantes foram encontrados por Vettorazzi (2016) que ao trabalhar com criopreservação de explantes de batata-doce pelo protocolo de encapsulamento-vitrificação, somente os tratamentos controle (sem imersão em NL)

sobreviveram, mesmo com o uso de solução de sacarose a 0,3 M como pré-tratamento, determinada como a ideal para a espécie.

### 3.1.2 Experimento 1.2:

Com o objetivo de promover a sobrevivência das gemas após a exposição ao NL, neste experimento foi aumentado o tempo de pré-tratamento de aclimação ao frio de 2 para 3 semanas a 4 °C e foi adicionado o fator fotoperíodo, já que alguns estudos mostram a eficiência da criopreservação em explantes pré-tratados no escuro.

Höfer e Reed (2011) ao testarem diferentes protocolos de vitrificação em morangueiro verificaram que a aclimação ao frio durante 14 dias (16 horas de escuro -1 °C e 8 horas de luz a 22 °C) proporcionou o melhor rebrote e a menor variação para duas cultivares ('Aprikose' e 'Herzbergs Triumph') e três acessos de *Fragaria* (*F. corymbosum* 28, *F. gracilis* 33 e *F. moupinensis* 76).

O efeito positivo demonstrado dos pré-tratamentos de aclimação ao frio em morangueiro foram reportados por Zhao et al. (2006) usando 2% de DMSO e por Reed e Hummer (1995) com temperatura alternada de aclimação ao frio e 5% de DMSO, Hirai et al. (1998) e Clavero-Ramirez et al. (2005) aplicaram aclimação ao frio de 4 °C.

Além disso, foi acrescentado no meio MS de pré-cultivo, carvão ativado, ácido ascórbico e ácido cítrico para que as gemas pudessem tolerar a desidratação com menor taxa de oxidação (Figura 2A, 2B). Aloufa (2003) cita que o carvão ativado quando usado em pequenas concentrações traz muitos benefícios ao desenvolvimento dos explantes, além de seu efeito físico de escurecer o meio e simular condições propícias ao enraizamento, apresenta a propriedade química de adsorver componentes que podem prejudicar o crescimento do material vegetal, como citocininas e/ou giberelinas residuais e componentes tóxicos liberados pelos tecidos.

Com base nos resultados obtidos, o tempo (48 horas) das gemas inoculadas no meio MS de pré-cultivo com carvão ativado, ácido ascórbico e ácido cítrico não foi suficiente para proporcionar redução da oxidação das gemas após a exposição

ao NL, acredita-se que o aumento no tempo neste meio poderá trazer resultados positivos na sobrevivência após a criopreservação (Figura 2A, 2B).

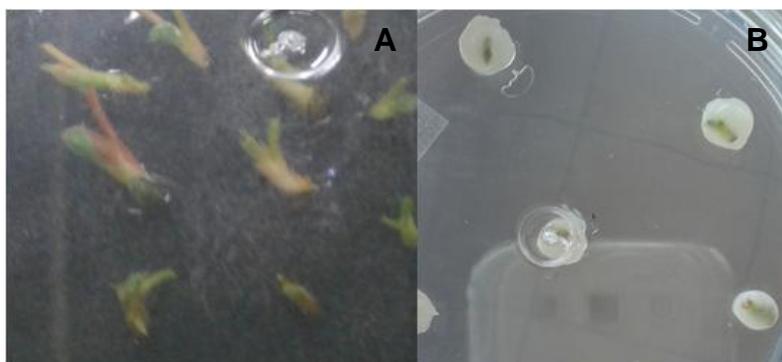


Figura 1 2. Gemas de morangueiro após cultivo em B.O.D (meio MS com carvão ativado) antes da padronização do tamanho (A) e cápsulas em meio de recultivo após criopreservação (pré-tratamento de 16 horas de fotoperíodo e duas horas de imersão em solução de PVS2 a 24 °C) (B). Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Tabela 1 4. Porcentagem de sobrevivência de cada cultivar de morangueiro nos fotoperíodos da pré-aclimação e temperaturas da solução de PVS2 antes da imersão em NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Cultivar	Fotoperíodo (h)	Temperatura		C.V. (%) <sup>1</sup>
		0 °C	24 °C	
Aromas	0	76Ab*	86Aa	9,66
	16	73Ab	86Aa	
Benícia	0	72Ab	84Aa	7,84
	16	71Ab	83Aa	
Camino Real	0	74Ab	84Aa	7,42
	16	72Ab	83Aa	
Monterey	0	78Ab	84Aa	7,21
	16	74Ab	83Aa	
Portola	0	79Ab	84Aa	7,12
	16	74Bb	83Aa	
Sugyeong	0	81Ab	86Aa	6,47
	16	76Bb	83Aa	

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (fotoperíodos da pré-aclimação) e médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha (temperaturas da solução de PVS2) de cada cultivar, diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

De maneira geral o fotoperíodo durante a aclimação ao frio, não interferiu na sobrevivência das cultivares tanto na solução de PVS2 a 4 °C quanto a 24 °C, houve diferença significativa para as cultivares Portola (79%) e Sugyeong (81%) quando pré-aclimatadas no escuro e imersas em solução de PVS2 a 0 °C, porém a taxa de

sobrevivência para estas mesmas cultivares na solução de PVS2 a 24 °C foi maior (Tabela 4).

Com base nas observações, pode-se concluir que o período de luz e/ou escuro na temperatura de 4 °C durante 3 semanas de aclimação não teve efeito sobre o crescimento e desenvolvimento das gemas na avaliação realizada aos 30 dias.

Ao analisar os tempos de desidratação em PVS2, pode-se observar que o aumento do tempo de desidratação reduziu a porcentagem de sobrevivência em todas as cultivares testadas, chegando a 68% de sobrevivência para 'Camino Real' (Tabela 5).

Tabela 1 5. Porcentagem de sobrevivência de cada cultivar de morangueiro nos fotoperíodos da pré-aclimação e tempos de desidratação em solução de PVS2 antes da imersão em NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Cultivar	Fotoperíodo (h)	Tempo de desidratação (h)				C.V. (%) <sup>1</sup>
		0	1	2	3	
<b>Aromas</b>	0	90Aa*	77Ab	82Aab	75Ab	<b>9,66</b>
	16	82Aa	78Aa	83Aa	75Aa	
<b>Benícia</b>	0	88Aa	77Ab	75Ab	72Ab	<b>7,84</b>
	16	80Ba	78Aa	77Aa	72Aa	
<b>Camino Real</b>	0	92Aa	78Ab	75Ab	71Ab	<b>7,42</b>
	16	83Ba	80Aa	78Aa	68Ab	
<b>Monterey</b>	0	93Aa	80Ab	77Ab	73Ab	<b>7,21</b>
	16	83Ba	80Aa	80Aa	70Ab	
<b>Portola</b>	0	92Aa	82Ab	78Ab	75Ab	<b>7,12</b>
	16	85Ba	78Aab	78Aab	72Ab	
<b>Sugyeong</b>	0	93Aa	85Ab	78Abc	77Ac	<b>6,47</b>
	16	85Ba	80Aab	78Aab	73Ab	

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (fotoperíodos da pré-aclimação) e médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha (tempos de desidratação em solução de PVS2) de cada cultivar, diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

A redução da taxa de sobrevivência com o aumento do tempo de desidratação em solução de PVS2 está claramente relacionado com a temperatura do PVS2, como observado na tabela 6, para todas as cultivares e em todos os tempos de desidratação na solução de PVS2, a temperatura do PVS2 de 24 °C foi mais eficiente.

Este resultado diverge com os dados reportados por Hirai et al. (1998) em meristemas de morangueiro, ao qual obtiveram 80% de recuperação do crescimento

após o armazenamento criogênico, com o pré-tratamento de adaptação ao frio e 3 horas de exposição a solução de PVS2 a 0°C.

Já Niino et al. (2003) ao trabalharem com morangueiro pelo método de vitrificação encontraram de 50 a 85% de sobrevivência entre as cultivares testadas com o uso do PSV2 a temperatura ambiente (25 °C).

Tabela 1 6. Porcentagem de sobrevivência de cada cultivar de morangueiro nas temperaturas da solução de PVS2 e tempos de desidratação em solução de PVS2 antes da imersão em NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Cultivar	Temperatura PVS2	Tempo de desidratação (h)				C.V. (%) <sup>1</sup>
		0	1	2	3	
<b>Aromas</b>	0 °C	82Aa*	73Aab	75Bab	68Bb	<b>9,69</b>
	24 °C	90Aa	82Aa	90Aa	82Aa	
<b>Benícia</b>	0 °C	80Ba	72Bab	68Bb	65Bb	<b>8,05</b>
	24 °C	88Aa	83Aab	83Aab	78Ab	
<b>Camino Real</b>	0 °C	83Ba	73Bb	70Bb	65Bb	<b>7,9</b>
	24 °C	92Aa	85Aa	83Aab	75Ab	
<b>Monterey</b>	0 °C	87Aa	77Ab	73Bbc	67Bc	<b>7,78</b>
	24 °C	90Aa	83Aab	83Aab	77Ab	
<b>Portola</b>	0 °C	85Aa	77Aab	75Ab	70Ab	<b>7,57</b>
	24 °C	92Aa	83Aab	82Ab	77Ab	
<b>Sugyeong</b>	0 °C	87Aa	80Aab	75Ab	72Ab	<b>7,19</b>
	24 °C	92Aa	85Aab	82Ab	78Ab	

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (temperaturas da solução de PVS2) e médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha (tempos de desidratação em solução de PVS2) de cada cultivar, diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Contudo, deve-se observar que as menores taxas de sobrevivência foram justamente das gemas onde apresentaram reduzido teor de umidade, geralmente na criopreservação os tratamentos após a imersão em NL, cujos resultados são positivos, são inversamente proporcionais à taxa de sobrevivência nos tratamentos controle (sem imersão em NL) (Tabela 7).

Para esta variável, o fotoperíodo de 16 horas durante a pré-aclimatação ao frio, aliado a temperatura do PVS2 de 24 °C promoveu os menores teores de umidade para 'Aromas' (51%), já 'Benícia' (61% a 24 °C) foi indiferente ao fotoperíodo e 'Sugyeong' apresentou 53% de umidade no fotoperíodo de 16 horas e temperatura do PVS2 a 0 °C. A menor porcentagem de umidade apresentada na cultivar Aromas a 24 °C se deve ao fato desta temperatura promover a retirada da

água dos tecidos mais rapidamente que a 0 °C, devido a velocidade das reações serem mais acentuadas na temperatura ambiente.

Tabela 1 7. Porcentagem de umidade de cada cultivar de morangueiro nos fotoperíodos de pré-aclimatação e temperaturas da solução de PVS2 antes da imersão em NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Cultivar	Fotoperíodo (h)	Temperatura		C.V. (%) <sup>1</sup>
		0 °C	24 °C	
Aromas	0	66Aa	59Ab	5,62
	16	60Ba	51Bb	
Benícia	0	66Aa	61Ab	2,73
	16	63Ba	61Ab	
Sugyeong	0	59Aa	56Ba	9,19
	16	53Bb	61Aa	

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (fotoperíodos da pré-aclimatação) e médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha (temperaturas da solução de PVS2) de cada cultivar, diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Conforme observado na figura 3, a solução de PVS2 é mais eficiente para induzir a retirada de água dos tecidos vegetais em um curto período, além de ser menos dispendiosa em relação ao protocolo de encapsulamento-desidratação testado no experimento 2.1, onde 3 horas de desidratação em fluxo resultou no mesmo teor de umidade encontrado neste experimento.

O teor de umidade das cultivares tanto nos diferentes fotoperíodos de pré-aclimatação quanto nas temperaturas da solução de PVS2 apresentou o mesmo padrão, reduzindo até 2 horas de desidratação em PVS2 (aproximadamente 50% de umidade) e após este período as gemas voltaram a absorver os solutos (Figura 3A, 3B).

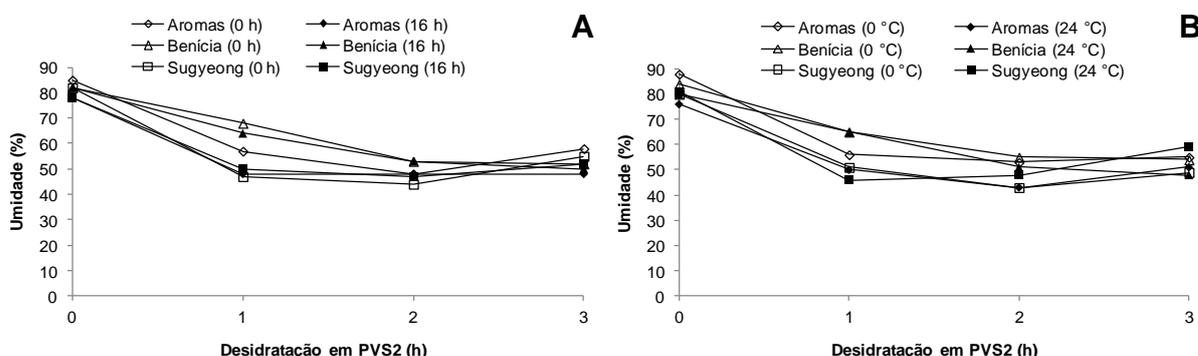


Figura 1 3. Porcentagem de umidade de gemas encapsuladas das cultivares de morangueiro nos diferentes fotoperíodos (A) e temperaturas (B) durante os tempos de desidratação em PVS2, antes da exposição ao NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Com base nestes dados é possível afirmar que a solução de PVS2 apresenta máxima eficiência nas células até 2 horas de desidratação, após este período o aumento da umidade pode ser ocasionado pelo rompimento dos tecidos ou pela mistura de solutos na solução de PVS2, tornando-a menos concentrada.

Neste experimento o uso do PVS2 nos tempos testados não apresentou toxicidade aos tecidos, embora tenha sido mais baixa a taxa de sobrevivência das cultivares com o aumento do tempo na solução, esta permaneceu acima de 65%.

Assim exclui-se a hipótese do insucesso da criopreservação devido a citotoxicidade do PVS2 como relatado por alguns autores (BENSON, 2008; RAY; BHATTACHARYA, 2008).

Pode ter ocorrido a formação de cristais de gelo intracelular, resultando no colapso do sistema de endomembranas (SANTOS et al., 2000; KAVIANI et al., 2009) e, conseqüentemente, na morte dos tecidos após a exposição a temperaturas ultrabaixas do nitrogênio líquido.

Segundo Antony et al. (2010) a duração na solução de PVS2 é um dos fatores que mais influenciam a recuperação pós-descongelamento dos explantes criopreservados. Assim, a formação dos cristais de gelo pode estar associada ao tempo de exposição dos tecidos à solução de vitrificação. Há trabalhos que relacionam o sucesso na regeneração ao maior o tempo de exposição ao PVS2 (SANTOS et al., 2015).

Hirai e Sakai (2003) observaram uma maior taxa de recuperação dos explantes para aqueles imersos em solução crioprotetora (contendo glicerol e sacarose), em comparação com os explantes que não passaram por essa solução. Ao trabalharem com a técnica de encapsulamento-vitrificação, estes autores otimizaram o tempo de imersão dos explantes de batata-doce em solução crioprotetora para três horas, o mesmo tempo utilizado nos experimentos de encapsulamento-vitrificação, do presente trabalho.

Os crioprotetores podem ser classificados como intracelulares ou permeáveis e extracelulares ou impermeáveis. De acordo com Felizardo et al. (2007), os crioprotetores intracelulares são substâncias químicas que retiram a água da célula durante o processo de congelamento; já os crioprotetores extracelulares como a sacarose, manitol, trealose recobrem a superfície celular e estabilizam a membrana, ajudando, portanto, a minimizar e reparar os possíveis danos celulares causados

pelo processo de congelamento. Entre os crioprotetores intracelulares mais utilizados podem ser citados dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, metanol e etileno glicol.

Assim, uma hipótese levantada para o insucesso da criopreservação neste experimento foi a omissão de uma etapa de pré-cultivo com soluções altamente concentradas, como, o uso de sacarose e glicerol (nas mesmas concentrações da matriz de encapsulamento) na solução de cálcio e deixando complexar ao invés de 30 minutos por no mínimo uma hora.

Para Pennycooke e Towill (2000), a eliminação da etapa de pré-cultivo em meio contendo sacarose resultou na morte de todos os explantes criopreservados. O pré-cultivo em meio contendo sacarose é essencial para a sobrevivência dos explantes criopreservados (PENNYCOOKE; TOWILL, 2001; HIRAI; SAKAI, 2003).

Com base nestes resultados novos estudos devem ser realizados, visando adaptar o protocolo de encapsulamento-vitrificação em espécies de morangueiro, visto que o PVS2 não ocasionou toxicidade aos tecidos.

### 3.2 Experimento 2: Criopreservação de gemas apicais de morangueiro pelo método de encapsulamento-desidratação

#### 3.2.1 Experimento 2.1:

No protocolo de encapsulamento-desidratação, os explantes encapsulados são pré-cultivados em meio líquido com elevada concentração de sacarose e parcialmente dessecados antes da exposição ao NL (ENGELMANN et al., 2008). A dessecação dos explantes de morangueiro tem sido realizada em câmara de fluxo laminar (HALMAGYI; DELIU, 2006; SOLOV'EVA; VYSOTSKAYA; DOLGIKH, 2016), mas também pode ser feita em sílica gel (CLAVERO-RAMÍREZ et al., 2005).

Neste estudo, a desidratação em solução altamente concentrada com sacarose foi realizada desde o período de aclimação ao frio de 4 °C, sendo que após 4 semanas, as gemas permaneceram por 24 horas em meio MS com 0,3 M de sacarose, durante o encapsulamento e complexação da cápsula, a concentração de sacarose foi aumentada para 0,4 M e posterior cultivo em solução de sacarose a 0,8 M durante 19 horas antes da desidratação em fluxo.

Esse aumento gradual na concentração de sacarose foi eficiente para manter altas taxas de sobrevivência das gemas de morangueiro durante a exposição destas a desidratação em câmara de fluxo laminar.

Na primeira hora de desidratação em fluxo não houve diferença da porcentagem de sobrevivência entre as cultivares, já a partir de duas horas até cinco horas 'Monterey' se mostrou inferior às demais cultivares quanto à tolerância a desidratação com 73%, 63% e 57% de sobrevivência durante 2, 3 e 4 horas, respectivamente (Tabela 8).

'Benícia' apresentou taxas mais altas de sobrevivência em todos os tempos de desidratação em fluxo (1-4 horas) com uma redução de apenas 30% em 4 horas de desidratação. A superioridade desta cultivar pode estar relacionada a sua maior adaptação as condições climáticas do RS, com resultados positivos em termos de produção.

Tabela 1 8. Porcentagem de sobrevivência das cultivares de morangueiro durante a desidratação em fluxo, antes da imersão em NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Cultivar	Duração da desidratação (h)				
	0	1	2	3	4
<b>Aromas</b>	100Aa*	97Aa	90Aab	80Ab	67ABc
<b>Benícia</b>	100Aa	100Aa	93Aab	83Ab	70Ac
<b>Camino Real</b>	97Aa	93Aa	87Aab	77Abc	67ABc
<b>Monterey</b>	100Aa	90Aa	73Bb	63Bbc	57Bc
<b>Sugyeong</b>	100Aa	97Aab	87Ab	73ABc	67ABc
<b>C.V.(%)<sup>1</sup></b>	<b>6,43</b>				

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (cultivares) e médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha (tempos de desidratação em fluxo) diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Embora os esforços neste experimento para se obter sobrevivência após a criopreservação não tenham sido atingidos, estes resultados mostram a eficiência da desidratação em soluções altamente concentradas de sacarose na tolerância até 4 horas de desidratação em fluxo, evidenciada pelos resultados satisfatórios na taxa de sobrevivência sem a imersão em NL.

Clavero-Ramírez et al. (2005) ao trabalharem com diferentes cultivares de morangueiro, conseguiram para a cultivar camarosa 63% de sobrevivência após a criopreservação, com um protocolo modificado de encapsulamento-desidratação baseado em um pré-tratamento de 4 semanas a 4°C, seguido de encapsulamento

em alginato 3% adicionado ao meio contendo 2 M de glicerol e 0,4 M de sacarose. Os ápices permaneceram por um dia em solução de sacarose a 0,3 M antes da desidratação em sílica gel durante 4 horas. Para outras cultivares estes autores encontraram taxas de sobrevivência menores.

Um dos fatores relacionados à eficiência da criopreservação é o teor de umidade dos explantes. Já que um bom nível de sobrevivência geralmente é obtido quando as amostras são congeladas a um grau de umidade de 10% a 30% do seu peso inicial (WOWK, 2010; SOLOV'EVA; VYSOTSKAYA; DOLGIKH, 2016).

Como pode ser observado na figura 4, embora tenha ocorrido redução gradual com o aumento do tempo de exposição das cápsulas ao fluxo, o teor de umidade final (em 4 horas de desidratação) foi alto para ambas cultivares variando de 31% para 'Camino Real' a 42% para 'Benícia'.

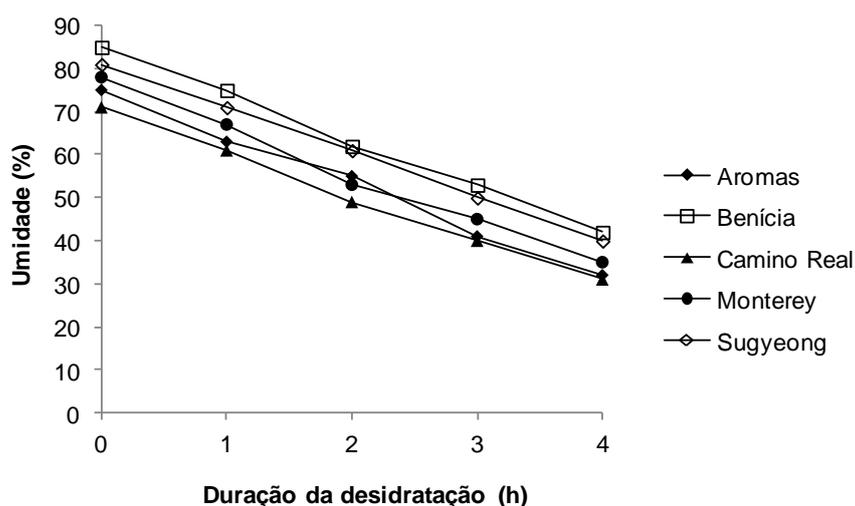


Figura 1 4. Porcentagem de umidade de gemas encapsuladas das cultivares de morangueiro nos diferentes tempos de desidratação em fluxo, antes da exposição ao NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Em plantas tolerantes à dessecação, órgãos vegetativos podem resistir até cerca de 4% a 13% de teor relativo de água, enquanto as plantas sensíveis à dessecação morrem quando seu teor relativo de água cai abaixo de 20% a 50% (SILVEIRA, 2015). Segundo Toldi et al. (2009) a dessecação de plantas tolerantes têm diferentes estratégias de estresse-adaptação: proteção extra de mecanismos reparadores, características inter-relacionadas de taxas metabólicas, além de produção de biomassa geralmente mais baixa em plantas tolerantes à dessecação quando comparadas à plantas sensíveis.

Visto que a porcentagem de sobrevivência entre as cultivares foi acima de 50% em quatro horas de desidratação em fluxo e esta não ter induzido a um teor de umidade abaixo de 30% no mínimo, para que se pudesse notar diferenças nos resultados, um novo experimento foi realizado aumentando o tempo de desidratação no fluxo.

### 3.2.2 Experimento 2.2:

Adotou-se a temperatura de pré-aclimatação ao frio de 4 °C por 4 semanas devido aos resultados positivos apresentados nos outros experimentos deste estudo. Porém o adicional deste experimento em relação ao anterior é que foram adicionados reguladores de crescimento ao meio MS na pré-aclimatação (MS de multiplicação) e pré-cultivo. Assim, após 4 semanas de indução ao frio, as gemas foram mantidas durante 24 horas a 4 °C em meio MS líquido, acrescido de BAP (1 mg L<sup>-1</sup>), ANA (0,5 mg L<sup>-1</sup>) e sacarose (0,08 M).

Na matriz de encapsulamento também foi acrescentado glicerol (2 M) como em experimentos anteriores.

A partir dos dados obtidos pode-se perceber que este protocolo foi mais eficiente em relação ao experimento 2.1, com taxas de sobrevivência superiores nos mesmos tempos de desidratação, devido a influência do uso do glicerol na cápsula e do aumento das concentrações de sacarose, ambos fatores resultando em maior tolerância das cultivares a desidratação.

Como pode ser observado na tabela 9, o aumento na concentração de sacarose reduziu a porcentagem de sobrevivência das cultivares, porém esta redução não foi prejudicial aos tecidos devido aos valores apresentados, principalmente na maior concentração (1 M), onde a taxa média de sobrevivência foi de 70,3% entre as cultivares.

A sacarose atua como soluto compatível na proteção das macromoléculas e membranas durante a secagem, quando a água ainda está presente na massa citoplasmática, e como substituta da água quando a hidratação é perdida gradualmente. Neste último caso, interage com as proteínas e membranas através da ligação de hidrogênio impedindo, assim, a desnaturação das proteínas (HOEKSTRA et al., 2001).

Tabela 1 9. Porcentagem de sobrevivência das cultivares de morangueiro nas concentrações de sacarose, antes da imersão em NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Cultivar	Sacarose		
	0,5 M	0,75 M	1 M
<b>Aromas</b>	88Aa*	82Ab	72Ac
<b>Camino Real</b>	89Aa	82Ab	73Ac
<b>Sugyeong</b>	84Aa	82Aa	66Bb
<b>C.V. (%)<sup>1</sup></b>	<b>7,26</b>		

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (cultivares) e médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha (concentrações da solução de sacarose) diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Este comportamento indica que a concentração 1 M de sacarose foi eficiente na proteção da bicamada lipídica e das proteínas durante a secagem. E que esta é, provavelmente, a concentração de sacarose necessária para a formação da camada de hidratação vítrea amorfa, responsável por impedir os rompimentos mecânicos e a desnaturação das proteínas.

É importante destacar que a concentração ideal de sacarose varia entre as espécies e até mesmo entre cultivares da mesma espécie. Navatel e Capron (1997) ao trabalharem com o protocolo de encapsulamento-desidratação encontraram diferenças na sobrevivência entre cultivares de morangueiro após a criopreservação, ‘Chandler’ (64% a 0,4 M e 78% a 0,75 M) e ‘Elsanta’ (33% a 0,4 M e 85% a 0,75 M). Quanto ao tempo de desidratação em sílica gel ‘Chandler’ se mostrou superior (29% em 5h, 59% em 6h e 70% em 7h) a ‘Elsanta’ (5% em 5h, 50% em 6h e 60% em 7h).

Muito cuidado deve ser tomado ao elencar a melhor concentração de sacarose somente com a sobrevivência do tratamento, pois muitas vezes após a criopreservação, os resultados em comparação ao controle mostram-se inversamente proporcionais. Como relatado por Halmagyi e Deliu (2006) ao trabalharem com morangueiro, mostraram que a porcentagem de rebrota das cápsulas foi aumentando e medida que ia aumentando a concentração da solução de sacarose (0,25; 0,5; 0,75 M) o tempo de desidratação (1-5 h) dos tratamentos expostos ao NL e ia reduzindo nos tratamentos controle (sem imersão em NL).

Por este motivo, antes de se aplicar um protocolo de criopreservação é necessário avaliar qual a concentração ideal de sacarose para a espécie/cultivar de interesse.

Quanto às diferenças na porcentagem de sobrevivência entre as cultivares nos tempos de desidratação em fluxo pode-se perceber que houve interação significativa durante 4 e 5 horas de desidratação, sendo ‘Camino Real’ (74% a 4 h e 63% a 5 h) superior a ‘Aromas’ e ‘Sugyeong’ (Tabela 10).

Tabela 10. Porcentagem de sobrevivência das cultivares de morangueiro durante a desidratação em fluxo, antes da imersão em NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Cultivar	Duração da desidratação (h)					
	0	1	2	3	4	5
<b>Aromas</b>	93Aa*	91Aa	88Aab	80Ab	69ABc	62ABc
<b>Camino Real</b>	94Aa	90Aa	87Aab	79Abc	74Ac	63Ad
<b>Sugyeong</b>	92Aa	89Aa	84Aa	76Ab	67Bc	57Bd
<b>C.V. (%)<sup>1</sup></b>	<b>7,29</b>					

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (cultivares) e médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha (duração da desidratação em fluxo) diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Na interação entre as concentrações de sacarose e os tempos de desidratação em fluxo para cada cultivar pode-se perceber que a menor concentração de sacarose (0,5 M) se mostrou superior na taxa de sobrevivência de todas as cultivares em todos os tempos de desidratação em fluxo. Contudo nenhuma concentração de sacarose usada se mostrou prejudicial aos tecidos, apenas reduziram a sobrevivência. Porém, como não ocorreu sobrevivência após a imersão em NL, não se pode comparar os resultados (Tabela 11).

Segundo Reed et al. (2005) quando o material é seco ao ar em câmara de fluxo laminar, normalmente não há nenhum controle da temperatura ou da umidade relativa onde a secagem está sendo realizada. Wang et al. (2000) comparando os efeitos da secagem com sílica gel e ao ar em câmara de fluxo laminar para ápices caulinares encapsulados de videira criopreservados, concluíram que a sobrevivência foi dependente do teor de umidade e não do método de secagem. Entretanto, os autores preferem a adoção do método de secagem ao ar, uma vez que a secagem obtida com o uso de sílica gel requer um teor de umidade inicial padronizado e, também, devido ao fato de o uso deste método ser mais laborioso.

Tabela 11. Porcentagem de sobrevivência de cada cultivar de morangueiro durante a desidratação em fluxo, antes da imersão em NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Cultivar	Sacarose	Duração da desidratação (h)					C.V. (%) <sup>1</sup>	
		0	1	2	3	4		5
<b>Aromas</b>	0,5 M	97Aa*	97Aa	93Aa	90Aa	80Aab	70Ab	<b>8,61</b>
	0,75 M	93Aa	93Aa	90Aa	83Aab	70ABbc	63ABc	
	1 M	90Aa	83Aab	80Aab	67Bbc	57Bc	53Bc	
<b>Camino Real</b>	0,5 M	100Aa	97Aab	93Aabc	87Abc	83Acd	73Ad	<b>5,8</b>
	0,75 M	97Aa	93Aa	90Aab	80Abc	73Bc	60Bd	
	1 M	87Ba	80Bab	77Babc	70Bbc	67Bcd	57Bd	
<b>Sugyeong</b>	0,5 M	100Aa	93Aab	87Aabc	83Abc	77Acd	67Ad	<b>7,46</b>
	0,75 M	97Aa	97Aa	93Aab	80Abc	67ABcd	57ABd	
	1 M	80Ba	77Bab	73Bab	63Bbc	57Bcd	47Bd	

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (cultivar) e médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha (duração da desidratação em fluxo) de cada cultivar, diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

O aumento do tempo de desidratação em fluxo, aliado ao aumento das concentrações da solução de sacarose reduziram o teor de umidade das cápsulas nas três cultivares testadas. Na concentração de 1 M durante 5 horas de desidratação em fluxo a porcentagem de umidade das cápsulas chegou a 23% para 'Aromas', 21% para 'Camino Real' e 25% para 'Sugyeong' (Figura 5).

Sabe-se que os mecanismos de regulação gênica para dessecação estão relacionados aos mecanismos de regulação para estresse ao congelamento. Acredita-se que açúcares e outros solutos polihídricos são responsáveis por proteger estruturas de proteínas de membrana durante a dessecação de sementes e células vegetativas. Estas últimas podem tolerar a dessecação por meio de aquaporinas específicas no tonoplasto, além dos canais de água presentes nas membranas, os quais desempenham papel crítico no movimento da água durante a dessecação e reidratação.

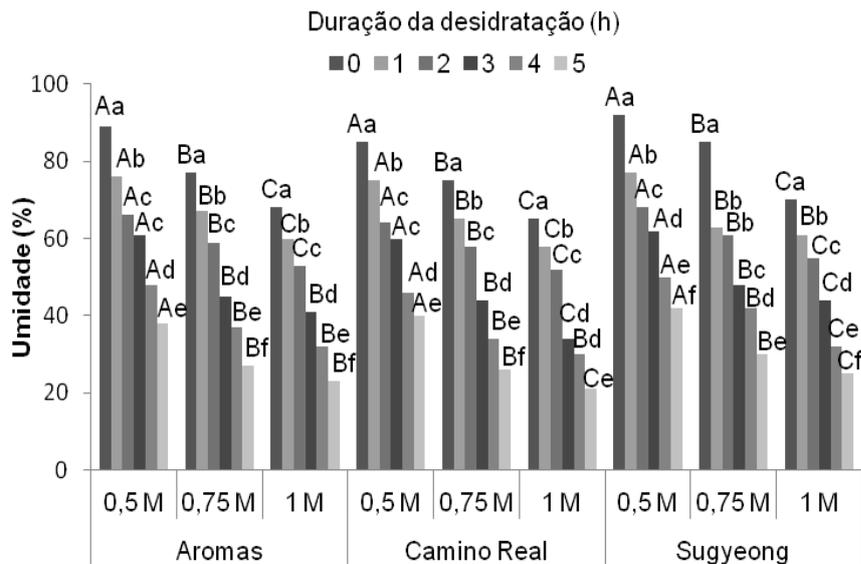


Figura 1 5. Porcentagem de umidade das gemas encapsuladas de cada cultivar de morangueiro em diferentes concentrações de sacarose e tempos de desidratação em fluxo, antes da exposição ao NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Entretanto, a sobrevivência após a dessecação/criopreservação é dependente de proteção celular do estresse da perda de água, bem como da disponibilidade de mecanismos funcionais de reparo após a reidratação, o que é presente de maneira geral em espécies tolerantes à dessecação, como as de sementes ortodoxas ou espécies de clima temperado. No caso de espécies não tolerantes à dessecação, a presença de espécies reativas de oxigênio no interior das células após o estresse pode danificá-las e gerar os peróxidos lipídicos, produtos aldeídicos e carbonilação de proteínas (VOLK, 2010).

Neste estudo, provavelmente a combinação nível de sacarose versus tempo de desidratação em fluxo não foi suficiente para induzir a vitrificação do citoplasma, ocasionando ruptura do sistema de membranas pela formação de cristais de gelo, o que resultou em lesões às células antes ou após o descongelamento.

Portanto, são necessários esforços continuados em técnicas de criopreservação para desenvolver protocolos para uma ampla gama de plantas (KAVIANI, 2011). A sobrevivência é extremamente variável entre espécies e os protocolos testados na grande maioria apresentam regeneração muitas vezes restrita a calos ou desenvolvimento incompleto de mudas (ENGELMAN, 2009).

Neste contexto, a hipótese de testar o aumento da desidratação para verificar o comportamento das cultivares foi validada, porém este aumento não chegou num ponto crítico, pois o mínimo de umidade obtida (21%) neste experimento mostrou

que as cultivares testadas toleram esta redução nos tratamentos controle, mas este teor de umidade ainda foi alto e ocasionou a morte das gemas após a criopreservação. Assim, novos estudos devem ser realizados aumentando o tempo de desidratação em fluxo.

### 3.3 Experimento 3: Criopreservação de gemas apicais de morangueiro pela técnica da crio lâmina

A aplicação desta técnica não foi eficiente para a sobrevivência das gemas de morangueiro nas cultivares testadas após a criopreservação. Contudo, muitas respostas foram encontradas com base no recultivo das gemas não imersas em NL.

Foi observado que o aumento de 21 para 28 dias durante a pré-aclimatação ao frio a 4 °C resultou em uma maior porcentagem de sobrevivência em todas as cultivares, sem diferença significativa entre cultivares (Figura 6A).

Quando analisado os tempos de pré-cultivo das gemas antes do encapsulamento entre as cultivares, foi constatado que a exclusão deste pré-cultivo (tratamento controle: 0 h) resultou no aumento da sobrevivência em todas as cultivares (Figura 6B).

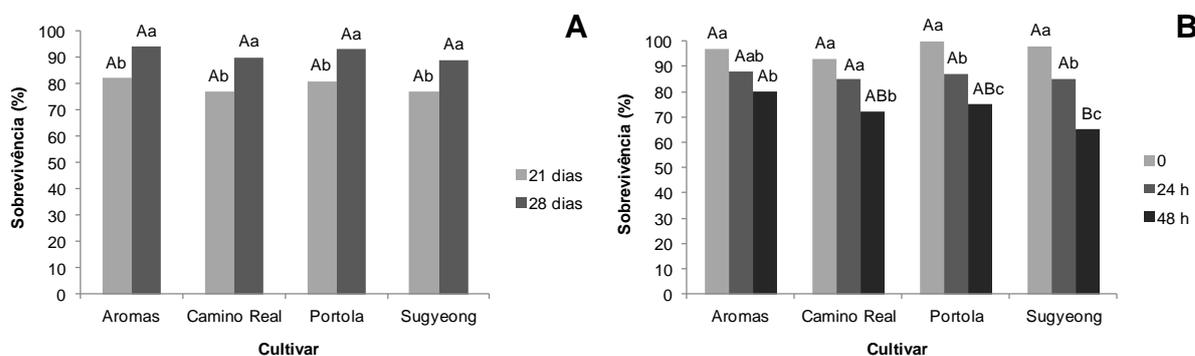


Figura 1 6. Porcentagem de sobrevivência das cultivares de morangueiro nos diferentes pré-tratamentos (21 e 28 dias) (A) e tempos de pré-cultivo (0, 24 e 48 horas) (B), antes da exposição ao NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Yamamoto et al. (2012a) criopreservaram 15 cultivares de morangueiro com esta técnica obtendo taxas de sobrevivência de 70 a 93%, para isto, as brotações foram pré-tratadas por 21 dias a 5 °C; pré-cultivadas por dois dias a 5 °C em meio MS com 0,3 M de sacarose e 2 M de glicerol; carregadas em solução com 2 M de glicerol e 0,8 M de sacarose por 30 minutos a 25 °C; expostas a PVS2 for 50

minutos a 25 °C; imersão rápida em NL por 30 minutos; descarregadas em solução de sacarose a 1 M por 15 minutos e recultivadas em meio MS.

Já neste experimento, como pode ser observado para cada cultivar na figura 7, a pré-aclimatação ao frio de 28 dias promoveu as melhores taxas de sobrevivência, independente do tempo de pré-cultivo.

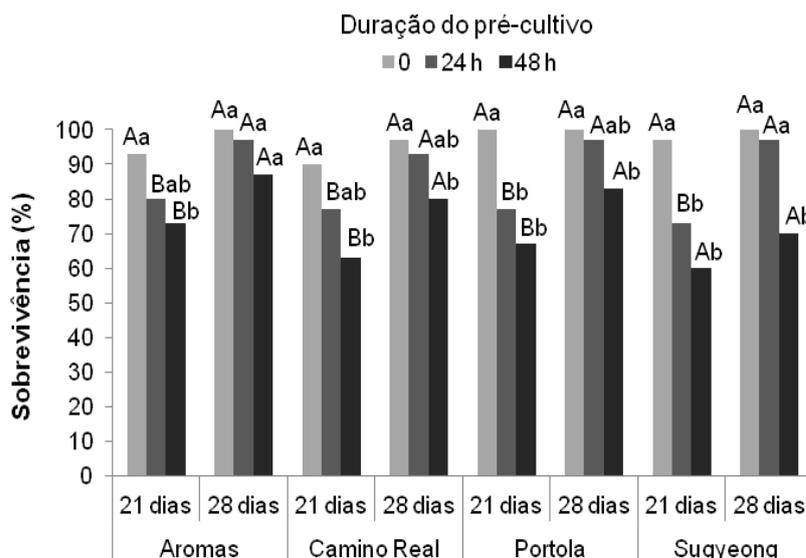


Figura 1 7. Porcentagem de sobrevivência de cada cultivar de morangueiro nos diferentes pré-tratamentos (21 e 28 dias) e duração de pré-cultivo (0, 24 e 48 horas), antes da exposição ao NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Com base no aspecto visual das gemas, pode-se observar que tanto as soluções altamente concentradas de sacarose e glicerol antes da imersão em NL (figura 8A) quanto a solução de PVS2 nos diferentes tempos após a exposição em NL (figura 8B) não causaram efeito tóxico aparente nos tecidos.

O tamanho do explante utilizado também pode justificar a morte das gemas criopreservadas. Ray e Bhattacharya (2008) citam que explantes maiores podem apresentar uma penetração incompleta da solução de vitrificação que conduzem a vitrificação abaixo do ideal das camadas celulares internas.

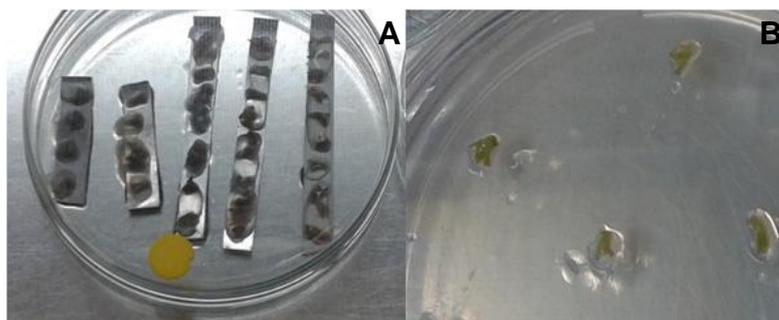


Figura 18. Complexação das cápsulas sobre as placas de alumínio (A) e recultivo das gemas após a criopreservação (28 dias de pré-tratamento e 48 horas de pré-cultivo). Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

De modo geral, estruturas de tamanho reduzido são mais apropriadas para o congelamento, uma vez que a desidratação e congelamento ocorrem de forma mais rápida e uniforme em estruturas menores (SANTOS, 2000). No entanto, para híbridos de *Dendrobium*, protocormos maiores, de 3-4 mm, apresentaram maior viabilidade que os de tamanho reduzido, de 1-2 mm (ANTONY et al., 2010). Os explantes menores também apresentam a desvantagem de sofrerem mais injúrias mecânicas (ANTONY et al., 2010) provavelmente serem mais sensíveis e, conseqüentemente, incapazes de lidar com o estresse (RAY; BHATTACHARYA, 2008). Isso demonstra que o tamanho ideal depende do tipo de explante e, sobretudo, espécie analisada.

A criopreservação ainda é um desafio, pois, para que seja bem sucedida, as células devem ter membranas íntegras e proteínas estáveis para tolerar a dessecação e congelamento. Por conseguinte, o sucesso no pós-congelamento não é apenas determinado pela técnica da criopreservação em si, mas também por outros fatores fisiológicos relacionados à própria espécie.

Sartor et al. (2012) em estudo sobre a criopreservação de gemas de mangabeira (*Hancomia speciosa* Gomes), concluiu que o encapsulamento-desidratação e a vitrificação não foram meios adequados em crioprotoger as gemas de mangabeira, já que não houve regeneração. Os autores indicam que a regeneração nula se deve ao fato de que provavelmente a mangabeira não suporta altos níveis de desidratação. A exposição das gemas à dessecação, mesmo com a ação dos crioprotetores, pode ter ocasionado alta desidratação, impedindo assim a sua regeneração.

Embora os resultados deste estudo tenham divergido com os encontrados por Yamamoto et al. (2012a), eles servirão de base para estudos futuros tanto com

estas cultivares quanto outras utilizadas no Brasil afim de criar um protocolo eficiente de criopreservação do morangueiro.

#### **4 Conclusões**

Na técnica de encapsulamento-vitrificação de cultivares de morangueiro é indicado:

- experimento 1.1 - aclimação ao frio de 4°C durante duas semanas;
- experimento 1.2 - uso de solução de PVS2 a 24°C durante 2 horas.

Na técnica de encapsulamento-desidratação é indicado:

- experimento 2.1 - desidratação em fluxo por um período superior a 4 horas;
- experimento 2.2 - uso de solução de sacarose a 0,75M e desidratação em fluxo por um período superior a 5 horas.

Na técnica de crio lâmina em cultivares de morangueiro é indicada a pré-aclimação ao frio de 4 semanas a 4°C, sem a etapa de pré-cultivo.

## Capítulo 3

### **Prolina na criopreservação de gemas de morangueiro pela técnica de encapsulamento-desidratação**

#### **1 Introdução**

A conservação *in vitro* por meio da criopreservação tem atraído a atenção como um método para o armazenamento a longo prazo de recursos fitogenéticos e materiais vegetais cultivados (SUZUKI et al., 2006), pois requer um mínimo de espaço, mão de obra, meio de cultura e manutenção (YAMAMOTO et al., 2012).

A criopreservação pode evitar os efeitos prejudiciais dos subcultivos subjacentes por um período prolongado, como contaminação, variação somaclonal ou perda de competência embriogênica (LAMBARDI et al., 2008). Além disso, esta técnica pode prevenir a perda de características celulares devido à instabilidade epigenética, tais como alterações estruturais na morfologia cromossômica, ploidia, morfologia celular e capacidade biossintética de uma linhagem celular, causadas principalmente por subcultivos prolongados (MUSTAFA et al., 2011).

Na última década, novas técnicas de criopreservação de morangueiro foram desenvolvidas e adaptadas, incluindo a vitrificação (ZHAO et al., 2006), desidratação (SOLOV'EVA; VYSOTSKAYA; DOLGIKH, 2016), encapsulamento-desidratação (HALMAGYI; DELIU, 2006) e criolâmina (YAMAMOTO et al., 2012). Em qualquer um dos métodos, a indução de níveis elevados de tolerância à desidratação no tecido ou órgão a preservar é um passo essencial, uma vez que a amostra tem de suportar extrema desidratação na solução de vitrificação ou secagem ao ar antes da imersão em nitrogênio líquido (SUZUKI et al., 2006).

Independentemente da técnica utilizada, as etapas da criopreservação do morangueiro consistem em uma adaptação dos explantes ao frio, o seu pré-cultivo em meios com crioprotetores, desidratação, congelamento, armazenamento em NL, descongelamento, reidratação e recuperação do crescimento (SOLOV'EVA; VYSOTSKAYA; DOLGIKH, 2016).

Embora existam vários métodos de criopreservação, o encapsulamento-desidratação tem uma série de vantagens. Por exemplo, não requer o uso de

congeladores programáveis e geralmente usa crioprotetores leves, como a sacarose, evitando assim as questões potenciais de toxicidade associadas com outros crioprotetores (BURRITT, 2008). Além disso, o encapsulamento dos explantes permite a exposição a tratamentos, incluindo o pré-cultivo com altas concentrações de sacarose e dessecação a baixos teores de umidade que seriam altamente prejudiciais ou letais para amostras não encapsuladas (ENGELMANN et al., 2008).

Vários materiais vegetais têm diferentes resistência geneticamente determinada à desidratação e congelamento. Portanto, o tipo de explante a ser congelado deve ter certos parâmetros de teor de umidade, o que requer a sua desidratação parcial preliminar, a fim de evitar lesões na célula com a formação de cristais de gelo, para recuperar com sucesso o seu crescimento após a criopreservação. Como regra geral, parâmetros ideais de teor de umidade do material a ser congelado são experimentalmente determinados para cada espécie, sendo que no morangueiro os explantes são desidratados antes de congelar a 25-30% do seu peso inicial (SOLOV'EVA; VYSOTSKAYA; DOLGIKH, 2016).

Durante a criopreservação, as células vegetais encontram problemas semelhantes às condições de congelamento no campo. Mudanças na organização espacial das membranas biológicas, reações bioquímicas e químicas podem ser retardadas, e, o status e a disponibilidade de água podem ser alterados. Por estas razões, a prolina é suscetível de ser um crioprotetor para células e tecidos criopreservados de plantas (BURRITT, 2012).

A prolina parece ter um papel protetor específico na adaptação das células vegetais à desidratação em muitas plantas. Acumula-se normalmente no citosol, onde contribui para o ajuste osmótico citoplasmático em resposta à perda de água sem interferir nos processos celulares e reações bioquímicas (ASHRAF; FOOLAD, 2007).

O uso integrado da prolina e a criopreservação pela técnica de encapsulamento-desidratação possibilitarão o armazenamento e a recuperação eficiente de clones obtidos a partir de tecidos jovens, genótipos de elite, células com atributos especiais ou derivadas de espécies ameaçadas de extinção (ENGELMANN, 2011).

Neste sentido, este trabalho objetivou quantificar o teor de prolina durante as etapas da criopreservação pela adaptação da técnica de encapsulamento-desidratação para relacionar a interação deste aminoácido com a sobrevivência das gemas de morangueiro.

## **2 Metodologia**

O experimento foi conduzido no laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Clima Temperado. A extração e quantificação de prolina foi realizada no laboratório de Bioquímica Vegetal do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA) da Universidade Federal de Pelotas, campus Capão do Leão.

### **2.1 Material vegetal**

Foi utilizado neste experimento explantes de morangueiro da cultivar Sugyeong, coletados do matrizeiro mantido em casa de vegetação.

### **2.2 Coleta, assepsia e estabelecimento in vitro dos explantes**

Para a excisão de meristemas, porções terminais de brotações com aproximadamente 5 cm de comprimento foram coletadas do matrizeiro em casa de vegetação, as folhas foram retiradas e as brotações acondicionadas em recipiente com água deionizada. Em seguida, foram levados ao laboratório para passar pelo processo de assepsia.

Inicialmente, o material coletado foi imerso em álcool 70% por 10 segundos; seguido de imersão por 10 minutos em solução de hipoclorito de sódio 1% e 3 gotas de detergente comercial sob agitação. Os explantes foram lavados em câmara de fluxo laminar, por três vezes, em água deionizada estéril para a extração dos meristemas.

O meristema foi excisado com auxílio de pinça e bisturi, utilizando lupa estereoscópica e inoculado em tubos de ensaio contendo aproximadamente 10 mL de meio de cultura estéril.

O meio de cultura usado para o isolamento dos ápices de morangueiro foi composto pelos sais e vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com mio-inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), BAP ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ); ANA ( $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ );  $\text{GA}_3$  ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ); sacarose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) e ágar ( $7 \text{ g L}^{-1}$ ), com pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem.

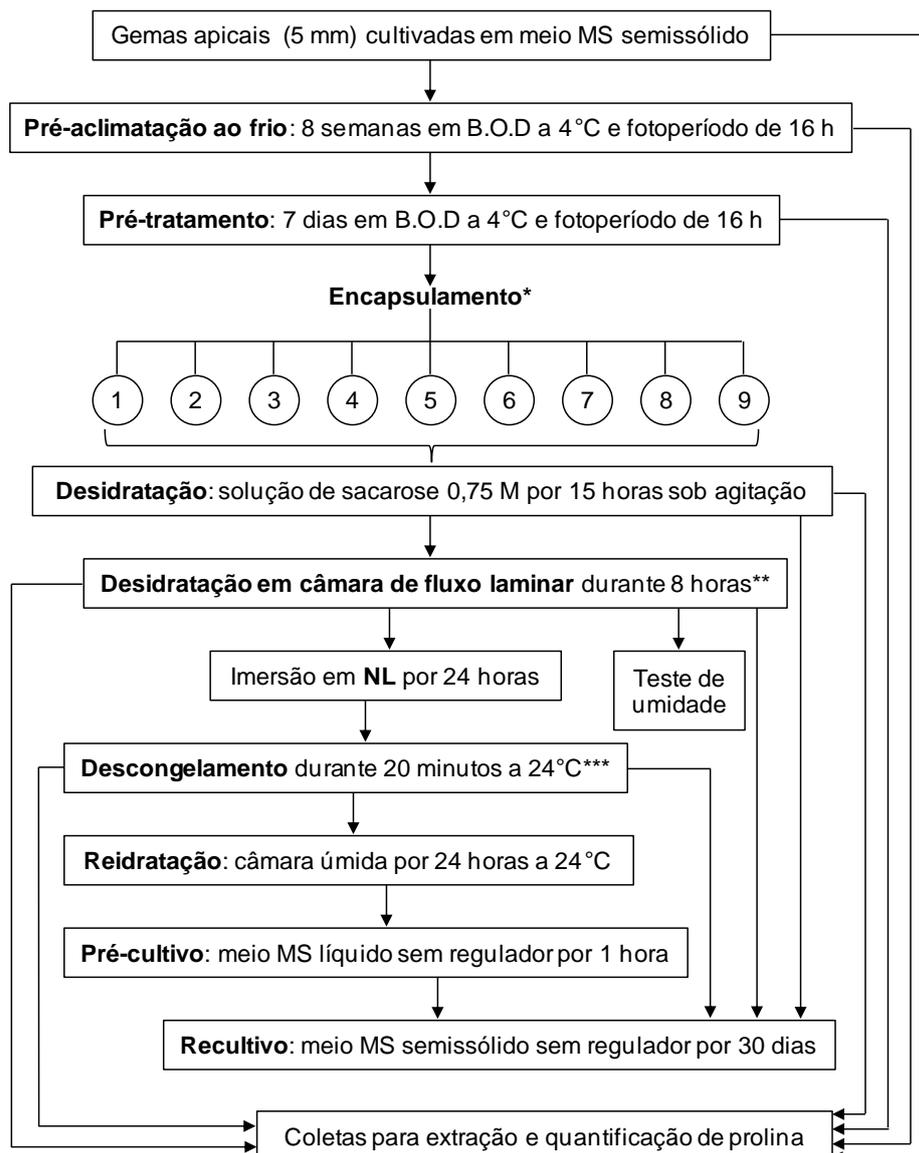
Os meristemas foram mantidos em sala de crescimento no escuro por 3 dias, e, posteriormente em fotoperíodo de 16 horas, intensidade luminosa  $45\text{-}55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e temperatura de  $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  por aproximadamente 60 dias.

### 2.3 Multiplicação dos explantes

Os explantes estabelecidos na etapa anterior foram transferidos para frascos com aproximadamente 30 mL de meio de multiplicação, contendo os sais do meio MS suplementado com mio-inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ); BAP ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ); sacarose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) e ágar ( $7 \text{ g L}^{-1}$ ), com pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. Os explantes com tamanho entre 1 e 3 cm, contendo de 2 a 3 gemas foram mantidos em sala de crescimento por 30 dias. Sendo repicados neste meio por 3 subcultivos até atingir o número desejado de material vegetal para instalação do experimento.

### 2.4 Criopreservação de gemas de morangueiro pela técnica de encapsulamento-desidratação com o uso de prolina

As etapas da criopreservação foram adaptadas do protocolo estabelecido por Burritt (2008) na seguinte ordem: pré-aclimatação ao frio; pré-tratamentos usando prolina; encapsulamento; desidratação; congelamento rápido em NL; descongelamento lento; reidratação; pré-cultivo e recultivo, conforme esquema representativo (figura 1) e descrição detalhada de cada etapa a seguir.



**\*Encapsulamento:** 1- gemas oriundas do pré-tratamento de 7 dias a 4°C em meio MS controle encapsuladas em meio MS controle; 2- gemas oriundas do pré-tratamento de 7 dias a 4°C em meio MS controle encapsuladas em meio MS + 2,15 mM de prolina; 3- gemas oriundas do pré-tratamento de 7 dias a 4°C em meio MS controle encapsuladas em meio MS + 4,30 mM de prolina; 4- gemas oriundas do pré-tratamento de 7 dias a 4°C em meio MS + 2,15 mM de prolina encapsuladas em meio MS controle; 5- gemas oriundas do pré-tratamento de 7 dias a 4°C em meio MS + 2,15 mM de prolina encapsuladas em meio MS + 2,15 mM de prolina; 6- gemas oriundas do pré-tratamento de 7 dias a 4°C em meio MS + 2,15 mM de prolina encapsuladas em meio MS + 4,30 mM de prolina; 7- gemas oriundas do pré-tratamento de 7 dias a 4°C em meio MS + 4,30 mM de prolina encapsuladas em meio MS controle; 8- gemas oriundas do pré-tratamento de 7 dias a 4°C em meio MS + 4,30 mM de prolina encapsuladas em meio MS + 2,15 mM de prolina; 9- gemas oriundas do pré-tratamento de 7 dias a 4°C em meio MS + 4,30 mM de prolina encapsuladas em meio MS + 4,30 mM de prolina.

**\*\*Desidratação em fluxo:** a cada 2 horas foi realizado o teste de umidade, porém para a extração e quantificação de prolina as coletas ocorreram em dois tempos (4 e 8 horas) de desidratação.

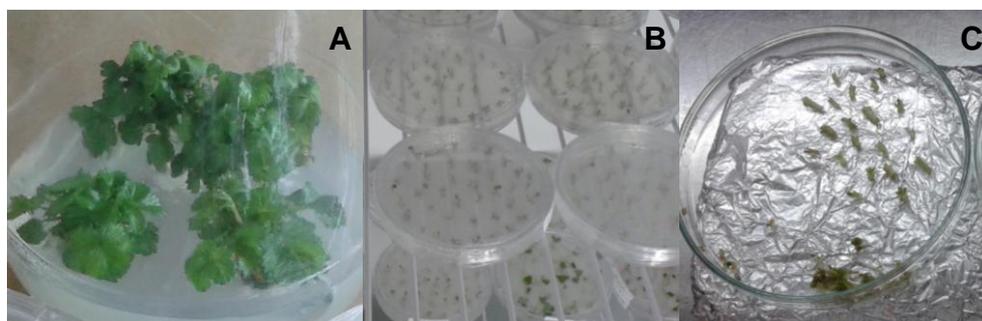
**\*\*\*Descongelamento:** após o descongelamento, as coletas para prolina foram realizadas dos tratamentos oriundos do congelamento em NL com 0, 4 e 8 de desidratação em fluxo.

Figura 1. Esquema representativo das etapas do protocolo de criopreservação pelo método de encapsulamento-desidratação de gemas apicais de morangueiro, cultivar Sugyeong. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

#### 2.4.1 Pré-aclimatação ao frio e pré-tratamentos usando prolina

Gemas apicais de morangueiro obtidas a partir de brotações in vitro foram transferidas para placas contendo aproximadamente 20 mL de meio MS na mesma formulação do item 2.3, sendo pré-aclimatadas ao frio por 8 semanas em B.O.D a 4 °C com 16 horas de fotoperíodo (Figura 1, 2A e 2B). Após este período, foi realizada a limpeza nas gemas, com a retirada das folhas que eventualmente se desenvolveram e padronização do tamanho para 5 mm. Esta limpeza ocorreu em câmara de fluxo laminar mantendo as gemas e todo o material de uso, refrigerados (mantidos sobre placas de gelo forradas com papel alumínio, figura 2C).

As gemas foram incubadas em placas contendo 20 mL de meio MS, suplementado com BAP (4,44 µM), GA<sub>3</sub> (2,8 µM), mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (30 g L<sup>-1</sup>) e ágar (7 g L<sup>-1</sup>), com pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem (pré-tratamento 1= controle); os pré-tratamentos 2 e 3 corresponderam a mesma formulação deste meio, porém acrescido de 2,15 mM e 4,30 mM de prolina; respectivamente, permanecendo por 7 dias em B.O.D a 4 °C com 16 horas de fotoperíodo.



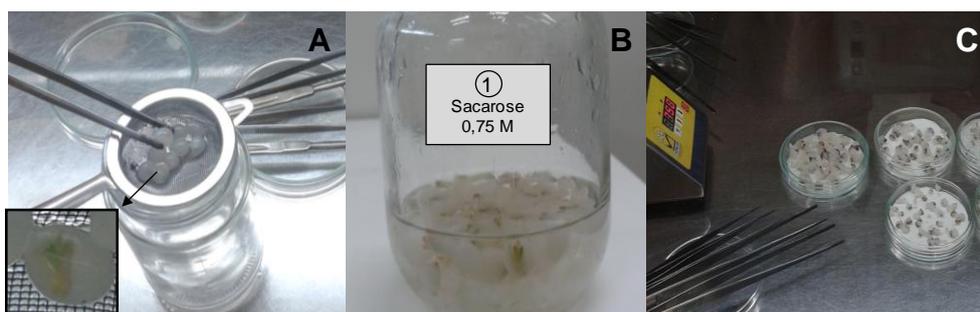
**Figura 2.** Brotações de morangueiro ‘Sugyeong’ mantidas in vitro em meio MS semissólido de multiplicação (A), gemas apicais com aproximadamente 5 mm inoculadas em placas contendo meio MS semissólido, em B.O.D a 4 °C (B), limpeza das gemas sob placas refrigeradas antes da inoculação nos meios de pré-tratamentos (C). Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

#### 2.4.2 Encapsulamento e desidratação

Após os pré-tratamentos as gemas foram novamente padronizadas para o tamanho de 3 mm e distribuídas igualmente nos três tratamentos de encapsulamento, em matriz de alginato de sódio 5,0% (p/v) constituído de meio MS (sem cálcio) suplementado com BAP (4,44 µM), GA<sub>3</sub> (2,8 µM), mio-inositol

(100 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (30 g L<sup>-1</sup>) e pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem (tratamento 1= controle); os tratamentos 2 e 3 corresponderam a mesma formulação da matriz de encapsulamento, porém acrescido de 2,15 mM e 4,30 mM de prolina; respectivamente (3 pré-tratamentos combinados com 3 tratamentos de encapsulamento, totalizando 9 tratamentos).

As unidades encapsuláveis foram individualmente resgatadas e gotejadas em solução de cloreto de cálcio (100 mM) na qual permaneceram por 30 minutos para complexação (Figura 3A). Após esta etapa, as cápsulas foram imersas em solução de sacarose a 0,75 M (figura 3B) e agitadas em shaker por 15 horas a 130 rpm a temperatura ambiente. Posteriormente, as cápsulas foram desidratadas em câmara de fluxo laminar durante 8 horas (com cerca de 30% de umidade relativa a 24 °C), o excesso da solução de sacarose foi retirado com papel filtro autoclavado (Figura 3C).



**Figura 3.** Encapsulamento de gemas apicais de morangueiro, em destaque uma gema encapsulada (A), cápsulas em solução de desidratação (B), desidratação das cápsulas em câmara de fluxo laminar (C). Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

#### 2.4.3 Congelamento rápido em NL, descongelamento lento, reidratação, pré-cultivo e recultivo

Após a desidratação em fluxo, as cápsulas foram inoculadas em criotubos de 4 mL e imediatamente imersas em nitrogênio líquido durante 24 horas (Figura 4A e 4B). O descongelamento foi realizado em fluxo a 24 °C por 20 minutos. Subsequentemente, as cápsulas foram reidratadas a 24 °C por 24 horas em câmara de plástico selado com umidade relativa em torno de 90% (Figura 4C). Posteriormente, as cápsulas foram pré-cultivadas em placas contendo 20 mL de meio MS líquido sem regulador, suplementado com mio-inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (30 g L<sup>-1</sup>) e pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem, durante uma hora.

Passado este período, o excesso de meio MS líquido foi retirado com a exposição das cápsulas em papel filtro autoclavado e inoculadas em meio de recultivo vertido em placas contendo 20 mL de meio MS, acrescido de mio-inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), ágar ( $7 \text{ g L}^{-1}$ ) e sacarose ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ), sem regulador de crescimento, mantidas em sala de crescimento por 2 dias no escuro e 28 dias a  $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossintética ativa de  $45\text{-}55 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

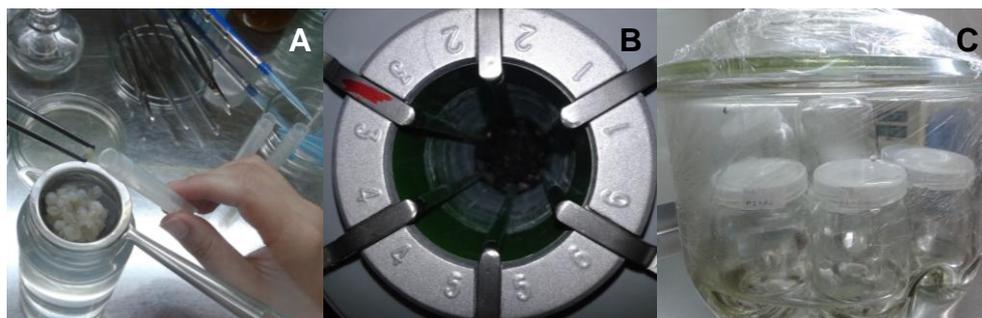


Figura 4. Criotubos de 4 mL contendo 10 cápsulas, cada criotubo representando uma repetição (A), criotubos submersos em NL (B), reidratação das cápsulas em câmara de plástico selado (C). Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

#### 2.4.4 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $9 \times 5$  (tratamentos de encapsulamento e tempos de desidratação) com três repetições, cada repetição contendo 10 gemas, totalizando 30 gemas por tratamento. Os dados foram submetidos à Análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, através do programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

#### 2.5 Determinações analíticas

Para extração e quantificação de prolina as cápsulas coletadas foram imediatamente separadas das gemas, sendo somente as gemas pesadas e armazenadas em ultrafreezer a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  até o momento das análises.

##### 2.5.1 Teor de umidade

O teste de umidade foi realizado a cada duas horas durante a etapa de desidratação em câmara de fluxo laminar (a 0, 2, 4, 6 e 8 horas), onde coletou-se de cada tratamento 10 cápsulas, sendo pesadas em balança analítica, obtendo a massa fresca (MF) e em seguida foram secas em estufa a 65°C por 48 horas, até atingir massa constante (MS). O cálculo da porcentagem de umidade (U%) foi obtido através da seguinte fórmula:

$$U (\%) = [(MF-MS / MF) \times 100]$$

### 2.5.2 Avaliação do crescimento - Recultivo

Como controle da sobrevivência, o recultivo das cápsulas foi realizado nas etapas de desidratação em sacarose, desidratação em fluxo (a 0, 2, 4, 6 e 8 horas), descongelamento e no final das etapas como é realizado habitualmente (Figura 1).

A porcentagem de rebrota das cápsulas (sobrevivência) foi avaliada aos 30 dias. Posteriormente, os explantes foram retirados das cápsulas e inoculados em meio MS de multiplicação para avaliar o potencial uso da aplicação da prolina exógena, sendo realizada avaliação do crescimento das gemas após 0, 4 e 8 horas de exposição ao fluxo, aos 56 dias após a criopreservação. Avaliou-se a sobrevivência (%), número de brotações, número de folhas e raízes, e, comprimento de folhas e raízes (cm).

### 2.5.3 Extração e quantificação de prolina

A prolina livre foi determinada seguindo metodologia adaptada de Bates; Waldren; Teare (1973) a partir da maceração de 100mg de gemas coletadas nas etapas representadas na Figura 1.

## 3 Resultados e Discussão

Embora não tenha ocorrido sobrevivência das gemas após a criopreservação. Esta pesquisa torna evidente a importância do período de aclimação ao frio e a influência deste fator no aumento da sobrevivência das gemas de morangueiro quando expostas a condições estressantes como a alta concentração de sacarose.

Como observado na tabela 2, o uso de solução de sacarose a 0,75 M não afetou a porcentagem de sobrevivência em relação as cápsulas não tratadas (0 sacarose) em todos os tratamentos testados, embora as gemas oriundas do pré-tratamento com meio MS + 2,15 mM de prolina e encapsuladas em meio MS + 4,30 mM de prolina tenham reduzido a sobrevivência (93%) e do pré-tratamento com meio MS + 4,30 mM de prolina e encapsuladas em meio MS + 2,15 mM de prolina para 87%, estas médias foram superiores a sobrevivência reportada por Burritt (2008) que reportou 55% de sobrevivência em begônia ao serem pré-tratadas por 7 dias em meio contendo 3,8 M de ABA e 2,15 mM de prolina e 15 horas de desidratação em 0,75 M de sacarose.

O pré-tratamento contendo prolina no meio (2,15 mM) das gemas encapsuladas em meio MS controle promoveu aumento no número de brotações e no comprimento da parte aérea, quando as gemas foram expostas a solução de sacarose 0,75 M (tabela 2), assim como este meio resultou em maior número de folhas formadas (Tabela 3).

Tabela 2. Porcentagem de sobrevivência, número de brotações (NB) e comprimento da parte aérea (CPA) de gemas de morangueiro 'Sugyeong' encapsuladas e desidratadas em solução de sacarose (0 e 0,75 M) antes da desidratação em fluxo e imersão em NL. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Pré-tratamento	Encapsulamento	Sobrevivência (%)		NB		CPA (cm)	
		0	0,75 M	0	0,75 M	0	0,75 M
MS controle	MS controle	100Aa	100Aa*	0,0Fb	3,0Ba	1,0Eb	1,6Ba
MS controle	MS + 2,15 mM Pro	100Aa	100Aa	2,2Ba	0,0Fb	1,5Da	0,7FGb
MS controle	MS + 4,30 mM Pro	100Aa	100Aa	1,3Da	0,0Fb	1,0Ea	0,6Gb
MS + 2,15 mM Pro	MS controle	100Aa	100Aa	3,0Ab	3,6Aa	1,8Cb	2,6Aa
MS + 2,15 mM Pro	MS + 2,15 mM Pro	100Aa	100Aa	2,2Ba	1,2Eb	1,4Da	1,1Db
MS + 2,15 mM Pro	MS + 4,30 mM Pro	100Aa	93ABb	2,3Ba	0,0Fb	1,5Da	1,7Ba
MS + 4,30 mM Pro	MS controle	100Aa	100Aa	1,0Eb	1,5Da	0,8Eb	1,1DEa
MS + 4,30 mM Pro	MS + 2,15 mM Pro	93Aa	87Bb	1,6Ca	0,0Fb	2,1Ba	1,4Cb
MS + 4,30 mM Pro	MS + 4,30 mM Pro	100Aa	100Aa	3,2aA	2,5Cb	2,5Aa	0,8EFb
<b>CV (%)<sup>1</sup></b>		<b>3,38</b>		<b>6,47</b>		<b>6,2</b>	

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (pré-tratamento + encapsulamento) e médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha (solução de sacarose) diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Tanto o número quanto o comprimento de raízes, independente do meio testado foram superiores no tratamento controle (0 sacarose), assim, o tratamento de desidratação em sacarose a 0,75 M reduziu a formação do sistema radicular nos

explantes (Tabela 3). Porém quando analisada a interação entre os meios testados observou-se que novamente o pré-tratamento com 2,15 mM de prolina das gemas encapsuladas em meio MS controle proporcionou o maior comprimento (1,3) e número de raízes (1,7).

Para as variáveis massa fresca, massa seca e porcentagem de umidade, independente da concentração de sacarose usada durante a desidratação, foi observado interação entre os meios, sendo o pré-tratamento com 2,15 mM de prolina das gemas encapsuladas em meio MS controle mais eficiente tanto no acúmulo de matéria seca, quanto na preservação da umidade no interior dos tecidos. Sabe-se que quanto menor a umidade, maior é o estresse causado na planta (Tabela 4).

**Tabela 3.** Número de folhas (NF), comprimento de raízes (CR) e número de raízes (NR) de gemas de morangueiro 'Sugyeong' encapsuladas e desidratadas em solução de sacarose (0 e 0,75 M) antes da desidratação em fluxo e imersão em NL. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Pré-tratamento	Encapsulamento	NF		CR (cm)		NR	
		0	0,75 M	0	0,75 M	0	0,75 M
MS controle	MS controle	3,5Fb*	14,0Ba	0,0Eb	0,2Ea	0,0Ga	0,6Ca
MS controle	MS + 2,15 mM Pro	7,7Da	2,6FGb	0,2Da	0,0Fb	0,3Fa	0,0Db
MS controle	MS + 4,30 mM Pro	5,6Ea	2,1Gb	0,2Da	0,0Fb	2,0Ba	0,0Db
MS + 2,15 mM Pro	MS controle	11,8Bb	15,3Aa	1,2Ba	1,3Aa	1,4Cb	1,7Aa
MS + 2,15 mM Pro	MS + 2,15 mM Pro	9,0Ca	6,6Db	0,4Ca	0,3Da	0,6Ea	0,5Ca
MS + 2,15 mM Pro	MS + 4,30 mM Pro	11,3Ba	3,6Fb	0,0Eb	0,7Ba	0,0Gb	1,6Ba
MS + 4,30 mM Pro	MS controle	4,0Fb	5,4Ea	0,0Ea	0,0Fa	0,0Ga	0,0Da
MS + 4,30 mM Pro	MS + 2,15 mM Pro	14,0Aa	3,2Fb	2,1Aa	0,5Cb	5,0Aa	1,1Bb
MS + 4,30 mM Pro	MS + 4,30 mM Pro	13,5Aa	9,7Cb	0,5Ca	0,2DEb	1,0Da	0,4Cb
<b>CV (%)<sup>1</sup></b>		<b>4,67</b>		<b>10,25</b>		<b>9,54</b>	

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (pré-tratamento + encapsulamento) e médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha (solução de sacarose) diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Tabela 4.** Massa fresca, massa seca e porcentagem de umidade de gemas de morangueiro 'Sugyeong' encapsuladas e desidratadas em solução de sacarose (0 e 0,75 M) antes da desidratação em fluxo e imersão em NL. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Pré-tratamento	Encapsulamento	Massa fresca (g)		Massa seca (g)		Umidade (%)	
		0	0,75 M	0	0,75 M	0	0,75 M
MS controle	MS controle	0,11Db*	0,25BCDa	0,01Db	0,05Aa	86,1Da	77,4Fb
MS controle	MS + 2,15 mM Pro	0,24BCa	0,27BCa	0,04ABb	0,05Aa	84,2Ea	79,1DEb
MS controle	MS + 4,30 mM Pro	0,15Db	0,28BA	0,02CDb	0,06Aa	87,5Ca	78,1EFb
MS + 2,15 mM Pro	MS controle	0,37Aa	0,4Aa	0,045Aa	0,06Aa	91,7Aa	85,0Ab
MS + 2,15 mM Pro	MS + 2,15 mM Pro	0,31Aba	0,21BCDEb	0,04ABb	0,04Ba	87,6Ca	80,6Cb

MS + 2,15 mM Pro	MS + 4,30 mM Pro	0,32Aba	0,22BCDEb	0,03BCb	0,04Ba	85,8Da	82,2Bb
MS + 4,30 mM Pro	MS controle	0,19CDa	0,17DEa	0,02CDb	0,03Ba	87,2Ca	79,8CDb
MS + 4,30 mM Pro	MS + 2,15 mM Pro	0,36Aa	0,15EBa	0,04ABa	0,03Bb	88,2BCa	80,7Cb
MS + 4,30 mM Pro	MS + 4,30 mM Pro	0,39Aa	0,18CDEb	0,04ABa	0,03Bb	89,2Ba	82,8Bb
<b>CV (%)<sup>1</sup></b>		<b>13,47</b>		<b>12,92</b>		<b>0,47</b>	

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (pré-tratamento + encapsulamento) e médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha (solução de sacarose) diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Wesley-Smith et al. (1995) em estudo sobre criopreservação de ervilha (*Pisum sativum* L.) por meio de rápida desidratação, concluiu que a consequência mais provável do protocolo de congelamento é a ocorrência generalizada de eventos de nucleação ao longo de todo o tecido, como a consequência da formação dos cristais de gelo após o descongelamento. Esta observação foi baseada pela ausência de dano visível nas organelas ou no citoplasma, independente do grau de hidratação.

No entanto, os autores observaram danos à membrana plasmática e nas paredes celulares quando os ápices embrionários de ervilha totalmente hidratados foram congelados rapidamente, baseando-se no pressuposto de que o super congelamento e a nucleação intracelular ocorrem quando o congelamento rápido é usado. De acordo com os autores, é possível que a cristalização se inicie no ambiente extracelular antes do meio intracelular. Se isto for válido, o cristal pode crescer suficientemente para induzir danos à parede celular e à membrana plasmática, antes mesmo de qualquer dano intracelular.

Conforme observado na tabela 5, todos os tratamentos foram eficientes para proteger as gemas contra a desidratação, independente do tempo de exposição a desidratação em fluxo. Os tratamentos com a inclusão de prolina tanto no meio de cultura quanto na cápsula não ocasionaram toxicidade aos tecidos.

Tabela 5. Porcentagem de sobrevivência de gemas encapsuladas de morangueiro 'Sugyeong' durante a desidratação em fluxo, antes da imersão em NL, após 30 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Pré-tratamento	Encapsulamento	Duração da desidratação				
		0 h	2 h	4 h	6 h	8 h
MS controle	MS controle	100Aa*	100Aa	100Aa	97Aa	100Aa
MS controle	MS + 2,15 mM Pro	100Aa	97Aa	83Bb	97Aa	100Aa
MS controle	MS + 4,30 mM Pro	100Aa	97Aa	83Bb	97Aa	97Aa
MS + 2,15 mM Pro	MS controle	100Aa	97Aa	93ABa	97Aa	100Aa

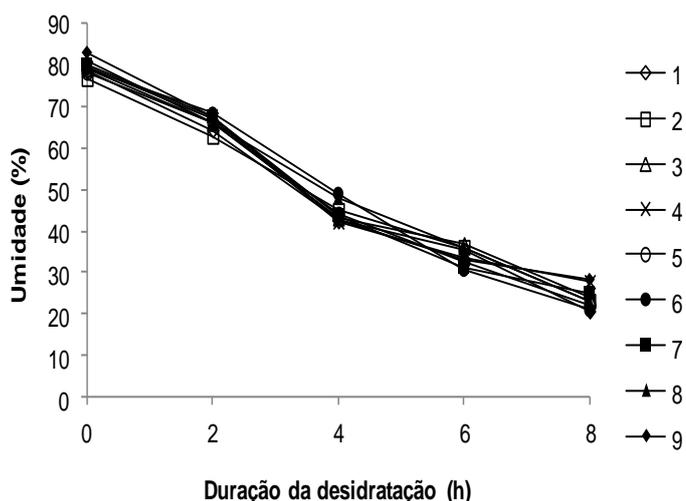
MS + 2,15 mM Pro	MS + 2,15 mM Pro	100Aa	97Aa	100Aa	97Aa	97Aa
MS + 2,15 mM Pro	MS + 4,30 mM Pro	93ABa	97Aa	90ABa	97Aa	97Aa
MS + 4,30 mM Pro	MS controle	100Aa	97Aa	100Aa	97Aa	100Aa
MS + 4,30 mM Pro	MS + 2,15 mM Pro	87Bb	97Aab	97Aab	93Aab	100Aa
MS + 4,30 mM Pro	MS + 4,30 mM Pro	100Aa	97Aa	100Aa	97Aa	100Aa
<b>CV (%)<sup>1</sup></b>				<b>4,79</b>		

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (pré-tratamento + encapsulamento) e médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha (duração da desidratação em fluxo) diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

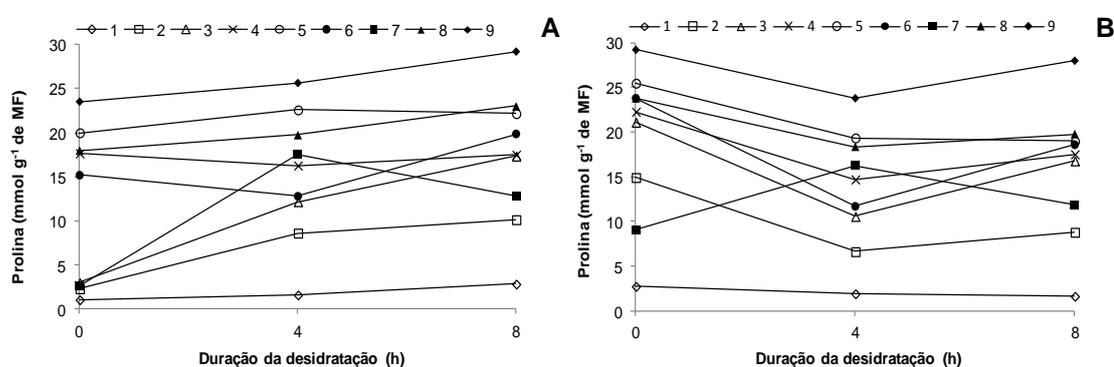
Alguns trabalhos relatam que a aplicação de prolina exógena em concentrações elevadas podem ser prejudiciais aos tecidos vegetais, o que não foi observado neste estudo nas concentrações testadas para as gemas que não foram congeladas em nitrogênio líquido.

O aumento do tempo da desidratação para 8 horas proporcionou redução nos teores de umidade, com uma média de 30% entre os tratamentos, porém esta redução não foi suficiente para que as gemas criopreservadas sobrevivessem (Figura 6). Isto sugere que o morangueiro tolera teores mais baixos de umidade e que a redução desta poderá proporcionar respostas positivas na sobrevivência após o congelamento em nitrogênio líquido.



**Figura 6.** Porcentagem de umidade de gemas de morangueiro 'Sugyeong' nos diferentes tempos de desidratação em fluxo, antes da imersão em NL. Tratamentos: 1- MS controle + MS controle; 2- MS controle + MS 2,15 mM Pro; 3- MS controle + MS 4,30 mM Pro; 4- MS 2,15 mM Pro + MS controle; 5- MS 2,15 mM Pro + MS 2,15 mM Pro; 6- MS 2,15 mM Pro + MS 4,30 mM Pro; 7- MS 4,30 mM Pro + MS controle; 8- MS 4,30 mM Pro + MS 2,15 mM Pro; 9- MS 4,30 mM Pro + MS 4,30 mM Pro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Quanto ao teor de prolina encontrado nas gemas pode-se observar que em todos os meios testados quando as cápsulas não foram desidratadas em fluxo (tempo de desidratação 0, figura 7B) e criopreservadas, o teor de prolina aumentou significativamente (chegando a 29,22 mmol g<sup>-1</sup> de MF no tratamento 9) em relação as gemas não desidratadas em fluxo e não expostas ao nitrogênio líquido (Figura 7A). Nos outros tempos de desidratação (4 e 8 horas) também ocorreu interação entre as gemas não criopreservadas e criopreservadas, porém não tão pronunciadas quanto o tempo zero.



**Figura 7.** Teor de prolina livre (mmol g<sup>-1</sup> Prolina MF) em gemas de morangueiro ‘Sugyeong’ nos diferentes tempos de desidratação em fluxo, antes (A) e depois da imersão em NL (B). Tratamentos: 1- MS controle + MS controle; 2- MS controle + MS 2,15 mM Pro; 3- MS controle + MS 4,30 mM Pro; 4- MS 2,15 mM Pro + MS controle; 5- MS 2,15 mM Pro + MS 2,15 mM Pro; 6- MS 2,15 mM Pro + MS 4,30 mM Pro; 7- MS 4,30 mM Pro + MS controle; 8- MS 4,30 mM Pro + MS 2,15 mM Pro; 9- MS 4,30 mM Pro + MS 4,30 mM Pro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Este fato pode estar relacionado com as condições de desidratação, sob as quais as células vegetais sofrem ajuste osmótico ao acumular um ou vários solutos orgânicos, que são frequentemente referidos como osmolitos compatíveis e / ou osmoprotetores. Estas moléculas desempenham um papel crítico em contrariar o efeito da osmose sob o estresse em plantas a nível celular (YOSHIBA et al., 1997).

Com relação à criopreservação, vários estudos têm demonstrado a importância da prolina na tolerância ao congelamento nas plantas (HOFFMAN et al., 2010; JAVADIAN et al., 2010; BURBULIS et al., 2011).

Foi sugerido que o acúmulo de aminoácidos como a prolina induzido pelo estresse pode não só ter um papel osmoregulatório, mas que também poderia ser um mecanismo para fornecer as células um conjunto de precursores necessários para a síntese de outras moléculas conhecidas por estarem envolvidas em estresses bióticos e abióticos (SANCHEZ et al., 2008). Por exemplo, as poliaminas podem ser

sintetizadas a partir da arginina ou ornitina e ornitina a partir de glutamato, assim, as vias para a biossíntese de prolina e poliamina estão interligadas, e ambos os grupos de moléculas são importantes nas respostas ao estresse das plantas (GROPPIA; BENAVIDES, 2008).

Pouco se sabe sobre o papel do metabolismo das poliaminas no processo de criopreservação, mas Ramon et al. (2002) relataram que um aumento no teor de putrescina foi positivamente correlacionado com a taxa de sobrevivência após o congelamento ou após a vitrificação em meristemas de banana. Os aminoácidos armazenados também podem ser úteis durante o processo de recuperação após o estresse.

O acúmulo de grandes pools celulares de aminoácidos poderia permitir a rápida síntese de enzimas e a reparação de proteínas estruturais, permitindo uma recuperação mais rápida das células após a criopreservação, mas essa possibilidade ainda não foi investigada.

Também foi sugerido que moléculas de prolina podem substituir diretamente moléculas de água em falta entre os grupos cabeça de fosfolipídios. Além disso, de acordo com a hipótese de exclusão preferencial, a prolina é um grupo de solutos que, quando em solução aquosa, são excluídos do contato com as superfícies de proteínas e bicamadas fosfolipídicas. Consequentemente, a adição de prolina a uma solução estabiliza a estrutura nativa de monômeros de proteínas e protege os complexos de proteínas oligoméricas da desnaturação e dissociação (BURRITT, 2012).

Pesquisas sugerem que, além de funcionar como um osmótico celular e protetor de membrana, a prolina pode reagir com algumas espécies reativas de oxigênio (EROs) potencialmente reduzindo o estresse oxidativo. Por exemplo, foi demonstrado que a prolina capta o oxigênio singleto (ALIA; MATYSIK, 2001) e os radicais hidroxila (SMIRNOFF; CUMBES, 1989) in vitro e ambas estas EROs podem ser produzidas em células vegetais sob estresse.

Em análises histológicas revelaram que as células dos ápices caulinares criopreservados foram severamente danificadas, o citoplasma ficou completamente retraído e concentrado na região central da célula, distanciando-se da parede celular, os núcleos tornaram-se intensamente e uniformemente corados e nenhum nucléolo era evidente.

A sobrevivência dos explantes não foi afetada pelos tratamentos com prolina, evidenciando que a prolina além de atuar na proteção das membranas, após o estresse, esta ajuda no crescimento e desenvolvimento dos explantes, como observado no aumento do número de brotações obtidas por explante, ao qual o pré-tratamento com 4,30 mM de prolina aliado ao encapsulamento das gemas nesta mesma concentração de prolina resultou em 5,3 brotações por explante quando desidratadas no fluxo por mais tempo (8 horas) (Tabela 6).

Tabela 6. Porcentagem de sobrevivência e número de brotações de gemas de morangueiro 'Sugyeong' encapsuladas e desidratadas em fluxo (0, 4 e 8 horas) sem imersão em NL, após 56 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Pré-tratamento	Encapsulamento	Sobrevivência (%)			Número de Brotações		
		0 h	4 h	8 h	0 h	4 h	8 h
MS controle	MS controle	100Aa*	100Aa	100Aa	3,0Bc	3,4Bb	3,6Da
MS controle	MS + 2,15 mM Pro	100Aa	83Bb	100Aa	0,0Fb	1,0Ea	0,0Gb
MS controle	MS + 4,30 mM Pro	100Aa	83Bb	97Aa	0,0Fb	0,8Ea	0,0Gb
MS + 2,15 mM Pro	MS controle	100Aa	93ABa	100Aa	3,6Ab	2,0Cc	4,9Ba
MS + 2,15 mM Pro	MS + 2,15 mM Pro	100Aa	100Aa	97Aa	1,2Eb	3,4Ba	3,4Da
MS + 2,15 mM Pro	MS + 4,30 mM Pro	93ABa	90ABa	97Aa	0,0Fc	1,3Db	2,5Fa
MS + 4,30 mM Pro	MS controle	100Aa	100Aa	100Aa	1,5Dc	4,4Aa	2,9Eb
MS + 4,30 mM Pro	MS + 2,15 mM Pro	86,7Bb	97Aa	100Aa	0,0Fc	2,0Cb	4,0Ca
MS + 4,30 mM Pro	MS + 4,30 mM Pro	100Aa	100Aa	100Aa	2,5Cc	3,5Bb	5,3Aa
<b>CV (%)<sup>1</sup></b>		<b>3,97</b>			<b>4,51</b>		

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (pré-tratamento + encapsulamento) e médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha (duração da desidratação em fluxo) diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Para as variáveis comprimento da parte aérea, número de folhas (tabela 7), comprimento de raiz e número de raízes (tabela 8), massa fresca e massa seca (tabela 9), foi obtido interação para explantes oriundos do pré-tratamento com MS + 2,15 mM de prolina, cujas gemas foram encapsuladas em meio MS controle para a maioria dos tempos de desidratação testados.

Tabela 7. Comprimento da parte aérea (CPA) e número de folhas de gemas de morangueiro 'Sugyeong' encapsuladas e desidratadas em fluxo (0, 4 e 8 horas) sem imersão em NL, após 56 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Pré-tratamento	Encapsulamento	CPA (cm)			Número de folhas		
		0 h	4 h	8 h	0 h	4 h	8 h
MS controle	MS controle	1,65Ba*	1,1Cb	1,5Da	13,3Aab	11,8Cb	8,9Ec
MS controle	MS + 2,15 mM Pro	0,75EFc	0,9CDEb	1,5Da	2,6GHc	5,0Fb	6,5Fa
MS controle	MS + 4,30 mM Pro	0,57Fb	0,85DEa	0,7Fb	2,1Hc	4,5Fa	3,0Gb

MS + 2,15 mM Pro	MS controle	2,60Aa	1,69Bb	3,0Aa	14,2Ba	8,8Db	15,0Aa
MS + 2,15 mM Pro	MS + 2,15 mM Pro	1,13Dc	1,49Bb	2,1Ca	6,6Db	12,2Ca	12,3Ca
MS + 2,15 mM Pro	MS + 4,30 mM Pro	1,67Bb	1,02CDc	2,1Ca	3,6Fc	6,5Eb	9,2Ea
MS + 4,30 mM Pro	MS controle	1,08Dc	1,55Bb	2,1Ca	5,4Ec	20,0Aa	11,3Db
MS + 4,30 mM Pro	MS + 2,15 mM Pro	1,41Ca	0,79Ec	1,22Eb	3,2FGc	6,5Eb	14,0Ba
MS + 4,30 mM Pro	MS + 4,30 mM Pro	0,86Ec	2,50Ab	2,52Ba	9,7Cc	15,0Ba	12,0Cb
<b>CV (%)<sup>1</sup></b>		<b>5,41</b>			<b>2,87</b>		

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (pré-tratamento + encapsulamento) e médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha (duração da desidratação em fluxo) diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Exceto para o comprimento da parte aérea e número de folhas, cujos explantes desidratados durante quatro horas, obtiveram maior incremento no desenvolvimento da parte aérea, no meio com a maior concentração de prolina (4,30 mM, 2,5 cm e 15 folhas por explante).

Sabe-se que o crescimento do sistema radicular deve acompanhar o desenvolvimento do sistema aéreo para que a planta possa se adaptar as condições ex vitro, estes dados confirmam esta relação, principalmente no meio com a inclusão de prolina (2,15 mM) (Tabelas 7 e 8).

Tabela 8. Comprimento de raiz (CR) e número de raízes de gemas de morangueiro 'Sugyeong' encapsuladas e desidratadas em fluxo (0, 4 e 8 horas) antes da imersão em NL, após 56 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Pré-tratamento	Encapsulamento	CR (cm)			Número de raízes		
		0 h	4 h	8 h	0 h	4 h	8 h
MS controle	MS controle	0,2Ea*	0,0Cb	0,0Eb	0,6Ca	0,0Cb	0,0Eb
MS controle	MS + 2,15 mM Pro	0,0Fb	0,0Cb	0,5Ca	0,0Db	0,0Cb	1,0BCa
MS controle	MS + 4,30 mM Pro	0,0Fa	0,0Ca	0,0Ea	0,0Da	0,0Ca	0,0Ea
MS + 2,15 mM Pro	MS controle	1,3Ab	1,0Aa	3,0Aa	1,7Ac	7,3Aa	4,0Ab
MS + 2,15 mM Pro	MS + 2,15 mM Pro	0,3Db	0,8Bc	1,0Ba	0,5Cc	2,0Ba	1,1Bb
MS + 2,15 mM Pro	MS + 4,30 mM Pro	0,7Ba	0,0Cb	0,6Ca	1,6Aa	0,0Cc	0,8Cb
MS + 4,30 mM Pro	MS controle	0,0Fb	0,0Cb	0,2Da	0,0Db	0,0Cb	0,4Da
MS + 4,30 mM Pro	MS + 2,15 mM Pro	0,5Ca	0,0Cb	0,0Eb	1,1Ba	0,0Cb	0,0Eb
MS + 4,30 mM Pro	MS + 4,30 mM Pro	0,2DEa	0,0Cb	0,0Eb	0,4Ca	0,0Cb	0,0Eb
<b>CV (%)<sup>1</sup></b>		<b>12,39</b>			<b>10,78</b>		

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (pré-tratamento + encapsulamento) e médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha (duração da desidratação em fluxo) diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Era esperado encontrar explantes com menor conteúdo de massa seca quando foram desidratados por mais tempo (8 horas), mas esta relação não foi

observada, apresentando valores pouco variáveis entre os tempos e meios testados (Tabela 9).

Tabela 9. Massa fresca e massa seca de gemas de morangueiro 'Sugyeong' encapsuladas e desidratadas em fluxo (0, 4 e 8 horas) antes da imersão em NL, após 56 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Pré-tratamento	Encapsulamento	Massa Fresca (g)			Massa Seca (g)		
		0 h	4 h	8 h	0 h	4 h	8 h
MS controle	MS controle	0,26Bb*	0,19CDc	0,36Ba	0,058Aa	0,041Cb	0,062Aa
MS controle	MS + 2,15 mM Pro	0,27Ba	0,15Db	0,15Db	0,057Aa	0,032CDb	0,026EFb
MS controle	MS + 4,30 mM Pro	0,28Ba	0,15Db	0,14Db	0,06Aa	0,028Db	0,018Fc
MS + 2,15 mM Pro	MS controle	0,40Ab	0,19CDc	0,47Aa	0,059Aa	0,028Db	0,06ABa
MS + 2,15 mM Pro	MS + 2,15 mM Pro	0,21BCb	0,23Cb	0,36Ba	0,04Bb	0,042Cab	0,05BCa
MS + 2,15 mM Pro	MS + 4,30 mM Pro	0,22BCa	0,16Db	0,26Ca	0,038Ba	0,026Db	0,031DEab
MS + 4,30 mM Pro	MS controle	0,18Cc	0,45Aa	0,26Cb	0,035Bb	0,071Aa	0,038CDb
MS + 4,30 mM Pro	MS + 2,15 mM Pro	0,16Cb	0,36Ba	0,17Db	0,03Bb	0,06ABa	0,028DEFb
MS + 4,30 mM Pro	MS + 4,30 mM Pro	0,18Cb	0,39ABa	0,38Ba	0,031Bb	0,057Ba	0,05BCa
<b>CV (%)<sup>1</sup></b>		<b>10,48</b>			<b>10,51</b>		

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (pré-tratamento + encapsulamento) e médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha (duração da desidratação em fluxo) diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

A porcentagem de umidade dos explantes desenvolvidos in vitro após 56 dias de recultivo evidencia a importância da inclusão da prolina tanto nos pré-tratamentos quanto na matriz de encapsulamento, pois nota-se que explantes oriundos do tratamento controle (sem prolina exógena) apresentaram as menores porcentagens de umidade nos três tempos de desidratação, sendo estas mais sensíveis a perda de água que explantes oriundos de tratamentos com prolina (Tabela 10).

Os dados encontrados neste protocolo para o morangueiro 'Sugyeong', ao qual não foi obtido sobrevivência após a criogenia vão ao encontro dos resultados reportados por Melo (2008), ao criopreservar ápices caulinares de *Sacharum* ssp. L. comprovou que independentemente da combinação adotada de concentração de sacarose versus tempo de pré-cultivo versus tempo de secagem versus método de descongelamento, a taxa de sobrevivência obtida, quando os explantes foram criopreservados, foi nula.

Tabela 10. Porcentagem de umidade das gemas de morangueiro 'Sugyeong' encapsuladas e desidratadas em fluxo (0, 4 e 8 horas) antes da imersão em NL, após 56 dias de recultivo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

Pré-tratamento	Encapsulamento	Umidade (%)		
		0 h	4 h	8 h
MS controle	MS controle	77,0Fc	78,2Fb	82,6Ea
MS controle	MS + 2,15 mM Pro	79,1DEb	79,9Ec	83,6Da
MS controle	MS + 4,30 mM Pro	78,1EFc	80,5Eb	86,0Ba
MS + 2,15 mM Pro	MS controle	85,0Ab	85,0ABb	88,3Aa
MS + 2,15 mM Pro	MS + 2,15 mM Pro	80,6Cc	81,8Db	86,2BCa
MS + 2,15 mM Pro	MS + 4,30 mM Pro	82,2Bc	83,5Cb	88,4Aa
MS + 4,30 mM Pro	MS controle	79,8CDc	84,3BCb	85,3Ca
MS + 4,30 mM Pro	MS + 2,15 mM Pro	80,7Cb	83,5Ca	83,6Da
MS + 4,30 mM Pro	MS + 4,30 mM Pro	82,8Bc	85,7Ab	87,0Ba
<b>CV (%)<sup>1</sup></b>		<b>0,46</b>		

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (pré-tratamento + encapsulamento) e médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma linha (duração da desidratação em fluxo) diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Mesmo não obtendo nenhuma regeneração pós-criopreservação, pode-se dizer que os resultados encontrados para o morangueiro 'Sugyeong' podem ser aproveitados para o desenvolvimento futuro de protocolos utilizando tempos maiores de desidratação em fluxo e com a inclusão de prolina nos pré-tratamentos.

#### 4 Conclusão

A criopreservação de gemas de morangueiro 'Sugyeong' pelo protocolo de encapsulamento-desidratação deve ser realizada com tempos maiores de desidratação em fluxo, até o teor de umidade crítico.

A inclusão de prolina na cápsula aumenta a tolerância a desidratação nas concentrações testadas, não sendo tóxica aos tecidos vegetais.

#### Considerações Finais

Um eficiente protocolo de conservação in vitro via crescimento lento foi obtido através deste estudo com a redução do metabolismo dos explantes de morangueiro e concomitante retomada do crescimento sem afetar a viabilidade e multiplicação através da redução da temperatura para 4°C em explantes inoculados com o sistema radicular formado sobre o meio contendo sorbitol, permanecendo neste sistema durante um ano sem a necessidade de subcultivos ou troca de meio de cultura. O protocolo obtido será utilizado no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado para a manutenção dos genótipos de morangueiro utilizados no programa de melhoramento genético, criando um banco de germoplasma do morangueiro.

A criopreservação é uma técnica recente no Brasil, principalmente com espécies vegetativas, que contém elevado teor de água e este estudo foi o pioneiro, onde muitos resultados preliminares foram encontrados para as cultivares de morangueiro testadas.

Novos estudos devem ser realizados empregando-se a técnica de encapsulamento-vitrificação, aumentando o período de pré-aclimação a 4°C, avaliando mensalmente o comportamento do material vegetal até se obter um tempo ideal. A solução de PVS2 a 24°C deverá ser testada em períodos superiores a duas horas.

No protocolo de encapsulamento-desidratação sugere-se a quantificação da desidratação das cápsulas a cada uma ou duas horas durante 24 horas para se obter a curva de desidratação completa, além de utilizar soluções concentradas de sacarose na matriz de encapsulamento.

A prolina, considerando-se que seu teor aumenta em função do estresse dos tecidos, deve fazer parte das investigações em estudos futuros de criopreservação. É um aminoácido indicador de estresse extremamente importante, não somente em estudos bioquímicos, mas também em moleculares.

Com os resultados obtidos através da criopreservação com as etapas anteriores ao congelamento em nitrogênio líquido, novos protocolos devem ser

testados para o morangueiro, analisando a viabilidade de se usar a tecnologia do encapsulamento das gemas para o armazenamento a 4°C por um determinado período, além da facilidade para o intercâmbio entre bancos de germoplasma.

## Referências

ABDALLAH, F. B.; GOFFART, J. P. Potential indicators based on leaf flavonoids content for the evaluation of potato crop nitrogen status. In: 17<sup>th</sup> Nitrogen Workshop –

Innovations for sustainable use of nitrogen resources, 2012, Wexford. **Anais...** 2012. p. 1-18.

AHANGER, M. A.; TYAGI, S. R.; WANI, M. R.; AHMAD, P. Drought Tolerance: Role of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients. In: AHMAD, P.; WANI, M. R. **Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment**. Springer, New York, p. 25-55, 2013.

ALMEIDA, I. R. de; STEINMETZ, S.; REISSER JÚNIOR, C.; ANTUNES, L. E. C.; ALBA, J. M. F.; MATZENAUER, R.; RADIN, B. **Zoneamento Agroclimático para Produção de Morango no Rio Grande do Sul**. Embrapa Clima Temperado, Documento 283, 2009. 28 p.

AMOO, S. O.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. The role of meta-topolins in alleviating micropropagation problems. **Plant Growth Regulators**, v. 63, n. 2, p. 197-206, ago. 2010.

ANJUM, F.; RISHI, V.; AHMAD, F. Compatibility of osmolytes with Gibbs energy of stabilization of proteins. **Biochimica et biophysica acta-protein structure and molecular enzymology**, v. 1476, p. 75-84, 2000.

ANTUNES, L. E. C.; DUARTE FILHO, J. Produção de mudas de morango. In: SANTOS, A. M. dos; MEDEIROS, A. R. M. **Sistemas de produção**, 5. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005.

ANTUNES, L. E. C.; PERES, N. A. Strawberry production in Brazil and South America. **International Journal of Fruit Science**, Philadelphia, v. 13, n. 1-2, p. 156-161, 2013.

ANTUNES, L. E. C.; RISTOW, N. C.; KROLOW, A. C. R.; CAPENEDO, S.; REISSER JÚNIOR, R. N. C. Yield and quality of strawberry cultivars. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 222-226, abr./jun. 2010.

AREMU, A. O.; BAIRU, M. W.; DOLEZAL, K.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. Topolins: A panacea to plant tissue culture challenges? **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 108, p. 1-16, 2012.

ASHRAF M.; FOOLAD M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, p. 206-216, 2007.

BACHIRI, Y.; GAZEAU, C.; HANSZ, J.; MORISSET, C.; DEREUDDRE, J. Successful cryopreservation of suspension cells by encapsulation-dehydration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 43, p. 241-248, 1995.

BADONI, A.; CHAUHAN, J. S. Conventional *vis -α- vis* Biotechnological Methods of Propagation in Potato: A Review. **Stem Cell**, v. 1, p. 1-6, 2010.

BAIRU, M. W.; AREMU, A. O.; VAN STADEN, J. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. **Plant Growth Regulation**, v. 63, n. 2, p. 147-173, 2011.

BENELLI, C.; CARLO, A. de; ENGELMANN, F. Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees of *Actinidia*, *Diospyros*, *Malus*, *Olea*, *Prunus*, *Pyrus* and *Vitis*. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 175-185, 2013.

BENSON, E. E.; JOHNSTON, J.; MUTHUSAMY, J.; HARDING, K. Physical and engineering perspectives of *in vitro* plant cryopreservation. In: GUPTA, D. S.; IBARAKI, Y. eds. **Plant Tissue Culture Engineering**. Springer, p. 441-476, 2006.

BEYENE, G. T.; KEHOE, E.; MACSIURTAIN, M.; HUNTER, A. Effect of different transplanting dates and runner types on quality and yield of 'Elsanta' strawberry. **Acta Horticulturae**, v. 926, p. 483-489, 2012.

BHATTI, S.; JHA, G. Current trends and future prospects of biotechnological interventions through tissue culture in apple. **Plant Cell**, v. 29, p. 1215-1225, 2010.

BISOGNIN, D. A. Produção de plantas matrizes de morangueiro. In: SEMINÁRIO SOBRE CULTIVO HIDROPÔNICO DO MORANGUEIRO, 2007, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 2007. 106 p.

BORDIGNON JÚNIOR, C. L. **Análise química de cultivares de morango em diferentes sistemas de cultivo e época de colheita**. 2008. 132 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2008.

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

BRASIL. **O Bioma Cerrado**. Brasília, Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 25 ago 2016.

BUCCI, A.; FAEDI, W.; BARUZZI, G. Botanica. Origine ed evoluzione. In: AA.VV. **La fragola, coordinamento scientifico** di W. Faedi. Collana Coltura&Cultura, ideata e coordinata da R. Angelini. Bayer CropScience, Ed. Script, Bologna. 2010.

BURBULIS, N.; JONYTIENE, V.; KUPRIENE, R.; BLINSTRUBIENE, A. Changes in proline and soluble sugars content during cold acclimation of winter rapeseed shoots *in vitro*. **Journal of Food Agriculture & Environment**, v. 9, p. 371-374, 2011.

BURRITT, D. J. Efficient cryopreservation of adventitious shoots of *Begonia x erythrophylla* using encapsulation-dehydration requires pretreatment with both ABA and proline. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 95, p. 209-215, 2008.

BURRITT, D. J. Proline and the cryopreservation of plant tissues: functions and practical applications. In: KATKOV, I. (ed.). **Current Frontiers in Cryopreservation**. 2012. p. 415-430

- CALVETE, E. O.; AZEVEDO, M.; BORDIGNON, M. H.; SUZIN, M. Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas in vitro e ex vitro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 649-653, dez. 2002.
- CALVETE, E. O.; MARIANI, F.; WESP, C. D. L.; NIENOW, A. A.; CASTILHOS, T.; CECCHETTI, D. Fenologia, produção e teor de antocianinas de cultivares de morangueiro em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 396-401, 2008.
- CARVALHO, A. C.; TORRES, A. C.; BRAGA, E. J. B.; LEMOS, E. E.; SOUZA, F. V.; WILLADINO, L.; CÂMARA, T. R. Glossário de Cultura de Tecidos de Plantas. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, v. 7, n. 1, p. 30-60, 2011.
- CARVALHO, S. F. **Produção, qualidade e conservação pós-colheita de frutas de diferentes cultivares de morangueiro nas condições edafoclimáticas de Pelotas-RS**. 2013. 104 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.
- CASWELL, K. L.; KARTHA, K. K. Recovery of plants from pea and strawberry meristems cryopreserved for 28 years. **CryoLetters**, v. 30, n. 1, p. 41-46, 2009.
- CID, L. P. B. **Cultivo in vitro de plantas**. Embrapa, 3ª ed., 2014. 325 p.
- CLAVERO-RAMÍREZ, I.; GÁLVEZ-FARFÁN, J.; LÓPEZ-ARANDA, J. M.; GONZÁLEZ-BENITO, M. E. Apex cryopreservation of several strawberry genotypes by two encapsulation-dehydration methods. **CryoLetters**, v. 26, n. 1, p. 17-24, 2005.
- COUTO, M.; WAGNER JÚNIOR, A.; QUEZADA, A. C. Efeitos de diferentes substratos durante a aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto mirabolano 29C (*Prunus cesarifera* EHRH) em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Agrocência**, Pelotas, v. 9, n. 2, p. 125-128, 2003.
- DAUD, N.; TAHA, R. M.; HASBULLAH, N. A. Artificial seed production from encapsulated micro shoots of *Saintpaulia ionantha* Wendl. (African Violet). **Journal of Applied Sciences**, New York, v. 8, n. 24, p. 4662-4667, dec. 2008.
- DIXIT, S.; AHUJA, S.; NARULA, A.; SRIVASTAVA, P. S. Cryopreservation: a potencial tool for long-term conservation of medicinal plants. In: SRIVASTAVA, P. S.; NARULA, A.; SRIVASTAVA, S. eds. **Plant biotechnology and molecular markers**. Kluwer Academic Publishers, Holanda??, Nueva Delhi, India, 2004. 400 p.
- DOBRÁNSKI, J.; SILVA, J. A. Micropropagation of apple - A review. **Biotechnonology Advances**, v. 28, p. 452-488, 2010.
- DUSSERT, S.; CHABRILLANGE, N.; MONTILLET, J-L.; AGNEL, J-P.; ENGELMANN, F.; NOIROT, M. Basis of coffee seed sensitivity to liquid nitrogen exposure: oxidative stress or imbibitional damage? **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 119, n. 4, p. 534-543, mar. 2003.

DUTRA, L. F.; SILVA, N. D. G. da; DONINI, L. P.; NINO, A. F. P.; SILVA, F. O. X. da; VIEIRA, F. C. B. **Protocolos de Micropropagação de Plantas IV - Morangueiro**. Embrapa Clima Temperado, Documento 345, nov. 2012. 20 p.

ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. **Plant Genetic Resources**, Newsletter, v. 112, p. 9-18, 1997.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 40, p. 427-433, 2004.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 47, n. 1, p. 5-16, fev. 2011.

ENGELMANN, F.; GONZALEZ-ARNAO, M. T.; WU, Y.; ESCOBAR, R. The development of encapsulation dehydration. In: REED B. M. (ed.) **Plant cryopreservation: a practical guide**. Springer, New York, p. 3-13, 2008.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 961-965, jul/ago, 2005.

FABRE, J.; DEREUDDRE, J. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. **CryoLetters**, v. 11, p. 413-426, 1990.

FACHINELLO, J. C.; PASA, M. D. S.; SCHMITZ, J. D.; BETEMPS, D. L. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, volume especial, E, p. 109-120, 2011.

FAGHERAZZI, A. F.; COCCO, C.; ANTUNES, L. E. C.; SOUZA, J. A.; RUFATO, L. La fragolicoltura brasiliana guarda avanti. **Rivista di Frutticoltura e di Ortofrutticoltura**, Bologna, v. 6, p. 20-24, 2014.

FAO. Faostat: agricultural production strawberry. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 3 jan 2017.

FARIA, G. A.; COSTA, M. A. P. C.; JUNGHANS, T. G.; LEDO, C. A. S.; SOUZA, A. S. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação in vitro de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 267-270, 2006.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, p. 109-112, 2014.

FLECK, R. A.; BENSON, E. E.; BREMNER, D. H.; DAY, J. G. Studies of free radical-mediated cryoinjury in the unicellular green alga *Euglena gracilis* using a non-destructive hydroxyl radical assay: A novel approach for developing protistan cryopreservation strategies. **Free Radical Research**, v. 32, p. 157-170, 2000.

FONSECA, A. P. da; SILVA, E. C. da; PEREIRA, M. B.; OLIVEIRA, R. P. de; DORNELLES, A. L. C. Estabilidade fenotípica de genótipos de morangueiro

submetidos a número variável de subcultivos *in vitro*. **Ciência Rural**, v. 43, n. 8, p. 1345-1350, ago. 2013.

FORTES, G. R de L.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Preservação *in vitro* de batata com ácido acetilsalicílico e duas fontes de carboidrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 10, p. 1261-1264, 2001.

FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. N.; PUTTKAMMER, C. C.; SILVA, J. M. da; ANJOS, K. G. dos; OLIVEIRA, E. M.; GUERRA, M. P. High-efficiency cryopreservation of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze embryogenic cultures: ultrastructural characterization and morpho-physiological features. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 124, p. 307-318, 2016.

GALLI, V.; BOROWSKI, J. M.; PERIN, E. C.; MESSIAS, R. S.; LABONDE, J.; PEREIRA, I. S.; ANJOS SILVA, S. D.; ROMBALDI, C. V. Validation of reference genes for accurate normalization of gene expression for real time-quantitative PCR in strawberry fruits using different cultivars and osmotic stresses. **Gene**, California, v. 554, p. 205-214, 2015.

GEORGE, E. F.; DEBERGH, P. C. Micropropagation: uses and methods. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G-J. de. (eds) **Plant Propagation by Tissue Culture**, 3 ed., Dordrecht, Netherlands: Springer, 2008.

GIMÉNEZ, G. **Seleção e propagação de clones de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.)**. 2008. 119 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

GONÇALVES, A. M.; VIGNOLO, G. K.; ANTUNES, L. E. C. Produção de mudas de morango. In: NASCIMENTO, W. M.; PEREIRA, R. B. **Hortaliças de propagação vegetativa: tecnologia de multiplicação**. 1 ed. Brasília: Embrapa, 2016. p. 153-174.

GONZALEZ-ARNAO, M. T.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: Review and case study on sugarcane. **CryoLetters**, v. 27, p. 155-168, 2006.

GONZALEZ-ARNAO, M. T.; PANTA, A.; ROCA, W. M.; ESCOBAR, R. E.; ENGELMANN, F. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, n. 1, p. 1-13, 2008.

GROPPIA M. D.; BENAVIDES M. P. Polyamines and abiotic stress: Recent advances. **Amino Acids**, v. 34, p. 35-45, 2008.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; DUCROQUET, J. P. H. J.; NODARI, R. O.; REIS, M. S. Somatic embryogenesis in *Feijoa sellowiana*: Genotype Response, Auxinic shock and Synthetic Seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, p. 117-128, 2001.

- HALMAGYI, A.; DELIU, C. Cryopreservation of strawberry shoot tips by encapsulation-dehydration. **Botanicae Horti Agrobotanici**, v. 34, p. 28-33, 2006.
- HARE, P. D.; CRESS, W. A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 21, p. 79-102, 1997.
- HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, Bangalore, v. 85, n. 12, p. 1704-1712, 2003.
- HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. **Scientia horticulturae**, v. 108, p. 105-120, 2006.
- HERINGER, A. S.; STEINMACHER, D. A.; FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. N.; REE, J. F.; GUERRA, M. P. Global DNA methylation profiles of somatic embryos of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) are influenced by cryoprotectants and droplet-vitrification cryopreservation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 114, p. 365-372, 2013.
- HIRAI, D.; SAKAI, A. Simplified cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) by optimizing conditions for osmoprotection. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 961-966, 2003.
- HIRAI, D.; SHIRAI, K.; SHIRAI, S.; SAKAI, A. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) by encapsulation-vitrification. **Euphytica**, v. 101, p. 109-115, 1998.
- HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 431-438, 2001.
- HOFFMAN, L.; DACOSTA, M.; EBDON, S. J.; WATKINS, E. Physiological changes during cold acclimation of perennial ryegrass accessions differing in freeze tolerance. **Crop Science**, v. 50, n. 3, p. 1037-1047, 2010.
- HUNG, C. D.; TRUEMAN, S. J. Preservation of encapsulated shoot tips and nodes of the tropical hardwoods *Corymbia torelliana*, *C. citriodora* and *Khaya senegalensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Urbana, v. 109, n. 2, p. 341-352, mai. 2012.
- IKHLAQ, M.; HAFIZ, I. A.; MICHELI, M.; AHMAD, T.; ABBASI, N. A.; STANDARDI, A. In vitro storage of synthetic seeds: Effect of different storage conditions and intervals on their conversion ability. **African Journal of Biotechnology**, Johannesburg, v. 9, n. 35, p. 5712-5721, 2010.
- INOCENTE, G. C. C. **Embriogênese somática e sementes sintéticas em *Feijoa sellowiana* Berg.: Sistema referência e aspectos morfo-histológicos e bioquímicos**. 2002. 95 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

JAVADIAN, N.; KARIMZADEH, G.; MAHFOOZI, S.; GHANATI, F. Cold-induced changes of enzymes, proline, carbohydrates, and chlorophyll in wheat. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.57, p. 540-547, 2010.

JOSÉ, S. C. B. R. **Manual de curadores de germoplasma – Vegetal: Conservação ex situ (Colbase – Sementes)**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Documento 317, 2010. 12 p.

KACZMARCZYK, A.; SHVACHKO, N.; LUPYSHEVA, Y.; HAJIREZAEI, M. R.; KELLER, E. R. J. Influence of altering temperature preculture on cryopreservation results for potato shoot tips. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 1551-1558, 2008.

KARLSSON, J. O. M. A theoretical model of intracellular devitrification. **Cryobiology**, Rockville, v. 42, p. 154-169, 2001.

KARTHA, K. K.; LEUNG, N. L.; PAHL, K. Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v. 105, p. 481-484, 1980.

KAVIANI, B. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 6, p. 778-800, 2011.

KELLER, E. R. J.; SENULA, A.; LEUNUFNA, S.; GRÜBE, M. Slow growth storage and cryopreservation - tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. **International Journal of Refrigeration**, v. 29, p. 411-417, 2006.

KOVALCHUK, I.; LYUDVIKOVA, Y.; VOLGINA, M.; REED, B. M. Medium, container and genotype all influence in vitro cold storage of apple germplasm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 96, n. 2, p. 127-136, 2009.

LÉDO, A. da S.; SILVA JÚNIOR, J. F. S.; BARBOZA, S. B. S. C. **Germinação in vitro da mangabeira**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, Boletim Técnico, 2007. 16 p.

LEMO, E. E. P.; FERREIRA M. S.; ALENCAR, L. M. C.; NETO, C. E. R.; ALBUQUERQUE, M. M. Conservação in vitro de germoplasma de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 10, p. 1359-1364, 2002.

LI, B-Q.; FENG, C-H.; HU, L-Y.; WANG, M-R.; CHEN, L.; WANG, Q-C. Shoot regeneration and cryopreservation of shoot tips of apple (*Malus*) by encapsulation – dehydration. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 50, n. 3, p. 357-368, jun. 2014.

LISEK, A.; ORLIKOWSKA, T. In vitro storage of strawberry and raspberry in calcium alginate beads at 4°C. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 78, p. 167-172, 2004.

LOPES, K. P. **Criopreservação de germoplasma de oleaginosas de importância econômica para o nordeste brasileiro**. 2005. 155 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2005.

LYNCH, P. T.; SIDDIKA, A.; JOHNSTON, J. W.; TRIGWELL, S. M.; MEHRA, A.; BENELLI, C.; LAMBARDI, M.; BENSON, E. E. Effects of osmotic pretreatments on oxidative stress, antioxidant profiles and cryopreservation of olive somatic embryos. **Plant Science**, v. 181, p. 47-56, 2011.

MAGGIO, A.; MIYAZAKI, S.; VERONESE, P. Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? **Plant Journal**, v. 31, p. 699-712, 2002.

MANSUR, E.; PACHECO, G.; VIEIRA, M. L. C. Conservação in vitro de Germoplasma. In: BORÉM, A.; LOPES, M. T. G.; CLEMENT, C. R. (Eds.). **Domesticação e Melhoramento: Espécies Amazônicas**. Viçosa, p. 167-188, 2009.

MARÇO, P. H. Estudo da influência da radiação e pH no comportamento cinético de antocianinas de plantas do gênero *hibiscus* por métodos quimiométricos. 2009. 209 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

MARQUES, G. N. **Substrato, combinação de cultivares e mudas de morangueiro produzidas em cultivo sem solo**. 2016. 150f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Programa de pós-graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

MARTIN, K. P. Clonal propagation, encapsulation and reintroduction of *Ipsea malabarica* (Reichb. F.) J.D. Hook., an endangered orchid. **In vitro Cell and Developmental Biology-Plant**, v. 39, p. 322-326, 2003.

MATYSIK, J.; ALIA, ; BHALU, B.; MOHANTY, P. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. **Current Science**, v. 82, p. 525-532, 2002.

MOLINA, A. M. R. **A cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) no estado de Santa Catarina: sistemas de produção e riscos climáticos**. 2016. 195 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

MOLINA, T. F.; TILLMANN, M. Â. A.; DODE, L. B.; VIÉGAS, J. Crioconservação em sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 3, p. 72-81, 2006.

MUNIZ, A. W.; SÁ, E. L. de; DALAGNOL, G. L.; AMÉRICO FILHO, J. Rooting and acclimatization of micropropagated marubakaido apple rootstock using *Adesmia latifolia* rhizobia. **Springer Plus**, v. 4, n. 2, p. 437-441, 2013.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAVATEL, J. C.; CAPRON, M. Cryopreservation of alginate-coated strawberry axillary buds. **Acta Horticulturae**, v. 2, n. 439, p. 659-661, 1997.

NICK, C.; SILVA, D. J. H.; MATTEDI, A. P.; PEDROSA, D. A. Conservação ex situ dos recursos fitogenéticos. In: PEREIRA, T. N. S. (ed.) **Germoplasma: conservação, manejo e uso no melhoramento de plantas**, Viçosa, MG: Arka, 2010. p. 59-88.

NIINO, T.; TANAKA, D.; ICHIKAWA, S.; TAKANO, J.; IVETTE, S.; SHIRATA, K.; UEMURA, M. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical shoot tips of strawberry by vitrification. **Plant Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 75-80, 2003.

NORCAL NURSERY. **Strawberry Cultivars**. USA, 2013. Disponível em: <<http://norcalnursery.com/strawberry-varieties/>>. Acesso em: 10 mai. 2016.

OLIVEIRA, A. C. B.; BONOW, S. Novos desafios para o melhoramento genético da cultura do morangueiro no Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 33, n. 268, p. 21-26, 2012.

OLIVEIRA, C. S.; COCCO, C.; ANDRIOLO, J. L.; BISOGNIN, D. A.; ERPEN, L.; GIMÉNEZ, G. F. Produção e qualidade de propágulos de morangueiro em diferentes concentrações de nitrogênio no cultivo sem solo. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 57, n. 4, p. 554-559, 2010.

OLIVEIRA, R. P. de; NINO, A. F. P.; SCIVITTARO, W. B. Mudanças certificadas de morangueiro: maior produção e melhor qualidade da fruta. **A Lavoura**, v. 108, p. 35-38, 2005.

OLIVEIRA, R. P. de; NINO, A. F. P.; SILVA, F. O. X. da; BRAHM, R. U. **Produção de matrizes de morangueiro por meio da cultura de tecidos**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, Sistemas de Produção 7, 2005, 34 p.

OLIVEIRA, R. P. de; NINO, A. F. P.; SILVA, F. O. X. da; BRAHM, R. U. **Produção de matrizes de morangueiro por meio da cultura de tecidos**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, Sistemas de Produção 7, 2005, 34 p.

OLIVEIRA, R. P. de; SCIVITTARO, W. B. Produção de frutos de morango em função de diferentes períodos de vernalização das mudas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 91-95, 2009.

PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant Science**, v. 168, p. 45-55, 2005.

PASA, M. da S.; CARVALHO, G. L.; SCHUCH, M. W.; SCHIMITZ, J. D.; TORCHELSEN, M. de M.; NICKEL, G. K.; SOMMER, L. R.; LIMA, T. S.; CAMARGO, S. S. Qualidade de luz e fitoreguladores na multiplicação e enraizamento *in vitro* da amoreira-preta 'Xavante'. **Ciência Rural**, v. 42, n. 8, p. 1392-1396, 2012.

PAUNESCU, A. Biotechnology for endangered plant conservation: A critical overview. **Romanian Biotechnological Letters**, Bucharest, v. 14, n. 2, p. 4095-4103, 2009.

PILATTI, F. K.; AGUIAR, T.; SIMÕES, T.; BENSON, E. E.; VIANA, A. M. In vitro and cryogenic preservation of plant biodiversity in Brazil. **In vitro Cellular & Developmental Biology**, Gaithersburg, v. 47, n. 1, p. 82-98, fev. 2011.

PORTELA, I. P.; PEIL, R. M. N.; ROMBALDI, C. V. Efeito da concentração de nutrientes no crescimento, produtividade e qualidade de morangos em hidroponia. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 266-273, 2012.

RABIER, J.; LAFFONT-SCHWOB, I.; PRICOP, A.; ELLILI, A.; D'ENJOY-WEINKAMMERER, G.; SALDUCCI, M-D.; PRUDENT, P.; LOTMANI, B.; TONETTO, A.; MASOTTI, V. Heavy metal and arsenic resistance of the halophyte *Atriplex halimus* L. along a gradient of contamination in a French Mediterranean spray zone. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 225, n. 7, p. 1-16, 2014.

RAMON, M.; GEUNS, J. M. C.; SWENNEN, R.; PANIS, B. Polyamines and fatty acids in sucrose precultured banana meristems and correlation with survival rate after cryopreservation. **Cryoletters**, v. 23, p. 345-352, 2002.

RAO, N. K. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 136-145, 2004.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 856 p.

RAZDAN, M. K. **Introduction to plant tissue culture**. 2ª ed. Enfield: Science Publishers. p. 287-306, 2003. 375 p.

RECH FILHO, A. **Biorreatores de imersão temporária e unidades encapsuláveis como ferramentas na consolidação de protocolos de micropropagação de bromélias**. 2004. 74 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

REED, B. M. Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. **CryoLetters**, v. 22, p. 97-104, 2001.

REED, B. M.; SARASAN, V.; KANE, M.; BUNN, E.; PENCE, V. C. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 47, n. 1, p. 1-4, 2011.

RÊGO, G.M.; POSSAMAI, E. **Avaliação dos teores de clorofila no crescimento de mudas de Jequitibá-Rosa (*Cariniana legalis*)**. **Comunicado Técnico 128**, Colombo, PR, Embrapa, dez. 2004.

RHEE, Y.; SEKHON, R. S.; KAEPLER, S. Tissue culture-induced novel epialleles of a Myb transcription factor encoded by pericarp color1 in maize. **Genetics**, v.186, n. 3, p. 843-855, 2010.

ROACH, T.; IVANOVA, M.; BECKETT, R. P.; MINIBAYEVA, F. V.; GREEN, I.; PRITCHARD, H. W.; KRANNER, I. An oxidative burst of superoxide in embryonic axes of recalcitrant sweet chestnut seeds as induced by excision and desiccation. **Physiologia Plantarum**, v. 133, p. 131-139, 2008.

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

ROSA, H. T.; STRECK, N. A.; WALTER, L. C.; ANDRIOLO, J. L.; SILVA, M. R. da. Crescimento vegetativo e produtivo de duas cultivares de morango sob épocas de plantio em ambiente subtropical. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, p. 604-613, 2013.

SÁ, A. J.; LÉDO, A. S.; LÉDO, C. A. S. Conservação in vitro de mangabeira da região nordeste do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 1, p. 57-62, 2011.

SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: BAJAJ, Y. P. S. (ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry**. v. 32. Cryopreservation of plant germplasm I. Springer-Verlag, 1995. p. 53-69.

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet vitrification: a review. **CryoLetters**, v. 28, p. 151-172, 2007.

SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. In: REED, B. (ed.) **Plant cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, p. 33-58, 2008. 534 p.

SANCHEZ, D. H.; SIAHPOOSH, M. R.; ROESSNER, U.; UDVARDI, M.; KOPKA, J. Plant metabolomics reveals conserved and divergent metabolic responses to salinity. **Physiologia Plantarum**, v. 132, p. 209-219, 2008.

SÁNCHEZ-CHIANG, N.; JIMÉNEZ, V. M. Técnicas de conservación in vitro para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. **Agronomía Mesoamericana**, v. 21, n. 1, p. 193-205, 2010.

SANDOVAL, E. Y.; GUERRA, M. P. Encapsulamento de microbrotos de bananeira cv. Grand Naine. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17, 2002, Jaboticabal. **Anais...**, Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Fruticultura (CD-ROM), 2002.

SANHUEZA, R. M. V.; HOFFMANN, A.; ANTUNES, L. E. C.; FREIRE, J. M. Importância da cultura. In: **Sistema de produção de morango para mesa na Região da Serra Gaúcha e Encosta Superior do Nordeste**. Bento Gonçalves, 2005.

SANT, R.; PANIS, B.; TAYLOR, M.; TYAGI, A. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta*) accessions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 92, p. 107-111, 2008.

- SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 20, p. 60-65, 2001.
- SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. Campinas, v.12, p.70-84, 2000.
- SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N. **Manual de curadores de germoplasma-vegetal: criopreservação**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 17p.
- SANTOS, M. C.; LÉDO, A. S.; LÉDO, C. A. S.; SOUZA, F. V. D.; JUNIOR, J. F. S. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação in vitro de segmentos nodais de mangabeira. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 42, n. 3, p. 735-741, 2011.
- SARTOR, F. R.; MORAES, A. M. D.; ALMEIDA, F. D. A. C. Técnicas para criopreservação de gemas de mangabeira. **Revista Agrotecnologia**, Anápolis, v. 3, n. 1, p. 31-39, 2012.
- SASTRY, K. S.; ZITTER, T. A. Management of virus and viroids diseases of crops in the tropics. In: SASTRY, K. S. **Plant virus and viroids diseases in the tropics** (p. 149-480). Springer Netherlands, 2014.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; COSTA, F. H. S. Conservação in vitro de recursos genéticos de plantas: estratégias, princípios e aplicações. In: BARRUETO CID, L. P. (Org.). **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p. 177-234.
- SHARMA, G. E. J. Cryopreservation of equine embryos. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, Santa Barbara, v. 12, n. 1, p. 186-207, mar./abr. 2013.
- SHIBLI, R. A.; MOHAMAD, A. S.; WALID, S. S.; MOHAMMED, M. A. In vitro conservation and cryopreservation of plant genetic resources: A Review. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 24, p. 372-382. 2006.
- SILVA, A. F.; DIAS, M. S. C.; MARO, L. A. C. Botânica e fisiologia do morangueiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 28, n. 236, p. 7-13, 2007.
- SIMON, M. F. **Manual de curadores de germoplasma Vegetal: Conservação in situ**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Documento 322, jul. 2010, 13 p.
- SIQUEIRA, A. B. **Ocorrência de populações naturais de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke. e *Piper peltatum* L. ao longo dos rios Solimões e Amazonas e estratégias de conservação *ex situ* de germoplasma por técnicas in vitro, temperaturas sub zero e criogênicas**. 2010. 123 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.

SMULDERS, M. J. M.; DE KLERK, G. J. Epigenetics in plant tissue culture. **Plant Growth Regulation**, v. 63, p. 137-146, 2011.

SOENGAS, P.; CARTEA, E.; LEMA, M.; VELASCO, P. Effect of regeneration procedures on the genetic integrity of *Brassica oleracea* accessions. **Molecular Breeding**, v. 23, p. 389-395, 2009.

SOLOV'EVA, A. I.; VYSOTSKAYA, O. N.; DOLGIKH, Y. I. Effect of Dehydration Duration of Apices on Characteristics of In Vitro Plants of *Fragaria vesca* after Cryopreservation. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 63, n. 2, p. 243-251, 2016.

SONNEVELD, C.; STRAVER, N. Nutrient solution for vegetables and flowers grown in water or substrates. 10<sup>a</sup> ed. The Netherlands, proefstation voor Tuinbouw onder Glas Te Naaldwijk. (Series: **Voedingsoplossingen Glastuinbouw, n 8**). 1994. 45 p.

STRASSBURGER, A. S.; PEIL, R. M. N.; SCHWENGBER, J. E.; MEDEIROS, C. A. B.; MARTINS, D. D. S.; SILVA, J. B. E. Crescimento e produtividade de cultivares de morangueiro de “dia neutro” em diferentes densidades de plantio em sistema de cultivo orgânico. **Bragantia**, v. 69, n. 3, p. 623-630, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Respostas e adaptações ao estresse abiótico. In: \_\_\_\_\_. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artimed, 2013. p.763-780.

TEIXEIRA, C. P. **Produção de mudas e frutos de morangueiro em diferentes sistemas de cultivo**. 2011. 74 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

TIMM, L. C.; TAVARES, V. E. O.; REISSER JUNIOR, C.; ESTRELA, C. C. **Morangueiro irrigado: aspectos técnicos e ambientais do cultivo**. 1. ed. Pelotas: Editora da Universidade Federal de Pelotas, 2009. 163 p.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, v. 35, p. 753-759, 2008.

VERDIAL, M. F.; NETO, J. T.; MINAMI, K.; FILHO, J. A. S.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; SCARPARE, F. V.; KLUGE, R. A. Fisiologia de mudas de morangueiro produzidas em sistema convencional e em vasos suspensos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 31, n. 2, p. 524-531, 2009.

VERLEYSSEN, H.; SAMYN, G.; VAN BOCKSTAELE, E.; DEBERGH, P. Evaluation of analytical techniques to predict viability after cryopreservation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 77, n. 1, p.11-21, apr. 2004.

VETTORAZZI, R. G. **Caracterização, estabelecimento in vitro e criopreservação de variedades locais de batata-doce (*Ipomoea batatas* L. Lam)**. 2016. 83 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2016.

WANG, Y. L.; FAN, M. J.; LIAW, S. L. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification. **Botanical Bulletin of the Academia Sinica**, v. 46, p. 29-34, 2005.

WOOD, C. W.; REEVES, D. W.; HIMELRICK, D. G. Relationships between chlorophyll meter readings and leaf chlorophyll concentration, N status, and crop yield: a review. **Proceedings Agronomy Society of N.Z.** 23, 1993. p. 1-9.

WOWK, B. Thermodynamic aspects of vitrification. **Cryobiology**, v. 60, n. 1, p. 11-22, feb. 2010.

YAMAMOTO, S.; FUKUI, K.; RAFIQUE, T.; KHAN, N. I.; MARTINEZ, C. R. C.; SEKIZAWA, K.; MATSUMOTO, T.; NIINO, T. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of strawberry by the vitrification method using aluminium cryo-plates. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, v. 10, n. 1, p. 14 -19, 2012a.

YAMAMOTO, S.; RAFIQUE, T.; FUKUI, K.; SEKIZAWA, K.; NIINO, T. Cryo-plate procedure as an effective protocol for cryobanks: case study of mint cryopreservation. **CryoLetters**, v. 33, n. 1, p. 12-23, jan/fev. 2012b.

YAMAMOTO, S.; RAFIQUE, T.; PRIYANTHA, W. S.; FUKUI, K.; MATSUMOTO, T.; NIINO, T. Development of a cryopreservation procedure using aluminium cryo-plates. **CryoLetters**, v. 32, n. 3, p. 256-265, mai/jun. 2011.

YOSHIBA, Y.; KIYOSUE, T.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. **Plant and Cell Physiology**, v. 38, p. 1095-1102, 1997.

ZHAO, M.; WANG, Z.; SU, J.; QIAN, Y. Cryopreservation of In Vitro Cultured Shoot Tips of Strawberry, **Acta Horticulturae**, v. 708, p. 265-270, 2006.

ZHU, L. H.; LI, X. Y.; WELANDER, M. Optimization of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 313-318, 2005.

## **Apêndices**

## Apêndice A – Tabela da Indução do crescimento lento in vitro na temperatura de 24 °C, capítulo 1

Porcentagem de sobrevivência e número de brotações de explantes de morangueiro 'Benícia' em diferentes tipos de meio aos 0, 3 e 6 meses de conservação in vitro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

<b>Sobrevivência (%)</b>				
<b>Tipos de meio</b>	<b>Explante</b>	<b>0 meses</b>	<b>3 meses</b>	<b>6 meses</b>
<b>MS</b>	Parte aérea	100AaA*	70,2AaA	29,5AaB
	Planta inteira	100AaA	75,2AaA	29,2AaB
<b>MS + 20g L<sup>-1</sup> Manitol</b>	Parte aérea	100AaA	57,6AaB	35,4AaB
	Planta inteira	100AaA	0,0BbB	0,0AbB
<b>MS + 40g L<sup>-1</sup> Manitol</b>	Parte aérea	100AaA	0,0BaB	0,0AaB
	Planta inteira	100AaA	0,7BaB	0,0AaB
<b>MS + 20g L<sup>-1</sup> Sorbitol</b>	Parte aérea	100AaA	2,9BbB	0,0AaB
	Planta inteira	100AaA	83,0AaA	24,9AaB
<b>MS + 40g L<sup>-1</sup> Sorbitol</b>	Parte aérea	100AaA	75,6AaA	26,7AaB
	Planta inteira	100AaA	74,9AaA	21,0AaB
<b>C.V. (%)</b>			<b>32,72</b>	
<b>Número de brotações</b>				
<b>Tipos de meio</b>	<b>Explante</b>	<b>0 meses</b>	<b>3 meses</b>	<b>6 meses</b>
<b>MS</b>	Parte aérea	0,0AaC	4,0AaB	8,0AaA
	Planta inteira	0,0AaC	4,4AaB	9,3AaA
<b>MS + 20g L<sup>-1</sup> Manitol</b>	Parte aérea	0,0AaB	2,4ABaAB	5,5ABaA
	Planta inteira	0,0AaA	0,0BaA	0,0CbA
<b>MS + 40g L<sup>-1</sup> Manitol</b>	Parte aérea	0,0AaA	0,1BaA	0,1CaA
	Planta inteira	0,0AaA	0,0BaA	0,0CaA
<b>MS + 20g L<sup>-1</sup> Sorbitol</b>	Parte aérea	0,0AaA	0,0BbA	0,0CbA
	Planta inteira	0,0AaB	2,8ABaB	7,7ABaA
<b>MS + 40g L<sup>-1</sup> Sorbitol</b>	Parte aérea	0,0AaB	1,9ABaAB	4,0BaA
	Planta inteira	0,0AaB	1,4ABaAB	4,1BaA
<b>C.V. (%)<sup>1</sup></b>			<b>89,86</b>	

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (tipos de meio de cultura), médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma coluna (tipos de explante) e médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma linha (períodos de avaliação) diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

## Apêndice B – Tabela da Indução do crescimento lento in vitro na temperatura de 24 °C, capítulo 1

Comprimento da parte aérea e número folhas de explantes de morangueiro 'Benícia' em diferentes tipos de meio aos 0, 3 e 6 meses de conservação in vitro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

<b>Comprimento da parte aérea (cm)</b>				
<b>Tipos de meio</b>	<b>Explante</b>	<b>0 meses</b>	<b>3 meses</b>	<b>6 meses</b>
<b>MS</b>	Parte aérea	1,6AaB*	7,7AaA	7,9AaA
	Planta inteira	3,3AaB	7,3AaA	7,5AaA
<b>MS + 20g L<sup>-1</sup> Manitol</b>	Parte aérea	1,8AaB	4,1BaAB	4,4BaA
	Planta inteira	2,3AaA	2,3BaA	2,3BbA
<b>MS + 40g L<sup>-1</sup> Manitol</b>	Parte aérea	1,4AaA	1,5BaA	1,5BCaA
	Planta inteira	2,1AaA	2,1BaA	2,1BaA
<b>MS + 20g L<sup>-1</sup> Sorbitol</b>	Parte aérea	1,3AaA	1,4BbA	1,4CbA
	Planta inteira	2,7AaB	6,2AaA	6,4AaA
<b>MS + 40g L<sup>-1</sup> Sorbitol</b>	Parte aérea	1,7AaA	2,4BaA	3,4BCaA
	Planta inteira	2,1AaA	3,2BaA	3,5BaA
<b>C.V. (%)</b>			<b>38,5</b>	
<b>Número de folhas</b>				
<b>Tipos de meio</b>	<b>Explante</b>	<b>0 meses</b>	<b>3 meses</b>	<b>6 meses</b>
<b>MS</b>	Parte aérea	3,0AaB	22,7AaA	35,0AaA
	Planta inteira	3,0AaB	23,6AaA	29,3AaA
<b>MS + 20g L<sup>-1</sup> Manitol</b>	Parte aérea	3,0AaC	20,5AaB	34,6AaA
	Planta inteira	3,0AaA	5,2BbA	6,1BCbA
<b>MS + 40g L<sup>-1</sup> Manitol</b>	Parte aérea	3,0AaA	4,2BaA	4,2BaA
	Planta inteira	3,0AaA	4,9BaA	4,9CaA
<b>MS + 20g L<sup>-1</sup> Sorbitol</b>	Parte aérea	3,0AaA	4,0BbA	4,0BbA
	Planta inteira	3,0AaB	19,8AaA	26,8AaA
<b>MS + 40g L<sup>-1</sup> Sorbitol</b>	Parte aérea	3,0AaB	12,8ABaAB	23,7AaA
	Planta inteira	3,0AaB	15,9ABaA	20,6ABaA
<b>C.V. (%)<sup>1</sup></b>			<b>54,58</b>	

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (tipos de meio de cultura), médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma coluna (tipos de explante) e médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma linha (períodos de avaliação) diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

**Apêndice C – Tabela da Indução do crescimento lento in vitro na temperatura de 24 °C, capítulo 1**

Comprimento e número de raízes de explantes de morangueiro 'Benícia' em diferentes tipos de meio aos 0, 3 e 6 meses de conservação in vitro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS, 2017.

<b>Comprimento de raízes (cm)</b>				
<b>Tipos de meio</b>	<b>Explante</b>	<b>0 meses</b>	<b>3 meses</b>	<b>6 meses</b>
<b>MS</b>	Parte aérea	0,0AaB*	5,9AaA	6,3AbA
	Planta inteira	2,3AaB	6,5AaA	8,9AaA
<b>MS + 20g L<sup>-1</sup> Manitol</b>	Parte aérea	0,0AaB	4,1AaA	5,1AaA
	Planta inteira	2,2AaA	2,8BCaA	2,9CaA
<b>MS + 40g L<sup>-1</sup> Manitol</b>	Parte aérea	0,0AaA	0,0BaA	0,0BaA
	Planta inteira	2,2AaA	2,2CaA	2,3CaA
<b>MS + 20g L<sup>-1</sup> Sorbitol</b>	Parte aérea	0,0AbA	0,0BbA	0,0BbA
	Planta inteira	2,4AaB	5,8ABaA	7,8ABaA
<b>MS + 40g L<sup>-1</sup> Sorbitol</b>	Parte aérea	0,0AaB	3,1ABaA	4,4AaA
	Planta inteira	2,1AaA	4,3ABCaA	4,6BCaA
<b>C.V. (%)</b>			<b>48,82</b>	
<b>Número de raízes</b>				
<b>Tipos de meio</b>	<b>Explante</b>	<b>0 meses</b>	<b>3 meses</b>	<b>6 meses</b>
<b>MS</b>	Parte aérea	0,0AaC	21,6AaB	33,6AaA
	Planta inteira	6,8AaB	19,4AaA	22,9AbA
<b>MS + 20g L<sup>-1</sup> Manitol</b>	Parte aérea	0,0AaB	8,8BaAB	12,3BaA
	Planta inteira	5,9AaA	7,5BaA	9,0BaA
<b>MS + 40g L<sup>-1</sup> Manitol</b>	Parte aérea	0,0AaA	0,1BaA	0,1CaA
	Planta inteira	5,8AaA	6,2BaA	7,0BaA
<b>MS + 20g L<sup>-1</sup> Sorbitol</b>	Parte aérea	0,0AaA	0,0BbA	0,0CbA
	Planta inteira	6,7AaB	13,3ABaB	25,0AaA
<b>MS + 40g L<sup>-1</sup> Sorbitol</b>	Parte aérea	0,0AaB	6,5BaAB	12,0BaA
	Planta inteira	6,1AaA	8,3ABaA	10,6BaA
<b>C.V. (%)<sup>1</sup></b>			<b>59,22</b>	

<sup>1</sup> C.V. (%) Coeficiente de variação.

\*Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma coluna (tipos de meio de cultura), médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma coluna (tipos de explante) e médias seguidas por letras maiúsculas distintas, na mesma linha (períodos de avaliação) diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.