

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E
MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**MICROPROPAGAÇÃO DE ALCACHOFRA A
PARTIR DE PLÂNTULAS GERMINADAS *IN VITRO***

SILVANA FÁTIMA DIDONÉ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal.

Passo Fundo, Junho de 2013.

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E
MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**MICROPROPAGAÇÃO DE ALCACHOFRA A
PARTIR DE PLÂNTULAS GERMINADAS *IN VITRO***

SILVANA FÁTIMA DIDONÉ

**Orientadora: Prof. Ph.D. Magali Ferrari Grandó
Coorientadora: Prof. Dra. Eunice Oliveira Calvete**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal.

Passo Fundo, Junho de 2013.



UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA
VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA

ppgAgro

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.

“Micropropagação de Alcachofra a partir de plântulas germinadas *in vitro*”

Elaborada por

Silvana Fátima Didoné

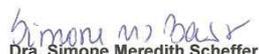
Como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Agronomia – Área de Produção Vegetal

Aprovada em: 21/06/2013
Pela Comissão Examinadora


Dra. Magali Ferrari Grando
Presidente da Comissão Examinadora
Orientadora


Dra. Eunice Oliveira Calvete
Coorientadora
FAMV - UPF


Dr. Nilton Cesar Mantovani
UFMS


Dra. Simone Meredith Scheffer Basso
Coord. Prog. Pós-Graduação em Agronomia


Dr. Hélio Carlos Rocha
Diretor FAMV


Dra. Lizete Augustin
FAMV - UPF

CIP – Catalogação na Publicação

D557m Didoné, Silvana Fátima
Micropropagação de alcachofra a partir de plântulas
germinadas in vitro / Silvana Fátima Didoné. – 2013.
160 f. : il. color. ; 25 cm.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) –
Universidade de Passo Fundo, 2013.
Orientadora : Prof. Ph.D. Magali Ferrari Grando.
Coorientadora : Prof. Dra. Eunice Oliveira Calvete.

1. Alcachofra. 2. Plantio (Cultivo de plantas).
3. Produtividade agrícola. I. Grando, Magali Ferrari,
orientadora. II. Calvete, Eunice Oliveira,
coorientadora. III. Título.

CDU: 635.32

Catalogação: Bibliotecária Marciéli de Oliveira - CRB 10/2113

BIOGRAFIA DO AUTOR

Silvana Fátima Didoné, filha de Olivino Didoné (*in memoriam*) e Lourdes Pimentel Didoné, nasceu no município de Ciríaco, estado do Rio Grande do Sul, aos onze dias do mês de maio de 1969. Graduada pela Universidade de Passo Fundo – Passo Fundo/RS em Ciências Biológicas: Licenciatura plena e Bacharelado em 1998. Especialista em Genética e Evolução Biológica na referida universidade em 2005. Em março de 2011 ingressou no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, na Universidade de Passo Fundo sob a orientação da professora Ph.D. Magali Ferrari Grando e Coorientação da professora Dra. Eunice Oliveira Calvete.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder a vida. Aos meus pais, Olivino Didoné (*in memoriam*) e Lourdes Pimentel Didoné, que sempre acreditaram na minha capacidade e persistência, e com amor me ajudaram a superar os momentos difíceis. Agradeço também a toda minha família, pelo apoio e carinho a mim dedicado.

A Universidade de Passo Fundo, em especial à Faculdade de Agronomia, pela oportunidade e apoio durante o período de realização do trabalho.

Com muito carinho e admiração agradeço a minha orientadora, Prof. Ph.D. Magali Ferrari Grando, pela dedicação, confiança e compreensão nos momentos difíceis. A minha co-orientadora Prof. Dra. Eunice Oliveira Calvete, pelo apoio, dedicação, carinho e momentos de aprendizagem. A Prof. Dra. Lizete Augustin, pelo apoio, incentivo e conhecimentos proporcionados.

Agradeço em especial a toda equipe do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, pelo incentivo para o desenvolvimento deste trabalho, pela amizade e momentos de diversão.

Agradeço as amigas Marilei Suzin mestre, e Angélica Reolon da Costa Doutoranda por todo o carinho e dedicação nos momentos mais difíceis, pelo grande incentivo e disponibilidade na realização deste trabalho. E também, a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	29
2.1 Origem, taxonomia e descrição botânica	29
2.2 Utilizações, importância econômica e cultivo da alcachofra	33
2.3 Métodos de Propagação de Alcachofra	39
2.3.1 Propagação sexual e vegetativa	39
2.3.2 Cultura de Tecidos e Micropropagação.....	42
2.3.3 Micropropagação de Alcachofra	48
2.4 Substratos Hortícolas.....	53
3 MATERIAL E MÉTODOS	57
3.1. EXPERIMENTO I – CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE ÁPICES CAULINARES DE TRÊS CULTIVARES DE ALCACHOFRA PRODUZIDAS NO CAMPO.....	57
3.1.1 Material	57
3.1.2 Fase de Assepsia e isolamento	58
3.1.3 Fase de Multiplicação.....	60
3.1.4 Delineamento experimental e Variáveis analisadas	61
3.2 EXPERIMENTO II – CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE ÁPICES CAULINARES DE PROGÊNIES DE ALCACHOFRA PROVENIENTES DE PLÂNTULAS OBTIDAS DE SEMENTES .	62
3.2.1 Material	62
3.2.2 Fase de Assepsia e Isolamento	63
3.2.3 Variáveis analisadas	65
3.3 EXPERIMENTO III - MICROPROPAGAÇÃO DE ALCACHOFRA A PARTIR DE SEMENTES GERMINADS <i>IN</i> <i>VITRO</i>	65
3.3.1 Material	65
3.3.2 Assepsia da semente, germinação <i>in vitro</i> e obtenção dos explantes.....	66
3.3.4 Fase de Multiplicação.....	68
3.3.5 Variáveis e análise estatística para a fase de estabelecimento e multiplicação	69
3.3.6 Enraizamento.....	70
3.3.7 Aclimatização	71
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	73
4.1 EXPERIMENTO I – CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE ÁPICES CAULINARES DE TRÊS CULTIVARES DE ALCACHOFRA PRODUZIDAS NO CAMPO.....	73

4.1.1 Fase de Isolamento	73
4.1.2 Fase de Multiplicação.....	80
4.2 EXPERIMENTO II – CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE ÁPICES CAULINARES DE PROGÊNIES DE ALCACHOFRA PROVENIENTES DE PLÂNTULAS OBTIDAS DE SEMENTES .	84
4.2.1 Fase de isolamento	84
4.3 EXPERIMENTO III - MICROPROPAGAÇÃO DE ALCACHOFRA A PARTIR DE SEMENTES GERMINADS <i>IN</i> <i>VITRO</i>	88
4.3.1 Germinação <i>in vitro</i>	89
4.3.2 Estabelecimento do cultivo <i>in vitro</i>	91
4.3.3 Fase de Multiplicação.....	99
<i>Taxa de Multiplicação</i>	99
<i>Número médio de folhas, comprimento, massa fresca e seca das</i> <i>brotações</i>	105
<i>Hiperhidricidade</i>	111
4.3.4 Validação da taxa de multiplicação em progênies de alcachofra utilizando a metodologia	115
4.4 Enraizamento	119
4.5 Aclimatização	127
CONCLUSÕES	141
REFERÊNCIAS	142

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Produção mundial de alcachofra segundo a FAO, 2011.....	36
2	Porcentagem de ápices caulinares de alcachofra sobreviventes e contaminados por fungos e bactérias, durante o cultivo em meio de isolamento contendo hipoclorito de sódio, hipoclorito de sódio + gentamicina, e gentamicina.....	74
3	Porcentagem de ápices caulinares de alcachofra contaminados por bactérias, fungos e bactérias + fungos após 30 dias de cultivo em meio de isolamento contendo hipoclorito de sódio, hipoclorito de sódio + gentamicina, e gentamicina.....	76
4	Ápices caulinares de seis progênies de alcachofra, sobreviventes e não sobreviventes após 30 dias de cultivo no meio de isolamento	84
5	Fase de estabelecimento <i>in vitro</i> de explantes do ápice caulinar obtidos de sementes germinadas <i>in vitro</i> de três progênies de alcachofra cultivados em dois meios de cultura	91
6	Taxa de multiplicação de duas progênies de alcachofra em 4 subcultivos em meio de multiplicação contendo MS modificado suplementado com 1mg.L ⁻¹ de BAP e 0,1 mg.L ⁻¹ de ANA.....	99
7	Número médio de folhas por brotações produzidas por duas progênies de alcachofra em quatro subcultivos durante a fase de multiplicação <i>in vitro</i>	105
8	Comprimento das brotações (cm) produzidas por duas progênies de alcachofra em quatro subcultivos durante a fase de multiplicação <i>in vitro</i>	108
9	Massa fresca e massa seca das brotações (g)	

	produzidas por duas progênies de alcachofra em quatro subcultivos durante a fase de multiplicação <i>in vitro</i>	110
10	Porcentagem de plantas com hiperhidricidade no subcultivo I, com dois progênies diferentes de alcachofra e dois meios de cultura (M1 e M2).....	112
11	Taxa de multiplicação, número de folhas e comprimento das brotações de três progênies de alcachofra cultivadas dois meios de cultura no final do subcultivo I.....	116
12	Taxa de multiplicação, número de folhas e comprimento das brotações de três progênies de alcachofra cultivados dois meios de cultura no final do subcultivo I	117
13	Brotos enraizados e não enraizados em duas progênies de alcachofra cultivados <i>in vitro</i> em meio de enraizamento por 30 dias. Teste de ANOVA, probabilidade de médias de Tukey 0,05 % de erro.....	121
14	Médias de maior raiz, número de folhas e volume de raiz observadas em duas progênies de alcachofra no final da fase de enraizamento	125
15	Porcentagem de plântulas/brotações de alcachofra sobreviventes, em três substratos diferentes com e sem raiz, após 30 dias de aclimatização (P1/P2).....	132

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	(a) Brotações de alcachofra coletados do campo e cultivados em substrato, em estufa semi-climatizada; (b) Plantas desenvolvidas após três meses, antes da retirada dos ápices caulinares. FAMV – UPF, Passo Fundo -RS - 2011.....	58
2	Etapas do preparo do material vegetal de alcachofra para o cultivo <i>in vitro</i> (a)Material vegetal medindo cerca de 3,0 cm após a remoção das folhas adultas e porção radical; (b) Processo de Assepsia: Material vegetal; (c) Retirada de ápice caulinar; (d) Meio de isolamento. FAMV/ UPF, Passo Fundo – RS - 2011.....	59
3	a) Plântulas de alcachofra provenientes de sementes de plantas selecionadas de seis progênes C0, com 20 dias; (b) Plântulas de alcachofra doadoras dos ápices caulinares aos 60 dias de cultivo em estufa semi-climatizada, da FAMV - UPF- Passo Fundo- RS- 2012.....	63
4	a) Obtenção das brotações de alcachofra proveniente de plântulas jovens obtidas de 6 progênes de alcachofra; (b) processo de assepsia das brotações. (c) Retirada de ápice caulinar de alcachofra com auxílio de lupa estereomicroscópica em câmara de fluxo laminar. FAMV /UPF- Passo Fundo – RS - 2012.....	64
5	Regiões de corte da plântula de alcachofra proveniente de semente germinada <i>in vitro</i> por 21 dias: região contendo o ápice caulinar, segmento do epicótilo e segmento do hipocótilo.....	67
6	Ápices caulinares de alcachofra no meio de isolamento: contaminação de diferentes clones por bactérias e fungos (após 15 dias de cultivo <i>in</i>	

	<i>vitro</i>).....	75
7	Propágulo de alcachofra no meio de multiplicação em Câmara de fluxo laminar, Subcultivo II. FAMV- UPF – Passo Fundo – RS - 2011.....	80
8	Número e Frequência de propágulos de alcachofra morte e sobreviventes após 3 subcultivos em meio de multiplicação – FAMV-UPF. Passo Fundo – RS- 2011.....	81
9	Porcentagem de morte dos ápices caulinares obtidos de plântulas provenientes de sementes de seis progênies de alcachofra, por infecção bacteriana, fúngica e associação. FAMV-UPF. Passo Fundo – RS- 2011.....	86
10	(a) Germinação de sementes de alcachofra <i>in vitro</i> em meio MS; (b) Plântulas desenvolvidas após 21 dias do cultivo das sementes <i>in vitro</i> FAMV-UPF. Passo Fundo – RS- 2012.....	89
11	Fase do estabelecimento do cultivo <i>in vitro</i> de diferentes explantes de alcachofra: (a) segmentos de hipocótilo (base), (b) segmentos de epicótilo (apical); (c) Região do ápice caulinar, 30 dias de cultivo.....	93
12	(a) Brotações axiliares produzidas pelos propágulos de alcachofra em meio de multiplicação, subcultivo II; (b) Brotações individualizadas para contabilização da taxa de multiplicação e transferência para o subcultivo III..	100
13	(a) Meio de Multiplicação em câmara de fluxo laminar (b) Brotações axiliares produzidas pelos propágulos de alcachofra em meio de multiplicação, subcultivo III.	100
14	Comportamento de duas progênies de alcachofra, ao longo de 4 subcultivos sucessivos. Progênies- P1: B2L4R6; P2: B1L4R7.....	104
15	Brotação de alcachofra, no subcultivo IV, demonstrando o comprimento das brotações.....	109

16	Médias de massa fresca e massa seca de brotações de alcachofra produzidas durante os subcultivos II, III e IV. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).....	111
17	(a) Brotos de alcachofra apresentando hiperhidricidade e broto normal no subcultivo I. (b) Brotos separados e com hiperhiricidade no subcultivo. FAMV – UPF – Passo Fundo,2012.	114
18	(a) Plântula de alcachofra germinada <i>in vitro</i> por 21 dias indicando a região contendo o ápice caulinar; (b) Detalhe da região do ápice caulinar (1 a 2,0 cm) utilizado com explante para iniciar o cultivo <i>in vitro</i> FAMV – UPF – Passo Fundo,2012.....	115
19	Comparação da taxa de multiplicação de progênies de alcachofra cultivadas meio M1 (MS modificado suplementados com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA em quatro subcultivos. (a) Ensaio original e (b) Ensaio de validação.....	118
20	Propágulo de alcachofra após 30 dias em meio MS, sem reguladores de crescimento (Meio de pré-enraizamento) FAMV – UPF- Passo Fundo. 2012.	119
21	Plântulas de alcachofra após 30 dias de cultivo em meio de enraizamento contendo 10 mg.l^{-1} de AIA. a) plântulas não enraizadas; b) Plântula enraizada do progênie P1(B2L4R6) FAMV – UPF – Passo Fundo.2012	124
22	Plântulas de alcachofra após 30 dias de cultivo em meio de enraizamento contendo 10 mg.L^{-1} de AIA. a e b) Plântulas enraizadas e não enraizadas do progênie P2 (B1L4R7) FAMV- UPF-Passo Fundo-RS - 2012	125

- 23 Caracterização física dos substratos utilizados na etapa de aclimatização de mudas de alcachofra produzidas *in vitro* quanto à Porosidade Total (sólidos - PT), Espaço de Aeração (EA), Água Facilmente Disponível (AFD), Água Tamponante (AT) e Água Residual (100 cm de pressão de sucção). FAMV - UPF - Passo Fundo -RS - 2012. S1: Horta 2 ® 100%/ S2: Horta 2® + CAC 50% / S3: CAC 100%..... 128
- 24 Análise química dos três substratos utilizados na aclimatização de plântulas de alcachofra produzidas *in vitro*. FAMV, 2012/13 PASSO FUNDO - RS. S1: Horta 2 ® 100% S2: Horta 2® + CAC 50% S3: CAC 100%..... 130
- 25 Plantas aclimatizadas de alcachofra após 30 dias de cultivo em câmara climatizada; a) plantas cultivadas em vasos de 500 ml, com três diferentes substratos; b) plântula inicialmente não enraizada mostrando o desenvolvimento de novas raízes.. FAMV – UPF – Passo Fundo – RS..... 137
- 26 Plantas de alcachofra após 60 dias de aclimatização; (a) planta da progênie P1 que foi transferida para aclimatização sem apresentar raízes e agora com raízes bem desenvolvidas; (b) Plantas de alcachofra após 60 dias de aclimatização em estufa semi-climatizada. FAMV – UPF – Passo Fundo – RS. 138

**MICROPROPAGAÇÃO DE ALCACHOFRA A
PARTIR DE PLÂNTULAS GERMINADAS *IN VITRO*
SILVANA FÁTIMADIDONÉ ¹**

RESUMO - A alcachofra *Cynara cardunculus* L. Var. *scolymus* Fiori é uma planta herbácea, de fecundação cruzada, pertencente à família Asteraceae, é uma hortaliça de alto valor nutricional e medicinal oriunda do Mediterrâneo. O cultivo da alcachofra apresenta fatores limitantes relacionados às formas de propagação sexual e vegetativa. A micropropagação é considerada uma alternativa para a obtenção de populações homogêneas, de boa qualidade e livre de doenças. Com o objetivo de estabelecer protocolo para micropropagação de alcachofra selecionadas para consumo *in natura*, foram realizados experimentos para: (I) avaliar a capacidade de estabelecimento de cultivo *in vitro* a partir de ápices caulinares obtidos de plantas adultas cultivadas no campo e de plântulas obtidas de sementes cultivadas em casa de vegetação; (II) avaliar a possibilidade de estabelecer o cultivo *in vitro* a partir de explantes obtidos de sementes germinadas *in vitro*; (III) avaliar a taxa de multiplicação de progênies selecionadas em diferentes meios de cultura; (IV) avaliar a porcentagem de plantas enraizadas e aclimatizadas em diferentes substratos. Este estudo foi constituído de três experimentos e foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, e no Setor de Horticultura, da FAMV da UPF. No experimento I foram utilizados ápices caulinares obtidos de plantas adultas de três cultivares cultivadas no campo para estabelecer

¹ Bióloga, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGAgr) da FAMV/UPF, Área de concentração em Produção Vegetal .

o processo de micropropagação. No experimento II ápices caulinares obtidos de plantas germinadas em ambiente semi-protegido de seis progênes selecionadas de alcachofra foram avaliadas quanto a possibilidade de multiplicação *in vitro*. No experimento III diferentes explantes obtidos de sementes germinadas *in vitro* de três progênes ((P1)B2L4R6, (P2)B1L4R7 e (P3)B1L3R1) foram avaliados quanto ao seu potencial de multiplicação *in vitro* utilizando os meios de cultura (M1 e M2) e as plântulas multiplicadas a partir do ápice caulinar foram enraizadas e aclimatizadas em três diferentes substratos. Nesse experimento o delineamento experimental utilizado foi o completamente casualizado sendo a unidade experimental composta por um ápice/propágulo/plântula para os estádios da micropropagação e de acordo com a disponibilidade de material. Para análise estatística os dados foram submetidos à análise de variância com médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. No experimento I e II, observou-se alto índice de contaminação por bactérias e fungos, na fase de isolamento, mesmo sendo utilizado hipoclorito de sódio e gentamicina no meio de cultura. Na fase de multiplicação também foi observada alta taxa de contaminação, de provável origem endógena. No experimento III o cultivo *in vitro* foi estabelecido com sucesso sem a presença de contaminantes. No entanto, somente ápices caulinares foram capazes de multiplicar *in vitro*. Na fase de multiplicação foi obtida a média da taxa de multiplicação que variou entre 2,09:1 e 6,4:1 entre as duas progênes utilizadas, em quatro subcultivos. O meio de cultura 1 (M1) foi o mais adequado ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA). A frequência de enraizamento é influenciada pela progêne sendo que

51,9% dos propágulos da progênie 1 (P1) enraizaram e somente 14,9% da progênie 2 (P2). As brotações sem raízes visíveis apresentaram maior sobrevivência na fase de aclimatização. Os substratos mais adequados para a aclimatização nas duas progênies avaliadas foi o substrato 1 (S1: Mecplant Horta 2®: 100%) e Substrato 2 (S2: Mecplant Horta 2®:50% e Casca de arroz carbonizada:50%). A taxa de sobrevivência na aclimatização final de 75 %, para substrato 1 (S1). Foi possível estabelecer o processo de micropropagação de progênies de alcachofra selecionadas para o cultivo *in vitro*, utilizando como fonte de explantes as sementes germinadas *in vitro*.

Palavras-chave: *Cynara cardunculus* L. Var. *scolymus* Fiori, cultivo *in vitro*, taxa de multiplicação, enraizamento, aclimatização.

MICROPROPAGATION ARTICHOKE FROM *IN VITRO* GERMINATED SEEDLINGS

ABSTRACT – The artichoke *Cynara cardunculus* L. Var. *scolymus* Fiori is a herbaceous plant, outcrossing, belonging to the family Asteraceae, is a vegetable of high nutritional and medicinal value coming from the Mediterranean. The cultivation of the artichoke has limiting factors related to forms of sexual and vegetative propagation. Micropropagation is considered an alternative for obtaining homogeneous populations of good quality and free of disease. In order to establish protocol for micropropagation artichoke selected for fresh consumption, experiments were conducted to: (I) assess the ability of *in vitro* establishment from shoot tips obtained from adult plants grown in the field and seedlings obtained from seeds grown in the greenhouse, (II) to evaluate the possibility of establishing *in vitro* culture from explants obtained from seeds germinated *in vitro*, (III) evaluate the multiplication rate of selected progenies in different culture media, (IV) evaluate the percentage of rooting and acclimatized plants in different substrates. This study consisted of three experiments and was conducted in the Laboratory of Plant Biotechnology, and Department of Horticulture, the Passo UPF. In experiment I used apexes obtained from adult plants of three cultivars grown in the field to establish the micropropagation process. In experiment II Apical obtained from plants germinated in semi-protected environment six progenies artichoke were evaluated for the possibility of *in vitro* multiplication. In experiment III different explants obtained from seeds germinated *in vitro* three progenies ((P1) B2L4R6, (P2) and B1L4R7 (P3) B1L3R1) were evaluated for their

potential in vitro multiplication using culture media (M1 and M2) and multiplied plantlets from shoot apex were rooted and acclimatized in three different substrates. In this experiment, the experimental design was completely randomized and the experimental unit consists of an apex / propagules / seedlings for stages of micropropagation and according to the availability of material. For statistical analysis, the data were subjected to analysis of variance with means compared by Tukey test at 5% probability of error. In experiment I and II, we found high levels of contamination by bacteria and fungi in the phase of isolation, even if used sodium hypochlorite and gentamicin in the culture medium. In the multiplication phase was also observed high rate of contamination of probable endogenous origin. In experiment III in vitro was established successfully without the presence of contaminants. However, only apexes were able to multiply in vitro. In the phase of proliferation was obtained at an average rate of multiplication varied between 6,4:1 and 2,09:1 between the two progeny used in four subcultures. The culture medium 1 (M1) was the most appropriate (1.0 mg.L⁻¹ BAP and 0.1 mg L⁻¹ NAA). The frequency of rooting is influenced by the progeny of which 51.9% of the progeny seedlings 1 (P1) rooted and only 14.9% of the progeny 2 (P2). The shoots without visible roots had higher survival during the acclimatization phase. The most suitable substrates for acclimatization in the two progenies evaluated was the substrate 1 (S1: Mecplant Horta 2 ®: 100%) and substrate 2 (S2: Mecplant Horta ® 2: 50% and Burnt rice husk: 50%). The survival rate at the end of acclimatization 75% for the substrate (S1). It was possible to establish the

micropropagation process progenies selected for artichoke cultivation *in vitro*, using as source of explants seeds germinated *in vitro*.

Key words: *Cynara cardunculus* L. Var. *scolymus* Fiori; cultivation *in vitro*, multiplication rate, rooting, acclimatization, substrates.

1 INTRODUÇÃO

A alcachofra *Cynara cardunculus* L. Var. *scolymus* Fiori é uma espécie pertencente à família das Asteraceae, originada da Bacia do Mediterrâneo, de onde foi difundida para a Europa e América (FOURY, 1967). É uma planta alógama e diplóide com $2n=2x=34$ cromossomos (SCARASCIA et al., 1969). Essa hortaliça produz capítulos bem desenvolvidos que podem ser consumidos *in natura* ou na forma industrializada. Apresenta alto valor nutricional sendo inclusive considerada uma espécie nutracêutica e medicinal e de alta rentabilidade.

Apesar de a alcachofra ser cultivada em vários países, a Itália se destaca por ser o maior produtor mundial, seguido pela Espanha. Na América Latina é cultivada principalmente na Argentina, Chile e Peru.

No Brasil, a produção desta cultura se concentra no estado de São Paulo, onde é comercializada para o mercado *in natura* e representa fonte significativa de lucro para pequenos produtores da região. No Rio grande do Sul, uma pequena área foi cultivada, no norte do estado e se destinou à industrialização (Globo Rural, 2004), sendo que há carência de progênies com aptidão para consumo *in natura* adaptados as condições microclimáticas deste estado. O desenvolvimento de material genético adaptado a condições ambientais e com características que atendam as necessidades dos produtores e mercado consumidor (rendimento, precocidade e qualidade de capítulo), bem como a disponibilidade destes materiais

aos produtores rurais, é de extrema importância para que ocorra maior difusão desta cultura no Brasil, especialmente no Rio Grande do Sul.

A produção de mudas de progênies selecionadas de alcachofra para consumo *in natura* através da micropropagação sendo uma das formas de incentivar o cultivo da alcachofra na região o norte do Rio Grande do Sul. Neste sentido, a Universidade de Passo Fundo iniciou um programa de melhoramento nesta espécie. Inicialmente uma pequena coleção de germoplasma foi estabelecida constando de materiais introduzidos da Itália e Argentina, coletados em hortas domésticas e de cultivares comerciais. Esta coleção foi avaliada morfológicamente e acessada quanto a variabilidade disponível (REOLON DA COSTA et al., 2009). Plantas selecionadas foram clonadas e se iniciou os cruzamentos sexuais, gerando progênies que se encontram em fase de avaliação. O material selecionado pode ser utilizado para a micropropagação visando o estabelecimento e desenvolvimento de cultivares de polinização aberta. Sendo que clones podem ser utilizados para o desenvolvimento de variedades sintéticas.

Embora a propagação da cultura seja predominantemente vegetativa através de brotações que surgem na base da planta matriz, a alcachofra pode ser propagada por métodos sexuais, ou seja, por sementes, obedecendo a um sistema de alogamia. As múltiplas formas de reprodução da alcachofra proporciona flexibilidade na forma de condução e melhoramento. Segundo Cointry et al. (1999), a existência de variabilidade genética em alcachofra, somada a possibilidade de propagação vegetativa ou sexual, permite o emprego de diferentes estratégias de melhoramento que mantenham a uniformidade dos

clones ou que promovam a criação de novos clones por hibridização sexual.

Conforme Grolli (2000), a propagação vegetativa é o método que utiliza partes das plantas, que não sejam as sementes, com a finalidade de produzir novas mudas. Este método proporciona a obtenção de plantas bastante uniformes e produtivas, quando as condições de clima e solo são favoráveis, apresentando vantagens, como a rapidez de produção das mudas, reprodução fiel da planta matriz e maior precocidade para entrar em produção. A propagação vegetativa é de grande importância quando se deseja multiplicar uma progênie que é altamente heterozigoto e que apresenta características consideradas superiores, que se perdem quando propagadas por sementes (PAIVA & GOMES, 2001).

No entanto, de acordo com Mauromicale (1984) a multiplicação vegetativa por rebentos em alcachofra apresenta inconveniente como: heterogeneidade fisiológica dos órgãos de multiplicação, determinando uma variabilidade morfológica e biológica nas plantas originadas desses órgãos; problemas fitossanitários da planta-matriz, que pode concentrar agentes patogênicos como vírus, fungos e bactérias. Outros problemas observados da propagação clonal são: a baixa taxa de multiplicação, cerca de três a cinco rebentos por planta/ano na maioria das cultivares e de oito a dez nos progênies mais prolíficos (HARBAOUI & DEBERGH, 1980; PECAUT et al., 1983); dificuldade na introdução e difusão da cultura; elevado custo de implantação do matrizeiro e escassa possibilidade de mecanização (MAUROMICALE, 1984; MAUROMICALE et al., 1989; GIL ORTEGA, 1996).

A propagação de alcachofra por sementes apresenta algumas vantagens, tais como a possibilidade da semeadura mecânica, reduzindo custos de mão-de-obra e a rotação com outras espécies, para o controle de moléstias e nematóides (BASNIZKY & ZOHARY, 1987). Outro aspecto importante da propagação sexuada é a prevenção de viroses, que não são transmitidas através da semente (BASNIZKY & ZOHARY, 1994; CAMARGO, 1992). As sementes geralmente funcionam como um filtro na disseminação de doenças, principalmente viroses.

As cultivares de alcachofra são altamente heterozigotas, segregando quando propagadas por semente (BASNIZKY & MAYER, 1985). Portanto, a propagação por sementes origina descendência heterogênea, não reproduzindo exatamente os caracteres da planta matriz, sendo frequente o aparecimento de formas do tipo silvestre com capítulos de tamanho pequenos e espinhosos, não comestíveis (CAMARGO, 1992; COINTRY et al., 1999).

No entanto, atualmente, devido às vantagens da propagação sexual da espécie, programas de melhoramento da Europa (Itália, França e Espanha) e Argentina concentram seus esforços no desenvolvimento de cultivares de polinização aberta e híbridos de alcachofra. O programa de melhoramento de alcachofra da Universidade de Passo Fundo, em colaboração com a Universidade Nacional de Rosario, Argentina, vem empregando o sistema de seleção recorrente para produção de uma cultivar de polinização aberta com aptidão ao consumo *in natura*. Este trabalho envolve ciclos de seleção e recombinação entre as plantas selecionadas com auxílio de abelhas (REOLON DA COSTA et al., em preparação),

buscando-se aumentar a frequência de genes desejáveis na população. A propagação vegetativa de materiais segregantes de alcachofra, obtidos a partir de plantas selecionadas para o consumo *in natura*, pode auxiliar na produção rápida de mudas para avaliação, seleção e disponibilização destas mudas para o produtor.

Além da reprodução por rebentos e por semente, a alcachofra pode ser também propagada vegetativamente *in vitro*, pelo processo denominado de micropropagação. Segundo Lauzer & Vieth (1990), a propagação por cultura de tecidos oferece um método para produzir uma população grande, homogênea e livre de enfermidades, permitindo também a rápida instalação de progênies selecionados em uma região específica.

Segundo Cointry et al. (1999) o emprego da micropropagação pode ajudar a superar os fatores limitantes da multiplicação vegetativa e sexual da alcachofra, pois surge como uma alternativa para a produção de mudas de qualidade, saudáveis e uniformes, podendo promover aumento da área de cultivo, além de ser de grande auxílio em trabalhos de melhoramento genético, visando gerar clones uniformes a partir de plantas selecionadas ou desenvolvimento de linhagens sintéticas (ANCORA et al., 2012; RUTA et al., 2012).

Segundo Bedini et al. (2012), a micropropagação de alcachofra permite a rápida proliferação de um grande número de clones de plantas selecionadas pelo seu valor usado nas características fisiológicas e reprodutivas. As plantas de alcachofra propagadas *in vitro* apresentam maior taxa de multiplicação, maior vigor e

produtividade comparada às plantas multiplicadas vegetativamente no campo.

A micropropagação é realizada mediante uma série de estádios, cada um com objetivos diferentes. O sucesso da micropropagação esta na dependência não somente de fatores genéticos, mas de fatores fisiológicos e ambientais, principalmente em relação à composição dos meios de cultura e reguladores de crescimentos utilizados, os quais somados geram grande variabilidade nas respostas *in vitro*.

De acordo com Caldas et al. (1998), a composição e concentração hormonal no meio de cultura nos diferentes estádios da micropropagação determinam o crescimento e o padrão de desenvolvimento. As auxinas, citocininas e giberelinas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas nessas etapas.

Apesar do cultivo *in vitro* de alcachofra ter se difundido nos últimos anos pelos benefícios na produção de mudas uniformes e saudáveis, protocolos de micropropagação em alcachofra têm sido relatados para poucas cultivares (PECAUT et al, 1992; BRUTTI et al., 2000; MORONE FORTUNATO & RUTA, 2003; TAVAZZA et al. 2004; MORONE FORTUNATO et al., 2005; ELIA et al., 2007; GRANDO et al, 2011; BEDINI et al.;2012). Brutti et al. (2000) comentam que a maior parte das pesquisas sobre propagação *in vitro* de alcachofra estão limitadas a cultivares européias e a cultivar *Green Globe*. Da mesma forma, Mauromicale & Ierna (2000) afirmaram que pesquisas relacionadas à micropropagação de alcachofra têm sido limitadas à grupo restrito de cultivares, sendo utilizada para propagação comercial somente na Itália. Segundo Ancora et al. (1981)

e Tavazza et al. (2004), a propagação *in vitro* de alcachofra é principalmente utilizada na Itália para poucas cultivares tardias e permite a produção de plântulas para distribuição aos produtores.

Problemas de contaminação, baixa taxa de multiplicação e dificuldade de enraizamento são fatores que limitam a micropropagação desta espécie, sendo necessário o estabelecimento de protocolos adequados para que se tenha sucesso no uso desta técnica em alcachofra (BRUTTI et al., 2000; CASANOVA et al., 2002; MORONE FORTUNATO et al., 2005; AUGUSTIN et al. 2002; GRANDO et al., 2011; BEDINI et al., 2012).

Os problemas de contaminação durante o cultivo *in vitro* de alcachofra se relacionam à dificuldade de desinfecção do material utilizado como fonte de explante devido à proximidade dos mesmos com contaminantes do solo, como bactérias, e também ao desenvolvimento de bactérias de origem endógena durante os estádios mais avançados do cultivo *in vitro* (SUZIN, et al., 2008).

A baixa taxa de multiplicação da alcachofra *in vitro* é considerada outro fator importante que limita a utilização da micropropagação em escala comercial. Taxas de multiplicação em torno de 4:1 tem sido registradas entre os relatos de maior sucesso para a espécie. Taxa de multiplicação de 4,5:1 foi obtida por Ancora et al. (1981) para a cultivar *Romanesco* e por Elia et al. (2007) para a cultivar precoce *Violet du Provence*. Da mesma forma, Grando et al. (2011) obtiveram uma taxa de multiplicação de 4:1 na cultivar brasileira Nobre cultivada em meio contendo uma combinação específica de reguladores de crescimento citocinina e auxina.

A micropropagação de cultivares precoces de alcachofra apresenta um problema adicional referente a perda da precocidade em parte das plantas micropropagadas (PECAUT et al., 1992; ELIA et al., 2007). No entanto, estratégias têm sido desenvolvidas especificamente para esse tipo de material, com o objetivo evitar a alteração do ciclo causado pela passagem do material pelo cultivo *in vitro* (MORONE FORTUNATO et al., 2003, 2005; TAVAZZA et al., 2004; ELIA et al., 2007).

Para que a técnica de micropropagação seja empregada com sucesso na produção de mudas uniformes de alcachofra visando a disponibilização de mudas para os produtores do sul do país, é necessário desenvolver protocolos que proporcionem adequado controle de infecção e alta taxa de multiplicação para as progênies selecionadas.

Com a finalidade de estabelecer protocolo eficiente para micropropagação de clones e progênies de alcachofra selecionada para consumo *in natura* (Tipo Romanesco), foram realizados experimentos com o objetivo de: (I) avaliar a capacidade de estabelecimento de cultivo *in vitro* a partir de ápices caulinares obtidos de plantas adultas cultivadas no campo e de plântulas obtidas de sementes cultivadas em casa de vegetação; (II) avaliar a possibilidade de estabelecer o cultivo *in vitro* a partir de explantes (hipocótilo, epicótilo e ápice caulinar) obtidos de sementes germinadas *in vitro*; (III) avaliar a taxa de multiplicação de progênies selecionadas em diferentes meios de cultura; (IV) avaliar a porcentagem de plantas enraizadas e aclimatizadas em diferentes substratos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Origem, taxonomia e descrição botânica

O termo “alcachofra” *Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* Fiori é derivado do árabe “Al Kharshuf”, que significa receptáculo com espinhos. Na região do Mediterrâneo a planta era conhecida como *Alcacilera*, que significa alcachofra silvestre, proveniente do grego, encontrada em quase toda a Europa como “alcachofra silvestre” ou *cardum* (cardo) (BIANCO, 1990). Segundo a mitologia, o nome científico *Cynara* é devido à cor acinzentada, e *scolymus*, derivado também do grego, da tradução latina *cardo* (LAFEPE, 2005).

A alcachofra foi primeiramente colhida em seu estado silvestre, e posteriormente foi desenvolvida na forma cultivada (RAYDER et al., 1983). Os povos do Mediterrâneo usam a alcachofra há séculos como alimento em seu estado silvestre, devido, principalmente, às suas propriedades medicinais (BIANCO, 1990). O grande número de cultivares de alcachofra plantada no mundo se deve aos estudos iniciados na Idade Média, na Itália, onde foram realizados os primeiros cruzamentos sexuais.

O médico grego Dioscórides, na época do nascimento de Cristo, foi o primeiro a descrever a alcachofra. Os árabes levaram a alcachofra para a Espanha a partir de Marrocos. Com a queda do Império Romano, houve um período, até o século XV, que a cultura perdeu o destaque, mas se manteve cultivada e melhorada por monges em mosteiros cristãos, evoluindo para a alcachofra atual. A sua

importância foi retomada em 1466, quando a família Strozzi a levou de Florença para Nápoles, onde recebeu o nome de *carciofi*, iniciando o cultivo em maior escala e expandindo-se para a Sicília, Sardenha e outras regiões da Itália (ROBLES, 2001).

O gênero *Cynara* é nativo do mediterrâneo. Segundo Mauro et al. (2009), a espécie *C. cardunculus* L. consiste da alcachofra cultivada (var. *scolymus* (L.) Fiori), o cardo cultivado (var. *altilis* DC.) e o cardo selvagem (var. *sylvestris* (Lamk) Fiori). Estas três cultivares são compatíveis geneticamente entre si e formam híbridos inter-varietais férteis (BASNIZKI & ZOHARY, 1994). Conforme Lapefe (2005), a partir do século XV a alcachofra passou a ser difundida na Europa, Ásia, América Latina e, posteriormente, no Brasil, onde foi bem aclimatada e apresenta grande prestígio alimentar e medicinal.

A alcachofra é uma hortaliça herbácea, perene, rica em propriedades medicinais, e nutricionais. Camargo (1992) descreve a parte aérea como um tufo de folhas longas, com coloração variando de verde claro a verde forte, profundamente recortada, formando lobos estreitos, com pecíolo largo e carnoso.

Possui inflorescência do tipo capítulo formado pelo conjunto das flores tubuladas hermafroditas e de simetria radial. A corola é do tipo gamopétala com cinco lobos iguais. O cálice é constituído de sépalas modificadas com aspecto piloso, denominadas “pappus”, que auxiliam no processo de dispersão do fruto (anemofilia). O androceu caracteriza-se por apresentar cinco estames, com filetes livres e anteras soldadas, que envolvem o estilete. O ovário é ínfero e unilocular, envolto pelas anteras em sinânteros, que

recebem a denominação de colar de anteras, já descrita para 56 espécies da família Asteraceae (MEIRI & DULBERGER, 1986).

As inflorescências se originam do centro das folhas, conhecido como “roseta”, onde a haste se desenvolve, empurrando a inflorescência para fora. Esta é formada, inicialmente, por células em intensa divisão celular, as quais, com o passar dos tempos, vão dando formato à inflorescência principal (MORAES et al., 2007), coberta por filárias membranosas, imbricadas, com a base carnosa, conhecidas por escamas, que se inserem num receptáculo também carnoso e achatado.

Segundo Mauromicale & Ierna (2000), a alcachofra é uma planta alógama, de estrutura genética altamente heterozigota, com $2n=2x=34$ cromossomos. Apresenta dicogamia do tipo protandria (flores hermafroditas com órgãos masculino e feminino viáveis em momentos diferentes). Conforme o referido autor, em cada flor as anteras maturam primeiro e o estilete, que ainda está se alongando, empurra o pólen para cima. As duas superfícies estigmáticas maturam 2 ou 3 dias após a disseminação do pólen. O pólen germina imediatamente, mas o estigma só se torna receptivo de 5 a 7 dias, impedindo a autofecundação nas flores individuais, e evitando a ocorrência de depressão consanguínea devido à autofecundação. O grau de depressão varia entre as cultivares. As cultivares diferem consideravelmente na quantidade e qualidade do pólen (FOURY, 1967).

A biologia floral da cultivar brasileira de alcachofra Nobre foi descrita por Baggio et al. (2009). Estes autores descreveram a existência de aproximadamente 1.400 flores por inflorescência, as quais apresentavam morfologia tubulada, hermafrodita e com simetria

radial e estabeleceram uma escala de 15 estádios de desenvolvimento do capítulo, compreendendo desde a emissão do capítulo até a dispersão dos frutos, indicando o estágio quatro como o estágio de coleta para comercialização.

A alcachofra possui um ciclo vegetativo que se renova anualmente, sem interferência do produtor, ou seja, a planta não morre, permanecendo as raízes (rizoma), parte do caule abaixo do nível do solo e acima deste. Assim, o ciclo se repete todos os anos, com o surgimento dos rebentos após o término das colheitas (CAMARGO, 1992).

Apresenta raízes, fasciculadas, medindo cerca de 0,50 m de comprimento, de cor parda, com inúmeras radículas. Durante o crescimento vegetativo ocorre a brotação de algumas gemas localizadas no rizoma, formando rebentos. O rizoma permanece vivo por muitos anos. Cada rebento tem seu sistema radicular, podendo constituir plantas completas e independentes. Estes são usados como material de propagação para iniciar novos plantios. O número de rebentos varia de um, em plantas jovens e fracas, até doze ou mais, em plantas vigorosas, de dois ou mais anos (CAMARGO, 1992).

Segundo Portis et al. (2005), o germoplasma cultivado de alcachofra tem sido classificado em quatro grupos principais, e principalmente com base na aparência do capítulo: (i) O grupo *spinoso*, caracterizado pela presença de longos e afiados espinhos nas brácteas e folhas, de capítulos cônicos (ii) O grupo *violetto*, precoce com capítulos de cor violeta, de tamanho médio e com pequenos espinhos; (iii) O Grupo Romanesco, tardia e vigorosa com capítulos grande, esféricos e sub-esféricos e sem espinhos; (iv) O grupo

catanese com capítulos relativamente pequenos, alongados e sem espinhos. Um quarto grupo é citado por Robles (2001), como sendo o grupo *Bianco Tarantino*, tardia de capítulo esférico, tamanho pequeno verde e espinhosos. Segundo Portis et al. (2005), outro critério de classificação é baseado no período de colheita: tipos precoces podem ser forçados a produzir capítulos entre outono e primavera enquanto que os tipos tardios, produzem capítulo somente durante a primavera e início de verão.

Segundo Mauromicale & Ierna (2000), as principais cultivares de alcachofra cultivadas na Itália são *Violetto di Sicilia* (70%), *Spinoso di Palermo* (20%), *Violet du Provence*, *Spinoso Sardo*, *Romanesco*, *Tema 2000* e *Terom* (10%).

2.2 Utilizações, importância econômica e cultivo da alcachofra

A alcachofra é uma cultura de grande relevância econômica e com importantes características nutricionais e medicinais, sendo considerada nutracêutica. Como alimento, é rica em proteínas, vitamina do complexo B, vitamina A, vitamina C, potássio, cálcio, sódio, fósforo, magnésio e ferro, além de ser fonte de fibras (RYDER et al., 1983).

Sua principal forma de consumo é como hortaliça, podendo ser consumida *in natura* na preparação de saladas, molhos e grelhados ou industrializada, na forma de conservas. Seu consumo é fundamentalmente *in natura* durante o período de produção inverno-primavera (GARCIA et al., 2005; GARCIA, 2007).

A existência de importantes compostos medicinais justifica as aplicações farmacológicas da alcachofra. O extrato das folhas de alcachofra é comercializado na forma de fitoterápico para o tratamento de diversas doenças. Estudos comprovam que as folhas possuem potentes atividades antioxidantes, diurético, hepatoestimulante e efeito terapêutico no tratamento de doenças gástricas. Atua também na inibição da biossíntese do colesterol (LDL), prevenindo a arteriosclerose e contra os radicais livres, diminuindo a formação de espécies reativas de oxigênio (CECCARELLI et al., 2010; KÜÇÜKGERGIN et al., 2010; CHRISTAKI et al.; 2012).

Conforme Murayama (1972), a cinarina, composto quinônico éster, 1-4 dicaféico do ácido cínico, é o princípio medicamentoso mais conhecido e estudado da alcachofra, é obtido das folhas mais desenvolvidas, após o término de colheita, empregada no combate às moléstias do fígado e por aumentar, nesse órgão a ação antitóxica, além da cinarina, a alcachofra possui princípios ativos como antioxidantes naturais, derivados de ácido caféico (KÜÇÜKGERGIN et al., 2010) que estimula a formação da bile hepática e regularizam a formação de sais e substâncias antioxidantes que ajudam no combate aos radicais livres. É diurético, regulando o metabolismo do colesterol e dos triglicérides, prevenindo, desta forma, a arteriosclerose e problemas cardíacos (PECAUT & FOURY, 1992).

Atualmente, tem se observado um aumento da demanda de mercado por alimentos funcionais, com propriedades antioxidantes. A concentração desses compostos é considerada importante parâmetro de qualidade para os vegetais, assim a aquisição e difusão de

informações científicas avaliando as propriedades nutricionais e os efeitos da alcachofra na saúde, tem estimulado o consumo desta cultura. A espécie foi definida como alimento funcional pela Comissão Europeia da Functional Food Science in Europe (FuFoSE), (CECCARELLI et al., 2010).

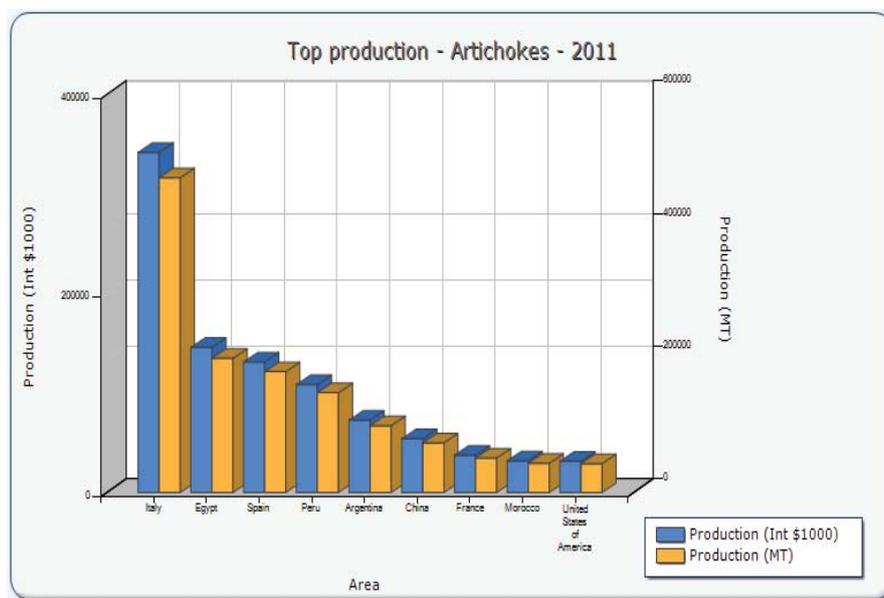
Segundo Mauro et al. (2009) há um renovado interesse na cultura da alcachofra devido à presença de uma série de produtos alternativos, incluindo a inulina nas raízes, considerado um anti-cancerígeno de colo (LATTANZIO et al., 2001; CHRISTAKI et al., 2012), bio-fármacos nas folhas (GEBHARDT, 1997; BROWN & RICE-EVANS, 1998; PEREZ-GARCIA et al., 2000; WANG et al., 2003), óleo nas sementes e ração dos resíduos (MACCARONE et al., 1999), bem como para uso forrageiro (MONTEMURRO & CIANCI, 1976) e produção de papel e bicomustível (FOTI et al., 1999; GOMINHO et al., 2002).

Conforme Escartín (1996), a Europa é o maior produtor de alcachofra do mundo, destacando-se em primeiro lugar com maior área de cultivo e maior produção a Itália, seguida pela Espanha e França. Do total da produção destes países 75% destina-se para o consumo interno e apenas 5% são destinados para a exportação.

A Espanha participa com aproximadamente 27,5% da produção mundial distribuída em cinco regiões produtoras. Na França se destacam duas zonas produtoras, que correspondem a 14% da produção mundial. Segundo o autor, o comércio internacional de alcachofra a fresco é muito baixo, em torno de 55.000 toneladas (5% da produção mundial). A França é a principal importadora, seguida da Alemanha e Bélgica. A Espanha exporta para a indústria de conservas

aproximadamente 22.500 toneladas, com destino fundamentalmente aos Estados Unidos e Canadá.

De acordo com Escartín (1996), a Califórnia (EUA) se destaca pela produção de alcachofra verde. Na América Latina, a alcachofra é cultivada na Argentina, Peru, Chile e Brasil, sendo que a Argentina é o quarto maior produtor mundial (FAO, 208), (Tabela 1).
Tabela 1- Produção mundial de alcachofra, segundo a FAO, 2011



Fonte: Food and Agriculture Organization (FAO, 2011).

Segundo Portis et al. (2005), a Itália possui em torno de 51.000 ha cultivados com alcachofra, representando ao redor de 35% da superfície cultivada no mundo com essa hortaliça. A cultura da alcachofra é considerada bastante rentável, originando um ingresso anual médio de U\$S 6.375/há na Argentina (ASPPELLI, 2000).

No Brasil, a alcachofra foi introduzida pelos imigrantes europeus, principalmente italianos, há cerca de cem anos, no início do

século XX (DONIDA, 2004). É cultivada no sul e sudeste, sendo São Paulo o maior produtor, responsável por 80% da área cultivada no país. A cultivar mais utilizada nessa região é a “Roxa de São Roque”, que produz capítulos roxos e é destinada principalmente ao consumo *in natura* (FILHO et al., 2009).

O Rio Grande do Sul a alcachofra foi introduzida pela Cooperativa Triticola Erechim Ltda. (COTREL), na região do Alto Uruguai, em 1994. Nessa instituição houve o desenvolvimento da cultivar brasileira Verde Nobre, destinada exclusivamente para fins industriais. A área cultivada na região do Alto Uruguai chegou a aproximadamente 50 ha, distribuídos em 21 pequenas propriedades (DONIDA, 2004). No entanto, o referido estado não tem tradição no cultivo da alcachofra para fins de consumo *in natura*, e uma das razões para isso é a falta de progênies desenvolvidas e adaptadas a região e inexistência de material vegetal disponível para o plantio. No entanto, o cultivo de alcachofra no sul do Brasil é percebido como uma alternativa rentável para a pequena propriedade rural (GRANDO et al., 2011).

Atualmente, a produção de alcachofra ocorre em diferentes condições de ambiente, porém para a produção comercial preferem-se climas mais amenos, com temperaturas noturnas relativamente baixas e alta umidade durante a maior parte do ano, pois em climas quentes ocorre o amadurecimento precoce das gemas e endurecimento das partes comestíveis, o que afeta a qualidade da cultura para consumo comercial (SIMS et al., 1968).

A melhor época para o plantio das mudas é de abril a fins de maio, quando as chuvas são mais espaçadas e os dias mais frescos

(MURAYAMA, 1983; ISECHI et al., 1998). A colheita dos capítulos ocorre de outubro até dezembro, e é feita manualmente cortando-se a haste com 20 a 30 cm de comprimento. O ponto de colheita é quando os botões apresentarem as brácteas aderentes e carnosas (MURAYAMA, 1972).

Nas plantações comerciais a temperatura ideal, para a alcachofra é de 15 °C a 18 °C, sendo que poderá ter uma variação de 8 °C para mais ou para menos, sendo que temperaturas abaixo de 5 °C podem inibir o desenvolvimento. Em local quente ocorre abertura precoce do botão, que prejudica a qualidade da porção comestível (ISECHI et al., 1998).

Segundo Foury (1967), as alcachofras são plantas de dias longos com um foto período crítico de cerca de 10,5 horas. Em indivíduos propagados por sementes, a transição do estágio vegetativo para o reprodutivo depende das interações entre os três seguintes determinantes: obtenção de plântulas de tamanho adequado; temperatura baixa e fotoperíodo. As plantas de alcachofra necessitam de 210 horas de frio par passar do estado vegetativo para o reprodutivo (GARCIA, COMUNICAÇÃO PESSOAL, 2009).

A alcachofra deve ser cultivada em lugares de solo fértil e bem drenado (MURAYAMA, 1972). Segundo Isechi et al. (1998), a alcachofra é muito exigente em solos, preferindo condições de elevada fertilidade, profundidade e drenagem. Além de exigir água em abundância e nutrientes básicos (NPK), necessita de cálcio, magnésio e boro, não dispensando adubação orgânica, desenvolvendo-se melhor em solos com pH entre 5,5 e 6,5. Como as condições de temperatura e umidade limitam as áreas favoráveis para plantios comerciais,

algumas vezes o solo ideal é deixado em segundo plano para atender as condições climáticas propícias (CAMARGO, 1992).

Filgueira (1982) reafirma que a alcachofra produz melhor em solos argilo-arenosos, de consistência média, com boa permeabilidade, sem problemas de drenagem, com pH entre 5,7 e 6,8, sendo exigente em cálcio e magnésio. Em solos excessivamente argilosos há maior risco de apodrecimento e o aparecimento de fungos, pulgões ou nematóides nas raízes (CASTRO & CHEMALE, 1995). Apesar de a alcachofra utilizar bem a fertilidade natural ou residual do solo, a obtenção de uma produção comercial, seja pelo tempo de colheita ou pela quantidade e qualidade produzida, somente pode ser atingida com um apropriado programa de fertilização (RYDER et al., 1983).

O cultivo da alcachofra apresenta algumas vantagens, tais como valor econômico e estabilidade de renda; qualidade alimentar, higiênica e farmacológica; multiplicidade de utilização; e grande biodiversidade (MAUROMICALE & IERNA, 2000).

2.3 Métodos de Propagação de Alcachofra

2.3.1 Propagação sexual e vegetativa

A alcachofra pode ser propagada por sementes (sexual) ou por meio vegetativo (assexual). A propagação vegetativa é de grande importância quando se deseja multiplicar uma progênie que é altamente heterozigoto e apresenta características consideradas superiores que se perdem quando propagadas por sementes devido à

segregação genética (PAIVA & GOMES, 2001). Podem ser utilizados rebentos e os talos do rizoma, em que os primeiros são plantas novas com seu próprio sistema radical (BRAVO, 1983). O processo de multiplicação por rebentos, também denominados “filhotes” ou mudas, é geralmente utilizado para antecipar início da colheita e reproduzir com segurança a cultivar (BORREGO, 1986; CAMARGO, 1992).

De acordo com Cointry (2001), na propagação vegetativa cada progênie obtida constitui um clone com homogeneidade fenotípica, independente da sua constituição genética, podendo um conjunto de clones formarem uma população.

A propagação de alcachofra é preponderantemente do tipo vegetativa (CRAVERO, 2001) e oferece uma série de inconvenientes como, a grande heterogeneidade no vigor e na produção em virtude de diferenças no desenvolvimento e enraizamento dos brotos (MAUROMICALE, 1984; MAUROMICALE et al., 1989).

Há também problemas fitossanitários da planta-matriz, que pode concentrar agentes patogênicos como vírus, fungos e bactérias (MAUROMICALE, 1984), baixa taxa de multiplicação, cerca de três a cinco rebentos por planta/ano, e de oito a dez nas cultivares mais prolíficas, dificuldade na introdução e difusão da cultura, elevado custo de implantação do matrizeiro e escassa possibilidade de mecanização (MAUROMICALE, 1984; MAUROMICALE et al., 1989).

Assim, o desenvolvimento de cultivares propagadas por semente tem sido priorizado pelos programas atuais de melhoramento desta espécie (MAUROMICALE & IERNA, 2000).

Segundo Cravero (2002), a produção de sementes melhoradas pode auxiliar na superação dos inconvenientes da propagação vegetativa. As principais vantagens de cultivares reproduzidas por sementes são: a possibilidade de implantação mecânica do cultivo, a redução dos custos de implantação, a garantia sanitária, que impede a transmissão de enfermidades e infecções virais, possibilidade de rotação de cultura, redução do tempo de permanência da cultura na lavoura e o aumento do sistema radicular das plantas (MAUROMICALE & IERNA, 2000; BARZNISKY & ZOHARY, 1994).

Novas cultivares obtidas por cruzamentos tem sido, desenvolvidas com o objetivo de proporcionar um incremento em qualidade e produtividade, bem como a tolerância a estresses climáticos e resistência a doenças. De maneira que o programa de melhoramento tem concentrado seus esforços no desenvolvimento de cultivares híbridas propagadas por sementes. A produção desses híbridos tem a vantagem de garantir a integridade genética destas novas cultivares (BIANCO, et al., 2011).

Por outro lado, a propagação por sementes apresenta problemas, pois forma plantas heterogêneas, não reproduzindo exatamente os caracteres da planta-matriz, originando grande quantidade de plantas com espinhos, com capítulos de baixa consistência e qualidade, baixa precocidade, recapitulando as progênes mais selvagens (CAMARGO, 1992; GIL ORTEGA, 1996). Segundo Cravero (2001), essa heterogeneidade se deve à alta heterozigose dos clones que originam as sementes. Além disso, a propagação sexual é limitada pela baixa produção de sementes. Diante dos problemas existentes com a multiplicação sexual e

vegetativa, a micropropagação surge como uma alternativa para a produção de mudas de alta qualidade sanitária, com elevada uniformidade entre os clones.

Segundo Cravero (2001), a micropropagação permite produzir uma população grande, homogênea e livre de enfermidades, permitindo, também, a rápida instalação de progênies selecionadas em uma região específica (LAUZER & VIETH, 1990). Esta técnica tem proporcionado resultados interessantes em outras espécies, o que ainda não se alcançou em alcachofra (GIL ORTEGA, 1996).

2.3.2 Cultura de Tecidos e Micropropagação

A técnica de cultura de tecidos está fundamentada no princípio da totipotencialidade celular, a qual se refere à capacidade das células vegetais para regenerar plantas completas através de divisões, crescimento e diferenciação, mesmo quando isoladas da planta que lhes deu origem (MANTOVANI, 2008).

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação, devido ao tamanho dos propágulos utilizados, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e aquela de maior impacto econômico (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). A micropropagação possibilita propagar vegetativamente, ou clonar, progênies de interesse, representando uma alternativa para a multiplicação de plantas que apresentam dificuldades de reprodução sexuada e, também, onde a aplicação dos métodos convencionais de propagação vegetativa não se tornam viáveis (MANTOVANI, 2008).

A proliferação *in vitro* a partir de gemas ou meristema, é basicamente a extensão da propagação vegetativa e tem sido também aplicada quando há escassez de material para o plantio, propiciando a produção de plantas uniformes e sadias com uma velocidade superior de crescimento em relação aos métodos convencionais de propagação, devido a maior produção menor tempo e espaço físico (CRÓCOMO, 1986). O cultivo *in vitro* ainda possibilita a conservação de germoplasma, garantindo a manutenção da biodiversidade para uso no melhoramento genético de plantas por meio da associação de métodos de cultura de tecidos e regeneração de plantas *in vitro* (SERAFINI, 2001).

No caso da alcachofra, a micropropagação tem sido empregada por vários motivos, como possibilidade de aumento rápido do número de indivíduos geneticamente idênticos a partir de plantas selecionadas, produção de plantas com elevada qualidade sanitária, em geral livres de bactérias, fungos e nematóides, obtenção de plantas altamente homogêneas a partir de plantas heterozigotas (BEDINI et al.; 2012), possibilitando o aproveitamento da heterose, sem as limitações da produção de semente.

A micropropagação é geralmente realizada através de uma seqüência de estágios, conforme originalmente proposto por Murashige (1974). O estágio inicial (Estádio 0) envolve o cultivo de plantas doadoras de explantes, o segundo (Estádio I- isolamento) compreende o estabelecimento da cultura asséptica, onde é preciso definir o tipo de explante a ser utilizado e o estímulo necessário ao seu crescimento em condições de isolamento *in vitro*. O terceiro (Estádio II- multiplicação) tem por objetivo a obtenção de grande quantidade

de plantas, a partir de rotas organogênicas ou embriogênicas, diretas ou indiretas, em sucessivas subculturas. Neste estágio consegue-se aumentar e manter o estoque de plantas em condições *in vitro* por tempo ilimitado. Este aumento no estoque de plantas depende basicamente da técnica utilizada, dos reguladores de crescimento presentes no meio de cultura, do tipo de explante, do número e intervalo dos subcultivos e da taxa de multiplicação que é obtida em cada subcultivo (DEBERGH & READ, 2000).

O último dos estágios adotados no processo de micropropagação (estágio III - enraizamento e aclimatização) tem como objetivos o enraizamento e aclimatização, o qual se refere ao processo de transferência da planta da condição *in vitro* para *ex vitro*. O enraizamento das partes aéreas que foram produzidas na fase de multiplicação via organogênese, pode ser estimulados pela adição de reguladores de crescimento, no meio de cultura, específicos para este fim. A indução e o desenvolvimento radicular podem ocorrer *in vitro*, ou alternativamente, o enraizamento pode ser induzido *in vitro* e o desenvolvimento radicular ocorrer posteriormente em substrato *ex vitro* (DEBERGH & READ, 2000).

Ainda, neste último estágio ocorre a preparação das plantas para a conversão de uma condição heterotrófica para autotrófica e dela depende, em grande parte, o sucesso de um protocolo de micropropagação. As condições estabelecidas durante o cultivo *in vitro* podem, muitas vezes, provocar distúrbios fisiológicos, estruturais e anatômicos que reduzem a eficiência fotossintética e dos tecidos de sustentação e de transporte de água e nutrientes. A preparação para a transferência das plantas do laboratório para ambientes de casa de

vegetação envolve uma fase de aclimatização, em que, geralmente, são adotadas medidas como alterações químicas do meio de cultura da fase de enraizamento, como a redução das concentrações de sais e fontes de carboidratos, e ainda mudanças nas condições ambientais de luz, temperatura e umidade (DEBERGH & READ, 2000).

A abertura gradual dos frascos de cultura ainda na sala de crescimento, no laboratório, permite uma maior troca gasosa, estimulando assim a corrente transpiratória do explante aumentando sua sobrevivência *ex vitro* (MANTOVANI, 1997).

As condições ótimas devem ser estabelecidas em cada estágio em função do material vegetal utilizado e da espécie propagada. A variabilidade existente na resposta morfogênica *in vitro*, não está apenas entre espécies do mesmo gênero, mas também de progênies da mesma espécie, leva à necessidade de se definirem protocolos diferenciados da cultura de tecidos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Os tecidos com alto potencial morfogênico podem se diferenciar diretamente em gemas, sem passar pela fase de calo, num processo denominado organogênese direta, ou pelo processo de diferenciação das gemas para a formação de um novo órgão, que é precedido da formação de calos. A partir das células não organizadas do calo surgem gemas adventícias e se desenvolvem em novas partes aéreas, esse processo denomina-se organogênese indireta (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). A multiplicação de plantas *in vitro* também pode ocorrer através do processo de embriogênese somática direta ou indireta, pela formação de embriões

somáticos que recapitulam o processo de embriogênese zigótica, mas a partir de células somáticas.

De acordo com Caldas et al. (1998), a composição e concentração hormonal no meio de cultura determinam o crescimento e o padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos. Para isso, as auxinas, citocininas e giberelinas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas.

As auxinas atuam no ciclo celular, no alongamento celular, dominância apical, formação de raízes adventícias e embriogênese somática. Os principais tipos de auxinas sintéticas utilizadas no cultivo *in vitro* são: ANA (ácido naftaleno-acético, 2-4,D (ácido diclorofenolacético), ao passo que as que ocorrem naturalmente nas plantas são: a AIA (ácido indolacético) e o IBA (ácido indolbutírico) (TRIGIANO & GRAY, 2010).

As citocininas promovem a divisão celular, proliferação de brotos e a formação de calos, sendo que as mais utilizadas são: Benzil-amino-purina (BAP), zeatina, kinetina, 2-isopenteniladenina (2iP) e Tiazurom (TDZ). Estas promovem a formação de brotos axilares.

As citocininas são muito utilizadas durante a fase de multiplicação *in vitro*, pois promovem a quebra da dominância apical, maximizam o número de brotos regenerados, favorecendo a propagação *in vitro*. Dentre os fatores que mais influenciam para a maximização do potencial genotípico na multiplicação *in vitro*, estão os reguladores de crescimento, em especial as citocininas como a BAP. A multiplicidade de brotações é característica do BAP, que é eficaz para promover a multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias em diversas espécies (GRATAPAGLIA &

MACHADO, 1998), o que resulta em alta taxa de multiplicação. No entanto, em concentrações não adequadas, as citocininas podem causar distúrbios fisiológicos característicos nas plantas, como redução no alongamento, encurtamento dos entrenós, hiperhircidade, inibição do enraizamento, entufamento e outros. De acordo com Flores et al. (2007), uma alternativa para minimizar os efeitos das citocininas no crescimento da parte aérea e no enraizamento de plantas *in vitro* é a transferência dos brotos para um meio nutritivo isento de regulador de crescimento.

A combinação de auxina e citocinina têm sido também bastante utilizadas na fase de multiplicação e o balanço hormonal adequado é bastante dependente da espécie e cultivar empregada. Esse delicado balanço auxina: citocinina que define os padrões de morfogênese que serão assumidos pelo tecido cultivado (SKOOG & MILLER, 1957). Outro regulador vegetal utilizado no cultivo *in vitro* é o ácido giberélico (GA₃). O efeito mais conhecido desta giberelina *in vitro* é no alongamento das partes aéreas quando estas não estão em condições de serem individualizadas para o enraizamento, devido ao seu pequeno tamanho (GRATAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Além dos reguladores de crescimento e dos componentes básicos do meio de cultura, macronutrientes, micronutrientes, sacarose, ágar e água outras substâncias podem ainda ser incorporadas aos meios de cultura com fins específicos.

As contaminações fúngicas e bacterianas, principalmente observadas na fase de isolamento do cultivo *in vitro*, representam um grande problema que pode levar ao insucesso o emprego da micropropagação. O hipoclorito de sódio tem sido usado com sucesso

na esterilização de meio de cultura para o cultivo *in vitro*, pois apresenta excelente atividade antibacteriana relacionada com a formação de compostos contendo cloro ativo (como o ácido hipocloroso e o íon hipoclorito) (TEIXEIRA et al., 1997). Segundo Grattapaglia e Machado (1998), a utilização de antibióticos no cultivo *in vitro* é interessante para o controle de contaminações bacterianas endógenas que frequentemente representam sérios problemas no estabelecimento *in vitro* das culturas. No entanto, é consenso que mesmo assim, dificilmente se consegue eliminar completamente as bactérias, pois os antibióticos normalmente utilizados em cultura de tecidos vegetais possuem ação bacteriostática e não bactericida. Além disso, são caros e difíceis de adquirir, e favorecerem o surgimento de cepas resistentes quando utilizados inadequadamente.

2.3.3 Micropropagação de Alcachofra

De Leon e Greco (1976), utilizaram pela primeira vez a propagação *in vitro* para produção de alcachofra. No entanto, pesquisas relacionadas à micropropagação de alcachofra têm sido limitadas a um grupo restrito de cultivares, principalmente cultivares européia (ANCORA et al., 1981; PECAUT et al., 1983; ANCORA, 1986; BRUTTI et al. 2000; MORONE FORTUNATO & RUTA, 2003; TAVAZZA et al., 2004; BEDINI et al.; 2012) e para a Cv. Green Globe (LAUZER & VIETH, 1990). Segundo Mauromicale & Ierna (2000), a micropropagação comercial de alcachofra tem sido empregada somente na Itália, principalemtno com o tipo de alcachofra Romanesco.

Segundo Rossi e De Paoli (1992), Bedini et al. (2012), a micropropagação de alcachofra apresenta taxas de multiplicação mais elevadas que pelos métodos tradicionais *in vivo*; plantas de alcachofra obtidas de plântulas produzidas *in vitro* exibem maior vigor e aumentada produtividade no campo.

A difusão da micropropagação comercial esbarra no elevado custo comercial das mudas produzidas por cultura de meristemas (MAUROMICALE & IERNA, 2000) e principalmente pelas dificuldades de estabelecimento da técnica de micropropagação para esta cultura, como a dificuldade de desinfecção do material utilizado como fonte de explante, em virtude da proximidade dos órgãos utilizados com contaminantes do solo, como bactérias, e a dificuldade de formação e indução de raízes (BRUTTI et al.; 2000; SUZIN, 2008; BEDINI et al.; 2012). Além disso, a baixa taxa de multiplicação é considerada uma limitação para o emprego da micropropagação de alcachofra em escala comercial (BRUTTI et al., 2000). Taxas de multiplicação em torno de 4:1 tem sido registradas entre os relatos de maior sucesso para a espécie. Taxa de multiplicação de 4,5:1 foi obtida por Ancora et al. (1981) para a cultivar Romanesco e por Elia et al. (2007) para a cultivar precoce ‘*Violet du Provence*’. Da mesma forma, Grando et al. (2011) obtiveram uma taxa de multiplicação de 4:1 para a cultivar brasileira Nobre cultivada em meio contendo uma combinação específica de reguladores de crescimento citocinina e auxina. Tavazza et al. (2004) também obtiveram similar taxa de proliferação da cultivar “*Spinoso sardo*” em meio de cultura contendo essa combinação. Uma taxa de 5:1 foi obtido para a cultivar “*Early French*” em meio contendo alta concentração de citocinina BAP

(Benzilamino-purina) isoladamente, porém os propágulos apresentaram reduzido alongamento (BRUTTI et al., 2000).

Outra estratégia para melhorar o enraizamento de alcachofra foram empregadas com o uso de ciclodextrinas (BRUTTI et al.; 2000) e uso de perlita adicionada ao meio líquido (BEDINI et al.; 2012).

Quanto a dificuldade de enraizamento, Morone-Fortunato et al., (2005) testaram varias concentrações de diferentes auxinas e observaram que a frequência de enraizamento de plantas no meio MS suplementado com 10 mg.L⁻¹ AIA foi de 62% para Cv. *Catanese*, com uso de micorrizas na aclimatização de plantas.

Na Itália tem ocorrido sucesso no estabelecimento de protocolos para assepsia, isolamento, multiplicação e enraizamento *in vitro*, bem como aclimatização de alcachofra (MORONE FORTUNATO, 1982; MORONE FORTUNATO & TAGARELLI, 1989; MORONE FORTUNATO & RUTA, 2003; TAVAZZA et al., 2004; ELIA et al., 2007). No entanto a propagação *in vitro* da alcachofra é principalmente empregada para poucas cultivares de primavera (tardias) e permite a produção de plantas para distribuição para produtores rurais italianos (ANCORA et al., 1981; TAVAZZA et al., 2004).

O processo de micropropagação de cultivares precoce apresenta maiores dificuldades, associadas principalmente com a perda da precocidade em parte das plantas micropropagadas (PECAUT & MARTIN, 1992) e com baixa taxa de multiplicação e baixa porcentagem de enraizamento (ELIA et al., 2007).

Tavazza et al. (2004) utilizando meio modificado com nitrato de amônia obtiveram a formação de brotos de qualidade e uma satisfatória propagação *in vitro* da cultivar de outono *Spinoso sardo*, sendo que a taxa de multiplicação obtida foi incrementada pelo uso de cinetina combinada com baixas concentrações IBA.

De acordo com Elia et al. (2007), na fase de multiplicação, o equilíbrio entre as concentrações de citocininas e auxinas pode promover ótima formação e desenvolvimento dos brotos especialmente na presença de GA₃. Para a Cv. “*Violet du Provence*”, estes autores demonstraram que uma maior concentração hormonal não é necessária, ocorrendo uma redução no crescimento dos brotos se o balanço hormonal citocinina:auxina for maior que dez. Morone Fortunato et al. (2003,2005) tem relatado o desenvolvimento de metodologias de para a cultivar precoce *Catanese*.

No Brasil, pesquisas relativas ao estabelecimento do processo de micropropagação de alcachofra têm sido realizadas na Universidade de Passo Fundo, principalmente com a Cv. de primavera (tardia) Nobre, sendo que problemas com contaminações iniciais, baixa taxa de multiplicação e de enraizamento também se mostraram com fatores limitantes na micropropagação desta cultivar (AUGUSTIN et al., 2006; GRANDO et al. 2011). Taxas de multiplicação em torno de 3:1 foram observadas por nestes estudos. No entanto, recentemente, Grando et al. (2011) alcançaram uma taxa de multiplicação satisfatória para esta cultivar (4.2:1), utilizando um meio de multiplicação suplementado com 0,4 mg.L⁻¹ de BAP combinado com 0,1 mg.L⁻¹ de ANA. Boscardin et al. (2007), ao avaliarem meios de isolamento de ápices caulinares da Cv. Nobre, e

agentes bactericidas no meio de cultura para controle das contaminações iniciais, concluíram que o uso de gentamicina numa concentração de 20 mg.L^{-1} e o hipoclorito de sódio (1 ml.L^{-1}) foram os mais efetivos. Da mesma forma, Suzin et al. (2008), ao tratarem brotos com diferentes agentes bactericidas, observaram que, tanto o cloreto de mercúrio a 1% como o hipoclorito de sódio a 50%, resultaram em índices de contaminação bem inferiores ao tratamento-controle, onde não foi usado nenhum tipo de agente desinfestante.

A aclimatização das mudas oriundas do cultivo *in vitro* foi estabelecida por Comin et al. (2007), que recomendaram o uso do substrato comercial Mecplant e temperatura de $10 \text{ }^\circ\text{C}$ para a eficiente recuperação das plantas.

O cultivo *in vitro* de alcachofra também tem sido estudado pelos cientistas como técnica de conservação de germoplasma de progênies selecionadas, considerando os inconvenientes das metodologias tradicionais utilizadas na manutenção de recursos genéticos encontrados na espécie. As vantagens associadas à manutenção de coleções *in vitro* de alcachofra são de pouco espaço requerido, facilidade de manuseio, homogeneidade do progênie conservado, evitando a erosão genética e garantia da sanidade do material conservado (BEKHEET, 2007).

O sucesso da micropropagação pode estar na dependência de fatores genéticos, fisiológicos ou ambientais, podendo ser encontrada grande variabilidade nas respostas *in vitro*. A variabilidade existente na resposta morfogenética *in vitro*, não apenas entre espécies do mesmo gênero, mas também entre progênies da

mesma espécie, leva à necessidade de se definirem protocolos diferenciados.

A micropropagação é uma alternativa para produção de mudas uniformes, com manutenção de características genéticas e livres de viroses e bacterioses. Porém, para que a técnica de micropropagação seja empregada com sucesso na produção de mudas de alcachofra, é necessário desenvolver protocolos adequados para multiplicação *in vitro* de progênies selecionados.

2.4 Substratos Hortícolas

Diversos materiais podem ser utilizados como substratos hortícolas, sendo divididos em duas grandes categorias: minerais, como por exemplo, a areia, vermiculita e a lã de rocha, e orgânicos, como por exemplo, a turfa, casca de arroz, casca de café, palha, serragens. Os substratos de origem mineral apresentam como maior vantagem sua inércia química. Os de origem orgânica podem sofrer alguma decomposição durante o período em que estão em contato com as raízes das plantas. Essa decomposição se for intensa, pode modificar o equilíbrio mineral do meio radicular (CARON, 2004).

Os substratos exercem grande importância no crescimento e desenvolvimento das plantas. Substrato é o meio onde se desenvolvem as raízes das plantas cultivadas fora do solo, servindo de suporte para as planta, podendo regular a disponibilidade de nutrientes para as raízes. Pode ser formado de solo mineral ou orgânico, e de um ou diversos materiais em misturas (KÄMPF, 2000).

De acordo com Calvete (1998), o substrato é o meio de sustentação ou de suporte das raízes e apresenta grande importância como meio de enraizamento inicial de mudas jovens, pois, conforme suas propriedades podem facilitar ou impedir o crescimento das plantas. O desenvolvimento das raízes em recipiente é diferente do apresentado no campo, considerando as restrições de espaço. Portanto, o substrato deve ser melhor que o solo, em características como a economia hídrica, aeração, permeabilidade, poder de tamponamento para pH e capacidade de retenção de nutrientes. O material deve apresentar alta estabilidade de estrutura, para evitar compactação; alto teor em fibras resistentes à decomposição, para impedir a compostagem no recipiente; e estar livre de agentes causadores de doenças, de pragas e de ervas daninhas (KÄMPF, 2000). Como normalmente é difícil encontrar todas as características ideais num único componente, são utilizadas misturas de materiais para proporcionar a obtenção de um melhor substrato (WENDLING et al., 2002). Para melhorar as características físicas e químicas, se adicionam materiais melhorados denominados condicionadores (FERMINO & BELLÉ, 2000).

Conforme Taveira (1996) são vários os critérios para a escolha do substrato mais adequado, como o custo e as características físico-químicas, difíceis de avaliar numa primeira análise, mas a primeira recomendação é escolher em função do sistema de irrigação ou fertirrigação que será adotado no viveiro. De acordo com Verdonck et al. (1981), as propriedades físicas e químicas dos diferentes substratos hortícolas diferem de acordo com a origem dos seus componentes. Portanto, é necessário conhecer essas propriedades

antes do seu uso para poder ajustá-los às diferentes circunstâncias de uso.

Entre as características físicas mais importantes na determinação da qualidade de um substrato, destacam-se a densidade seca (DS), a porosidade total (PT), o espaço de aeração (EA), a água facilmente disponível (AFD), a água disponível (AD) e a água de reserva ou tamponante (AT). Quanto às características físico-químicas dos substratos que mais influenciam na resposta das plântulas, é a água facilmente disponível, a mais importante a ser observadas na escolha de um substrato para aclimatização.

A porosidade total (PT) é a diferença entre o volume total e o volume de sólidos em dado volume de um substrato hortícola (CALVETE, 1998). A porosidade quantifica a fração do volume total do solo ocupado pelos poros, os quais podem estar preenchidos por ar (macroporos) ou por água (microporos).

O espaço de aeração (EA) corresponde ao volume de ar apresentado pelo substrato, após a drenagem. Esse valor é dado pela diferença entre a porosidade total e a porcentagem do volume de água a 10 cm de sucção (DE BOODT & VERDONCK, 1972)

A água disponível (AD) corresponde ao volume de água liberado entre 10 e 100 cm de sucção. Este valor compreende a água facilmente disponível (AFD), entre 10 e 50 cm, e a água de reserva ou tamponante (AT) entre 50 e 100 cm.

As características consideradas ideais segundo Boodt & Verdonck (1972), são de porosidade total, PT ($> 0,85$), espaço de aeração, EA (0,2 e 0,3), água facilmente distribuída, AFD (0,2 e 0,3) e água tamponante, AT (0,04 e 0,1). A qualidade de um substrato para

semeadura de hortaliças em bandejas depende de sua estrutura física e de sua composição química. Deve ser de baixa densidade, absorver e reter adequadamente a umidade e conter macro e micronutrientes em níveis suficientes, pois as espécies olerícolas, regra geral, crescem rapidamente, sendo bastante exigentes (SILVA JUNIOR & VISCONTI, 1991).

A determinação da curva de retenção de água de um substrato, segundo Fermino et al. (2000), é importante na medida em que informa o volume de água disponível às plantas dentro de cada faixa de tensão em uma determinada amostra. Maior volume de água disponível a baixas tensões representa menor gasto de energia pela planta para absorvê-la. Plantas submetidas a estresse moderado por falta de água ou salinidade excessiva são estimuladas a acumular e manter níveis elevados de solutos orgânicos no citoplasma, à custa de energia desviada de funções de crescimento. Esse acúmulo de solutos é uma forma de reduzir o potencial osmótico interno das células, e, assim, o potencial da água da planta como um todo, gerando um gradiente favorável à absorção de água. Esse fenômeno é denominado de ajuste osmótico (TAIZ & ZEIGER, 1998) ou condicionamento osmótico, e reduz a taxa de crescimento da planta.

Comin et al. (2007) testaram varios substratos para a aclimatizacao de mudas de alcachofra produzidas *in vitro* na Universidade de Passo Fundo e recomendaram o uso do substrato comercial Mecplant e temperatura de 10 °C para a eficiente recuperação das plantas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi constituído de três Experimentos (I, II e III) os quais foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Setor de Horticultura da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF).

3.1. EXPERIMENTO I – CULTIVO *IN VITRO* DE ÁPICES CAULINARES DE TRÊS CULTIVARES DE ALCACHOFRA PRODUZIDAS NO CAMPO

3.1.1 Material

Foram utilizadas três cultivares de alcachofra neste estudo: Romanesca, Verde Redonda e Verde Redonda Melhorada. Foram doadoras de explantes (5 clones da cultivar Romanesca, 12 clones da cultivar Verde Redonda e 12 clones da Verde Redonda Melhorada), num total de 29 clones anteriormente selecionadas por apresentarem características desejáveis para o consumo *in natura*, capítulo grande, redondo, apresentando coloração roxa e sem espinhos (REOLON DA COSTA, et al., 2011). As plantas doadoras de explante foram cultivadas no campo experimental da FAMV da Universidade de Passo Fundo em março de 2010 até a produção de novos rebentos de onde foram obtidos os ápices caulinares.

3.1.2 Fase de Assepsia e isolamento

Brotações jovens (rebentos) dos clones selecionados de alcachofra (25 a 30 cm) foram coletados, no campo, nos meses de fevereiro e março, e estabelecidos em floreiras com substratos composto de 50% casca de arroz carbonizada + 50% substrato comercial Mecplant Horta-2® em estufa semi-climatizada, onde receberam tratamento fitossanitário, utilizando fungicida com princípio ativo de Metalaxyl-M + Mancozeb, três dias antes da coleta dos propágulos, e adubação por aproximadamente três meses (Figuras 1a,b).



Figura 1 - (a) Brotações de alcachofra coletados do campo e cultivados em substrato, em estufa semi-climatizada; (b) Plantas desenvolvidas após três meses, antes da retirada dos ápices caulinares. FAMV – UPF, Passo Fundo/RS - 2011.

Para obtenção dos ápices caulinares, as folhas adultas, juntamente com a porção radicial dos brotos foram eliminadas, restando apenas um material constituído de parte das folhas mais internas e uma pequena porção basal, medindo cerca de 3,0 cm de

comprimento (Figura 2d). Este foi submetido à assepsia em etanol 70% por 5 minutos, seguido pela imersão em solução de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) por 20 minutos (Figura 2b).

Os ápices caulinares de aproximadamente 0,5 cm, foram isolados em câmara de fluxo laminar com o auxílio de um estereomicroscópio (Figura 2c) e inoculados no meio de isolamento, em tubos de ensaio, constituído por meio MS modificado (MORONE-FORTUNATO & RUTA, 2003), suplementado com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2iP 6-(γ,γ -dimetil-alilamino)-purina) + $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA (ácido-indolacético) + $0,025 \text{ mg.L}^{-1}$ GA₃ (ácido giberélico) + 20 g.L^{-1} de sacarose + $7,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ágar.

Para controle de microrganismos foram adicionados ao meio de isolamento a) hipoclorito de sódio $1,0 \text{ mL.L}^{-1}$ (NaClO) comercial contendo 2,5% de cloro ativo após a autoclavagem; b) gentamicina 20 mg.L^{-1} , c) Combinação de hipoclorito + gentamicina. As culturas foram mantidas no escuro por uma semana, e posteriormente expostas à luz com fotoperíodo diário de 12 horas utilizando, luz branca fluorescente de 20 watts com $6,75 \mu.\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de lux e temperatura de 25 °C.

Foram cultivados em cada um dos tubos de ensaio um ápice caulinar, constituindo assim uma repetição.



Figura 2 – Etapas do preparo do material vegetal de alcachofra para o cultivo *in vitro* (a) Material vegetal medindo cerca de 3,0 cm após a remoção das folhas adultas e porção radicular; (b) Processo de Assepsia das brotações de alcachofra; (c) Retirada de ápice caulinar com auxílio de lupa estereomicroscópica; (d) Ápices caulinares em meio de isolamento. FAMV/ UPF, Passo Fundo – RS - 2011.

3.1.3 Fase de Multiplicação

Decorridos 30 dias, os propágulos foram transferidos do meio de isolamento para o meio de multiplicação composto por meio MS modificado com os seguintes suplementos: MS modificado suplementado com $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ANA (GRANDO et al., 2011), em frascos de 10 cm de altura, de vidro transparente, com tampa plástica de coloração branca, e com aproximadamente 30 ml de meio de cultura, mantidos em câmara climatizada com temperatura de 25°C e fotoperíodo diários de 12 horas, utilizando luz fluorescente branca de 20 watts de aproximadamente $6,75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de lux.

Foram realizadas três subcultivos consecutivos a cada 30 dias utilizando a mesma composição do meio de multiplicação.

3.1.4 Delineamento experimental e Variáveis analisadas

O delineamento experimental foi o completamente casualizado para todos os estádios da micropropagação e a unidade experimental foi composta por um ápice/propágulo/plântula com um número variável de repetições, conforme a disponibilidade do material.

Na fase de isolamento foram observadas as frequências de contaminação e sobrevivência dos ápices caulinares após 30 dias de cultivo. Os tratamentos foram: 3 genótipos x 3 agentes antimicrobianos adicionados ao meio de cultura, no total de 9 tratamentos, sendo o número de repetições variável para cada cultivar de acordo com a disponibilidade do material selecionado.

Na fase de multiplicação foram avaliadas as taxas de multiplicação observada em três subcultivos sucessivos. A taxa de multiplicação diz respeito a média do número de novos brotos axilares obtidos por broto pré-existente. Os tratamentos foram: Genótipos x Meio de cultura.

3.2 EXPERIMENTO II – CULTIVO *IN VITRO* DE ÁPICES CAULINARES DE PROGÊNIES DE ALCACHOFRA PROVENIENTES DE PLÂNTULAS OBTIDAS DE SEMENTES

3.2.1 Material

Foram utilizados para este experimento ápices caulinares de plântulas provenientes de sementes de seis progênies selecionadas do programa de melhoramento de alcachofra da UPF. Estas progênies são originadas da população C0 de seleção recorrente resultante do cruzamento de Romanesca e Verde Redonda melhorada, selecionadas de acordo com as seguintes características: formato do capítulo, coloração, tamanho, curvatura das brácteas, ausência de espinhos, ausência de umbigo (orifício) nos capítulos, boa produtividade e maior número de capítulos secundário sendo elas: B1L3R1, B2L4R6, B3L4R2, B3L5R2, B4L5R6 e B5L1R4, foram semeadas o total de 100 sementes de cada progênie, totalizando 600 sementes, em bandejas de isopor com 72 células, (Figura 3a) com substrato esterilizado Mecplant Horta 2[®], mantidas em estufa semi-climatizada, com controle fitossanitário regular a cada 30 dias, utilizando fungicida com princípio ativo de Metalaxyl-M + Mancozeb, e também a cada 3 dias, antes da retirada da plântula para processo de cultivo *in vitro*. A semeadura ocorreu em fevereiro de 2012. Após 90 dias estas plantas foram transferidas e cultivadas em floreiras, mantidas em substrato comercial e estufa semi-climatizada, seguindo assim a retirada dos ápices caulinares (Figura 3b).



Figura 3 – (a) Plântulas de alcachofra provenientes de sementes de plantas selecionadas de seis progênies C0, com 20 dias; (b) Plântulas de alcachofra doadoras dos ápices caulinares aos 60 dias de cultivo em estufa semi-climatizada, da FAMV - UPF- Passo Fundo- RS - 2012.

3.2.2 Fase de Assepsia e Isolamento

Após 90 dias da sementeira, foram coletadas plântulas de alcachofra para obtenção dos explantes utilizados *in vitro*. As folhas das plântulas, juntamente com a porção radicular foram eliminadas, restando apenas um material constituído de parte das folhas mais internas e uma pequena porção basal, medindo cerca de 3,0 cm (Figura 4a). Para assepsia os explantes foram imersos em álcool 70% por 3 minutos, e a seguir imersos em hipoclorito de sódio a 1,5% de cloro ativo com ajuste para pH 6,0, durante 10 minutos, em câmara de fluxo laminar. Após foram lavados 4 vezes em água esterilizada, onde foram mantidos até a retirada do ápice caulinar (Figura 4b).

Os ápices caulinares de aproximadamente entre 0,3 e 0,5 cm, foram isolados em câmara de fluxo laminar com o auxílio de uma lupa estereomicroscópica (Figura 4b) e inoculados no meio de isolamento constituído por meio MS modificado (MORONE-FORTUNATO & RUTA, 2003), suplementado com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ 2iP 6-(γ,γ - dimetil-alilamino-purina) + $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA (ácido indolacético) + $0,025 \text{ mg.L}^{-1}$ GA₃ (ácido giberélico) + 20 g.L^{-1} de sacarose + $7,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ágar. Para controle de microrganismos foi adicionado ao meio de isolamento 20 mg.L^{-1} de gentamicina após a autoclavagem.

Foi cultivado em cada tubo de ensaio um ápice caulinar constituindo uma repetição. Para cada progênie foram utilizadas 55 amostras diferentes, contabilizando 55 repetições. Os tubos foram mantidos no escuro por uma semana, e posteriormente expostos fotoperíodo de 12 horas, utilizando fluorescentes, luz branca de 20 watts de aproximadamente 500 a medida de luz fotossintética e temperatura de 25°C.



Figura 4 – a) Obtenção das brotações de alcachofra proveniente de plântulas jovens obtidas de 6 progênies de alcachofra; (b) processo de assepsia das brotações. (c) Retirada de ápice caulinar de alcachofra com auxílio de lupa estereomicroscópica em câmara de fluxo laminar. FAMV /UPF- Passo Fundo – RS – 2012.

3.2.3 Variáveis analisadas

Foi avaliada a frequência de contaminação e sobrevivência com identificação visual dos propágulos contaminados após 30 dias de cultivo. O delineamento experimental foi o completamente casualizado e a unidade experimental foi composta por um ápice/propágulo com 55 repetições.

3.3 EXPERIMENTO III - MICROPROPAGAÇÃO DE ALCACHOFRA A PARTIR DE SEMENTES GERMINADAS *IN VITRO*

3.3.1 Material

Sementes de três progênies de uma população C0 de seleção recorrente do Programa de Melhoramento Genético de Alcachofra da UPF denominadas de (P1)B2L4R6, (P2)B1L4R7, (P3)B1L3R1, foram utilizadas como fonte de explantes. Estas progênies são provenientes do cruzamento entre clones selecionados das cultivares Romanesca e Verde Redonda Melhorada, selecionadas por apresentarem características desejáveis ao consumo *in natura*, ou seja, capítulo grande, redondo, apresentando coloração roxa e sem espinhos (REOLON DA COSTA et al., 2011). Estas cultivares são classificadas como cultivares tardias de alcachofra pertencente ao grupo Romanesco.

As plantas foram cultivadas no campo experimental da FAMV da Universidade de Passo Fundo em março de 2010, de onde foram obtidas as sementes utilizadas neste experimento.

3.3.2 Assepsia da semente, germinação *in vitro* e obtenção dos explantes

As sementes foram tratadas com fungicida Derozal plus, utilizando 2 ml/Kg de sementes. O procedimento foi realizado com a aplicação de fungicida dentro de saco plástico, homogeneizado com as sementes, sendo, em seguida as mesmas mantidas em temperatura ambiente até a secagem. Para a assepsia as sementes foram embebidas em álcool 70% durante 30 minutos, logo após em hipoclorito de sódio puro por 10 minutos, com concentração de 1,5% de cloro ativo, com pH ajustado para 6,0 em seguida foram mantidas em água esterilizadas por 48 horas, no escuro.

Após este período foram lavadas em água esterilizadas por três vezes. O tegumento das sementes foi retirado com auxílio de pinças e bisturi, em câmara de fluxo laminar, em ambiente estéril sendo estas semeadas em meio de cultura MS completo (MURASHIGE & SKOOG, 1962) para a germinação. As sementes colocadas *in vitro* foram mantidas no escuro durante sete dias, e após este período expostas a luz por mais 14 dias, com fotoperíodo de 12 horas e com temperatura controlada de 25 °C. Assim, após 21 dias do cultivo as plântulas obtidas *in vitro* foram clivadas em três regiões compreendendo a região do ápice caulinar, epicótilo e hipocótilo,

conforme mostrado na Figura 5, as quais foram utilizadas como explante.

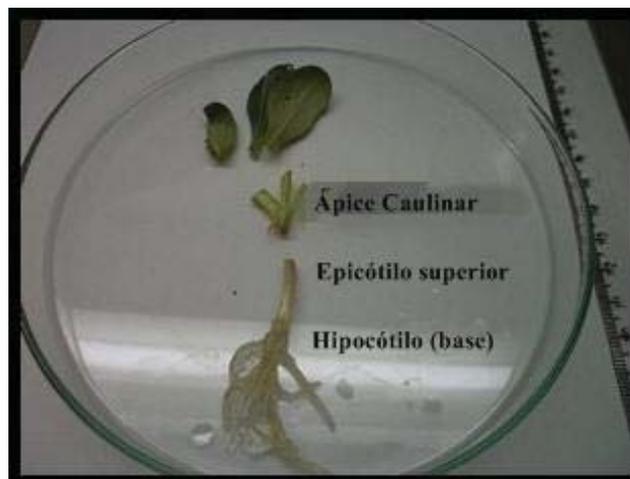


Figura 5 – Regiões de corte da plântula de alcachofra proveniente de semente germinada *in vitro* por 21 dias: região contendo o ápice caulinar, segmento do epicótilo e segmento do hipocótilo.

3.3.3 Fase de estabelecimento do cultivo *in vitro*

Cada explante foi cultivado em dois meios de cultura. O meio 1 (M1) foi composto do meio MS modificado com microelementos de Nitsch (NITSCH & NITSCH, 1972) acrescido de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA. O meio 2 (M2) foi constituído de meio MS com vitaminas B5 (GAMBORG et al., 1968) acrescidos de 1 mg.L^{-1} de kinetina, 40 mg.L^{-1} de sulfato de adenina e 50 mg.L^{-1} de fosfato monossódico (modificado de SERGHINI et al., 2012).

Os tratamentos constaram de três progênies, três explantes e dois meios de cultura, totalizando 18 tratamentos com 5

repetições. Cada repetição foi constituída por um frasco contendo um explante, e o delineamento empregado foi o completamente casualizado. As culturas foram mantidas por 30 dias em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25 °C.

3.3.4 Fase de Multiplicação

Decorridos 30 dias, os propágulos foram transferidos da fase de estabelecimento *in vitro* para o meio de multiplicação composto por Meio de cultura 1 (M1) e Meio de cultura 2 (M2), conforme descritos acima. Então foram mantidos em câmara climatizada nas mesmas condições descritas acima. Foram realizadas quatro subcultivos consecutivos a cada 30 dias utilizando meio fresco da mesma composição inicial.

O delineamento experimental foi o completamente casualizado com 5 repetições. As repetições foram constituídas de um frasco com 5 propágulos. Os tratamentos foram constituídos de três progênies selecionadas, três explantes e dois meios de cultura.

Validação da taxa de multiplicação em progênies de alcachofra utilizando a metodologia descrita acima

Para validar a metodologia descrita para a multiplicação *in vitro* de alcachofra, o experimento foi repetido utilizando somente a região do ápice caulinar de sementes germinadas *in vitro* de três progênies de alcachofra (P1= B2L4R6; P2= B1L4R7, P3= B1L3R1) cultivados nos meios de multiplicação M1 e M2.

Na etapa de validação a unidade experimental foi um frasco contendo 5 unidades experimentais, num total de 8 repetições, de onde foi avaliada a taxa de multiplicação, comprimento das brotações medindo pela altura da maior folha (cm), número médio de folhas por brotação.

3.3.5 Variáveis e análise estatística para a fase de estabelecimento e multiplicação

Na fase de estabelecimento *in vitro* foi avaliada a frequência de explantes desenvolvidos, apresentando brotações e contaminados.

Na fase de multiplicação foi avaliada, ao final de cada subcultivo, a taxa de multiplicação, comprimento das brotações (medido pela altura da maior folha / cm), número médio de folhas por brotação, massa fresca (g) e massa seca das brotações produzidas em quatro subcultivos sucessivos. Também foram contabilizadas as plantas sobreviventes, vitrificadas e contaminadas. A taxa de multiplicação foi obtida mediante a contagem dos novos propágulos (brotos axilares) originados a partir de um propágulo inicial. Para obtenção da massa seca, os propágulos foram colocados em estufa com temperatura constante de 65 °C, por 72 horas, seguido de pesagem em balança digital.

Para análise estatística os dados foram submetidos à análise de variância e médias das variáveis comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

3.3.6 Enraizamento

Propágulos de duas progênies P1 (B2L4R6) e P2 (B1L4R7) obtidos após quatro subcultivos foram transferidos para o meio de pré-enraizamento constituído de meio MS sem suplementação de reguladores de crescimento e permanecendo por 30 dias em câmara de cultura com fotoperíodo de 12 horas, com lâmpadas de luz fluorescentes sob intensidade de aproximadamente $6,75 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de lux e Temperatura de 20°C .

Em seguida foram transferidos para meio de enraizamento composto por MS modificado + $10 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIA + $30 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose (MORONE-FORTUNATO et al., 2005), permanecendo por mais 30 dias.

Após este período as plantas enraizadas e os propágulos que não apresentaram raízes visivelmente desenvolvidas, foram conduzidas para a fase de aclimatização. Na fase de enraizamento foram avaliadas a frequência de enraizamento (%), comprimento da maior raiz (cm), volume de raiz (cm^3) e número de folhas. O delineamento experimental foi o completamente casualizado e a unidade experimental foi composto por um broto/plântula de duas progênies. A análise estatística foi realizada através da análise de variância e as médias das variáveis comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

3.3.7 Aclimatização

A primeira etapa de aclimatização foi efetuada em câmara climatizada com temperatura média do ar no interior do ambiente de aproximadamente 25 °C, e fotoperíodo de 16 horas, com lâmpadas fluorescentes luz do dia de 110 watts, com aproximadamente 1000 a medida de luz fotossintética. Quando as plântulas das progênies P1 e P2 apresentaram de 3,0 a 7,0 cm, foram retiradas do meio de enraizamento e, após lavagem das raízes em água corrente, transferidas para vasos plásticos de 500 ml e protegidas por frascos de vidro transparente, individualmente, durante 10 dias e mantidas nas condições acima descritas.

Durante essa etapa as mudas foram irrigadas em sistema de *floating*, através de bandejas de alumínio medindo 40x25x5 cm, por subcapilaridade, compostas de um conjunto de 5 vasos, conforme a necessidade destas. Não houve adição de solução nutritiva, por um período de 30 dias.

Os tratamentos constituíram-se de duas progênies (P1 e P2) e três substratos, sendo utilizado o substrato comercial Mecplant Horta 2 ® e Casca de arroz carbonizada, em três diferentes concentrações: S1: Mecplant Horta 2 ® 100%, S2: 50% substrato comercial Mecplant Horta 2 ® e 50% Casca de arroz carbonizada (CAC) e S3: 100% Casca de arroz carbonizada (CAC). Os tratamentos (progênies x substratos) foram distribuídos em delineamento completamente casualizado. Após 30 dias de aclimatização foram obtidas as frequências das plantas sobreviventes nos diferentes substratos.

Nos substratos foram analisadas as características físico-químicas nos Laboratórios de Física dos Solos e de Solos, da FAMV/UPF. Para caracterização química, determinou-se o pH em H₂O, condutividade elétrica (CE) e capacidade de troca de cátions (CTC). Para a caracterização física, efetuou-se densidade (DS), porosidade total (PT), espaço de aeração (EA), água facilmente disponível (AFD) e água tamponante (AT) obtidas através da curva de retenção de água pelo método do funil de placa porosa, a partir das sucções de 0; 10; 50 e 100 cm (0; 1; 5 e 10 Kpa), fundamentado por De Boodt & Verdock (1972) e Libardi (1995) e descrito por Calvete (1998).

Após o período de aclimatização, as plântulas foram transferidas para floreiras retangulares de plástico, de coloração preta, medindo 35x15x12 cm em substrato comercial Mecplant Horta 2 ® (100%) e mantidas em estufa plástica com ambiente semi-controlado, medindo 499,20 m² (12,8x39m) e coberta por filme de polietileno de baixa densidade (PEBD) do tipo difusor e anti-UV, permanecendo a temperatura média do ar ao redor de 25 °C, no período de dezembro/2012 até março/2013, sendo avaliadas quanto a taxa de sobrevivência após 30 dias do transplante. Os dados coletados foram avaliados através do cálculo de porcentagem.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 EXPERIMENTO I – CULTIVO *IN VITRO* DE ÁPICES CAULINARES DE TRÊS CULTIVARES DE ALCACHOFRA PRODUZIDAS NO CAMPO

4.1.1 Fase de Isolamento

Os ápices caulinares de alcachofra obtidos de rebentos produzidos no campo apresentaram alto nível de contaminação bacteriana e fúngica quando cultivados *in vitro*. A adição de hipoclorito de sódio no meio de isolamento não foi efetivo para o controle por contaminação. A contaminação esteve presente em explantes das três cultivares utilizadas (Tabela 2).

Do total de 74 ápices caulinares, 45,9 % sobreviveram à fase de isolamento e 54,1 % foram perdidos devido a contaminação. A figura 6 mostra aspectos das contaminações observadas neste experimento.

A perda de mais de 50% dos explantes iniciais por contaminação é um fato esperado e relatado para a espécie, devido ao explante ser originado do campo. Alternativamente poderiam ser testadas outras fontes de explantes como discos foliares, gemas dormentes subterrâneas entre outros locais onde é possível reproduzir uma nova planta.

Tabela 2 – Porcentagem de ápices caulinares de alcachofra sobreviventes e contaminados por fungos e bactérias, durante o cultivo em meio de isolamento contendo hipoclorito de sódio, hipoclorito de sódio + gentamicina, e gentamicina

Tratamento infecção no Meio de isolamento	Cultivares de alcachofra*	Ápices	Ápices		Ápices	
		caulinares cultivados N.º	Nº	%	caulinares contamina dos Nº	%
Hipoclorito de sódio	RM*	15	05	33,3	10	66,7
	VR*	23	13	56,5	10	43,5
	VRM*	09	03	33,3	06	66,7
Subtotal		47	21	44,7	26	55,3
Hipoclorito + Gentamici na	RM*	02	01	50,0	01	100,0
	VR	03	00	50,0	03	37,5
	VRM	08	04	80,0	04	50,0
Subtotal		13	05	38,5	08	61,5
Gentamici na	RM*	02	01	50,0	01	50,0
	VR	06	03	50,0	02	50,0
	VRM	06	04	66,7	03	33,3
Subtotal		14	08	57,2	06	42,8
Total		74	34	45,9	40	54,1

* RM: Romanesca; VR: Verde Redonda; VRM: Verde Redonda melhorada.



Figura 6 – Ápices caulinares de alcachofra no meio de isolamento: contaminação de diferentes clones por bactérias e fungos (após 15 dias de cultivo *in vitro*)

A utilização da combinação de hipoclorito de sódio com o antibiótico gentamicina, ou somente gentamicina, adicionados ao meio de isolamento, também não foi eficiente para controlar as contaminações nesta fase do estabelecimento do cultivo *in vitro* de alcachofra, de forma que houve perda de mais de 50% do material inoculado pela presença de bactérias e fungos provenientes dos tecidos cultivados.

As contaminações ocorreram por bactérias (42,5%), por fungos (32,5 %) e pela associação de bactérias e fungos (25%), conforme demonstra a tabela 3. Dos 34 explantes que sobreviveram 4 (11,8%) foram perdidos por oxidação.

Tabela 3 – Porcentagem de ápices caulinares de três cultivares alcachofra contaminados por bactérias, fungos e bactérias + fungos após 30 dias de cultivo em meio de isolamento contendo hipoclorito de sódio, hipoclorito de sódio + gentamicina, e gentamicina

Tratamento infecção no Meio de isolamento	Cultivares de alcachofra*	Ápices caulina res contam inados	Bactérias		Fungos		Bactérias + Fungos	
			Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)
Hipoclorito de sódio	RM*	10	05	50,0	03	30,0	2,0	20,0
	VR*	10	01	10,0	02	20,0	7,0	70,0
	VRM*	06	02	33,3	03	50,0	1,0	16,7
Subtotal		26	08	30,8	08	30,8	10	38,4
Hipoclorito + Gentamicina	RM*	01	01	100,0	00	-	00	-
	VR	03	01	33,3	02	66,7	00	-
	VRM	04	03	75,0	01	25,0	00	-
Subtotal		08	05	62,5	03	37,5	00	-
Gentamicina	RM*	01	01	100,0	00	-	00	-
	VR	03	03	100,0	00	-	00	-
	VRM	02	00	-	02	100	00	-
Subtotal		06	04	66,7	02	33,3	00	
Total		40	17	42,5	13	32,5	10	25,0

*RM: Romanesca; VR: Verde Redonda; VRM: Verde Redonda melhorada.

O alto nível de contaminação observado pode ser atribuído ao fato de que as plantas matrizes usadas como doadoras dos explantes serem provenientes do campo e não foram submetidas a controle fitossanitário, ou este controle não foi satisfatório, indicando

a importância da qualidade fitossanitária das plantas doadoras dos explantes.

Medeiros (1999) afirmou que o nível de contaminação tende a ser maior quando as plantas matrizes, usadas como fonte de explantes, são provenientes do campo. O hipoclorito de sódio tem sido usado com sucesso na composição do meio de cultura para controle das infecções nos estádios iniciais do cultivo *in vitro*, pois apresenta excelente atividade antibacteriana relacionada com a formação de compostos contendo cloro ativo (como o ácido hipocloroso e o íon hipoclorito) (TEIXEIRA et al., 2008). A adição de antibiótico no meio de cultura tem sido utilizada com esta mesma finalidade (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). A utilização de antibióticos no cultivo *in vitro*, é também interessante para o controle de contaminações bacterianas endógenas que frequentemente representam problemas no estabelecimento *in vitro* das culturas.

Chaves et al. (2005) ratificam que um dos maiores entraves do cultivo *in vitro* está na dificuldade de obter tecidos livres de contaminação, principalmente por bactérias, pois nem sempre se pode eliminá-las com o uso de antibióticos. O uso de diferentes agentes germicidas é fundamental para a redução da contaminação dos explantes. A concentração da solução desinfetante, a combinação dos princípios ativos e o tempo de exposição podem variar muito (MONTARROYOS, 2000), por isso é necessário a adequação do protocolo de desinfestação de acordo com a espécie, cultivar e a sensibilidade do tecido a ser desinfestado (CHAVES et al., 2005).

Mesmo os compostos antifúngicos e antibacterianos de amplo espectro frequentemente apresentam dificuldades em eliminar

todos os microorganismos alvo, além de causarem efeitos colaterais negativos no crescimento das culturas vegetais *in vitro* (LEIFERT et al., 1991; OTONI et al., 2003). O efeito microbiano é somente suprimido pelos tratamentos antimicrobianos de modo que as bactérias são capazes de retornar a sua multiplicação após a interrupção do tratamento (CASSELLS, 1994).

De acordo com Grando et al., (2011), o hipoclorito de sódio e o antibiótico gentamicina foram eficazes, no estabelecimento da cultivar Nobre que apresentou 53% de contaminação em meio de isolamento sem adição de bactericidas, adicionado hipoclorito de sódio no meio de isolamento, ocorreu somente 15 % de contaminação, e com o uso de gentamicina os autores observaram somente 5 % de contaminação bacteriana.

Este resultado sugere que a adição de agentes bactericidas para o meio de isolamento pode reduzir significativamente a perda de explantes devido a contaminação bacteriana, a qual foi considerada como um dos fatores que limitam a aplicação da técnica de micropropagação para a referida cultivar.

Outro problema comum encontrado no estabelecimento da cultura de ápices caulinares e meristemas em alcachofra é o escurecimento do explante no meio de isolamento. Este processo de escurecimento se dá pela oxidação dos tecidos, e tem sido controlado pelo tratamento do explante de alcachofra com soluções antioxidantes contendo ácido ascórbico e/ou ácido cítrico (ANCORA et al.; 1981; IAPICHINO, 1996; BRUTTI et al.; 2000; ELIA et al.; 2007; TAVAZZA et al.; 2007; BEDINI et al.; 2012).

No entanto, no presente experimento a frequência dos explantes oxidados foi baixa, ou seja, dos 34 explantes, apenas 4 oxidaram mesmo sem a utilização de pré-tratamentos com agentes antioxidantes. Isso pode ser devido as diferenças genéticas dos materiais utilizados neste estudo e/ou diferença ambiental no cultivo.

A contaminação por patógenos nas fases iniciais de cultivo *in vitro* de explantes, provenientes do campo tem sido amplamente relatado em alcachofra e é considerada uma das limitações encontradas para a aplicação da micropropagação nesta espécie (LAUZER & VIETH, 1990; ROSSI & De PAOLI, 1992; BEDINI et al.; 2012). Rossi & De Paoli (1992), obtiveram de 50 a 60 % de explantes contaminados utilizando 2-3% hipoclorito de sódio.

Muitos trabalhos relatam a utilização de cloreto de mercúrio para a assepsia de ápices caulinares de alcachofra com algum nível de sucesso (BRUTTI et al.; 2000; TAVAZZA et al.; 2007). No entanto, Bedini et al. (2012) observou 54% de contaminação em ápices esterilizados principalmente por cloreto de mercúrio e hipoclorito de sódio, sugerindo que os contaminantes podem ser de origem endógena.

O cloreto de mercúrio potencialmente mais tóxico que outros agentes e sua utilização na desinfecção não se mostrou mais eficiente que a combinação de hipoclorito de sódio e gentamicina aplicados durante a assepsia ou adicionados no meio de isolamento de ápices caulinares de alcachofra C. Nobre (SUZIN et al. 2008).

A dificuldade com as contaminações observadas no cultivo *in vitro* de ápices caulinares e meristemas tem levado alguns pesquisadores a utilizar embriões maduros, obtidos das sementes de

alcachofra como explantes para a micropropagação (LAUZER & VIETH, 1990; BOULLANI et al.; 2012).

4.1.2 Fase de Multiplicação

Após 30 dias do isolamento, 30 propágulos saudáveis foram transferidos para o meio de multiplicação, sendo subcultivados em meio de multiplicação fresco, de mesma composição, a cada 30 dias, por três subcultivos.

Ao longo dos subcultivos, os propágulos cresceram, formando folhas bem desenvolvidas (Figura 7), mas não apresentaram formação de novas brotações que permitisse a multiplicação dos mesmos.



Figura 7 – Propágulo de alcachofra no meio de multiplicação no Subcultivo II. FAMV - UPF - Passo Fundo - RS -2011.

Durante os subcultivos também foi observado o desenvolvimento de bactérias, o que por sua vez pode ter interferido no desenvolvimento de novos brotos. Hipoclorito e gentamicina para o

controle de patógenos não foram acrescentados no meio de multiplicação e 41% dos propágulos foram perdidos por contaminações, principalmente bacteriana (Figura 8).

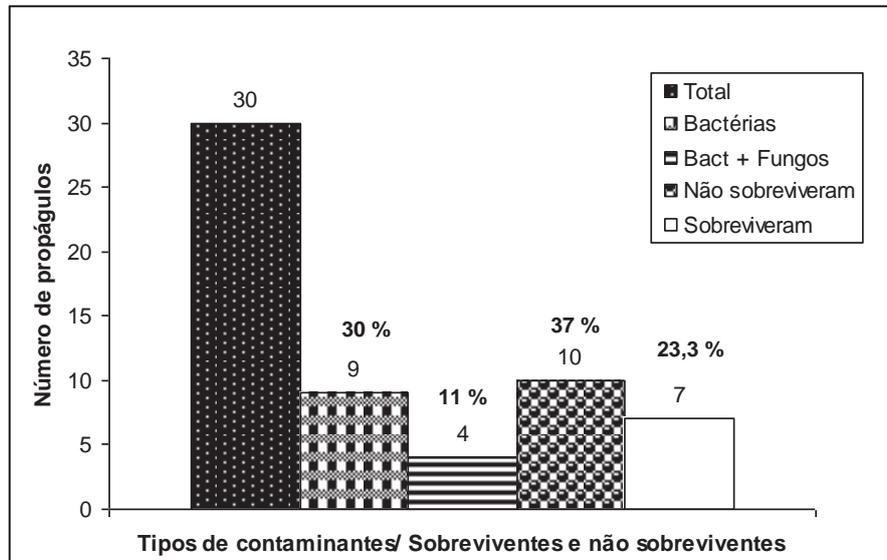


Figura 8 – Número e Frequência de propágulos de alcachofra: morte e sobreviventes após 3 subcultivos em meio de multiplicação – FAMV-UPF. Passo Fundo – RS- 2011.

No final do período de três subcultivos, somente permaneceram vivos e saudáveis sete propágulos (23,3%) dos 30 iniciais. A figura 8 apresenta a frequência de infecção por bactéria (30%), e por bactérias + fungos (11%) durante a fase de multiplicação e também 10 propágulos morreram (37%) mesmo sem apresentar sinais visíveis de contaminação. Isso pode indicar a ineficiência do meio de cultura no desenvolvimento dos propágulos. Os sete propágulos sobreviventes não se multiplicaram em 3 subcultivos realizados. As plantas apenas se mantiveram no meio de cultura, sem

nenhuma multiplicação, indicando que talvez a composição do meio de cultura utilizado pode não ser eficiente para induzir a brotações axilares nos progênies de alcachofra utilizados, ou ainda que substâncias tóxicas provenientes de contaminações bacterianas possam ter impedido o tecido de apresentarem respostas morfogênicas.

O fato de bactérias surgirem de propágulos saudáveis e já na fase de multiplicação indica que as mesmas são de origem endógena. O aparecimento de bactérias após um período maior de cultivo *in vitro* indica que elas são bactérias que vivem no interior do tecido vegetal e passam a viver fora dele quando se adaptam ao meio nutritivo e condições de cultura. Segundo Pierik (1988), as bactérias podem necessitar de condições de adaptação *in vitro*, ou pode não estar apta a multiplicar-se até que a cultura seja transferida para um meio favorável para seu crescimento.

Durante a micropropagação, é comum ocorrer perdas significativas de material devido à contaminação por microrganismos endofíticos, principalmente fungos e bactérias. A ocorrência desse tipo de contaminação é mais freqüente quando se realiza a micropropagação de espécies lenhosas, ou quando a assepsia é difícil de ser executada, devido às características do explante, ou por este estar localizado em regiões da planta matriz próximas do solo (SUZIN et al., 2008), como é o caso da alcachofra (MAUROMICALE, 1984). Em alcachofra, o aparecimento de contaminantes endógenos também foi relatado por Bedini et al. (2012), quando estabeleceu o cultivo *in vitro* de quatro cultivares de alcachofra *Toscana*.

Em trabalho realizado por Leifert et al. (1991), das 240 bactérias isoladas em 12 meses de cultivo de 12 diferentes espécies de

plantas, 75% foram gram-positivas e apenas 25% gram-negativas, onde mais da metade são habitantes da pele ou outros tecidos humanos e outros animais, também de outras fontes e, distintos métodos de tratamento podem ser necessários. Segundo Pierik, (1988), os contaminantes endógenos não podem ser eliminados por tratamento superficiais, pois as contaminações latentes não revelam imediatamente sua presença visível no material propagado ou no meio de cultivo. Frequentemente infecções latentes podem ser identificadas apenas após a cultura ter sido mantida por vários meses. No entanto, durante esse tempo, podem ter ocorrido transferências para muitos frascos durante os subcultivos, contribuindo para a ocorrência de novas contaminações. Como por exemplo, a contaminação pode não surgir no meio de isolamento e multiplicação, mas pode aparecer no meio de enraizamento (BOXUS & TERZI, 1987).

Os microorganismos competem com os explantes pelo espaço e carboidratos (fonte de energia) nutrientes e outros compostos, podendo liberar no meio de cultivo substâncias tóxicas prejudiciais ao crescimento do material vegetal *in vitro* (LEIFERT et al., 1991).

Os resultados nos levam a crer que antibióticos deveriam ser acrescentados ao meio de multiplicação para contornar estes problemas. Os antibióticos atuam de diversas maneiras como a inibição da síntese de peptidoglicano da parede celular bacteriana, lesão da parede citoplasmática, interferência na síntese de ácidos nucléicos e proteínas. Pelczar et al. (1996) relataram a eficiência comprovada da combinação de antibióticos visto que é muito mais

difícil um microorganismo tornar-se resistente contra dois antibióticos simultaneamente.

O meio de multiplicação utilizado nesse experimento contendo $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP + $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ANA foi utilizado com sucesso para a multiplicação *in vitro* da Cv. Nobre de alcachofra (GRANDO et al., 2011), onde foi obtido uma taxa de multiplicação de 4:1, considerada adequada para a alcachofra. Outros meios de multiplicação deverão ser testados para estas progênies de alcachofra.

4.2 EXPERIMENTO II – CULTIVO *IN VITRO* DE ÁPICES CAULINARES DE PROGÊNIES DE ALCACHOFRA PROVENIENTES DE PLÂNTULAS OBTIDAS DE SEMENTES

4.2.1 Fase de isolamento

Dos 330 ápices caulinares obtidos de plântulas de sementes germinadas em ambiente protegido e cultivados *in vitro* 22 sobreviveram (6,7%) aos 30 dias de cultivo, sendo que 308 ápices caulinares (93,3%) não sobreviveram por problemas de contaminação por bactérias e fungos, e em alguns casos por oxidação dos propágulos (Tabela 4).

Tabela 4 – Ápices caulinares de seis progênies de alcachofra, sobreviventes e não sobreviventes após 30 dias de cultivo no meio de isolamento

Progênie	Ápices cultivados N°	Sobreviventes		Não Sobreviventes	
		N°	%	N°	%
B1L3R1	55	02		53	
B2L4R6	55	05		50	
B3L4R2	55	02		53	
B3L5R2	55	04		51	
B4L5R6	55	05		50	
B5L1R4	55	04		51	
Total (%)	330	22	6,7%	308	93,3%

A figura 9 mostra que a perda dos ápices caulinares de alcachofra cultivadas em meio de isolamento foi principalmente por contaminações bacterianas dos explantes, seguidas por fungos e bactérias associadas com fungos, inviabilizando assim o desenvolvimento dos propágulos. As infecções bacterianas foram em maior número, com valores entre 47% e 76%, entre as progênies (Figura 9). Foi observado também que uma pequena porcentagem de perdas foi devido à oxidação (2,4%) do propágulo. Alguns explantes simplesmente não desenvolveram e estão classificados como outros (1,2%).

Para Leggatt et al., (1988) mesmo após uma adequada esterilização, é possível que contaminantes microbianos sejam introduzidos na cultura com o explante, como componente de uma microflora sistêmica natural a qual sobreviveu à desinfestação superficial. O elevado grau de contaminação e a localização sistêmica de microorganismos são responsáveis, em alguns casos, pelo insucesso da implantação de culturas *in vitro*. A contaminação tem prejudicado

inclusive experimentos em função da redução do número de explantes (PASQUAL, 2001).

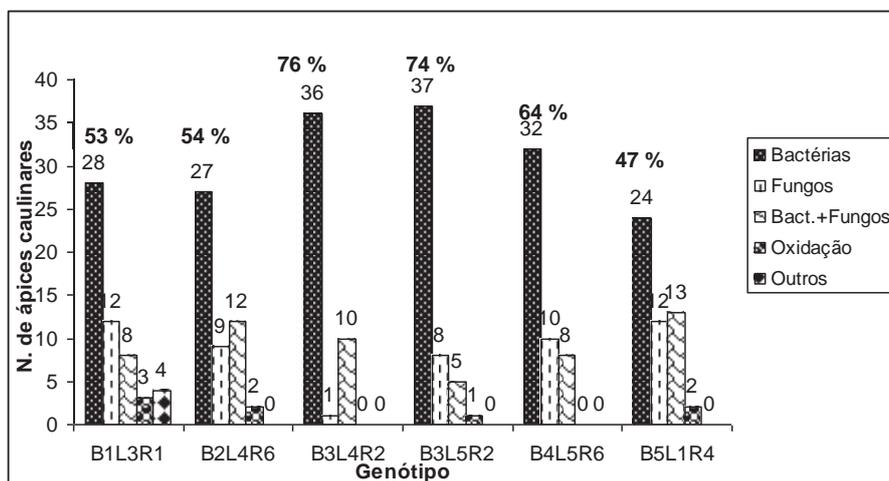


Figura 9 – Porcentagem de morte dos ápices caulinares obtidos de plântulas provenientes de sementes de seis progênies de alcachofra, por infecção bacteriana, fúngica e associação. FAMV-UPF. Passo Fundo – RS- 2011.

Para superar os problemas de contaminação de explantes provenientes do campo, George (1993) sugere a utilização de explantes obtidos de plântulas obtidas de sementes. No entanto, esta estratégia não se mostrou útil no caso da alcachofra, visto que os ápices caulinares utilizados neste experimento foram obtidos de plântulas provenientes de sementes de seis progênies estabelecidas em estufa semi-climatizada e mantidas sob tratamento fitossanitário, com o uso fungicida com princípio ativo de Metalaxyl-M + Mancozeb, a cada 30 dias e 3 dias antes da coleta das plântulas, e sendo assim, o nível de contaminação observado não era esperado.

O tratamento fitossanitário aplicado às plantas doadoras de explante tem sido eficaz na prevenção de contaminações *in vitro*. Irrigação e pulverização, com soluções de agentes sistêmicos

(Benzimidazole e terramicina) com sulfato de estreptamicina alternados com fungicidas não sistêmicos com princípios ativos diferentes, tem sido empregados com sucesso (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

O hipoclorito de sódio causa alterações biossintéticas no metabolismo celular e a destruição de fosfolipídios formando cloraminas que interferem no metabolismo celular. Gera reações oxidativas com inativação enzimática irreversível em bactérias e a degradação de lipídios e ácidos graxos (ESTRELA et al., 2002). Para uma desinfestação mais efetiva do material vegetal, o hipoclorito deve ser usado com um pH entre 6 e 7. A gentamicina foi utilizada no meio de cultura, no meio de isolamento, porém nenhuns destes compostos foram eficientes no controle das contaminações bacterianas que foi a maior causa da morte dos ápices caulinares de progênies de alcachofra utilizados neste experimento.

Outros compostos químicos podem ser utilizados para o processo de assepsia dos explantes, como o cloreto de mercúrio. Em experimento realizado com explantes excisados a partir de crescimento ativo de ramificações radiciais de quatro cultivares de alcachofra cultivadas em campos experimentais Bedini et al. (2012) esterilizaram superficialmente os explantes em solução aquosa de cloreto de mercúrio (5 g.L^{-1}) durante 3 minutos e lavadas três vezes com água esterilizada. Após foram embebidos em solução aquosa de 20% de solução de hipoclorito de sódio (8% de cloro ativo) durante 15 minutos, e subsequentemente lavadas três vezes com água esterilizada. Mesmo assim, durante a fase de indução, mais da metade dos explantes (54%) da Cv. *Empolese* foi contaminada. Os autores

discutem que as possíveis causas destas contaminações podem ser de origem endógena transitadas de plantas-mãe, uma vez que a superfície esterilização foi realizada com cloreto de mercúrio e de hipoclorito de sódio, foi eficiente para a assepsia de todas as outras cultivares. Medeiros (2001) afirmou que os níveis de contaminação tendem a serem maiores quando as plantas matrizes, usadas como fonte de explantes, são provenientes do campo. No entanto, mesmo as plantas submetidas controle fitossanitário, e mantidas em viveiro protegido ou casa de vegetação, são fontes potenciais de microorganismos, podendo tornar-se limitantes aos procedimentos de cultivo *in vitro*.

Neste experimento foi observado alto nível de contaminação por bactérias, mesmo havendo adequada assepsia. Na fase inicial, a contaminação por fungos foi reduzida devido à utilização de fungicida como tratamento fitossanitário. Desta forma não foi possível estabelecer a micropropagação de alcachofra a partir de ápices caulinares obtidos de plantas originadas de sementes germinadas em condições controladas. Novos estudos poderão ser realizados para o desenvolvimento de técnicas diferenciadas de acordo com a origem do explante utilizado.

4.3 EXPERIMENTO III - MICROPROPAGAÇÃO DE ALCACHOFRA A PARTIR DE SEMENTES GERMINADAS *IN VITRO*

Na busca de uma alternativa para obter explantes livres de contaminação para iniciar o cultivo *in vitro* e estabelecer o processo de micropropagação de material selecionado de alcachofra, optou-se por trabalhar com sementes germinadas *in vitro*.

4.3.1 Germinação *in vitro*

Após 10 dias de cultivo 100% das sementes de alcachofra cultivadas em meio MS germinaram e se mostraram saudáveis, sem a presença de contaminações (Figura 10), de forma que foi possível acessar explantes para iniciar o processo de micropropagação. Este resultado indica que os tratamentos empregados para assepsia das sementes foram eficientes.

A micropropagação de alcachofra tem encontrado entraves no que diz respeito à assepsia do material utilizado como fonte de explante. Este experimento, no entanto, mostra que o uso de sementes germinadas *in vitro* como fonte de explantes, propiciou maior frequência de explantes não contaminados, como foi observado nos propágulos com os experimentos anteriores, quando foi empregado o ápice caulinar de brotações obtidas de plantas cultivadas no campo (54,1 % de contaminações) ou de sementes cultivadas em substrato esterilizado em ambiente controlado (93,3 % de contaminação).

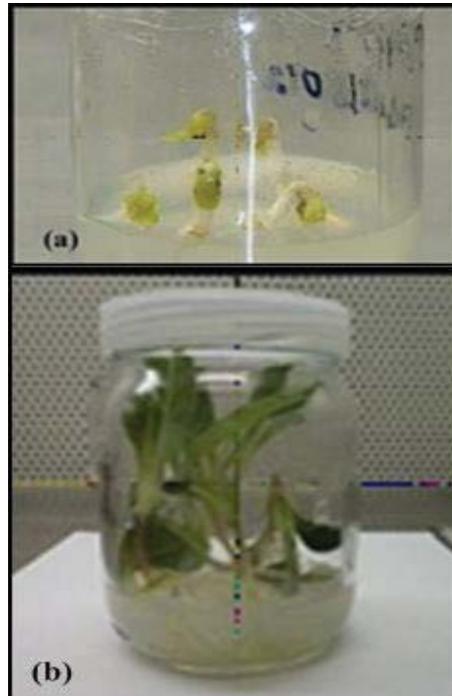


Figura 10 – (a) Germinação de sementes de alcachofra *in vitro* em meio MS; (b) Plântulas após 21 dias da germinação *in vitro* das sementes. FAMV – UPF- Passo Fundo - RS - 2012.

A estratégia de utilizar explantes obtidos de plântulas originadas de sementes germinadas *in vitro* como forma de superar os problemas de contaminação no início do cultivo *in vitro*, foi utilizada por Lauzer & Vieth (1990) e depois por Serghini et al. (2012) que obtiveram plântulas de embriões maduros cultivados *in vitro* respectivamente de *Green globe* e *globe artichoke* (*Cynara cardunculus* Var. *scolymus* L.) de origem no Marrocos.

4.3.2 Estabelecimento do cultivo *in vitro*

Conforme mostrado na tabela 5, os explantes hipocótilo e epicótilo não se desenvolveram ou mostraram qualquer expressão de morfogênese nos meios testados. No entanto, a região do ápice caulinar apresentou desenvolvimento em duas progênies (P1) B2L4R6 e (P2) B1L4R7. Para ambos os progênies responsivos, (P1) B2L4R6 e B1L4R7 (P2) o meio de cultura 1 (M1) promoveu maior frequência de ápices caulinares desenvolvidos, 100% para P1 e 80% para P2, comparado com o meio de cultura 2 M2 (20%) para ambos os genótipos (Tabela 5).

Nenhum dos explantes testados da progênie P3 (B1L3R1) apresentou desenvolvimento no meio M2. No meio M1 100% dos explantes desta progênie foram perdidos por contaminações, não permitindo a avaliação do potencial de desenvolvimento dos mesmos nesse meio. Estas contaminações são provavelmente de origem endógena, visto que as plantas doadoras dos explantes eram saudáveis. Então sementes não são fontes 100% confiáveis quanto à contaminação.

Tabela 5 – Fase de estabelecimento *in vitro* de explantes do ápice caulinar obtidos de sementes germinadas *in vitro* de três progênies de alcachofra cultivados em dois meios de cultura

Progênie	Meio de Cultura	Expl. Cult. N°	Explantes desenvolvidos N°	Explantes desenvolvidos (%)	Explantes Não desenv. N°	Explantes Não desenv. (%)	Tipo de Contaminação
(P1) B2L4R6	M1	05	05	100	00	00	-----
	M2	05	01	20	04	80	F
(P2) B1L4R7	M1	05	04	80	01	20	-----
	M2	05	01	20	04	80	-----
(P3) B1L3R1	M1	05	00	00	05	100	F
	M2	05	00	00	05	100	-----
Total		30	11	12,2	19	87,8	-----

N° exp. Cult.: Número de explantes cultivados (número de repetições).

Tipo de contaminantes: - = sem contaminação; F=Fungos;

As sementes são portadoras de patógenos naturalmente, e estes podem ser transportados nas sementes e associar-se às mesmas de diferentes maneiras, contaminando-as superficialmente, ou colonizando os tecidos internos (TEIXEIRA et al., 1997).

A presença de fungos no interior da semente pode permanecer macroscopicamente indetectável por um longo período de tempo, durante o qual o crescimento fúngico continua além dos tecidos

desse órgão causando danos que podem levar à completa perda de viabilidade da semente (BERJAK, 1987). Em muitos casos, a semente com baixa incidência de fungos germina quando semeada em condições ambientais favoráveis. No entanto, em ambiente adverso, a germinação é lenta e os fungos infectantes têm oportunidade de colonizar a semente e a plântula em desenvolvimento, ou mesmo podem causar a morte das mesmas após a semeadura. Isso ocorre devido à rapidez de desenvolvimento e a alta agressividade de certos patógenos latentes na semente, os quais retornam à atividade assim que encontram condições favoráveis, causando a morte da semente antes que essa evidencie os primeiros indícios de germinação (CASA et al. 1995).

A figura 11 mostra a resposta diferencial dos explantes de alcachofra utilizados para estabelecer o cultivo *in vitro*. Os explantes epicótilo e hipocótilo não responderam nos dois meios testados. Nenhum indicio de morfogênese, proliferação celular ou formação de calos foi observada. A região do ápice caulinar, ao contrario, se desenvolveu promovendo a formação de gemas e brotos axilares e novas folhas, necessários para o inicio do processo de multiplicação *in vitro*. Este comportamento pode ser explicado pelo fato do explante ápice caulinar apresentar maior quantidade de células não diferenciadas, comparado com os outros dois explantes, que se encontram mais diferenciados.

Para responder *in vitro*, as células diferenciadas cultivadas *in vitro* devem passar pelo processo de desdiferenciação, a qual se refere a perda da especialização e a reversão da célula diferenciada em um estágio meristemático. As células desdiferenciadas podem reiniciar a divisão celular, através do fornecimento de nutrientes e hormônios adequados levando a regeneração de uma planta, devido ao

processo de regulação da expressão gênica e manutenção de seu genoma (KERBAUY, 1998).

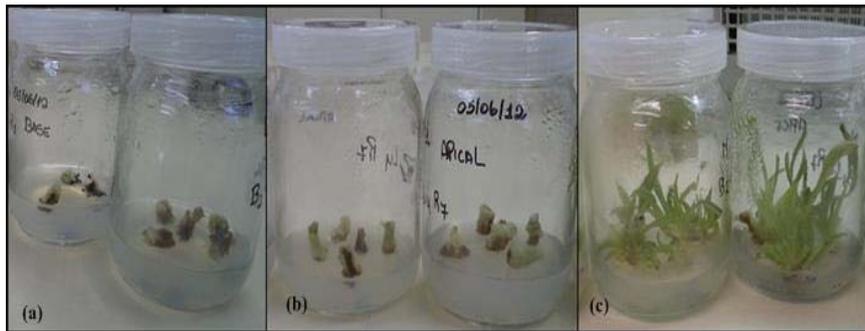


Figura 11 – Fase do estabelecimento do cultivo *in vitro* de diferentes explantes de alcachofra: (a) segmentos de hipocótilo (base) não desenvolvidos; (b) segmentos de epicótilo (apical) não desenvolvidos; (c) Região do ápice caulinar com brotações após 30 dias de cultivo. FAMV – UPF/ Passo Fundo – Rs.

A proliferação de células e a criação de uma nova organização celular nos tecidos e formação de novos órgãos onde eles antes não existiam é chamada de organogênese ou morfogênese. A morfogênese é a consequência dos processos de divisão e diferenciação integrados, bem como de alterações na regulação gênica e depende da intensidade de determinação, competência e diferenciação das células (THORPE, 1980).

A micropropagação por gemas adventícias via organogênese, ocorre pela formação de gemas vegetativas em tecidos onde, em condições naturais não seriam formadas na planta. Em condições *in vitro* as gemas adventícias são induzidas a se formar diretamente (organogênese direta) em tecidos do explante primário, ou indiretamente (organogênese indireta) a partir de células que se

multiplicam de forma desordenada no explante, formando uma massa celular chamada de calo (MANTOVANI et al.; 2008).

A resposta do explante ao cultivo *in vitro* depende muito do seu nível de diferenciação celular, o qual está relacionado com os conceitos da determinação e competência celular.

A determinação é como o grau de comprometimento da célula com uma rota específica de desenvolvimento, ou seja, uma célula é determinada quando está comprometida em seguir um destino e se especializar numa função por causa da ativação de genes específicos. A competência se refere à capacidade da célula em responder ao estímulo de sinais, como os reguladores de crescimento, necessários à diferenciação celular de um órgão ou da planta completa (CHRISTIANSON & WARNICK, 1983).

Quanto menos diferenciadas as células do explante, mais competência elas apresentam para responder *in vitro*, seja pela organogênese ou pela embriogênese. A resposta diferencial entre os explantes de uma mesma planta pode ser explicada pelas variações nos níveis de hormônios endógenos do explante (NORSTOG, 1970). Além disso, Wernicke & Brettell (1982), colocam que diferentes explantes obtidos a partir de uma única progênie não respondem identicamente ao cultivo, provavelmente devido às variações de gradiente dos hormônios endógenos.

Os dados mostrados no presente experimento evidenciam o efeito do explante no estabelecimento do cultivo *in vitro* de alcachofra. Esta diferença na resposta reflete a existência de diferentes tipos de células e graus de diferenciação entre os mesmos.

Quanto aos meios de cultura empregados para o cultivo dos ápices caulinares das duas progênies responsivos, observou-se que o meio M1 promoveu maior frequência no desenvolvimento de brotos comparado ao meio M2. O meio M1 (1 mg.L⁻¹ de BAP e 0,1 mg.L⁻¹ de ANA) é uma combinação de citocinina e auxina. Já o meio M2 (1 mg.L⁻¹ de kinetina e 40 mg.L⁻¹ de sulfato de adenina) foi empregado com sucesso na multiplicação de brotos a partir de explantes obtidas de plântulas produzidas de sementes germinadas *in vitro* em um progênie Marroquino de alcachofra (SERGHINI et al., 2012). Este meio, no entanto, não se mostrou eficiente para o estabelecimento do cultivo *in vitro* das três progênies de alcachofra utilizadas no presente experimento, provavelmente devido às diferenças genotípicas.

Iapichino (1996) testou várias concentrações de BAP e sua combinação com ANA para determinar a combinação ótima de reguladores de crescimento para a multiplicação da cv *Violetto Spinoso* de alcachofra a partir de gemas dormentes subterrâneas e concluiu que a concentração de 1 mg.L⁻¹ de BAP sem ANA foi a combinação que resultou num maior número de brotações axilares induzidas. Este mesmo autor testou outras citocininas, entre elas Kinetina, zeatina e 2ip (2-isopentenil-adenina) as quais foram menos efetivas que a citocinina BAP na indução de brotos axilares. Recentemente Bedini et al., (2012) relataram a possibilidade de multiplicação *in vitro* de 4 cultivares de alcachofra da Toscana a partir de brotos cultivados em meio contendo 0,03 mg.L⁻¹ de BAP e 0,05 mg.L⁻¹ de Ga₃. Combinações semelhantes a estas, são utilizadas por Rossi e De Paoli (1992) para a multiplicação *in vitro* de propágulos de alcachofra (0,05 mg.L⁻¹ de BAP e 0,5 mg.L⁻¹ de Ga₃). Segundo estes

autores, para indução de proliferação de brotos as citocininas mais utilizadas são kinetina (1-5 mg.L⁻¹) ou BAP (em baixas concentrações (0,050) ou 2iP (10 mg.l⁻¹). Para multiplicação de alcachofra do tipo *catanese*, Morone Fortunato et al. (2005) utilizaram 0,05 mg.L⁻¹ de BAP.

Em trabalho realizado por Grandó et al. (2011) onde foram testados oito meios de cultura que combinaram quatro concentrações de BAP (0,05; 0,1; 0,2; 0,4 mg.L⁻¹) e presença ou ausência de ANA (0 e 0,1 mg.L⁻¹) para multiplicação *in vitro* da cv Nobre de alcachofra, o meio contendo 0,4 mg.L⁻¹ BAP + 0,1 mg.L⁻¹ ANA foi o que apresentou maior taxa de multiplicação o que permitiu afirmar que o balanço adequado de auxina:citocinina influencia o desenvolvimento da planta.

Lauzer & Vieth (1990) demonstraram que o uso de BAP nas concentrações de 0,5 a 1 mg.L⁻¹ combinados com 0,5 mg.L⁻¹ de ANA aumentou significativamente a taxa de multiplicação comparado ao uso de kinetina e 2iP em varias concentrações e combinações com auxinas quando utilizaram plântulas de alcachofra obtidos de embriões maduros cultivados *in vitro* como explantes. Por outro lado, SERGHINI et al. (2012), demonstraram a efeito positivo da combinação de kinetina + sulfato de adenina + ANA na indução de novas brotações a partir de explantes obtidos de plântulas de embriões maduros de alcachofra cultivados *in vitro*.

O efeito positivo da combinação de kinetina + sulfato de adenina+ 2iP foi também reportado por Brutti (2000) na multiplicação *in vitro* da Cv. *Early French* de alcachofra. Embora a Kinetina tenha se mostrado muito importante na indução da formação de gemas em

alcachofra (ANCORA et al., 1981; BIGOT E FOURY, 1984; LAUZER & VIETH, 1990; PÉCAUT & MARTIN, 1992; MOZARDEC & HOURMANT, 1997; BRUTTI et al.; 2000; TAVAZZA et al.; 2004. APOSTOLO et al.;, 2005. SCHNEIDER, 2005; BEKHEET, 2007), a melhor taxa de multiplicação para a cultivar *Violet du Provence* foi obtida em meios contendo a citocinina BAP na dose de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, pois estimula a formação de brotos axilares nesta cultivar (ELIA et al., 2007). A citocinina BAP também se mostrou mais eficiente que outras citocininas (zeatina, Kinetina e 2iP) na indução de maior número de brotos por explante na cultivar de alcachofra *Violetto Spinoso di Sicilia* (IAPICHINO, 1996).

Skoog & Miller (1957) demonstraram que a formação de dois órgãos *in vitro*, caules e raízes, era controlada pelas concentrações relativas entre auxina e citocinina (PERES, 2002). Segundo Caldas et al. (1998) a composição e concentração hormonal no meio são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento na maioria dos sistemas de cultura de tecidos. Para isso, as auxinas e as citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas, sendo que a formação de raiz, parte aérea e calo, é regulada pela disponibilidade e interação entre os reguladores. Entretanto, existem diferenças entre as citocininas, sendo que o BAP induz a formação de grande número de brotos e alta taxa de multiplicação em sistemas de micropropagação, para algumas espécies. No presente trabalho a combinação de BAP + ANA, uma citocinina com auxina, foi favorável ao desenvolvimento das brotações comparado com o uso de duas citocininas simultaneamente (Kinetina + sulfato de adenina).

4.3.3 Fase de Multiplicação

Somente as brotações obtidas do cultivo da região do ápice caulinar obtidos no meio M1 das progênies P1 e P2 foram individualizadas e transferidas para a fase de multiplicação, onde foram subcultivados por 4 vezes (4 subcultivos) um a cada 30 dias.

Taxa de Multiplicação

A média de número de novo brotos formados a partir do broto inicial foi contabilizada em cada subcultivo. No subcultivo I a taxa média de multiplicação foi de 4,7, sendo que não houve diferença estatística entre as taxas observadas entre as duas progênies estudadas. No entanto, a amplitude observada foi maior para a progênie P1, onde se observou brotos individuais que produziram até 11 novas brotações axilares (tabela 6).

No subcultivo II, a média da taxa de multiplicação aumentou para 6,5, havendo brotos que produziram 12 e 14 novas brotações axilares (Figura 12). A taxa de multiplicação de 12 e 14 é considerada elevada para alcachofra. As duas progênies não diferiram em seu potencial de multiplicação nesse subcultivo.

Na figura 12 e 13 se observa diferentes brotos, das progênies de alcachofra, produzidos pelo meio de cultura 1 (M1), no subcultivo II. As novas brotações obtidas neste experimento tiveram um bom desenvolvimento e as plantas tinham aspectos saudáveis. Nos subcultivos subsequentes ocorreu uma redução da taxa de multiplicação para 4,0 (subcultivo III) e 5,2 (subcultivo IV). No

entanto neste último subcultivo, a progênie P2 apresentou uma taxa de multiplicação de 6,8, sendo superior ao P1 (3,5) (tabela 6), o que indica a possível influencia da progênie para esta característica.

Tabela 6 – Taxa de multiplicação de duas progênies de alcachofra em 4 subcultivos em meio de multiplicação contendo MS modificado suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP e 0,1 mg.L⁻¹ de ANA

Progênie	SUBCULTIVOS				Média
	I TM (amp)	II TM (amp)	III TM (amp)	IV TM (amp)	
P1	5,3 (2-11)	6,4 (3,5-14)	3,5 (1,5-10)	3,5 b (2-9)	4,7
P2	4,0 (3-5)	6,5 (4-12)	4,4 (3-6)	6,8 a (2,5-10)	5,4
Média	4,7	6,5	4,0	5,2	5,1
Fonte de variação	Valores de F teste				
Progênie	0,64 ns	0,003 ns	0,458 ns	6,274 *	
C.V(%)	53,79%	60,15%	61,71 %	57,11 %	

Progênies: P1= B2L4R6, P2= B1L4R7; TM= taxa de multiplicação; Amp= amplitude. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0.05). * Significativo ao nível de 5% pelo F teste; ns= não significativo.

A média da taxa de multiplicação ao longo de 4 subcultivos foi de 4,7 para o progênie P1 e 5,4 para o progênie P2. Esta taxa de multiplicação é considerada adequada para alcachofra, comparado as melhores taxas publicadas para esta espécie, de 4.0 a 6,5 (DEBERG et al. 1981; ANCORA et al. 1981; DRIDI, 2003; ELIA et al. 2007; BRUTTI et al. 2000; LAUZER & VIETH, 1990; e SCHNEIDER, 2005).



Figura 12 - (a) Brotações axiliares produzidas pelos propágulos de alcachofra em meio de multiplicação, subcultivo II; (b) Brotações individualizadas para contabilização da taxa de multiplicação e transferência para o subcultivo III. FAMV – UPF – Passo Fundo - RS – 2012.

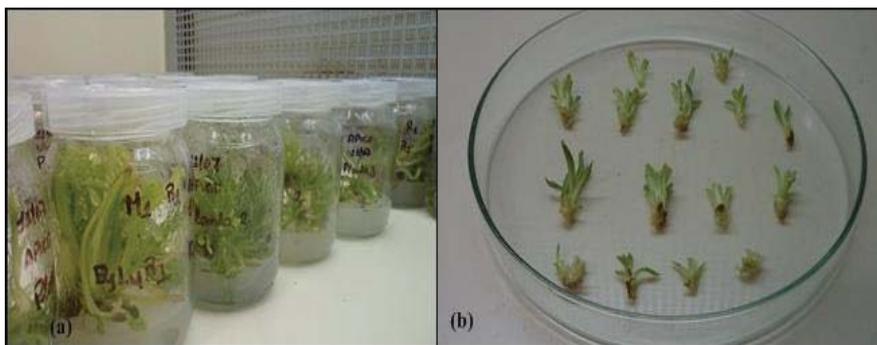


Figura 13 - (a) Meio de Multiplicação em câmara de fluxo laminar (b) Brotações axiliares produzidas pelos propágulos de alcachofra em meio de multiplicação, subcultivo III. FAMV - UPF - Passo Fundo - RS - 2012.

Em trabalho realizado por Grandó et al. (2011) onde foram testados oito meios de cultura que combinaram quatro concentrações de BAP (0,05; 0,1; 0,2; 0,4 mg.L⁻¹) e presença ou ausência de ANA (0 e 0,1 mg.L⁻¹), foram obtidas taxas de multiplicação variando de 1:1 a 3:1 em dois subcultivos sucessivos utilizando a cultivar Nobre. No entanto, Grandó et al. (2011) alcançaram uma taxa de multiplicação satisfatória para esta cultivar (4,2), utilizando o meio de multiplicação MS modificado suplementado com 0,4 mg.L⁻¹ BAP + 0,1 mg.L⁻¹ de ANA, o que permite afirmar que o balanço adequado de auxina:citocinina é importante para induzir a produção de brotos axilares em alcachofra.

No presente trabalho, a maior taxa de multiplicação obtida para o progênie P2 foi superior (6,8) ou relatado por Grandó et al. (2011) também utilizando uma combinação semelhante de 1,0 mg.L⁻¹ BAP + 0,1 mg.L⁻¹ ANA. No campo, a taxa de multiplicação encontrada é cerca de três a cinco rebentos por planta/ano, na maioria das cultivares de alcachofra (HARBAOUI & DEBERGH, 1980; PECAUT et al., 1983).

Brutti et al. (2000), testando diferentes reguladores de crescimento (Kinetina, BAP, 2ip e Sulfato de Adenina) no meio de multiplicação de alcachofra da Cv. *Early French* obtiveram taxa de multiplicação de 1:1 a 5:1. A taxa máxima obtida por estes autores foi quando utilizaram 2,0 mg.L⁻¹ de BAP, no entanto, as brotações obtidas nessa concentração apresentavam uma baixa estatura (0,57cm) e portanto consideradas anormais.

Na micropropagação de alcachofra a partir de gemas dormentes subterrâneas, Iapichino (1996) testou a concentração BAP

e a interação com a concentração de ANA, em dez níveis diferentes e demonstrou que a maior multiplicação das brotações (cinco brotos por explante 5:1) foi obtida com 1,0 mg.L⁻¹ BAP e 0,0 mg.L⁻¹ ANA, para a cultivar *Violetto Spinoso di Sicilia* pode ser melhor utilizando somente BAP.

Em trabalho realizado por Serghini et al. (2012), onde embriões maduros foram cultivados *in vitro* para gerarem os explantes para iniciar a cultura de tecidos para micropropagação de alcachofra de origem Marroquina, foram obtidos embriões maduros e foi registrado uma média de 17 gemas axilares (17:1) por explante na fase de estabelecimento, alcançando uma taxa média de multiplicação de 7,56 brotos por explante em 12 subcultivos. Essas taxas foram bastante elevado comparado com a taxa de multiplicação observada na espécie. A redução da intensidade da luz 40-20 μ .E.m-2.s-1 aumentou a taxa de multiplicação de 2,8 para mais de 6,5 brotos em três gerações. Alta intensidade de luz aumentou substancialmente o número de folhas necróticas e diminuiu o número de rebentos recém-formados. Além disso, a redução da densidade da cultura 6-7 para 3-4 explantes por recipiente (132 cm² de área de crescimento) aumentou a taxa de multiplicação de 3 para 6,3. O meio de proliferação contendo fosfato monossódico e sulfato de adenina melhorou a taxa de multiplicação e a qualidade das brotações em comparação com o mesmo meio sem estes dois compostos. A redução da luminosidade e da densidade do explante podem ser fatores importantes a serem avaliados em experimentos futuros.

Lauzer & Vieth (1990), usando a mesma fonte de explantes (plântula de sementes maduras) e o mesmo meio de cultura

contendo sulfato de adenina obtiveram uma taxa de multiplicação 3,6 brotos por explante na cultivar de alcachofra *Green Globe*, muito cultivada na América do Norte. Estes autores também avaliaram outros meios de cultura contendo 0,5; 1,0 e 2,5 mg.L⁻¹ de BAP combinados com 0,5 mg.L⁻¹ de ANA, onde obtiveram uma taxa de multiplicação de 4,7; 5,2 e 6,4 respectivamente. No entanto, 2 mg de BAP resultou em propágulos de baixa estatura, sendo recomendado 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹ de BAP + 0,5 de ANA para essa cultivar.

A elevação do nível de BAP aumenta a taxa de multiplicação, mas reduz o comprimento das brotações. Essa relação também foi observada por Brutti et al. (2000) para a cultivar *Early French*, de forma que se deve determinar a melhor concentração para cada material genético.

No presente experimento o meio contendo sulfato de adenina não se mostrou eficiente no estágio de estabelecimento e o meio contendo 1 de BAP e 0,1 de ANA, e resultou numa taxa de multiplicação considerada desejável para alcachofra, ou seja 5,1. A progênie P2 apresentou uma taxa de multiplicação média de 5,4 enquanto que a progênie P1 a média foi de 4,7. As taxas de multiplicação obtidas pelas duas progênies apresentaram uma oscilação ao longo dos subcultivos, conforme mostrado na Figura 14.

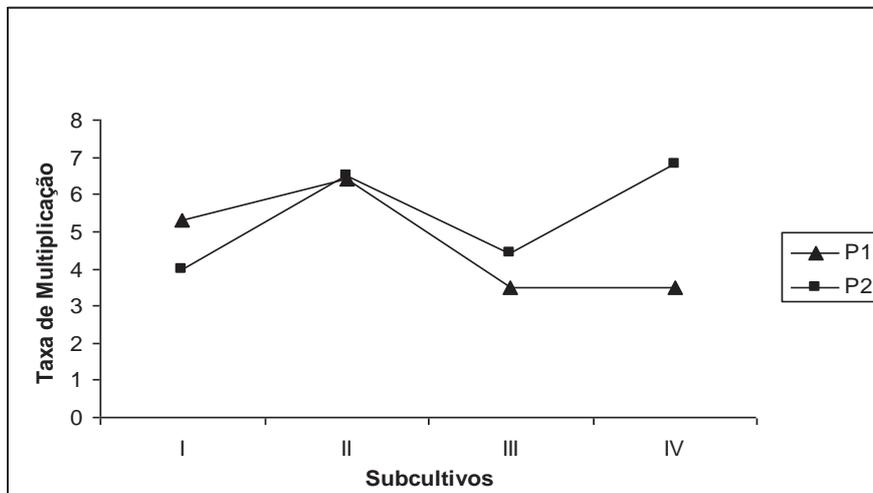


Figura 14 - Comportamento de duas progênies de alcachofra, ao longo de 4 subcultivos sucessivos. Progênies-P1: B2L4R6; P2: B1L4R7.

Este comportamento de oscilação da taxa de multiplicação ao longo dos subcultivos poderia ser explicado, pelo fato de que a produção de grande número brotos num determinado subcultivo, consome grande quantidade reservas de nutrientes endógenos resultando na redução da taxa de multiplicação no subcultivo subsequente. Neste haveria a recuperação das reservas, permitindo que no próximo subcultivo a taxa de multiplicação volte a crescer.

Número médio de folhas, comprimento, massa fresca e seca das brotações

Durante os quatro subcultivos, realizados na fase de multiplicação *in vitro*, também foram avaliadas o número médio de folhas e comprimento das brotações, bem como a massa fresca e seca das mesmas.

O número de folhas não variou entre as progênies nos subcultivos I, II e III. No entanto no subcultivo IV as brotações produzidas pela progênie P2 produziram maior número de folhas (45,4) que a progênie P1 (21,2) (tabela 7). O número de folhas está relacionado com a taxa de multiplicação, visto que a progênie P2 também apresentou maior taxa de multiplicação no subcultivo IV (6,8) comparado a progênie P1 (3,5).

Tabela 7- Número médio de folhas por brotação produzida nas duas progênies de alcachofra em quatro subcultivos durante a fase de multiplicação *in vitro*

Progênie	Subcultivos				Média
	I NF (amp)	II NF (amp)	III NF (amp)	IV NF (amp)	
P1	25,3 (11-49)	43,5 (11-99)	20,9 (11-51)	21,2 b (9-32)	27,7
P2	21,3 (14-31)	47,5 (21-63)	26,1 (15-50)	45,5 a (9-15)	33,5
Média	23,3	45,5	23,5	33,4	31,4
Fonte de variação	Valores de F teste				
Progênie	0,312 ns	0,09169 ns	0,408 ns	4,728 *	
C.V(%)	47,73 %	53,41 %	65,32 %	78,89 %	

Progênies: P1= B2L4R6 P2= B1L4R7; NF: Número de folhas; Amp: Amplitude. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0.05). * Significativo ao nível de 5% pelo F teste; ns= não significativo.

A adição exógena de reguladores de crescimento no meio de cultura desencadeia uma alteração no balanço hormonal endógeno dos tecidos dos explantes. Esta adequada combinação pode interferir

no balanço interno das citocininas endógenas e desencadear uma resposta de indução de novos meristemas e brotos, o que pode diferir entre progênies. Isso foi demonstrado por Mercier et al. (2003) que identificaram os níveis endógenos de cinco citocininas em segmentos foliares de abacaxizeiro e constataram que a aplicação de ANA (1mg.L^{-1}) e BAP 2mg.L^{-1} produziu maior número de brotações na base das folhas, e que na sua ausência nenhum broto era formado demonstrando que o conteúdo hormonal presente na porção basal das folhas foi correlacionado com a resposta organogênica das culturas.

Quanto ao comprimento das brotações, a progênie P2 foi superior ao P1 somente no subcultivo III (Tabela 8). No geral o comprimento das brotações foi de 4,64, variando de 3,5 a 5,66 entre os subcultivos.

O comprimento das brotações obtidas no presente experimento foi alta (média de 3,5 cm) comparada com o relatado para a espécie. Lauzer & Vieth (1990) observaram o comprimento médio das brotações da cultivar *Green Globe* de 1,7 cm (taxa de multiplicação de 3,7). Estes autores ainda relataram que o aumento de BAP no meio de multiplicação de 0,5 para $2,5\text{mg.L}^{-1}$ aumenta a taxa de multiplicação de 4,6 para 6,4, mas este aumento na concentração de BAP leva a redução do comprimento das brotações de 2,2 cm para 1,3, o que não é desejável.

O mesmo foi observado por Brutti et al. (2000) para a cultivar de alcachofra *Early French*, onde a adição de $2,0\text{mg.L}^{-1}$ de BAP produziu uma excelente taxa de multiplicação (5,0), mas este aumento foi acompanhado pela redução na altura das brotações, as quais alcançaram somente 0,57 cm de estatura, foram consideradas

brotações anormais. No presente experimento também foi utilizado $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e esse fenômeno não foi observado. A adição de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA no meio de multiplicação utilizado talvez tenha estimulado, de alguma forma, o alongamento das brotações, ou talvez este efeito possa ser relativo a diferenças genotípicas.

Tavazza et al. (2004) relataram que para a cultivar precoce *Spinoso Sardo*, o uso de BAP no meio de cultura ($0,5$ a $1,2 \text{ mg.L}^{-1}$) resultou num aumento da taxa de proliferação, mas este aumento foi acompanhado pela gradual redução da estatura das brotações ao longo dos subcultivos, possivelmente pelo acúmulo de BAP nos tecidos. Isso não foi observado para as progênies empregadas no presente experimento. Elia et al., (2007) obteve brotações variando de $2,94$ a $4,19$ cm de altura dependendo do meio de multiplicação utilizado para a cultivar *Violet du Provence* (taxa de multiplicação variando de $2,3$ a $4,5$), demonstrando o efeito da combinação de reguladores de crescimento empregado no meio de multiplicação para esta característica.

Tabela 8 – Comprimento das brotações (cm) produzidas por duas progênie de alcachofra em quatro subcultivos durante a fase de multiplicação *in vitro*

Comprimento das brotações - (cm)				
Subcultivos				
Progênie	I (amp)	II (amp)	III (amp)	IV (amp)
P1	5,33 (4-6)	4,40 (2,5-9)	3,47 b (2-7)	3,37 (3-5,3)
P2	6,00 (5-7)	5,50 (4-7)	5,38 a (3,7-7)	3,63 (2,3-4,6)
Média	5,66	4,95	4,43	3,50
Fonte de variação	Valores de F teste			
Progênie	1,6 ns	1,189 ns	10, 239 **	0,208 ns
C.V(%)	14,58 %	38,69%	26,94 %	29,96 %

Progênie: P1= B2L4R6 P2= B1L4R7 - A: Amplitude

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0.05).

* Significativo ao nível de 5% pelo F teste; ns= não significativo.

Bedini et al. (2012) estudando quatro variedades de alcachofra observou que a altura das brotações obtidas durante a fase de multiplicação variam conforme a cultivar empregada e tende a aumentar ao longo dos sucessivos subcultivos. No oitavo subcultivo observaram uma variação de 3,81 a 6,19 cm entre as quatro cultivares testadas. No entanto a taxa de multiplicação foi inferior a 2,0 em todos os oito subcultivos avaliados para as quatro cultivares empregadas.

A figura 15 mostra o aspecto das brotações obtidas no presente experimento.



Figura 15 – Broto de alcachofra, no subcultivo IV, demonstrando o comprimento das brotações. FAMV - UPF- Passo Fundo - RS - 2012.

A massa fresca e seca foram avaliadas somente nos subcultivos II, III e IV, visto que a avaliação da massa seca é destrutiva e, portanto, há necessidade de maior quantidade de material para tal.

A massa fresca e seca não variou entre as progênies, mas variaram entre os subcultivos (Tabela 9). A quantidade de matéria seca e fresca das brotações produzidas baixou ao longo dos subcultivos (Figura 16). Esta redução poderia ser explicada pela formação de novos brotos a cada subcultivo, sendo que cada propágulo compartilha sua estrutura orgânica para formação de novos tecidos.

Tabela 9 – Massa fresca e massa seca das brotações (g) produzidas por duas progênies de alcachofra em quatro subcultivos durante a fase de multiplicação *in vitro*

Progênie	Massa fresca (g)	Massa seca (g)
P1	2,41	0,56
P2	3,72	0,67
Média	2,85	0,60
Fonte de variação	Valores de F teste	
Progênie	0,29 ns	1,76 ns
Subcultivo	5,23 *	10,93 **
Gen. x Subcultivo	0,88 ns	0,48 ns
C.V(%)	62,38 %	18,21 %

Progênies: P1= B2L4R6 P2= B1L4R7

Medias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0.05). * Significativo ao nível de 5% pelo F teste; ns= não significativo.

Hiperhidricidade

Algumas plantas apresentaram hiperhidricidade no estágio inicial da multiplicação. Do total de 34 plantas analisadas 10 apresentaram hiperhidricidade num total (29,4%), (Tabela 10) sendo que estas plantas foram eliminadas no subcultivo I. A hiperhidricidade é uma desordem fisiológica e morfológica que no momento da propagação *in vitro*, pode afetar plantas herbáceas e lenhosas. Não é um fenômeno frequente, e depende muito das condições *in vitro* para que ocorra e se expresse em diferentes graus (PEREZ, 2002).

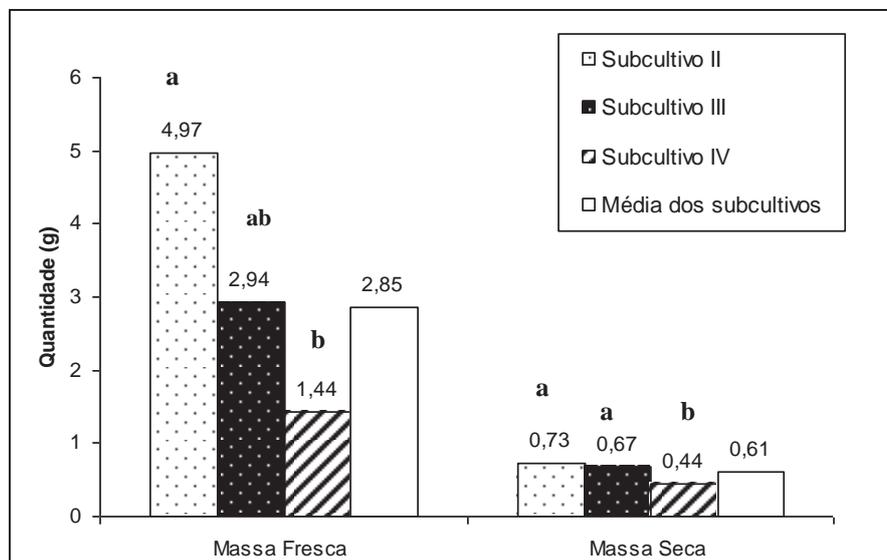


Figura 16 - Médias de massa fresca e massa seca de brotações de alcachofra produzidas durante os subcultivos II, III e IV. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

Tabela 10 – Porcentagem de plantas com hiperhidricidade no subcultivo I, em duas progêneses diferentes de alcachofra e dois meios de cultura (M1 e M2)

Progênie	Meio de cultura	Normal	Hiperhidricidade	
			Nº	%
P1	M1	19	05	26
	M2	02	01	50
P2	M1	13	04	31
Total	-----	34	10	29,4

Progêneses: P1= B2L4R6 P2= B1L4R7

Uma planta hiperhidrificada apresenta as seguintes características: desenvolvimento insuficiente, folhas quebradiças e translúcidas, estômatos anormais, pouco desenvolvimento do domo apical, primórdios foliares alongados, grandes espaços intercelulares na região do corpo subapical das gemas, incompleta conexão vascular entre primórdios foliares e câmbio vascular, xilema menos lignificado e mesófilo com tecido paliçádico e esponjoso não bem estruturado. Em resumo, as plantas não têm valor comercial (DEBERGH et al. 1981). Entre as causas responsáveis pela hiperhidricidade, estão a alta concentração de citocinina e a alta umidade dos tubos de ensaio, ou placas de petry. Também há evidências de que o cloro, a amônia e o etileno estejam envolvidos nesse processo (ZIV, 1991).

A umidade relativa no interior dos tubos de ensaio é influenciada pela temperatura externa e esse fator favorece a condensação do vapor de água nas paredes dos tubos por isso alguns autores têm aumentado a concentração de ágar, a fim de diminuir a vaporização da água (DEBERGH et al., 1981). Outros fatores envolvidos no fenômeno da hiperhidricidade dizem respeito ao tipo e concentração do ágar, a flutuação de temperatura na câmara de crescimento e acúmulo de substâncias tóxicas no meio de cultura (ROSSI & DE PAOLI, 1992). A hiperhidricidade é um fenômeno indesejável e tem sido registrada no cultivo *in vitro* de alcachofra por muitos autores. Foi relatada inicialmente por Debergh et al. (1981) e Rossi e De Paoli (1992).

Lauzer & Vieth (1990) observou a ocorrência de hiperhidricidade durante a fase isolamento de multiplicação *in vitro* da cultivar *Green Globe* de alcachofra. Os autores relataram que estas

brotações cresceram dez vezes mais rápido que as brotações normais se tornaram rapidamente necróticas. Eles encontraram relação da hiperhircidade com o tamanho inicial do explante inicial e observaram que essa pode ser reduzida evitando o contato com as folhas dos brotos no meio de cultura. Os autores acima não encontraram relação da hiperhircidade com a composição do meio de cultura. Castiglione et al. (2007), ao contrário, multiplicando 5 cultivares de alcachofra observaram que a frequência de hiperhircidade variou de 0 a 67%, sendo fortemente influenciada pelo meio e cultivar. A Figura 17 mostra o aspecto de uma brotação com hiperhidricidade de alcachofra observada no presente trabalho.



Figura 17 – (a) Brotos de alcachofra apresentando hiperhircidade e broto normal no subcultivo I. FAMV – UPF – Passo Fundo- RS - 2012.

4.3.4 Validação da taxa de multiplicação em progênes de alcachofra utilizando a metodologia

Na etapa de validação foi realizada a metodologia para a multiplicação *in vitro* de alcachofra, o experimento foi repetido utilizando somente a região do ápice caulinar de sementes germinadas *in vitro* (Figura 18) das três progênes de alcachofra (P1=B2L4R6 / P2=B1L4R7 / P3=B1L3R1). Foram avaliados novamente os meios de multiplicação M1 e M2.

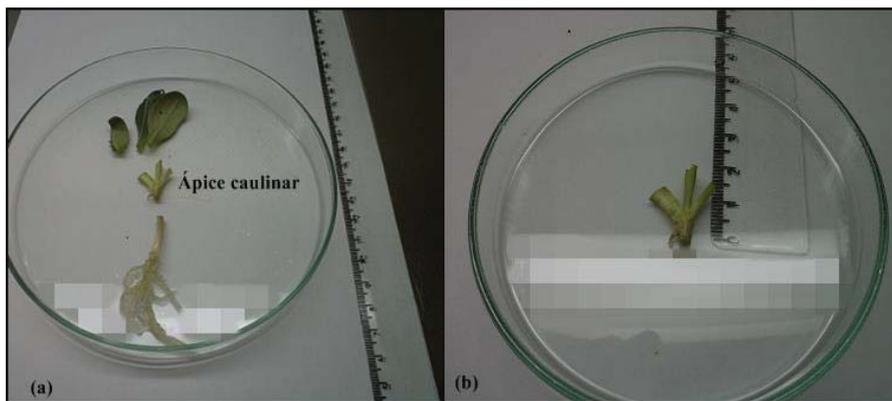


Figura 18 - (a) Plântula de alcachofra germinada *in vitro* por 21 dias indicando a região contendo o ápice caulinar; (b) Detalhe da região do ápice caulinar (1 a 2,0 cm) utilizado com explante para início do cultivo *in vitro* – FAMV – UPF- Passo Fundo - RS - 2012.

No subcultivo I foi observada diferença significativa entre as progênes e meio de cultura na taxa de multiplicação, no entanto não houve interação entre estes dois fatores. A progênie P1 apresentou maior taxa de multiplicação comparada a progênie P3 (tabela 11). Isso

confirma o desempenho inferior da progênie P3 observado no ensaio anterior. O efeito da progênie na capacidade de proliferação *in vitro* foi observado em alcachofra também por outros autores (PECAUT et al., 1992; ELIA et al., 2007). O número de folhas produzidas por brotação e altura das brotações não variaram entre as progênies avaliadas (Tabela 11).

Tabela 11 – Taxa de multiplicação, número de folhas e comprimento das brotações de três progênies de alcachofra cultivadas dois meios de cultura no final do subcultivo I

Progênie	Taxa de multiplicação	Número de Folhas	Comprimento das brotações (cm)
P1	2,88 a	10,97	4,48
P2	2,42 ab	8,75	4,53
P3	1,57 b	17,46	2,72
Média	2,09	12,27	1,55
Fonte de variação	Valores de F teste		
Progênie	5,373 *	0,479 ns	2,514 ns
Meio	9,496 **	6,433 *	1,864 ns
Progênie x Meio	0,800 ns	0,661 ns	0,383 ns
C.V(%)	31,42 %	74,32 %	39,54 %

Progênies: P1= B2L4R6 P2= B1L4R7 G3= B1L3R1

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0.05).

* Significativo ao nível de 5% pelo F teste; ns= não significativo.

O meio M1 induziu maior número de brotos axilares, exibindo, desta forma, maior taxa de multiplicação que o meio M2 (Tabela 12), confirmando a superioridade da combinação de 1,0 mg.L⁻¹ BAP e 0,1 mg.L⁻¹ de ANA (M1) comparado a 1,0 mg.L⁻¹ de kinetina e 40 mg.L⁻¹ de sulfato de adenina (M2) observado no ensaio anterior.

Os brotos gerados no meio M1 exibiram maior número de folhas (17,68) que o meio M2 (5,51), no entanto não houve diferença no comprimento das brotações (Tabela 12).

Tabela 12 - Taxa de multiplicação, número de folhas e comprimento das brotações de três progênies de alcachofra cultivadas em dois meios de cultura no final do subcultivo I

Meio de cultura	Taxa de multiplicação	Número de Folhas	Comprimento das brotações (cm)
M1	2,60 a	17,68 a	4,23
M2	1,45 b	5,51 b	3,51
Média	2,09	12,27	1,55
Fonte de Variação	Valores de F teste		
Progênie	5,373 *	0,479 ns	2,514 ns
Meio	9,496 **	6,433 *	1,864 ns
Progênie x Meio	1,852 ns	0,661 ns	0,383 ns
C.V(%)	31,42 %	74,32 %	39,54 %

Progênies: P1= B2L4R6 P2= B1L4R7 G3= B1L3R1 Meio de cultura: M1 e M2
Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0.05).
* Significativo ao nível de 5% pelo F teste; ns= não significativo.

A média da taxa de multiplicação nos subcultivos subsequentes II, III e IV foi de 3,14; 3,31 e 5,5, respectivamente, não havendo diferença na resposta entre os três progênies avaliados (Figura 19). A figura 19 a e b mostram a comparação dos resultados das taxas de multiplicação observadas entre os dois ensaios (ensaio original e validação).

O comportamento oscilatório da taxa de multiplicação ao longo do subcultivos foi observado na progênie P1.

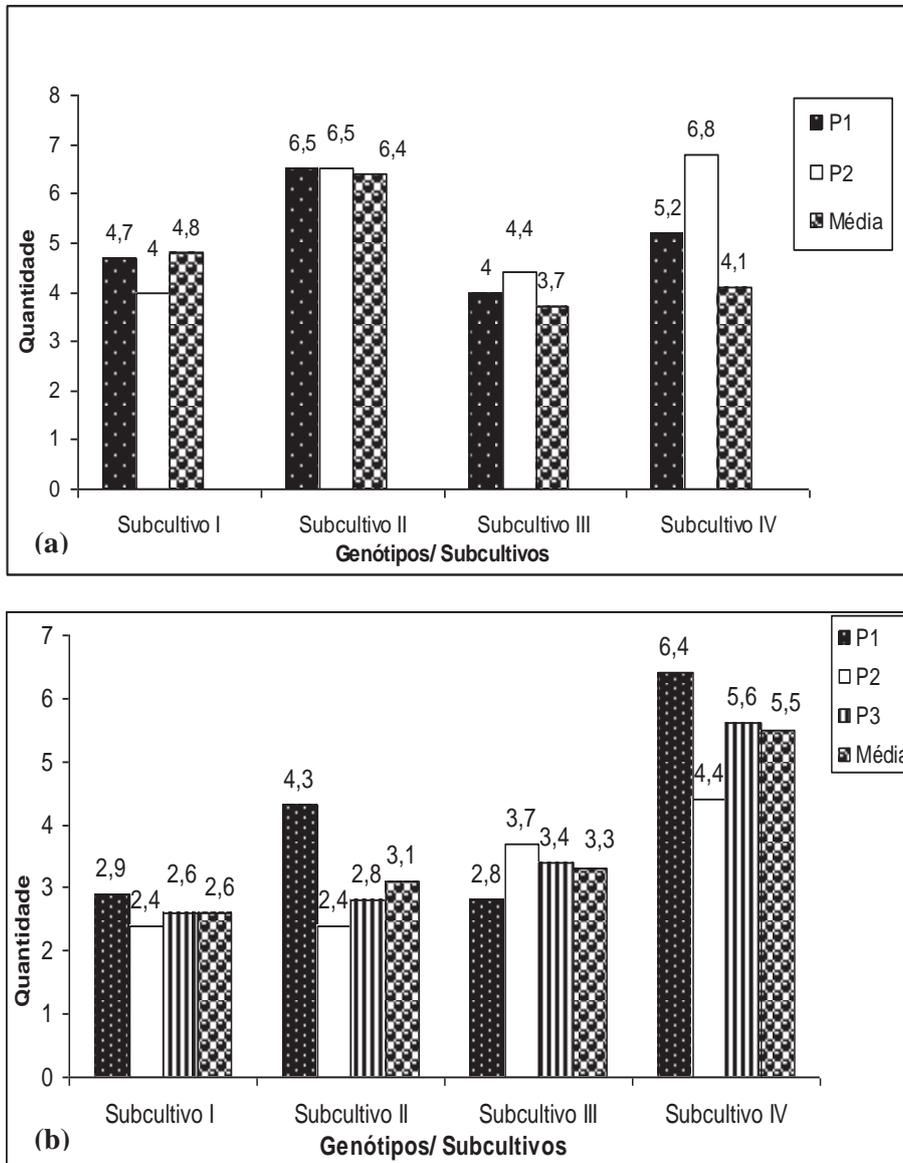


Figura 19 – Comparação da taxa de multiplicação de progênes de alcachofra cultivados meio M1 (MS modificado suplementado com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA em quatro subcultivos. (a) Ensaio original; (b) Ensaio de validação.

4.4 Enraizamento

A fase de enraizamento *in vitro* visa à indução e desenvolvimento de raízes na base das brotações produzidas na fase de multiplicação, e isso é geralmente obtido pela transferência das brotações de um meio com alta concentração de citocinina (meio de multiplicação) para um meio com baixa concentração ou ainda, mais frequentemente, na presença de uma auxina.

Um total de 54 propágulos, 27 de cada progênie (P1 e P2), foram transferidos para o meio de pré-enraizamento (MS sem suplementação de reguladores de crescimento) por 30 dias. Este procedimento favoreceu o crescimento dos propágulos e o fortalecimento do mesmo, de forma que as folhas se tornaram mais robustas e de tonalidade verde escuro. Os propágulos com comprimento médio inicial de 3,5 cm cresceram 42%, apresentando em média 5,0 cm. A Figura 20 mostra o aspecto dos propágulos ao final do período de pré-enraizamento.

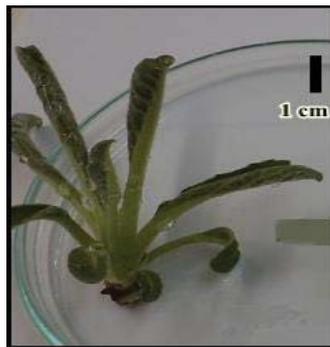


Figura 20 - Propágulo de alcachofra após 30 dias em meio de pré-enraizamento (meio MS sem reguladores de crescimento). FAMV – UPF- Passo Fundo- RS- 2012.

A fase de pré-enraizamento é considerada uma etapa preparatória para o enraizamento, uma vez que na ausência de citocinina (BAP), o propágulo reduz a produção de novos brotos axilares, o que permite seu crescimento, desenvolvimento, alongamento e produção de folhas maiores consistindo em uma etapa importante dentro da micropropagação de alcachofra (ANCORA 1986). Isso foi confirmado por Iapichino (1996) para a Cv. de alcachofra *Violetto Spinoso di Sicilia*, demonstrando que brotos transferidos diretamente para o enraizamento, não produziram raízes. Esse procedimento também foi empregado com sucesso por Morone et al. (2005), no enraizamento *in vitro* de alcachofra Cv. *Catanese*, e por Grando et al. (2011) na Cv. Brasileira de alcachofra Nobre.

Após 30 dias em meio de pré-enraizamento, os propágulos foram transferidos para meio de enraizamento, composto por MS modificado + 10 mg.L⁻¹ de AIA por mais 30 dias. Verificou-se maior frequência de brotações enraizadas no progênie P1 (51,9%) comparado ao progênie P2 (14,9%) (Tabela 13), evidenciando o efeito do progênie no enraizamento *in vitro* de alcachofra.

Em publicação recente, Bedini et al., (2012) avaliaram a possibilidade de micropropagar quatro progênies cultivados na região da Toscana, na Itália, e relataram o efeito da progênie na capacidade de enraizamento, a qual variou de 0 a 42,5%. As cultivares apresentaram, também, comportamento diferenciado em relação ao enraizamento em ágar e em perlita. A Cv. *Empolese*, cultivar do tipo Romanesco, produziu maior taxa de enraizamento em meio solidificado com ágar (30%), enquanto a *Terom* em meio líquido, contendo perlita como suporte (42,5%).

Tabela 13 – Brotos enraizados e não enraizados em duas progênies de alcachofra cultivados *in vitro* em meio de enraizamento por 30 dias

Progênie	Brotações enraizadas	Brotações não enraizadas
P1	0,518 a	0,48 b
P2	0,148 b	0,85 a
Média	0,34	0,67
Fontes de Variação	Valor de F teste	
Progênie	9,59 **	9,49 **
C.V. %	132,60 %	66,2 %

n= 27 / Progênies: P1= B2L4R6 P2= B1L4R7 - Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0.05). * Significativo ao nível de 5% pelo F teste; ns= não significativo.

Comparando os resultados obtidos com os dados descritos na literatura, observou-se que a frequência de enraizamento da progênie P1 (51,9 %) está dentro dos valores observados na espécie, mas pode ser otimizada, por outro lado a porcentagem de enraizamento da progênie P2 foi inadequada para estabelecimento de um protocolo eficiente de micropropagação.

No experimento realizado com a Cv. Nobre, a frequência de brotos enraizados foi de 62%, utilizando o mesmo meio de cultura desse experimento. No entanto, Morone-Fortunato et al. (2005) obtiveram 86% de brotos enraizados da Cv. *Catanese* de alcachofra e Tavazza et al. (2004) aproximadamente 90% de enraizamento na Cv. *Spinoso Sardo*, com a mesma formulação de meio de cultura (10 mg.l⁻¹ de AIA). Estas diferenças podem refletir o efeito do progênie ou das condições ambientais em que os experimentos foram conduzidos.

Segundo Morone et al. (2005), o AIA é a auxina mais eficaz no enraizamento de alcachofra, sendo ANA e IBA não tão efetivos para o enraizamento da Cv. *Catanese*, pois o excesso dessas auxinas inibe o processo de enraizamento. Como o AIA perde parte de sua eficiência durante o cultivo *in vitro* por ser foto-degradável, pode ser utilizado em alta concentração. Esse autores relataram que a concentração de 10 mg.L^{-1} de AIA resultou em 86% dos brotos enraizados, enquanto que $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ deste mesmo regulador induziu a brotação em somente 23% dos brotos. Esses resultados justificaram o emprego de alta concentração desta auxina no presente experimento.

Para a Cv. *Green Globe* de alcachofra, Lauzer & Vieth (1990) obtiveram 65% de enraizamento empregando um meio contendo 1 mg.L^{-1} de AIA, mas esse resultado somente foi possível mediante a permanência dos brotos durante dois meses no meio de enraizamento. Da mesma forma, Ancora et al. (1981), utilizando baixa concentração de auxina ANA ($2,0 \text{ mg.l}^{-1}$) nessa fase, necessitaram de dois meses de cultivo da cv. Romanesco para obter 58% de enraizamento. Cabe salientar que estes autores não utilizaram a fase de pré-enraizamento, o que pode ter postergado a indução de raízes.

O enraizamento *in vitro* é considerado uma das fases mais críticas da micropropagação de alcachofra (ANCORA et al., 1981; ANCORA, 1986; ROSSI & De PAOLI, 1992; BRUTTI et al., 2000; BEDINI et al., 2012). Para contornar este problema várias técnicas têm sido empregadas, entre elas a modificação na composição hormonal e mineral dos meios de enraizamento (MOZARDEC & HOURMANT, 1997; TAVAZZA et al., 2004), pela adição de componentes alternativos como as ciclodextrinas (BRUTTI et al.,

2000; BEDINI et al., 2012) ou pelo emprego de micorrizas (MORONE FORTUNATO & RUTA, 2003; MORONE FORTUNATO et al., 2005).

Quanto ao uso de reguladores de crescimento, pode-se citar o trabalho realizado por Morzadec & Hourmant (1997), que demonstraram que o uso de GA₃ combinado com auxina aumentou a porcentagem de enraizamento de 50% para 92,3%, comparado ao meio contendo somente auxina. Portanto, o acréscimo de GA₃ no meio de enraizamento pode ser uma das estratégias a serem utilizada para aumentar o enraizamento das progênies empregadas no presente experimento.

A redução de sais no meio de enraizamento é outra estratégia comumente utilizada para alcachofra. O uso do meio MS com elementos reduzidos pela metade tem sido relatado por Ancora et al. (1981), Pecaut et al. (1983), Iapichino (1996) e Lauzer & Vieth (1990).

Quanto ao uso de componentes alternativos no enraizamento *in vitro* de alcachofra, Brutti et al., (2000) relataram que o uso de 2 g.l⁻¹ de β-ciclodextrina e 3 mg.l⁻¹ de ANA, aumentou em três vezes a porcentagem de raízes para a Cv. *Early French* comparado ao uso isolado de ANA, ou seja, a frequência de enraizamento aumentou de 20 para 60%. Ciclodextrina também foi empregada por Bedini et al., (2012) no enraizamento *in vitro* de alcachofra.

A ausência de raízes pode prejudicar a fase de aclimatização, no entanto, experiências anteriores com esta espécie mostrou que aproximadamente 40% dos brotos não enraizados produziram raízes na fase da aclimatização (GRANDO et al., 2011),

demonstrando que embora as raízes não sejam visíveis nessa fase, houve indução de raízes nesses brotos, durante a fase de enraizamento.

O mesmo foi observado anteriormente por Rossi & De Paoli (1992). Segundo estes autores somente brotos desenvolvidos em meio de enraizamento, mesmo sem raízes, podem ser transferidos com sucesso para a aclimatização. No entanto, as folhas devem estar abertas e de cor verde escura. A figura 21 e 22 mostra aspectos das plântulas enraizadas e não enraizadas das progênies P1 e P2 de alcachofra.

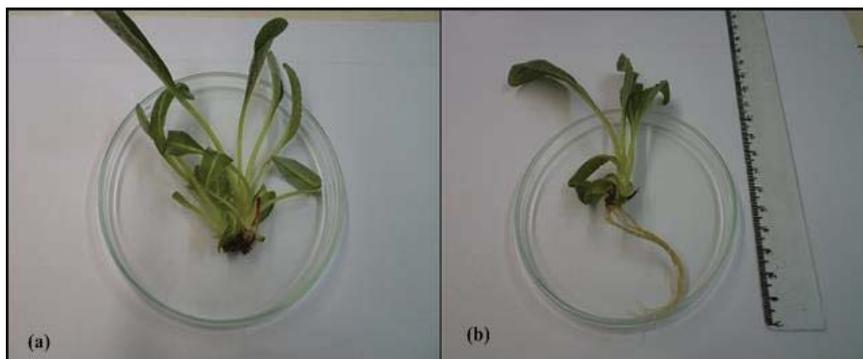


Figura 21 – Plântulas de alcachofra da progênie P1 (B2L4R6) após 30 dias de cultivo em meio de enraizamento contendo 10 mg.l^{-1} de AIA. a) plântulas não enraizadas; b) Plântula enraizada. FAMV- UPF - Passo Fundo - RS - 2012.

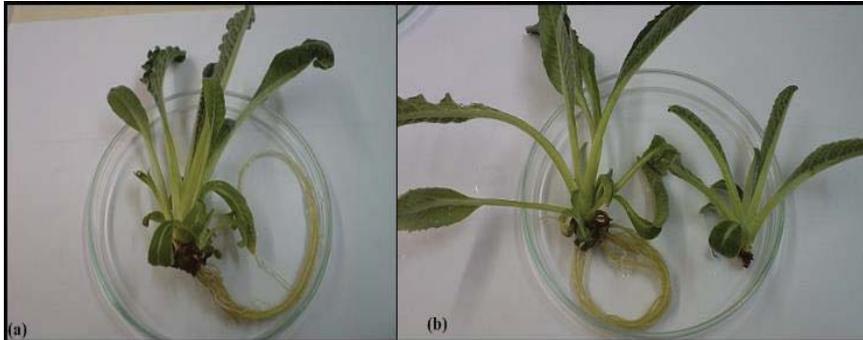


Figura 22 – Plântulas de alcachofra da progênie P2 (B1L4R7) após 30 dias de cultivo em meio de enraizamento contendo 10 mg.l^{-1} de AIA. a e b) Plântulas enraizadas e não enraizadas. FAMV – UPF- Passo Fundo - RS - 2012.

Também foram observadas muitas plantas com características heterogêneas, tanto no tamanho das raízes, quanto as folhas, demonstrando assim a grande variabilidade existente dentro da mesma progênie de alcachofra.

A média do maior comprimento de raiz foi observada no progênie P2 (12,88) o qual também apresentou maior volume de raiz ($2,3 \text{ cm}^3$), (Tabela 14). Nesta progênie, apesar de apresentar baixa frequência de enraizamento (14,9%) as brotações enraizadas apresentaram raízes longas e com grande volume. Para a variável número de folhas não houve diferença significativa entre os progênies (Tabela 14).

Tabela 14 - Médias de maior raiz, número de folhas e volume de raiz observadas em duas progênie de alcachofra no final da fase de enraizamento

Progênie	Maior raiz (cm)	Volume de raiz (cm ³)	Nº de folhas
P1	6,48 b	0,68 b	10,46
P2	12,88 a	2,30 a	12,80
Média	8,26	1,13	11,11
Fontes de Variação		Valores de F teste	
Progênie	9,752**	8,21 **	1,21 ns
C.V(%)	47,10%	95,40 %	36,28 %

Progênie: P1= B2L4R6 P2= B1L4R7

Teste ANOVA comparação de médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste Tukey 0,05% de erro.

O número de raízes obtidas nas brotações cultivadas *in vitro* neste estudo foi maior do que o comumente relatado para alcachofra, entre 1 a 3 (IAPICHINO, 1996). Neste experimento não foi possível a contabilização do número de raízes devido ao seu grande número e pela consistência fina (Figura 22), portanto, optou-se pela avaliação do volume das mesmas. Segundo Rossi e De Paoli (1992) se a planta apresentar um sistema de enraizamento contendo 3 ou 4 raízes, sua transferência para a casa de vegetação será satisfatória. Ao contrário plantas pequenas e fracas e apresentando somente uma raiz tem pouca chance de sobreviver ao processo de aclimatização.

De acordo com Bedini et al., (2012) os brotos de boa qualidade são um pré-requisito básico para um enraizamento e aclimatização das plantas com estabelecimento em todas as fases da micropropagação e posterior cultivo a campo.

O processo de formação de raiz adventícia ocorre de uma a três semanas e pode ser dividido em três fases: indução, iniciação e alongação. As fases de indução e iniciação, geralmente são dependentes de auxina, mas o crescimento (alongação) das raízes pode ser inibido pela presença dessa classe de substâncias (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

A relação existente entre aplicação de auxina exógena e concentração da auxina endógena, também deve ser levada em consideração nesse processo. (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Segundo esses mesmos autores, plântulas conduzidas ao enraizamento com reduzido número de folhas e pouco alongadas não enraízam bem e o comprimento ideal da planta é em torno de 1,0 cm e a presença de folha é importante, considerando que estas são fundamentais na produção de auxinas, nutrientes, sacarose ou compostos nitrogenados necessários para a formação de raízes.

4.5 Aclimatização

Após a fase de enraizamento *in vitro*, plântulas/brotações das duas progênies de alcachofra foram transferidos para três substratos: S1: Mecplant Horta 2 ® 100%, S2: 50% substrato comercial Mecplant Horta 2 ® e 50% Casca de arroz carbonizada (CAC) e S3: 100% Casca de arroz carbonizada (CAC). Após 30 dias de aclimatização foi obtida a frequência de sobrevivência destes materiais nos diferentes substratos.

O conceito de substrato pode ser definido como sendo o meio em que as raízes das plantas desenvolvem-se quando não

cultivadas no solo *in situ*, apresentando como principal função conceder suporte às plantas, podendo ainda regular a disponibilidade de água e nutrientes (KÄMPF, 2000).

Na figura 23, se observa as diferenças quanto às características físicas dos substratos. Observa-se que o substrato com 100% do produto comercial Horta 2 ® (S1) apresentou menor espaço de aeração (EA) com $0,244 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3}$, embora dentro da faixa considerada ideal ($0,20\text{-}0,30 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3}$) por De Boodt & Verdonck (1972). Quando se adicionou 50% de CAC (Casca de Arroz Carbonizada) a esse material (S2) o valor de espaço de aeração aumentou para $0,442 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3}$. Porém, valor menor do que o substrato contendo 100% de CAC, o qual apresentou $0,704 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3}$. A CAC é um substrato utilizado para o enraizamento de estacas de espécies ornamentais, pois destaca-se pelo elevado volume de aeração e por resistir à decomposição, mantendo a estabilidade do mesmo.

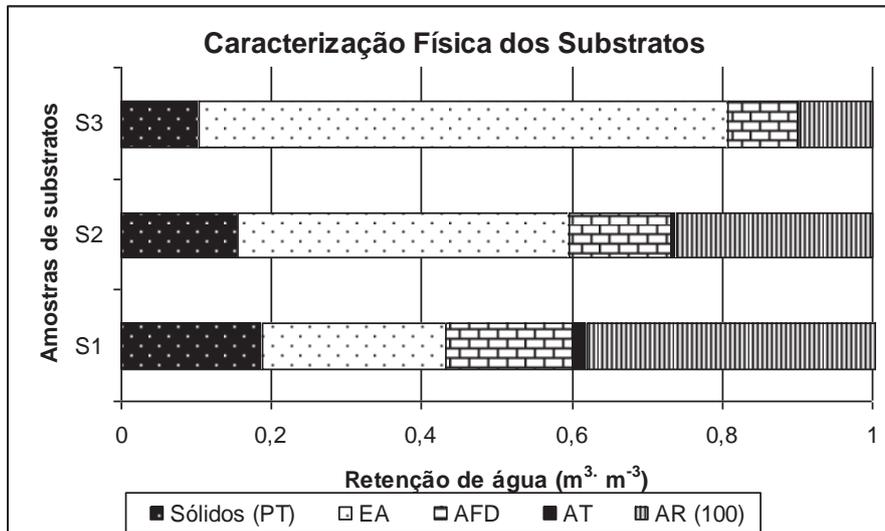


Figura 23 - Caracterização física dos substratos utilizados na etapa de aclimatização de mudas de alcachofra produzidas *in vitro* quanto à Porosidade Total (sólidos - PT), Espaço de Aeração (EA), Água Facilmente Disponível (AFD), Água Tamponante (AT) e Água Residual (100 cm de pressão de sucção). FAMV - UPF - Passo Fundo -RS - 2012.

S1: Horta 2 ® 100%/ S2: Horta 2® + CAC 50% / S3: CAC 100%

Quanto à capacidade de retenção de água verificou-se ao contrário, à medida que aumentou a CAC foi diminuindo a água facilmente disponível ($0,136 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3}$), a água tamponante ($0,007 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3}$) e a água residual ($0,26 \text{ m}^3 \text{ m}^{-3}$). Para as características químicas os valores ideais situam-se na faixa de 5,5 a 6,5 (pH em H_2O), para materiais minerais, e de até 5,8, para materiais orgânicos Fermino e Bellé (2000). Na análise dos materiais os três substratos apresentaram valores de pH na faixa de 7,0 a 7,5, acima do ideal considerado por esses autores (Figura 24).

O valor do pH determina a acidez relativa de um meio, sendo o critério químico de maior importância para o desenvolvimento da planta, em razão do efeito direto na

disponibilidade de nutrientes, particularmente dos micronutrientes (FERMINO & BELLÉ, 2000). Já para a condutividade elétrica (CE) os autores Ballester-Olmos (1993) consideram como ideal os valores entre 0,75 a 2,0 m.Scm⁻¹.

No presente trabalho houve diminuição da CE à medida que foi adicionado CAC, sendo os valores inferiores ao determinado por esses autores como ideais. A respeito da capacidade de troca de cátions (CTC) houve resposta semelhante à encontrada para a CE, sendo de 314,3 em S1, 256,7 em S2 e 61,22 m.mol_c/kg em S3. Neste experimento observou-se que nas progênies utilizadas (P1 e P2) mesmo as plantas sem raízes apresentaram bom desenvolvimento e aclimatização, talvez as raízes já estavam induzidas, no momento da transferência de meio de cultura para vasos com substratos.

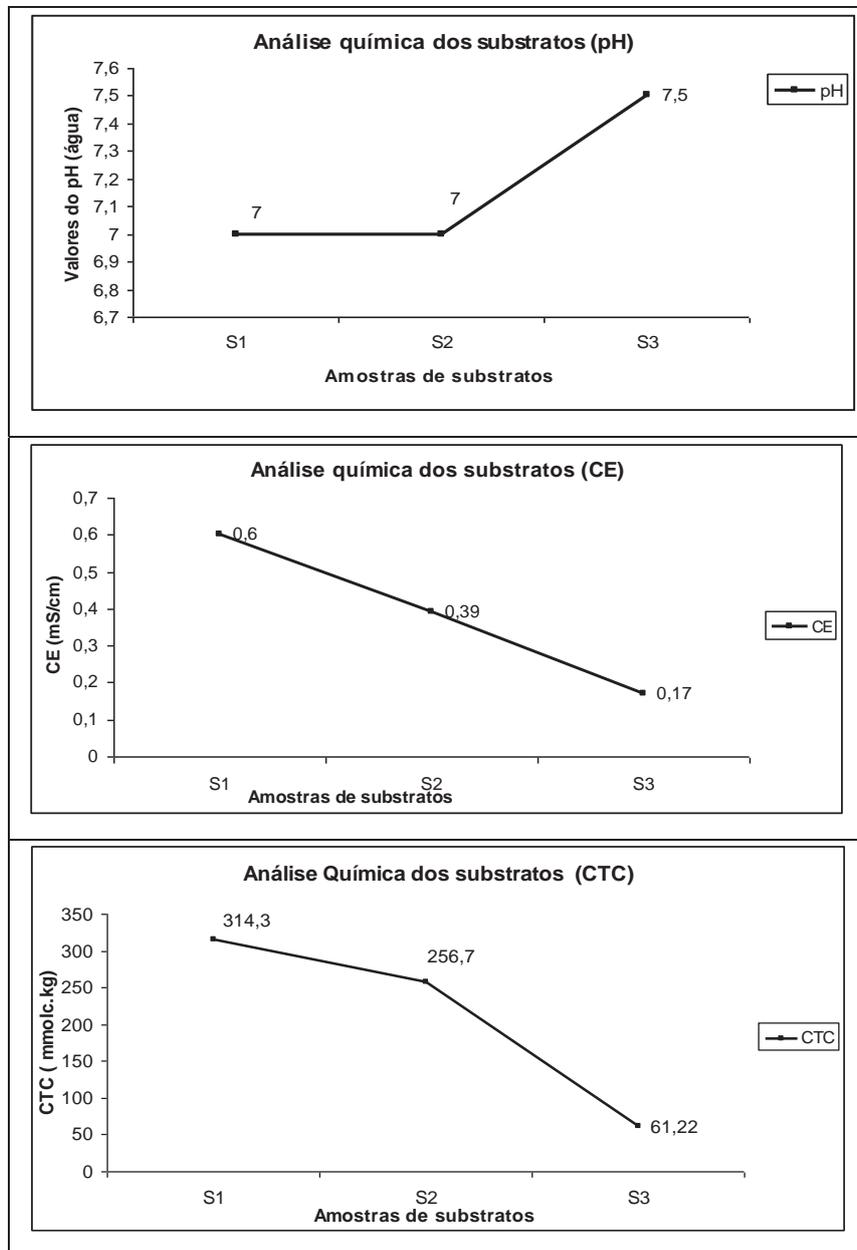


Figura 24- Análise química dos três substratos utilizados na aclimatização de plântulas de alcachofra produzidas *in vitro*. M FAMV, 2012/13- Passo Fundo - RS.

S1: Horta 2 ® 100% S2: Horta 2® + CAC 50% S3: CAC 100%

A CTC é definida como a capacidade de absorver e trocar cátions. É representada pela quantidade de cátions trocados, retidos em uma unidade de massa ou de volume (DE BOODT & VERDONCK, 1972). Em altos valores de CTC há redução da lixiviação dos nutrientes e aumentam a capacidade de tamponamento, prevenindo amplas variações no pH e na disponibilidade de nutrientes. A capacidade de troca de cátions (CTC) está diretamente ligada à disponibilidade de cátions e à redução nas perdas por lixiviação, uma vez que quanto maior, aumenta a retenção de cátions absorvidos (FERMINO, 1996). Os valores de 6 cmolc.L^{-1} a 15 cmolc.L^{-1} são recomendados por Fonteno (1996) e 20 cmolc.L^{-1} por Martinez (2002). Assim, quanto mais alta for a CTC de um substrato, mais cátions ele pode reter. Os três principais fatores que afetam a CTC são a textura, a quantidade e tipo de argila e o teor de matéria orgânica. As propriedades químicas são mais facilmente modificadas pela utilização de soluções que contenham íons de minerais que serão úteis para o desenvolvimento das plantas (VERDONCK, 1981).

Um total de 27 plântulas/brotações da progênie P1, 14 plântulas contendo raízes e 13 brotações sem raízes foram aclimatizadas nos três substratos. A tabela 15 mostra a frequência plântulas/brotações de sobreviventes, após 30 dias de aclimatização. As plântulas contendo raízes sobreviveram somente quando cultivadas no substrato 1 (S1) e numa frequência de 60%. Já as brotações sem raízes tiveram 100% de sobrevivência no substrato 1 e 2 (S1 e S2) e 50% no substrato 3 (S3), evidenciando assim que a maior taxa de sobrevivência ocorreu em indivíduos sem a presença de raízes.

Tabela 15 – Porcentagem de plântulas/brotações de alcachofra sobreviventes, em três substratos diferentes com e sem raiz, após 30 dias de aclimatização (P1/P2)

Com raiz		Sem raiz				Total		
Progênie*	Substrato*	N. plantas	Sobrev N. %	Sobrev N. %	N. brotações	Sobrev N. %	Sobrev %	Sobrev %
P1	S1	05	03 60	04	04 100	77,8		
	S2	05	00 00	05	05 100	50,0		
	S3	04	00 00	04	02 50	25,0		
Total	-----	14	03 21,4	13	11 84,6	50,9		
P2	S1	05	00 00	06	06 100	54,5		
	S2	04	02 50	04	04 100	75,0		
	S3	04	00 00	04	02 50	25,0		
Total	-----	13	02 15,4	14	12 85,7	51,5		

*Progênies: P1= B2L4R6 ;; P2: B1L4R7 S1: H2 100% - *Substratos: S2:50%CAC 50% H2, S3: 100% CAC

Em geral, as plântulas enraizadas sobreviveram em menor número durante a aclimatização (21,4%) comparada com as não enraizadas (84,6%) (tabela 15). Isso demonstra que a ausência de raízes visíveis não impediu o desenvolvimento das brotações, e, portanto, supõe-se que as raízes já estavam induzidas na fase de enraizamento, garantindo a sua sobrevivência. A provável explicação para a mais baixa sobrevivência de plantas já apresentando raízes quando transferidas para a fase de aclimatização, pode ser pelo fato das raízes produzidas na fase de enraizamento não serem funcionais quando transferidas para substrato, necessitando da indução de novas

raízes. Como as raízes pré-existentes eram longas e bem desenvolvidas talvez as reservas para o desenvolvimento de novas raízes fosse escassa, ou foram danificadas durante o plantio.

Pierik (1988) afirma que as raízes formadas *in vitro* não se apresentam totalmente funcionais quando transferidas para *in vivo*, sendo fracas e com poucos pêlos absorventes, geralmente morrendo nas etapas seguintes. Debergh & Maene (1981) citaram a mesma razão para a perda de crescimento das brotações enraizadas *in vitro* após transferidas para *in vivo*. As raízes crescidas em ágar geralmente não possuem pêlos absorventes, podendo vir a morrer logo após o transplante.

A suposição de que a aeração deficiente pode vir a ser a causa da má qualidade ou falta de funcionalidade das raízes formadas em meio com ágar, é compartilhado por Pierik (1988). Com o uso de substratos inertes, porosos e opacos, como a vermiculita, espumas de poliuretano (e resíduos industriais, como a cinza vegetal, embebidos com meio nutritivo, podem ser alternativas de custo mais reduzido do que o ágar. Estes materiais, por promoverem maior aeração do meio e menor transmissão de luz, podem favorecer o enraizamento de plantas *in vitro* (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Debergh & Maene (1981) observaram que, quando as plantas são avaliadas aproximadamente em duas semanas depois do transplante, as raízes produzidas em meio de cultura tinham morrido, e outras tinham começado a se desenvolver, indicando que para algumas espécies, as raízes *in vitro* não são funcionais após transferência para a condição *ex vitro*.

A eliminação da etapa de enraizamento *in vitro* é extremamente desejável sob o aspecto econômico (Debergh & Maene, 1981) e da qualidade, pois a regeneração de raízes durante a fase de aclimatização tende a produzir um sistema radicular mais desenvolvido e funcional (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Ainda com relação à qualidade George, (1996) observou que raízes que se desenvolvem *in vitro* podem ser danificadas quando as plântulas são removidas da cultura e transplantadas para substrato, o que aumenta as chances de infecção por fungos e bactérias. Sabe-se que em espécies herbáceas como as lenhosas com grande capacidade de enraizamento de estacas, o enraizamento *in vitro* pode ser eliminado sem causar danos à planta (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Em alguns casos, o gasto extra com o enraizamento *in vitro* pode ser justificado se este resultar em mudas de melhor qualidade, ou se perdas durante a aclimatização podem ser reduzidas (GEORGE, 1996). Esta estratégia pode ser utilizada futuramente em alcachofra.

Em geral, para a progênie P1 o substrato 1 (S1) promoveu maior frequência de sobrevivência (77,8%), comparado ao substrato S2 (50%) e substrato S3 (25%). (Tabela 15). O substrato 1 (S1), composto por substrato comercial Mecplant Horta 2 ® (100%), parece ser o mais adequado para as progênies estudadas, com características de maior retenção de água, menor espaço de aeração, maior água residual (AR) e pH (7,0). Também a condutividade elétrica (CE) e capacidade de transporte de cátions (CTC) foi maior em comparação aos demais substratos analisados (Figura 25).

Na progênie P2, 13 plântulas brotações com raízes e 14 brotações sem raízes foram transferidas para os três substratos. As plântulas já enraizadas somente foram capazes de sobreviver no substrato S2 (50% de sobrevivência), enquanto que todas as brotações não enraizadas (100%) sobreviveram nos substratos 1 e 2, e somente 50% no substrato 3. Da mesma forma que observado para a progênie P1, as plântulas enraizadas da progênie P2 sobreviveram menos a aclimatização (15,4%) comparada com as não enraizadas (84,7 %). Em geral, para a progênie P2, o substrato S2 promoveu maior frequência de sobrevivência (75%), comparado ao substrato S1 (54,5%) e substrato S3 (25%).

Considerando o total das 54 plântulas/brotações pertencentes as duas progênies de alcachofra estudadas, 30 (55,55%) sobreviveram nos primeiros 30 dias de aclimatização, sendo do total da progênie P1, 21,42% com raízes e 78,57% sem raízes, e da progênie P2 14,28% com raízes e 85,71% sem raízes. A maior taxa de sobrevivência foi no substrato S1 com 77,8% para a progênie 1 (P1) e no substrato 2 (S2) de 75,0% para a progênie 2 (P2). O substrato S3, contendo 100% de CAC, não se mostrou favorável a aclimatização de mudas de alcachofra produzidas *in vitro*.

A provável explicação pode ser o fato de a CAC apresentar maior espaço de aeração(EA) e com isso drenar a água ministrada pela irrigação, sendo insuficiente para o desenvolvimento das plantas sobreviventes. Por outro lado, nas características químicas se observa que à medida que foi adicionado casca de arroz carbonizada (CAC), houve aumento do pH, diminuição da condutividade elétrica (CE) e da (CTC), Provavelmente, isso indica

que talvez seja necessário complementar com adubação externa, para repor as perdas com estas características.

Segundo Fonteno (1981) a alcachofra é pouco tolerante a acidez com pH entre 5,7 e 6,8. Quando é produzida no solo procura-se atingir o pH de 6,5. A faixa de pH ideal para demais plantas cultivadas, na horticultura, de acordo com alguns autores, fica entre 6,0 e 6,5, porque possibilita a absorção da maioria dos nutrientes. Já sem a presença de solo, o pH pode variar de 5,4 a 6,0 (FONTENO, 1996), de 5,5 a 6,3 (HANDRECK & BLACK, 1999), de 5,4 a 6,4 (BAILEY et al., 2000) e de 5,5 a 6,5 (FERMINO & BELLÉ, 2000). Já a capacidade de troca de cátions, segundo Gruszynski, et al. (2002), está diretamente relacionada com o nível tecnológico (manejo de fertirrigação) do produtor de mudas, capaz de controlar a ampla reserva dos nutrientes. Trabalhos com a cultura da alcachofra indicam que progênies dessa cultura ajustam-se melhor em materiais com uma relação equilibrada de ar e água, como foi verificado no substrato 1 (S1).

Grando et al. (2011) observaram que 40% dos brotos não enraizados produzidos *in vitro* da Cv. Nobre produziram raízes na fase da aclimatização quando transferidas para substrato Mecplant®, demonstrando que embora as raízes não sejam visíveis nessa fase, houve indução de raízes nesses brotos. O mesmo foi observado anteriormente por Rossi & De Paoli (1992). Segundo os autores somente brotos crescidos em meio de enraizamento, mesmo sem raízes, podem ser transferidos com sucesso para a aclimatização desde que as folhas estejam bem abertas e de cor verde escura. Esse fato nem sempre é observado em outras espécies. Ao contrário Araújo et

al., (2006), relataram que mudas de *Aloe vera* enraizadas *in vitro* apresentaram 80 a 95% de sobrevivência na aclimatização, enquanto que aquelas desprovidas de raízes a taxa de sobrevivência caiu para 30%.

A Figura 25 mostra aspectos das plântulas com 30 dias de aclimatização em câmara climatizada e aspectos do desenvolvimento de raízes em brotações inicialmente não enraizadas.

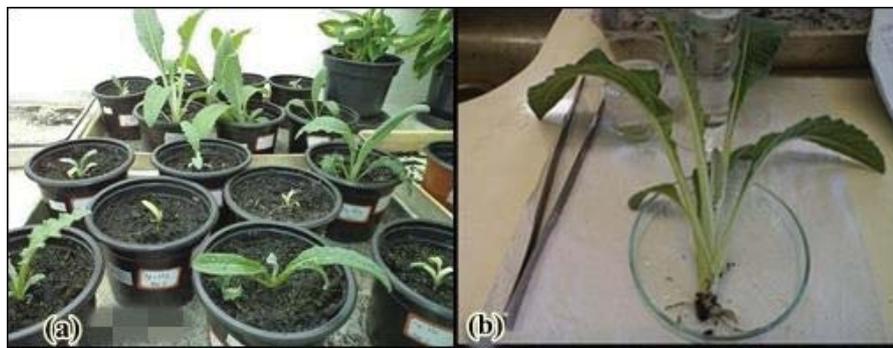


Figura 25 – Plantas aclimatizadas de alcachofra após 30 dias de cultivo em câmara climatizada; a) plantas cultivadas em vasos de 500 ml, com três diferentes substratos; b) plântula inicialmente não enraizada mostrando o desenvolvimento de novas raízes. FAMV – UPF – Passo Fundo – 2013.

Um total de 22 indivíduos aclimatizados, 14 de cada progênie, foram transferidas para a segunda etapa da aclimatização. As plântulas foram transferidas para o substrato Mecplant Horta 2® e mantidas em estufa agrícola semi-climatizada. Após 30 dias nessas condições, 81,1% das plântulas (18 plantas), sobreviveram e se mostraram saudáveis (Figura 26) e 17,3% não tiveram sucesso na aclimatização. As plantas não sobreviventes geralmente eram de tamanho pequeno ou não apresentavam raízes no final da primeira

etapa de aclimatização. Na Figura 26, observa-se, que mesmo as plantas que não apresentaram raízes durante a primeira fase de aclimatização, estavam com raízes desenvolvidas e com boa sanidade após 60 dias de aclimatização. As plantas climatizadas serão avaliadas futuramente em nível de campo quanto as suas características agronômicas e de qualidade de capítulo.

A fase de aclimatização de plantas micropropagadas é uma das mais delicadas da micropropagação e pode criar altos níveis de estresse, devido às características de plântulas cultivadas *in vitro*. Alcachofras micropropagadas são particularmente sensíveis ao processo de aclimatização (BRUTTI et al., 2000).



Figura 26 – Plantas de alcachofra após 60 dias de aclimatização; (a) planta da progênie P1 que foi transferida para aclimatização sem apresentar raízes e nesta etapa com raízes bem desenvolvidas; (b) Plantas de alcachofra após 60 dias de aclimatização em estufa semi-climatizada. FAMV – UPF – Passo Fundo - RS - 2013.

Na cultivar de alcachofra siciliana *Violetto Spinoso di Sicilia*, a sobrevivência das plântulas produzidas *in vitro* foi de 70%, durante a fase de aclimatização, quando novas raízes eram formadas. Esses autores discutem que um eficiente sistema *in vitro* possibilita a proliferação de gemas subterrâneas dormentes (IAPICHINO, 1996).

É possível propagar alcachofra através da técnica de micropropagação, e apesar das perdas por motivos adversos, principalmente contaminações por bactérias e fungos de ápices caulinares, foi obtido resultados satisfatórios e plantas saudáveis. Estes resultados indicam a possibilidade de cultivá-las no campo futuramente, observando as características fenotípicas de interesse para o consumo *in natura*.

Neste trabalho foi demonstrado a micropropagação de duas progênies (P1: B2L4R6 e P2: B1L4R7) de alcachofra, a partir de explantes obtidos de plântulas germinadas *in vitro*, com taxa de multiplicação de 5,5:1. Embora a frequência média de enraizamento foi de apenas 33,3% mais de 75% das plântulas foram aclimatizadas com sucesso no substrato S1, Mecplant Horta 2® em 100%. Esta técnica deve ser otimizada para diferentes progênies selecionadas para que sejam disponibilizadas mudas de qualidade para os produtores da região sul do Brasil.

CONCLUSÕES

EXPERIMENTO I e II

- Ápices caulinares obtidos de plantas adultas cultivadas no campo e plântulas originadas de sementes semeadas em substrato estéril apresentam muitos agentes patogênicos que dificultam o estabelecimento do cultivo *in vitro*;
- O meio de multiplicação utilizado ($0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA) não é eficiente para induzir o desenvolvimento de novas brotações nas 3 cultivares de alcachofra avaliadas.

EXPERIMENTO III

- A germinação *in vitro*, proporciona a produção de explantes assépticos para iniciar o processo de cultivo *in vitro*;
- O explante ápice caulinar das plântulas oriundas de sementes germinadas *in vitro* é adequado para micropropagação de alcachofra;
- A taxa de multiplicação de 5:1 é obtida pela utilização do meio de cultura MS suplementado com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA;
- A frequência do enraizamento de propágulos de alcachofra é influenciada pela progênie. No entanto a indução de raízes visíveis não é necessária para a aclimatização.
- Os substratos S1(Mecplant Horta 2® 100%) e S2 (Mecplant Horta 2® 50% e Casca de arroz carbonizada 50%) são adequados para a aclimatização de plântulas de alcachofra.

REFERÊNCIAS

ANCORA, G., BELLI D., M.L. and CUOZZO, L.; Globe artichoke plants obtained from shoot apices through rapid *in vitro* micropropagation. *Scientia Hort.* v.14 p. 207-213,1981.

ANCORA, G. Globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). In: Bajai, Y.P.S. (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Crops*, vol. 2 *Crops I*. Springer-Verlag, Berlin, Heideberg,1986, p. 471–484.

ANCORA, G.;GRINÒ, P., TAVAZZA, R., PAGNOTTA, M.A., TEMPERINI, O.; CAMPANELLI, R.; The first three clones selected from the traditional artichoke “*Romanesco*” population and proposed for the release of new varieties, In: Bazinet C. (Ed.), *Proceedings of VII INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ARTICHOKE, CAEDOON AN THEIR WILD RELATIVES* (1st January 2012, Saint Polde Léon, France), *Acta Horticulturae.*, vol. 942.

APOSTOLO, N.M.; BRUTTI, C, & LIORENTE, B. (2005) Leaf anatomy of *Cynara scolymus* l. In successive micropropagation stages. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 41: 307-313.

ASPRELLI P. D. *Determinación de la variancia genética para caracteres vegetativos y productivos en una población de clones de alcaucil (Cynara scolymus L.) y análisis de componentes principales y de agrupamento.* (Trabalho de graduação). Universidade Nacional de Rosário, Rosário- Argentina, 2000.

AUGUSTIN, L.; CALVETE, E.; GRANDO, M.F.; SUZIN, M. Micropropagação vegetal e sua importância econômica. In:BRAMMER, S.P.; IOCZESKI, E.J. (eds). *Aplicações em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal.* 1 ed. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2002, v. 1, p. 135-154.

AUGUSTIN, L.; GRANDO, M. F.; SUZIN, M.; PIVA, M.; DONIDA,

B.; FLOSS, E. Micropropagação de uma cultivar de alcachofra para uso industrial. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 46, 2002, Passo Fundo. *Resumos*. Goiânia, 2006. 1 CD-ROM.

BAGGIO, M. I.; PALLA, F.; BOSCARDIN, D. S.; MANTOVANI, N.; GRANDO, M. F.; AUGUSTIN, L.; SUZIN, M.; DONIDA, B. Floral Biology of Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Nobre-UPF Brazilian Cultivar In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE ALCACHOFRA, 7, 2009. França, Junho, 2009.

BALLESTER-OLMOS, J.F. *Substratos para el cultivo de plantas ornamentales*. Madrid: Saijen, 1993. 44p.

BASNIZKI, Y.; MAYER, A.M. Germination in *Cynara* seeds: effects of light and temperatura on the function of the endosperm. *Agronomie*, France, v. 5, p. 529-532, 1985.

BASNIZKI, Y.; ZOHARY, D. Beating of seed-planted artichoke. In: JANIK, J.; WILEY, J.S. (eds.). *Plant Breeding Reviews*, Connecticut, v. 12, p. 253-269, 1994.

BAILEY, D.A.; NELSON, P.V.; FONTENO, W.C. *Substrates pH and water quality*. Raleigh: Nort Carolina State, University, 2000. Disponível em: <http://www.ces.ncsu.edu/depts/hort/floriculturae/plugs/ph.pdf>>. Acesso em 20.01.2011.

BEDINI, L.; LUCCHESINI, M.; BERTOZZI, F.; GRAIFENBERG, A.; Plant tissue cultures from four *Tuscan* globe artichoke cultivares *Cent. Eur. Journal. Bioliology*. 7(4): 2012 ; p.680-689.

BEKHEET, S. A *In vitro* Preservation of Globe Artichoke Germplasm. *Plant Tissue Culture. & Biotech.* (June) PTC&B 17(1): 1-9, 2007.

BELLÉ, S.; KÄMPF, A.N. *Produção de mudas de maracujá amarelo em substratos à base de turfa*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 28, n. 3, p. 385-390, 1993.

BERJAK, P. Stored seeds: The problems caused by microorganisms (With particular reference to the fungi) In: NASSER, L. C.; WETEZ, M. M.; FERNADES, J. M. Seed pathology: International advance course, proceedings. Brasília: Abrates, 1987. p. 38-50.

BIANCO, V.V. Carciofo (*Cynara scolymus* L.) In: BIANCO, V.V.; PIRUPINI, F. (eds.). *Orticoltura*. Bologna: Pátron, p. 209-251, 1990.

BIANCO, C.; FERN'ANDEZ, J.; MIGLIARO, D.; CRINO, P.; GILABERT, C.. Identification of F1 hybrids of artichoke by ISSR markers and morphological analysis. *Molecular Breeding* (2011) v.27p.157–170.

BIGOT, C.; FOURY, C. Multiplication *in vitro* d' artichaut (*Cynara scolymus* L.) `a partir de semences: Comparaison au champ de quelques clones `a la lignée dont ils sont issus. *Agronomie*, France, v. 4, p. 699-710, 1984.

BORREGO, J. V. M. Hortalizas Aprovechables por sus inflorescências – Herbáceas Especial – In: *Horticultura – 2ª edição revisada y ampliada – Ediciones Mundi – Prensa: Castelo 37-28001 – Madrid, 1986, p.313-326.*

BOULLANI, R EL., ELMOSLIH, A. EL FINTI, A. EL MOUSADIK, M.A. SERGHINI, M.A.. Correlation between characters of quality and productivity os artichoke for in natura consuption. *ISHS Acta Horticulturae* 983: VIII INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ARTICJOKE, Cardoon and their Wild Relatives, 2012.

BOXUS,P.; TERZI,J.M.; Big losses due to bacterial contaminations can be avoided in mass propagation scheme. *Acta Horticulturae*, The Hague, v.212,p.91-93,1987.

BRAVO, A. Cultivo de la alcachofra: situacion actual y perspectivas. Santiago: *Corporacion de Fomento de la Producción Gerencia de Desarrollo/Facultad de Agronomia de la Pontificia Catolica de Chile,Chile, 1983. p. 17-31.*

BROWN, J. E.; RICE-EVANS, C. A. Luteolin rich artichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation in vitro. *Free Radic. Research*, v.29, p.247–255, 1998.

BRUTTI, C.; APÓSTOLO, N. M.; FERRAROTTI, S. A.; LLORENTE, B. E.; KRYMKIEWICZ, N. Micropropagation of *Cynara scolymus* L. employing cyclodextrins to promote rhizogenesis. *Scientia Horticulturae*, v. 83, p.1-10, 2000.

CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília:Embrapa – SPI/ Embrapa CNPH, 1998. p. 87-132.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa – SPI/ Embrapa – CNPH, 1998, p. 87-132.

CALVETE, E.O. Concentração de sacarose *in vitro* e seleção de substratos para aclimatização *ex vitro* de morangueiro Cv. Campinas (*Fragaria x ananassa* Duch.). 1998. Tese (Doutorado em Fitotecnia) Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998. 108p.

CALVETE, E.O.; KÄMPF, A.N.; DAUT, R. Efeito do substrato na aclimatização *ex vitro* de morangueiro, Cv. Campinas (*Fragaria x ananassa* Duch). In: KÄMPF, A.N.; FERMINO, M.H. (Ed.). *Substratos para plantas: a base da produção vegetal em recipientes*. Porto Alegre: *Gênese*, 2000. p. 257-264.

CAMARGO, L. S. *As hortaliças e seu cultivo*. 3. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1992. 252p.

CARON, B.O.; POMMER, S. F., SCHMIDT, D.; MANFRON, P.A MEDEIROS, S. L. Crescimento da alface em diferentes substratos. *Revista de Ciências Agro-veterinárias*, Lages, v.3, n.2, p. 97-104, 2004.

CASANOVA, C.F.; AUGUSTIN, L.; SUZIN, M. Viabilização do Processo de Micropropagação em *Cynara scolymus* L. In: MOSTRA

DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO, 12, 2002, Passo Fundo. *Resumos...* Passo Fundo, 2002. 1 CD ROM.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; MEDEIROS, C. A.; MOURA, B. Efeito do tratamento de sementes de milho com fungicida, na proteção de fungos do solo no Rio Grande do sul. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 4, p. 633–638, 1995.

CASSELLS, A.A; WALSH, C. Characteristics of *Dianthus* micro plants grown in agar and polyurethane foam using air-tight and water-permeable vessel. Lids in: REUTHER, G. (ed.) *Physiology and control of plant propagation in vitro*. Luxembourg, LU: CEC, 1994. p. 122-126.

CASTRO, L.O.; CHEMALE, V.M. Plantas medicinais, condimentares e aromáticas: Descrição e cultivo. Guaíba: *Agropecuária*, 1995. 195p.
CASTRO, J.L. *Medicina vegetal: teoria e prática conforme europatia*. 2. ed. Lisboa: Publicações Europa-América, 1981. 375p.

CECCARELLI, N.; CURADI, M.; PICCIARELLI, P.; MARTELLONI, L. SBRANA, C.; GIOVANNETTI, M. Globe artichoke as a functional food. *Mediterraneo Journal Nutritional Metabolismo*. (2010) 3:197–201.

CHAVES, A. Da C.; SCHUCH, M.W.; ERIG, A.C.; Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *physalis peruviana* L. *Ciência e Agrotecnologia*. Lavras, v.29,n.6,p.1281-1287,2005.

CHRISTIANSON, M.L.; WARNICK,D.A. Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis. *Developmental biology*. 1983. Elsevier V. 95, Issue 2, February 1983, Pages 288–293.

COINTRY, E. L.; LÓPEZ ANIDO, F. S.; GARCÍA, S. M.; FIRPO, I. T. Mejoramiento genético del alcaucil (*Cynara scolymus* L.). *Avances en Horticultura*. v.4, n.1, p. 51-60, 1999

COMIN, R.C. ; GIROTTO L. ; SUZIN, M. ; GRANDO, M.F.; AUGUSTIN, L.; DONIDA, B.; BAGGIO, M.I. . Ajuste de

metodologia para aclimatização de plântulas alcachofra micropropagadas *in vitro*. In: XVII MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO, 2007, Passo Fundo. XVI MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO. Passo Fundo: *Anais...* Editora UPF, 2007.

COTREL (Cooperativa Triticola de Erechim Ltda). Programa de cultivo da alcachofra. *Departamento Técnico*, av. Santo Dal Bosco, n.560, Erechim, RS, Brasil, 2005.

CRAVERO, V. P. *Evaluación de familias S1 de alcaucil (Cynara scolymus L.) y empleo de técnicas de análisis multivariado para caracterización y selección*. 2001. (Tese de Mestrado). Universidad Nacional de Rosario, 2001.

CRAVERO, V. P.; ANIDO, F. S. L.; COITRY, E. L. Caracterización y selección de familias S1 de *alcaucil* através de técnicas de análisis multivariado. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 4, p. 619-625, 2002.

CRÓCOMO, O.J. Plant biotechnology in the agriculture and development in Brazil. In: SIMPÓSIO ANUAL DA ACADEMIA DE CIÊNCIA DE SÃO PAULO, 11., 1986, São Paulo. *Anais....* São Paulo, 1986. p.53-71.

DEBERGH, P.C.; MAENE, L.J. A scheme for the commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, n.14, p.335-345, 1981.

DEBERGH, P. C.; READ, P. E. Micropropagation. In: ZIMMERMAM, R. H.; DEBERGH, P. C. *Micropropagation Technology and application*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht/ Boston/ London. 2000. p.484.

DE BOODT, M.; VERDONCK, O. The physical properties of the substrates in horticulturae. *Acta Horticulturae*, Wageningen, n. 26, p. 37-44, 1972.

DE LEO, P.; GRECO, B. New technique of artichoke propagation: *in vitro* culture of apical meristems Nuova tecnica di propagazione del carciofo: coltura *in vitro* di meristemi apicali, In: NEW STUDIES ABOUT ARTICHOKE (Nuovi studi sul carciofo), Minerva Medica Ed., Torino, Italy, 1976.

DONIDA, B. T. *Produção e qualidade de sementes da alcachofra*. 2004. (Tese de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Sementes), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 54p, 2004.

DRIDI, B., *An integrated system of micropropagation of artichoke Un système intégrée de micropropagation de l'artichaut (Cynara scolymus L.)*, PhD thesis, Faculty of Gent, Belgium, 2003.

ELIA, A., CONVERSA G., MONTERVINO C.; LOTTI C. Micropropagation o the Early Artichoke Cultivar 'Violet du Provence'. Proc. VI th IS on Artichoke, Cardoon and Their Wild Relatives Eds.: J.A. Fernández et al. *Acta Horticulturae*. 730, ISHS 2007.

ESCARTÍN HUERTO, J. *Perspectivas comerciales de la alcachofa en la U.E. Tudela – Navarra*. (ITGA ed.) p. 39 -53, 1996. (Boletim da Jornada Técnica de Alcachofra).

ESTRELA, C.; ESTRELA, C.R.A. BARBIN, E.L.; SPANÓ, J.C.O.; MARCHESAN, M.A.; PÉRCORA, J.D.; Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian Dental Journal*, Ribeirão Preto, v.13,n.2,p.113-117, 2002.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, OF THE UNITED NATIONS). *Italy Agricultural*, Roma, Italy, 2004-2005. FAO, 2011.

FERMINO, M.H.; BELLÉ, S. Substratos Hortícolas. In: PETRY, C. (Org.). *Plantas ornamentais: aspectos para produção*. Passo Fundo: Ed.Upf, 2000. 155p.

FILHO, W. P. D.; CAMARGO, A. M. M. P. D; CAMARGO, F. P. Mercado de Alcachofra no Estado de São Paulo e Viabilidade da

Produção Orgânica. *Informações Econômicas*, SP, v.39, n.4, p.70-75, 2009.

FILGUEIRA, F.A.R. *Novo Manual de olericultura: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*. Viçosa: Ed UFV, 1992.

FLORES, R.; MALDANER, J.; NICOLOSO, F.T. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. *Ciência Rural*. Santa Maria, v.36, n.3, p.845-851, 2007.

FONTENO, W.C. Growing media types and physical/chemical properties. In: REGD, D.W. (Ed.). *A growers guide to water, media and nutrition greenhouse crops*. Batavia: Ball, p. 93-122, 1996.

FOTI, S.; MAUROMICALE, G.; RACCUIA, S. A.; FALLICO, B.; FANELLA, F.; MACCARONE, E. Possible alternative utilization of *Cynara* spp. I. Biomass, grain yield and chemical composition of grain. *Ind. Crops Prod.*, v.10, p.219–228, 1999.

FOURY, C. Étude de la biologia florale de l' Artichaut (*Cynara scolymus* L.) Application a la selection. 1^o partie : Données sur la biologia florale. *Amélior. Plantes*, v.17, n.4, p. 357-373, 1967.

GAMBORG, O.L., MILLER, R., OJIMA, K., 1968. Nutrients requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50, p.150-158.

GARCIA, S. M.; COINTRY, E. L.; LÓPEZ ANIDO, F. S.; CRAVERO, V. P.; FIRPO, I. T.; *Artichoke situation in Argentina*, p. 195-200, 2005.

GARCIA, S. M. La producción hortícola en Argentina. *Horticultura Brasileira*, v.25, n.2, capa, abr/jun, 2007.

GARCIA, S.M. y COINTRY, E.L. - *Determinación de la fecha óptima de siembra en alcaucil Horticultura Argentina* 26(61): Jul.-Dic. 2007.

GEORGE, E. F. *Plant propagation by tissue culture, part 1 - The Technology*. 2. ed. Edington Limited, 1993. 786 p.

GEORGE, E.F. *Plant propagation by tissue culture; Part 2 in Practice*. 2.ed. Edington: Exejetics, 1996. 1361p.

GEBHARDT R,. Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of artichoke (*Cynara scolymus* L.) against hydroperoxide induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Toxicol Apply Pharmacology*, v.144, p.279–286, 1997.

GRANDO, M. F.; AUGUSTIN, L.; SUZIN, M.; CALVETE, E. O.; COMIN, R. C.; REOLON DA COSTA, A.; MORLIN, B.; DONIDA, B. Micropropagation of Globe Artichoke ‘Nobre-UPF’, a Brazilian Cultivar Used for Industrial Purpose. *Acta Horticulturae*, v.923, p. 147-154, 2011.

GIL ORTEGA, R. *Selección y mejora de la alcachofa*. Comunicaciones. Gobierno e Navarra, Instituto técnico y de Gestión agrícola, S.A. p.95-98, 1996. (Boletim da Jornada Técnica de Alcachofra, 1).

GLOBO RURAL REPORTAGENS. *Flores que Alimentam*.

Disponível em:

http://globorural.globo.com/barra.asp?d=/edic/182/rep_alcachofra.htm. Acesso em: 30 janeiro 2004.

GOMINHO, J.; FERNANDEZ, J.; PEREIRA, H. *Cynara cardunculus* L. a new fibre crop for pulp and paper production. *Ind Crops Prod*, v. 13, p.1–10, 2002.

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

GROLI, P. R. *Composto de lixo domiciliar urbano como condicionador de substratos para plantas arbóreas*. 1991. p.126. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Programa de Pós-Graduação

em Agronomia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1991.

GROLI, P. R. Propagação de Plantas Ornamentais. In: PETRY, C.(Org.). *Plantas ornamentais: aspectos para produção*, Passo Fundo: Ed. UPF, 2000, 155p.

GRUSZNSKI, C. *Resíduo agroindustrial “Casca de Tungue” como componente de substrato para plantas*. 2002. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002. 99p.

HANDRECH, K.A.; BLACK, N. *Growing media for ornamental plants and flowers*. Sydney: University of New South Wales Press, 1999.

HARBAOUI, Y.; DEBERGH, P. Application of culture *in vitro* pour l'amelioration des plants potageres. *Reun. Eucarpia*. Section Legumes : 1-7 Multiplication *in vitro* de clones sélectionées d'atichaut (*Cynara scolymus* L), Versailles, 1980.

HANG, G. *Análisis económico del alcaucil*. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, v.1, n.1, p4-14, 1993. (Boletín Horticola).

IAPICHINO, G., Micropropagation of Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.) from underground dormant buds (ovoli), *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 1996, 32, 249-252.

ISECHI, K.; PAIVA, L. C.; MALUF, W. Como plantar alcachofra. 1 ed. Lavras: UFLA/Departamento de Agricultura/Grupo de Estudos de Olericultura, 1998. (Boletim técnico de hortaliça, 11).Disponível em:<<http://www2.ufla.br/~wrmaluf/bth011/bth011.html>>. Acesso em: 31 julho, 2011.

KÄMPF, A. N. Produção comercial de plantas ornamentais. Guaíba. *Agropecuária*, 2000. 254 p.

KUCUKGERGIN, C.; AYDIN, F.; ERATA-OZDEMILER, G.; MEHMETICK, G.; KOÇAK, N.; UYSAL, M.. *Effect of Artichoke Leaf Extract on Hepatic and Cardiac. Oxidative Stress in Rats Fed on High Cholesterol Diet. Biol Trace Elem Res* (2010) 135:264–274.

KERBAUY, G.B.; Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas IN: TORRES, A.C. CALDAS, L.E.; BUSO, J.A. (Ed) *Cultura de Tecidos e Transformação genética de plantas. Brasília*. DF: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1998, v.2, p. 519-531.

LAFEPE medicamentos. *Alcachofra*. Disponível em: <<http://www.lafepe.pe.gov.br>>. Acesso em: 20 julho 2005.

LATTANZIO, V.; CICCIO, .; TERZANO, R.; RACCUIA, S. A.; MAUROMICALE; DI VENERE, D. Potenziale utilizzo di sottoprodotti derivanti dalla lavorazione industriale del carciofo [*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori]: antiossidanti di natura fenolica ed inulina. In: PROCEEDINGS OF THE 19 TH CONGRESS OF THE ITALIAN SOCIETY OF AGRICULTURAL (SICA). Reggio Calabria, 2001, p.15-28.

LAUZER, D.; VIETH, J. Micropropagation off seed derived plants of *Cynara scolymus* L., Cv. “*Green globe*”. *Plant Cel. Tissue end Organ Culture*, v.21, p.237-244, 1990.

LEIFERT, C.; CAMOTTA, H.; WAITTES, W.M. Effect of antibiotics on micropropagate plant cultures. *Plant Cell, Tissue and organ Culture*. Dordrecht, v.19,p.1530160. 1991.

MACCARONE, E.; FALLICO, B.; FANELLA, F.; MAUROMICALE, G.; RACUIA, S. A.; FOTI, S. Possible alternative utilization of *Cynara* spp. II. Chemical characterization of their grain oil. *Industrial Crops and Products*, EUA, v. 10, p. 229-237, 1999.

MANTOVANI, N. C. Estudo da regeneração *in vitro* de caixeta *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. Et Planch. 1997. 106p Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 1997.

MANTOVANI, Nilton, GRANDO, Magali Ferrari , SUZIN, Marilei , AUGUSTIN, Lizete, CALVETE Eunice Oliveira. *Livro Plantas Ornamentais: aspectos para a produção MICROPROPAGAÇÃO DE PLANTAS ORNAMENTAIS* (Petry, C. 2008 2a Ed.).

MARTINEZ, P. F. Manejo de substratos para horticultura. In: ENCONTRO NACIONAL DE SUBSTRATOS PARA PLANTAS, 2002. Campinas. Anais. Campinas: Instituto Agrônômico, 2002. p.53-76. (Documento IAC; 70).

MAURO, R.; PORTIS, E. E.; ACQUADRO, A.; LOMBARDO, S.; MAUROMICALE, G.; LANTERI, S. Genetic diversity of globe artichoke landraces from Sicilian sallow-holdings: implications for evolution en domestication. *Conservation. Genetic.*, v.10, p. 431- 440, 2009.

MAUROMICALE, G. Panorama varietale del carciofo e su prevedibile evoluzione. *L'Informatore Agrario*, Verona, n. 43, v. 4, p. 69-76, 1984.

MAUROMICALE, G. La coltivazione del carciofo in Sicilia. In: LA COLTIVAZIONE DEL CARCIOFO IN TOSCANA, 1., 1984, Venturina. Anais. Venturina: ETS, 1984. p. 35-69.

MAUROMICALE, G.; BASNIZKI, J.; CAVALLARO, V. Primi risultati sperimentali sulla propagazione del carciofo (*Cynara scolymus* L.) per seme. *Rivista di Agronomia*, Itália, n. 23, p. 417-423, 1989.

MAUROMICALE, G.; MORELLO, N.; SANTOIEEMMA, G.; IERNA, A. Speciale carciofo. Per aumentare il reddito: Nueve varietà per migliorare la cinaricoltura siciliana. *L'Informatore Agrario*, Verona, n.26, p. 47-51, 2000.

MAUROMICALE G; IERNA A. 2000. Characteristics of heads of seed-grown globe artichoke *Cynara scolymus* (L.) Fiori as affected by harvest period, sowing date and gibberellic acid. *Agronomic* 20:197-204.

MERCIER, H. & NIEVOLA, C.C. 2003. *Obtenção de bromélias in vitro como estratégia de preservação*. *Vidalia* 1: 57-62.

MEDEIROS, C. P. C. *Indução in vitro de respostas morfogênicas em explantes nodais de cajazeira (Spondias mombin L.)*. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2001.

MEIRI, L.; DULBERGER, R. Stamen Filament Structure in the Asteraceae: The Anther Collar. *New Phytologist*, Cambridge, v. 104,n. 4, p. 693-701, 1986.

MONTEMURRO, O.; CIANCI, D.; L'utilizzazione dei sottoprodotti delcarciofo nell'alimentazione del bestiame. In: MINERVA MEDIA (ED) PROCEEDING INTERNATIONAL CONGRESS ON ARTICHOKE, 2, 1976. Bari, 1974, p.22-24.

MONCOUSIN, C. Multiplication vegetative accelere et selection Bacterienne de *Cynara scolymus* L. In: CONGRESSO INTERNAZIONALE DI STUDI SUL CARCIOFO, 3, 1979. Bari, novembro, 1979, p. 219 - 229

MONTARROYOS, A.V.V.; *Contaminação in vitro*. ABCTP Notícias. Brasília, DF, n.36037, p.5-10, 2000.

MORAES, C. F. NIENOW, A. A. CALVETE, E. O. *Propagação por rebentos e germinação de sementes in vitro da alcachofra*. 2007. 158f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, 2007.

MORONE FORTUNATO, I., TAGARELLI, A. Micropropagazione di carciofo (*Cynara scolymus* L.) Cv. *Catanese*. Convegno su Colture *in vitro* e Micropropagazione in Ortoflorofruitticoltura. *Cesena*, v. 2, p. 111-113, 1989.

MORONE FORTUNATO, I., RUTA, C. Piantine micropropagate di carciofo precoce con inoculo di funghi micorrizici arbuscolari. *Italus Hortus*, v.10, p. 213-218, 2003.

MORONE FORTUNATO, I.; RUTA, C; CASTRIGNANÒ, A.; SACCARDO, F. The effect of mycorrhizal symbiosis on the development of micropropagated artichokes. *Scientia Horticulturae*, v. 106, p.472-483, 2005.

MORZADEC, J. M.; HOURMANT, A. *In vitro* rooting improvement of globe artichoke (Cv. Camus de Bretagne) by GA3. *Scientia Horticulturae*, v.72, p.59-62, 1997.

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.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology*, v.25, p.135-166, 1974.

MURAYAMA, S. Eng. Agr. diretor do colégio Agrícola de ITU, Estado de São Paulo – *Horticultura* – Inst. Campineiro de Ensino Agrícola – Campinas SP. In 5a parte – Hortaliças e frutos Alcachofra, 1972, pg. 675.

NORSTOG, K. Induction of embryo like structures by Kinetin cultured barley embryos. 1970. *Dev. Biol.* 23: 665-670.

OTTONI, W.C.; PICOLLE, E.A.T.; COSTA, M.G.C.; NOGUEIRA, F.T.S.; ZERBINI JUNIOR, F.M. Transgenic Tomato. In: SINGH, R.P.; PAWAN, K.J. (Ed.) *Plant Genetic Engineering*. Houston. Sci Teh Publishing LLC, 2003. v.5. p.41-131. 2003.

PAIVA, H. N.; GOMES, J. M. *Propagação vegetativa de espécies florestais*. Viçosa: UFV, 2001. 46p.

PASQUAL, M. *Textos acadêmicos: Meios de cultura*. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001, 127 p.

PECAUT, P.; DUMAS DE VAULX, R.; LOT, H. Virus – free clones of globe artichoke obtained after *in vitro* propagation. *Acta Horticulturae*. v.131, p. 303 – 309, 1983.

PECAUT P.; MARTIN, F. Non-conformity of *in vitro* propagated plants of early Mediterranean varieties of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Acta Horticulturae*. v.300, 1992, p. 363-366.

PELCZAR, M.J.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R.; *Microbiologia: Conceitos e aplicações*. São Paulo: Makron Books, 1996.v.1.p.210-224.

PEREZ-GARCIA, F.; ADZET, T.; CANIGUERAL, S. Activity of artichoke leaf extract on reactive oxygen species in human leukocytes. *Free Radic. Res.*, v.33, p.661–665, 2000.

PERES, L. E. P. Bases Fisiológicas e Genéticas da Regeneração de plantas. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília-DF, n.25, p. 44-48, 2002.

PIERIK, R.L.M. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Castelló/Madri: Ediciones Mundi-Prensa, 1990. 326p.

PORTIS E., ACQUADRO A., COMINO C., LANTERI S.; MAUROMICALE, G.; *Genetic structure of island populations of wild cardoon Cynara cardunculus L. var. sylvestris (Lamk) Fiori detected by AFLPs and SSRs*. 2005.

REOLON DA COSTA, A.; MORLIN, B.; SARTORI, G.; SUZIN, M.; AUGUSTIN, L.; DONIDA, B.; GRANDO, M.F.; CORRELATION Between characters of quality and productivity of artichoke for *in natura* consumption. *ISHS Acta Horticulturae*. 983: VIII INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ARTICHOKE, CARDOON AND THEIR WILD RELATIVES. 2011.

ROBLES, R.F. La alcachofra: nueva alternativa para la agricultura Peruana. Lima: *Prompex*, 2001. 42p.

ROSSI, V.; De PAOLI, G. Micropropagation of artichoke (*Cynara scolymus* L.). In: Bajay, Y. P. S., ed. *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol.19. High-tech and micropropagation III. Berlin: Springer-Verlag;1992:120-134.

RUTA, C. TAGARELLI, A.; CAMPANELLI, A.; DE MASTRO, G. MORONE-FORTUNATO, I.; Callogenesis capability of artichoke (*Cynara cardunculus* var. *Scolymus* L. Fiori). *ISHS Acta Horticulturae* 983: VIII International Symposium on Artichoke, Cardoon and their Wild Relatives. 2012

RYDER, E.J.; DE VOS, N.E.; BARI, M.A. The globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Horticulturae. Science*, Alexandria, v. 18, p. 646-653, 1983.

SALA, F.; CARPINTERO, C. *La alcachofra*. Madrid: Ministerio da Agricultura, 1967. 149p. (Manuales Técnicos, 40).

SCIUTTI, R.; MORINI S.; FORTUNA, P.; MULEO, R. Effect of different light-dark cycles on growth of fruit tree shoots cultured *in vitro*. *Advances in: Horticultural Science*, v.4, p.163-166, 1990.

SCARASCIAMUNNGOZZIA, G.T.; BOGYO, T.P. GURBJORNSSON, B.; BAGNARA, D.; Adaptation studies with radiation-induced durum wheat mutants In: *Induced mutation in plants*, Vienna, *International Atomic Energy Agency*, p. 699-717, 1969.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Biotecnologia: princípios e aplicações. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. *Biotecnologia na agricultura e na agroindústria*. Guaíba: Agropecuária, 2001. p.25-74.

SERGHINI M.A.; BOULLANI, R E.L., ELMOLISH,, A. El FINTI, A. E.I MOUSADIK, M.A. . Correlation between characters of quality

and productivity os artichoke for *in natura* consupcion. *ISHS Acta Horticulturae* 983: VIII INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ARTICHOKE. CARDOON AND THEIR WILD RELATIVES, 2012.

SCHNEIDER, F. (2005) *Effect of different cultural conditions on micropropagation of rose (Rosa sp. L.) and globe artichoke (Cynara scolymus L.)*. Thèse (doctorat), Université Technique de Munich. 145p.

SIMS, W. L.; SCIARONI, R. H.; LANGE, W. H. Growing Globe Artichokes in California. University of California, *Agricultural Extension Service*. AXT – 52 Rev., 1968.

SILVA JÚNIOR A A.; VISCONTI A. 1991. Recipientes e substratos para a produção de mudas de tomate. *Agropecuária Catarinense* v.4,p.20-23.

SKOOG, F. & MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11:118-231, 1957.

SUZIN, M.; GIROTTO, L.; GRANDO, M. F.; CALVETE, E. O.; DONIDA, B. T.; AUGUSTIN, L.; BAGGIO, M. I.; 2008. *Estabelecimento in vitro de explantes de cultivar brasileira de alcachofra*. In: Congresso Brasileiro de Olericultura, 48. Resumos...Maringá: ABH. p. S2973-2978(CD-ROM):Disponível em www.abhorticultura.com.br/

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant physiology*. 2. ed. Sunderland, MA: Sinauer associates, 1998. 792 p.

TAVAZZA, R., PAPACCHIOLI, V. and ANCORA, G. 2004. An improved medium for *in vitro* propagation of globe artichoke (*cynara scolymus l.*) Cv. *Acta horticulturae*. (ISHS) 660:91-97.

TAVEIRA, J. A. *Substratos: cuidados na escolha do tipo mais adequado*. (Boletim Ibraflor, Informativo n.13, Dezembro, 1996).

Disponível em: <http://www.unb/flower/substratos.htm>>. Acesso em: 30.01.2010.

TEIXEIRA, H.; MACHADO, J. C.; VIEIRA, M. G. G. C. Influência de *Colletotrichum gossypii* South. no desenvolvimento inicial do algodão (*Gossypium hirsutum* L.) em função da localização do inóculo e desinfestação das sementes. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v. 19, n. 1, p. 9-13, 1997.

TEIXEIRA, S. L.; RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, M. T. Utilização do hipoclorito de sódio na esterilização de meio de cultura para a multiplicação *in vitro* *Eucalliptus pellita* L. *Ciência florestal*, Santa Maria, v. 12, n. 2, p.185 – 191, 2008.

THORPE, T. A. Organogenesis in vitro: structural, physiological, and biochemical aspects. In: VASIL, I. K. *Perspectives in plant cell and tissue culture*. New York: Academic Press, 1980. p. 71-111.

TORRES, A.C., TEIXEIRA, S.L., POZZER, L. *Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus*. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A . (Ed.) *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, v. 1, 1998, p.183-242.

TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*, 2010, 583p.

VERDONCK, O.; VLEESCHAUWER, D.; DE BOODT, M. The influence of the substrate to plant growth. *Acta Horticulturae*, Wageningen, v. 126, p. 251-258, 1981.

WANG, Y.T.; GREGG, L.L. Medium and fertilizer affect the performance of Phalaenopsis during two flowering cycles. *Horticulturae Science*, Calcutta, v. 29, n. 4, p. 269-270, 1994.

WENDLING, I.; GATTO, A.; PAIVA, H.N. *Substratos, adubação e irrigação na produção de mudas*. Viçosa: Aprenda Fácil Editora, 2002. 166p.

WERNICKE, W.; BRETTELL, R. I. S. *Morphogenesis from cultured leaf tissue of Sorghum bicolor (L.) culture initiation*. Protoplasma, New York, v. 111, p. 19-27, 1982.

ZIV, M. Vitrification morphological and physiological disorders of *in vitro* plants In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R.H.; (Ed.) *Micropropagation technology and application*. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991.p.45-69.