

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAFAELA CRISTINA BRUNETTI MACHADO

MICROPROPAGAÇÃO E ORGANOGÊNESE DE LÚPULO VAR. CHINOOK

CURITIBA

2018

RAFAELA CRISTINA BRUNETTI MACHADO

MICROPROPAGAÇÃO E ORGANOGÊNESE DE LÚPULO VAR. CHINOOK

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Cícero Deschamps
Co-orientadora: Dra. Marília Pereira Machado

CURITIBA

2018

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Machado, Rafaela Cristina Brunetti

Micropropagação e organogênese de lúpulo var. Chinook/
Rafaela Cristina Brunetti Machado. – Curitiba, 2018.

1 recurso online: PDF.

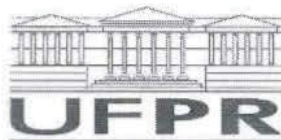
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor
de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia
(Produção Vegetal).

Orientador: Prof. Dr. Cícero Deschamps

Coorientadora: Dr^a Marília Pereira Machado

1. Mudanças - Produção. 2. Angiosperma. 3. Plantas - Reguladores.
4. Organogênese. I. Deschamps, Cícero. II. Machado. Marília Pereira.
III. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em
Agronomia (Produção Vegetal). IV. Título.

Bibliotecária: Telma Terezinha Stresser de Assis CRB-9/944



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA
(PRODUÇÃO VEGETAL)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **RAFAELA CRISTINA BRUNETTI MACHADO** intitulada: **MICROPROPAGAÇÃO E ORGANOGÊNESE DE LÚPULO VAR. CHINOOK**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

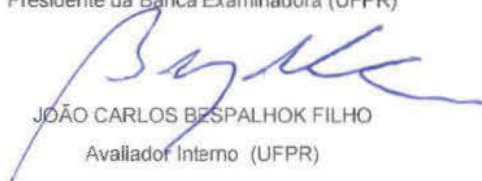
A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 02 de Abril de 2018.



CICERO DESCHAMPS

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



JOÃO CARLOS BESPALHOK FILHO
Avaliador Interno (UFPR)



JULIANA DEGENHARDT-GOLDBACH
Avaliador Externo (EMBRAPA)



BRUNO PORTELA BRASILEIRO
Avaliador Externo (UFPR)

Dedico esse trabalho aos meus
pais, Claudia e Luís Antônio e aos colegas
e amigos que fiz no programa de
Pós-Graduação com ênfase em Produção
Vegetal da UFPR.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cícero Deschamps, e à minha co-orientadora, Dr. Marília Pereira Machado, pelos ensinamentos, acompanhamento e orientação.

Aos técnicos dos laboratórios, Carlos Eduardo Piemonte Maduro, Cléia Maria Branco da Cunha, Maria Emília Kudla, Roger Raupp Cipriano, por todo auxílio e prontidão, vocês foram essenciais!

Às “tias da limpeza” que sempre estavam alegrando, mudando alguns dias estressantes com piadinhas e deixando o ambiente de trabalho sempre limpo para a realização das tarefas necessárias.

Aos professores, Átila Francisco Mógor, Cícero Deschamps, Diego Meloni, João Carlos Bespalhok Filho, Katia Zuffellato, Luiz Antônio Biasi, por lecionarem aulas incríveis, as quais aumentaram a vontade de aprender e buscar conhecimentos, pela dedicação e auxílio oferecidos.

Aos meus colegas de laboratório de Ecofisiologia e Micropropagação de Plantas, Cíntia Fagundes, Erik Nunes, Jéssica Tomasi, Juliana Matussi, Juliane Borella, Leandro Marcolino, Maíra Tomazzoli, Renata e Angelo, pela amizade, força, auxílio, “chimas” e muitas risadas!

Aos meus pais, Claudia Quadros Brunetti Machado e Luís Antônio Machado, pelo cuidado, pelo respaldo, pelas conversas, entre muitas outras coisas.

“Toda ação gera uma força energética que retorna a nós da mesma forma. O que semeamos é o que colhemos.”

(CHOPRA, Deepak, 1994)

RESUMO

Humulus lupulus L., popularmente conhecido como lúpulo, é uma espécie perene, dióica, trepadeira, pertencente à família Cannabaceae. De interesse econômico mundial, utilizado principalmente pela indústria cervejeira, a qual demanda a produção em larga escala. Existe necessidade de pesquisa para otimização do processo de obtenção de mudas saudáveis e de qualidade. O desenvolvimento de técnicas de micropropagação e organogênese para variedade Chinook, a qual demonstra potencial para cultivo no sul Brasil em resultados preliminares, a fim de gerar protocolos é o objetivo deste trabalho. A variedade Chinook foi estabelecida, com o desenvolvimento de uma assepsia específica, e multiplicada *in vitro*. Foram avaliados os efeitos do cultivo de explantes contendo um e dois pares de folhas em meio MS semi-sólido suplementado de citocininas (BAP e CIN) e em meio MS sob diferentes fontes luminosas (luz fluorescente branca fria e luz LED Green Power) quanto ao número de folhas geradas. Também foi avaliado o rendimento (massa final-massa inicial) dos explantes com dois pares de folhas sob imersão temporária em biorreator. Na aclimatização, microestacas de 2,5 cm providas de lúpulo var. Chinook micropropagado foram inseridas em tubetes com dois tipos de fertilizantes (fertilizante de liberação lenta Basacote Mini 6M e NPK – uréia, superfosfato simples e cloreto de potássio) misturados em substrato Tropstrato. Os experimentos de organogênese se deram a partir de diferentes tipos de explantes (folha, segmento internodal e segmento de raiz) em meio de cultura MS semi-sólido com diferentes reguladores vegetais (TDZ, BAP, IAA e BAP+IAA). A porcentagem de formação de calos, o diâmetro dos calos formados, a porcentagem de brotação e de enraizamento foram analisados. Os resultados da multiplicação que geraram quantidade superior de folhas formadas com alongamento de calule foram observados com explantes de dois pares de folhas sob luz LED Green Power. A concentração das citocininas utilizadas (0,1 mg/L) não auxiliou na multiplicação *in vitro* de lúpulo. A imersão do meio de cultura 4 vezes ao dia no biorreator de imersão temporária apresentou maior média de rendimento de massa. A maior porcentagem de brotações formadas, representando a regeneração da cultura de calos foi a partir do explante segmento internodal em interação com o regulador vegetal TDZ. A aclimatização com a utilização de NPK gerou resultados superiores para a parte aérea. Os protocolos de cultivo *in vitro* e, com isso, o começo da formação de um banco de germoplasma de lúpulo no Setor de Ciências Agrárias da UFPR são importantes, pois além da obtenção de mudas e melhoria no cultivo, auxiliará em projetos futuros.

Palavras-chave: *Humulus lupulus* L. Produção de mudas. Biorreator. Reguladores vegetais. Regeneração.

ABSTRACT

Humulus lupulus L., popularly known as hop, is a perennial, dioecious, climbing species, belonging to the Cannabaceae family. Of global economic interest, mainly used by the brewing industry, this demands large-scale production. There is a necessity for research to optimize the process of obtaining healthy and quality seedlings. The development of micropropagation and organogenesis techniques for Chinook variety, which shows potential for cultivation in southern Brazil in preliminary results, to generate protocols is the objective of this work. The Chinook variety was established, with the development of a specific asepsis, and multiplied *in vitro*. The explants containing one and two pairs of leaves culture in MS medium supplemented with cytokinins (BAP and CIN) and in MS medium under different light sources (cold white fluorescent light and LED Green Power light) effects were evaluated for number of leaves generated. The yield (final mass-initial mass) of the explants with two pairs of leaves under temporary immersion in bioreactor was also evaluated. In acclimatization, 2.5 cm microcuttings from micropropagated hop var. Chinook were inserted in tubes with two types of fertilizers (slow release fertilizer Basacote Mini 6M and NPK - urea, single superphosphate and potassium chloride) mixed in Tropstrato substrate. The organogenesis experiments started from different types of explants (leaf, internodal segment and root segment) in semi-solid MS culture medium with different plant regulators (TDZ, BAP, IAA and BAP + IAA). The percentage of callus formation, the diameter of the calli formed, the percentage of sprouting and rooting were analyzed. The results of the multiplication that generated superior amount of leaves formed with elongation were observed with explants of two pairs of leaves under LED Green Power light. The concentration of the cytokinins used (0.1 mg / L) did not aid in *in vitro* multiplication of hop. Immersion of culture medium 4 times daily in the temporary immersion bioreactor had the highest mass yield. The highest percentage of buds formed, representing the regeneration of callus culture was from the internodal segment explant with TDZ. The acclimatization with the use of NPK generated superior results for the aerial part. The *in vitro* cultivation protocols and, with this, the beginning of hop germplasm bank formation in the Sector of Agricultural Sciences of the UFPR are important, therefore besides obtaining seedlings and improvement in the crop, will aid in future projects.

Key-words: *Humulus lupulus* L. Seedling production. Bioreactor. Plant regulators. Regeneration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Inflorescências de lúpulo	23
Figura 2. Gema apical e lateral de lúpulo var. Chinook <i>in vitro</i> , após passarem pela assepsia de hipoclorito de sódio 10% (A2)	54
Figura 3. Plantas micropropagadas 15 dias após a instalação do experimento de aclimatização de lúpulo var. Chinook	60
Figura 4. Coloração de calos de lúpulo var. Chinook formados.....	76
Figura 5. Porcentagem de formação de calos de lúpulo var. Chinook.....	77
Figura 6. Formação e diâmetros de calos provenientes de diferentes tipos de explantes de lúpulo var. Chinook	78
Figura 7. Brotação formada a partir de calos de lúpulo var. Chinook (segmento internodal, TDZ).....	80

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Variedades de lúpulo, porcentagem de α e β – ácidos (%) e óleo essencial	25
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.

Taxa de sobrevivência de explantes de lúpulo var. Chinook em diferentes tipos de assepsia introdução *in vitro* 54

Tabela 2. Médias de número de folhas geradas na multiplicação *in vitro* lúpulo var. Chinook com o fator tipos de citocinina 55

Tabela 3. Médias de número de folhas geradas na multiplicação *in vitro* lúpulo var. Chinook com o fator número de pares de folhas no explante 56

Tabela 4. Médias de número de raízes geradas na multiplicação *in vitro* lúpulo var. Chinook com o fator tipos de citocinina 56

Tabela 5. Médias de número de folhas geradas na multiplicação *in vitro* lúpulo var. Chinook com diferentes fontes luminosas 57

Tabela 6. Rendimento da diferença de massa final para massa inicial na multiplicação *in vitro* lúpulo var. Chinook em biorreator de imersão temporária 59

Tabela 7. Taxa de sobrevivência (%) de estacas de lúpulo var. Chinook com fertilizantes 60

Tabela 8. Análises de comprimento (cm), volume (cm³), massa seca (g) e número de raízes principais formadas em estacas de lúpulo var. Chinook com fertilizantes 61

Tabela 9. Análises de altura de parte aérea (cm), número de folhas, área foliar (cm²), massa seca de folhas (g) e em estacas de lúpulo var. Chinook com fertilizantes 63

Tabela 10. Diâmetros de calos (cm) formados de lúpulo var. Chinook a partir de diferentes reguladores vegetais e tipos de explantes 79

Tabela 11. Porcentagem de formação de brotações (%) provenientes de calos de lúpulo var. Chinook a partir de diferentes reguladores vegetais e tipos de explantes 80

Tabela 12. Porcentagem de formação de raiz (%) provenientes de calos de lúpulo var. Chinook a partir de diferentes reguladores vegetais e tipos de explantes 82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	- Microgramas
µL	- Microlitros
µm	- Micrômetro
µM	- Micromolar
°C	- Graus Celsius
AF	- Área Foliar
atm	- Atmosfera
BA	- Benziladenina
BAP	- 6 - benzilaminopurina
BG	- Breews Gold (variedade de lúpulo)
Br	- Clone Bragança (clone de lúpulo espontâneo)
CIN	- Cinetina
cm	- Centímetro
cm ²	- Centímetro quadrado
dm ³	- Decímetro cúbico
EMBRAPA	- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FLL	- Fertilizante de Liberação Lenta
g	- Gramas
h	- Horas
IAA	- Ácido indol-3-acético
Int.	- Interação
K	- Potássio
L	- Litros
LED	- Light Emitting Diode
m	- Metros
m ²	- Metro quadrado
M	- Molar
mg	- Miligramas
min	- Minutos
mL	- Mililitros
mM	- Milimolar

MS	- Meio de cultura Murashige & Skoog (1962)
N	- Nitrogênio
NPK	- Nitrogênio, Fósforo e Potássio
P	- Fósforo
s	- Segundos
TDZ	- Thidiazuron (N-fenil-N"-1,2,3-thiadiazol-5-feniluréia)
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
USDA	- Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (traduzido)
var.	- Variedade

SUMÁRIO

1.1	INTRODUÇÃO	20
1.2	REVISÃO DE LITERATURA	22
1.2.1	LÚPULO	22
1.2.2.1	Micropropagação	26
1.2.2.2	Biorreator	28
1.2.2.3	Organogênese	28
2	MICROPROPAGAÇÃO DE LÚPULO VAR. CHINOOK	42
2.2	INTRODUÇÃO	45
2.3	MATERIAL E MÉTODOS	47
2.3.1	LOCALIZAÇÃO E MATERIAL VEGETAL	47
2.3.2	ASSEPSIA E ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i>	47
2.3.3	MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i>	48
2.3.4	ACLIMATIZAÇÃO	48
2.3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
2.4.1	ASSEPSIA E INTRODUÇÃO <i>IN VITRO</i>	53
2.4.2	MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i>	54
2.4.3	ACLIMATIZAÇÃO	54
2.5	CONCLUSÃO	65
2.6	ORGANOGRAMA DO PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO DE LÚPULO VAR. CHINOOK	65
2.7	REFERÊNCIAS	67
3	ORGANOGENESE DE LÚPULO VAR. CHINOOK	71
3.2	INTRODUÇÃO	73
3.3	MATERIAL E MÉTODOS	74
3.3.1	LOCALIZAÇÃO E MATERIAL VEGETAL	74
3.3.2	INDUÇÃO A FORMAÇÃO DE CALOS <i>IN VITRO</i>	74
3.3.3	PROLIFERAÇÃO E REGENERAÇÃO DE CALOS <i>IN VITRO</i>	74
3.3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	75
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
3.4.1	INDUÇÃO A FORMAÇÃO DE CALOS <i>IN VITRO</i>	74

3.4.2	PROLIFERAÇÃO DE CALOS <i>IN VITRO</i>	74
3.4.3	REGENERAÇÃO DE CALOS <i>IN VITRO</i>	74
3.5	CONCLUSÃO	83
3.6	ORGANOGRAMA DO PROTOCOLO DE ORGANOGÊNESE DE LÚPULO VAR. CHINOOK	84
3.7	REFERÊNCIAS	85
	ANEXO 1 – PARA 1 LITRO DE MEIO DE CULTURA MS	89
	ANEXO 2 – TABELAS DE ANÁLISES DE VARIÂNCIA	90
	ANEXO 3 – FORMULAÇÃO DO FERTILIZANTE DE LIBERAÇÃO LENTA BASACOTE	92

1.1 INTRODUÇÃO

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.), descrito pelo sueco Carlos Lineu em *Species plantarum*, é uma trepadeira herbácea perene, dióica e diplóide ($2n=20$), da família Cannabaceae.

De origem europeia, a produção de lúpulo concentra-se nas regiões temperadas e tem crescimento espontâneo no hemisfério Norte acima de 32° até 55° de latitude (BEER & HEALTH DOSSIERS, 2001), como Estados Unidos, Europa Central e China (SCHONBERGER et al., 2014).

O interesse econômico do lúpulo se dá pelas flores femininas por possuírem glândulas de lupulina, onde pode armazenar grandes quantidades de resinas e óleos essenciais (FARAG; WESSJOHANNM, 2012). A qualidade do lúpulo provém dessas substâncias armazenadas (KRALJ; HAUNOLD, 1991), responsáveis pelas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e, principalmente, organolépticas, exploradas na indústria cervejeira por conferir sabor e aroma às cervejas (LEITE, 2009).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de cervejas e fabricou 14,1 bilhões de litros de cerveja em 2016, segundo a Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (CERVBRASIL, 2017). A diferença para os maiores produtores de cerveja, China e Estados Unidos, é que o Brasil ainda não possui cultivo comercial de lúpulo e o importa em sua totalidade para fabricação de cerveja.

Resultados preliminares e ainda não publicados indicam que para início do cultivo comercial brasileiro de lúpulo a variedade Chinook tem se demonstrado com maior potencial. A obtenção de mudas sadias no Brasil, tendo em vista a dificuldade por não ser uma espécie nativa, pode ser feita a partir da micropropagação, já que a macropropagação não é viável quando não se tem disponibilidade de muitas plantas iniciais.

Projetos para a produção de lúpulo a nível comercial no Brasil estão sendo criados e para isso será necessária a otimização da produção de mudas. O uso da micropropagação, além de ser viável, tem a redução das variáveis tempo e espaço necessários e possibilita uma melhor escolha do material vegetal para início do cultivo. A criação de uma biofábrica de lúpulo, em paralelo, é um alicerce para a obtenção de mudas, conservação ou melhoria genética.

Os primeiros trabalhos de propagação *in vitro* de lúpulo foram desenvolvidos na década de 70, século XX, em locais onde a espécie vegetal é espontânea, com objetivos de obtenção e multiplicação de plantas livres de vírus e combate a patógenos (VINE; JONES, 1969; ADAMS, 1975). Os trabalhos demonstraram que há viabilidade na micropropagação *in vitro* do lúpulo a partir de explantes nodais, extremidades apicais (ROY et al., 2001; SMÝKALOVÁ et al., 2001), meristemas (ADAMS, 1975) e pontas do rebento ou folhas (FARAGÓ et al., 1996; PEREDO et al., 2006). Roy et al. (2001) tiveram respostas positivas sob efeito de reguladores de crescimento em uma cultivar de lúpulo, denominada H138, micropropagada em meio MS.

A utilização do biorreator de imersão temporária é outra opção para a produção em larga escala, podendo acelerar e otimizar o processo de cultivo *in vitro*. Os benefícios da micropropagação aliados à diminuição das suas dificuldades, como necessidade de realizar trocas de meio de cultura periodicamente, tornaria esta técnica mais simples e menos dispendiosa (LORENZO et al., 1998; PENCHEL et al., 2007). O sistema de biorreatores é eficiente na automatização e na aplicação de tecnologias em escala comercial na cultura de tecidos (PENCHEL et al., 2007).

A realização da organogênese para a variedade Chinook de lúpulo é necessária visando a possibilidade de realizar futuramente melhoramento genético vegetal. A eficiência do uso da transformação de calos depende primeiramente da regeneração dos mesmos, demonstrando a importância da criação de um protocolo específico para variedade. A regeneração de calos já foi relatada para outras variedades de lúpulo, como para as variedades Shinshawase e Italy-2 por Motegi (1976) e Nugget e Brewers Gold por Gurriarán et al. (1999).

O desenvolvimento de técnicas de micropropagação para lúpulo (*Humulus lupulus* L.) da variedade Chinook, a fim de gerar protocolos para a micropropagação e a organogênese, é o objetivo deste trabalho.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 LÚPULO

O gênero *Humulus*, pertencente à família Cannabaceae, era constituinte da ordem Urticales, porém foi incorporado à ordem Rosales em 2003 (BREMER et al., 2003) e tem como uma das espécies *Humulus lupulus* Linneus (SMALL, 1978). Segundo Neve (1991), o gênero *Humulus* é originário da China, pois foi onde todas as espécies foram encontradas.

Popularmente conhecido como lúpulo, *Humulus lupulus* L. é uma espécie que foi domesticada no centro da Europa e disseminada através de sementes para regiões temperadas (CHADWICK et al., 2006). A distribuição e exploração do cultivo de lúpulo ocorrem na África do Sul, Nova Zelândia e Austrália (CONNELL; HEALE, 1986), sendo espontâneo no hemisfério Norte nos Estados Unidos, Europa Central e China (BEER & HEALTH DOSSIERS, 2001).

O lúpulo é uma espécie herbácea perene, diploide ($2n=20$) e normalmente dioica (HEALE et al., 1989), com cromossomos sexuais heteromórficos (XX em plantas femininas e XY em plantas masculinas) em plantas cultivadas (DANILOVA; KARLOV, 2006). Embora tenham sido encontradas plantas monoicas em algumas populações selvagens de lúpulo norte-americano (HAUNOLD et al., 1993), a predominância dioica faz com que ocorra diferença na morfologia das flores das plantas masculinas e das plantas femininas. As inflorescências surgem na parte axilar das folhas, sendo as masculinas (Figura 1a) racemos de 7-14 cm de comprimento. Já as inflorescências femininas (Figura 1b), de importância comercial, são estróbilos com forma bojuda arredondada, como cones, de 2,5 – 6 cm de comprimento. Os estróbilos são constituídos por brácteas externas e internas, onde podem ser encontrados tricomas glandulares amarelos inseridos em zig-zag (BENITEZ et al., 2001). Os tricomas glandulares secretam uma substância denominada lupulina (RYBÁČEK, 1980), composta majoritariamente por α e β -ácidos (HILLER et al., 1996).

Figura 1 – a) Inflorescências masculinas de lúpulo, fazenda Canguiri em Pinhais - PR. b) Inflorescências femininas de lúpulo var. Chinook, Rio Grande do Sul - RS.



Fonte: a) Marília Machado (2018). b) A autora (2017).

No início da primavera produz novos brotos a cada ano a partir de rizomas subterrâneos (KRISTIN, 1987). O lúpulo é uma espécie de dia curto que inicia a floração quando atinge uma altura crítica de aproximadamente seis metros e cerca de 20 a 24 nós. Também é dependente de um fotoperíodo de 16 horas e, para que o crescimento vegetativo vertical cesse e inicie o desenvolvimento lateral dos meristemas florais, com a necessidade de um fotoperíodo de oito a dez horas (VILLACORTA et al., 2008). No inverno ocorre a senescência da parte aérea do lúpulo, o qual se reduz a rizoma dotado de gemas e raízes, podendo atingir 8 metros de profundidade (HILLER et al., 1996).

É uma planta trepadeira, com estruturas de fixação, que cresce rapidamente em torno de um suporte, enrolando-se no sentido destrógiro e em tempo inferior a cinco meses pode atingir cerca de nove metros de altura (HEALE et al., 1989). De acordo com Langer e Hill (1982), o lúpulo se desenvolve espontaneamente principalmente próximo a locais úmidos e o pH do solo ideal é neutro, entre seis e sete, com profundidade elevada, tendo em vista o crescimento de rizomas e raízes, leve e drenado. Como o lúpulo apresenta grande perda de água por transpiração, o solo deve apresentar grande disponibilidade de água (BEER & HEALTH DOSSIERS, 2001) e ser rico em matéria orgânica.

Além da necessidade de um número elevado de horas de sol e temperaturas altas no verão, a constância desses fenômenos é importante para o desenvolvimento do lúpulo. No mínimo devem ocorrer 120 dias com temperaturas altas e fotoperíodo próximo ao ideal (16 horas) e temperaturas baixas no inverno, para ocorrer o florescimento (HILTON, 2002).

O cultivo do lúpulo foi iniciado na Alemanha, no século IX, a partir de plantas selvagens coletadas (WILSON, 1975). Os lúpulos foram selecionados e propagados pelo crescente aumento do interesse no melhoramento e obtenção de novas plantas. O cultivo de algumas variedades se estende até a atualidade, como a variedade Hallertauer, explorada na Alemanha (MOIR, 2000; STAJNER et al., 2008).

No primeiro ano de plantio o lúpulo tem crescimento reduzido e atinge o melhor potencial de crescimento ao final de três anos (SOUSA, 2005), podendo manter plena produtividade por mais de 50 anos em solos com boa fertilidade (KNEEN, 2003). As formas mais comuns de plantio de lúpulo, nos locais onde existe plantação comercial, são por muda e por rizoma (PERAGINE, 2011) e a utilização de sistemas de suporte para a planta, como sistemas de treliças, é indicada, tendo em vista que atinge cerca de nove metros de altura (FISHER; FISHER, 1998).

A colheita pode ser manual ou mecanizada e tem início geralmente no verão. No primeiro ano após o plantio geralmente não há colheita, no segundo ano a colheita atinge produção de 50 a 65% da capacidade de colheita e no terceiro ano pode ser produzido 65 a 100% da capacidade de colheita (MARCOS et al., 2011). Após a colheita, os cones devem ser secados e beneficiados para a comercialização (FISHER; FISHER, 1998). Os produtos da colheita de lúpulo podem ser comercializados em flores prensadas, pó, extrato e pellets (ALVES, 2014).

A maior parte da produção mundial é utilizada pela indústria cervejeira e os maiores produtores de lúpulo em 2016 foram Alemanha (42.766.000 kg), Estados Unidos (40.206.000 kg) e China (4.500.000 kg) (INTERNATIONAL HOP GROWERS' CONVENTION, 2017). Porém, o lúpulo também apresenta diversas outras finalidades, como a utilização para fins medicinais. Também é utilizado como alimento, espécie ornamental, como aromatizante, bem como tem espaço nas indústrias cosmética e têxtil. Segundo Carvalho (2005), apresenta fins diuréticos e auxilia na digestão por meio de infusões, também podendo ser aplicado na forma de chás contra insônia, no tratamento de doenças que acometem o tubo digestivo e o fígado.

A quantidade de resinas e óleo essencial armazenados nas glândulas de lupulinas é responsável pelas propriedades medicinais e é diretamente ligada ao valor comercial do lúpulo (FARAG; WESSJOHAN, 2012). A resina tem como composição os α -ácidos e β -ácidos, os quais proporcionam o amargor na cerveja (CANBAS et al., 2001). Já o óleo essencial é responsável pelo componente aromático que confere à cerveja aroma típico (RODRIGUES et al., 2015).

O grande número de variedades de *Humulus lupulus* L. é geralmente dividido em dois grupos: alfa ou lúpulo de amargor, os quais possuem alto teor de α -ácidos, e lúpulo aromático, que possuem teor muito menor de α -ácidos (FARAGO et al., 2009). A comparação de algumas variedades de lúpulo podem ser observadas no Quadro 1:

Quadro 1. Variedades de lúpulo, porcentagem de α e β -ácidos (%) e óleo essencial (mL/100g).

VARIETADE	α -ÁCIDOS	β -ÁCIDOS	ÓLEO ESSENCIAL
Aurora	7 – 13	2,7 – 4,4	0,9 – 1,6
Cascade	5,5 – 9	6 – 7,5	0,8 – 2,5
Centennial	7 – 12	3,5 – 5,5	1 – 3
Chinook	11,5 – 15	3 – 4	1 – 2,5
Columbus	14,5 – 17,5	4,5 – 6	2,5 – 4,5
Mount Hood	4 – 6,5	4,4 – 7,2	0,8 – 2
Nugget	11,5 – 14	3 – 5	0,9 – 1,3

Fonte: Adaptado de YCHHOPS (2017).

A variedade Chinook foi desenvolvida pelo programa de melhoramento da USDA no Estado de Washington e lançada em 1985 como uma variedade de alto teor de alfa-ácidos e amargor. Ela provém do cruzamento da variedade Petham Golding fêmea com um lúpulo macho da USDA. Recentemente, foi encontrada dupla utilidade para variedade Chinook, além do amargor, também pode ser utilizada para aroma por apresentar aroma de especiarias, pinho e toranja (YCHHOPS, 2017). Essa variedade demonstrou bons resultados preliminares, ainda não publicados, e possibilidade para cultivo em larga escala nas condições do sul do Brasil, visando a utilização pela indústria cervejeira que possui alta demanda.

1.2.2.1 Micropropagação

O cultivo asséptico de órgãos, tecidos ou células em meio de cultura adequado, com condições controladas de luminosidade, temperatura, entre outros, para a multiplicação de plantas *in vitro* é denominado cultura de tecidos. A partir da cultura de tecidos vegetais pode ser realizada a micropropagação de plantas, que é um método baseado na totipotência de células indiferenciadas, geralmente meristemáticas, que podem vir a gerar um vegetal inteiro (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; GEORGE, 2008).

A temperatura, o fotoperíodo, a umidade relativa do ar, a intensidade luminosa a qual o material é exposto, meio de cultura utilizado, concentração de fitorreguladores e adição ao meio de cultura, assepsia realizada e habilidade do operador são fatores que podem influenciar na realização da técnica de micropropagação, sendo necessário um estudo prévio para melhor adequação e sucesso (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; GEORGE, 2008; LEITZKE et al., 2010).

Os meios de cultura têm como função suprir as necessidades nutricionais das plantas para possibilitar seu crescimento e desenvolvimento. Um meio de cultura pode ser composto basicamente por macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, fontes de carbono e nitrogênio, reguladores de crescimento e agentes gelificantes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Os reguladores vegetais podem ou não serem acrescidos ao meio de cultura. Auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico são as classificações de reguladores vegetais utilizadas, os quais têm ações diferentes em diferentes partes da planta e em diferentes períodos de desenvolvimento. A adição dos mesmos visa suprir deficiências endógenas ou balancear concentrações endógenas de hormônios vegetais nos explantes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Os reguladores mais utilizados para cultura de tecidos são as classes auxinas e citocininas, pois a morfogênese é regulada pela interação ou concentrações dos mesmos.

No balanço auxina – citocinina, quando a concentração de auxina é aumentada, geralmente ocorre a emissão de raízes. Na contramão, quando se aumenta a concentração de citocinina, a formação de gemas adventícias é o que geralmente ocorre (SKOOG; MILLER, 1957).

Após ser realizada a micropropagação, é necessário um processo de adaptação denominado aclimatização. As plantas devem possuir sistema radicular ou ter passado por tratamento com fitorreguladores para serem transferidas para um substrato estéril. O ambiente onde as plantas *ex vitro* serão alocadas deve apresentar umidade e receber pouca iluminação inicialmente (QUISEN; ANGELO, 2008).

As técnicas de micropropagação são bastante utilizadas e estudadas para várias espécies vegetais, dentre elas as plantas ornamentais e medicinais (CARVALHO et al., 2006), categorias que remetem a diferentes utilizações do lúpulo. A micropropagação tem muitas vantagens como a obtenção de melhores condições sanitárias, controle de fatores externos, propagação de espécies difíceis de propagar naturalmente, diminuição de tempo e de espaço necessários (CARVALHO et al., 2006). A forma viável para iniciar o cultivo comercial de lúpulo no Brasil é a obtenção de mudas através da micropropagação, por não ser uma espécie nativa e não se dispor de muitas plantas iniciais.

Os primeiros trabalhos de propagação *in vitro* de lúpulo foram desenvolvidos na década de 70, século XX. Os trabalhos objetivavam, em sua maioria, a obtenção e multiplicação de plantas livres de vírus, combate a patógenos e testes com concentrações de fitorreguladores (VINE; JONES, 1969; ADAMS, 1975).

A micropropagação do lúpulo tem viabilidade a partir de explantes nodais, extremidades apicais (ROY et al., 2001; SMÝKALOVÁ et al., 2001), meristemas (ADAMS, 1975) e pontas do rebento ou folhas (FARAGÓ et al., 1996; PEREDO et al., 2006). Roy et al. (2001) tiveram respostas positivas sob efeito de reguladores de crescimento em uma cultivar de lúpulo, denominada H138, micropropagada em meio MS. Foram desenvolvidas transformações genéticas por biobalística em lúpulo micropropagado (GATICA-ARIAS, 2013), transformações genéticas por *Agrobacterium tumefaciens* em lúpulo micropropagado em meio MS suplementado (HORLEMANN et al., 2003) e outras transformações por essas duas técnicas mais exploradas em lúpulos micropropagados em outros meios de cultura como meio B5 e Adams.

1.2.2.2 Biorreator

A micropropagação de plantas de cultura de células, tecidos, sementes, órgãos vegetais ou qualquer tipo de propágulo que possa ser utilizado pode ser feita com o uso de biorreatores de imersão temporária ou permanente (TEIXEIRA, 2006). O uso de biorreatores com meio de cultura líquido diminui a quantidade de repicagem, consistida na manipulação de explantes e troca de meio de cultura periódicas, facilitando e otimizando processos de multiplicação (SCHEIDT, 2008). Também ocorre a melhoria de condições assépticas e ambientais para as culturas, possibilitando a produção em maior escala. A tecnologia aplicada acarreta na diminuição de custos, além de redução no tempo do processo e aumento na eficiência em relação a outras técnicas de obtenção de mudas (ZIV, 1999). O cultivo de espécies em biorreatores fornece condições ótimas para o crescimento e o desenvolvimento, por regular os fatores químicos, físicos e/ou nutricionais, favorecendo a posterior aclimação (MURCH et al., 2004).

O biorreator patenteado pela Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia utiliza dois recipientes lado a lado para cada tratamento, um é preenchido com meio de cultura e o outro com material vegetal, os quais são ligados por tubos de silicone e o meio pode ser transferido para o outro conforme programado (LORENZO et al. 1998).

1.2.2.3 Organogênese

O calo é uma massa de células com crescimento desordenado, que pode vir a se diferenciar (TORRES et al., 2000). As células parenquimatosas pouco ou não diferenciadas e sem polaridade se desenvolvem em um sistema não-organizado denominado calo. A formação do calo pode ser a partir de um fragmento ou órgão vegetal obtido *in vitro*, sob condições assépticas, inserido em um meio de cultura suplementado com reguladores vegetais. Dependendo de diversos fatores, os calos podem apresentar diferentes estruturas, crescimento e desenvolvimento, regeneração, podem ser compactos ou friáveis e apresentar coloração variada,

como verdes e amarelas, ou não possuir pigmento (NARAYANASWAMY, 1994; CHAWLA, 2002; TERMIGNONI, 2005).

A cultura de calos é geralmente dividida em três etapas. A primeira etapa é a indução à formação de calos, a qual consiste na preparação da célula para divisão, ativando o seu metabolismo. A segunda etapa se dá pela divisão celular, ocorrendo a síntese ativa e a condição meristemática ou basal é retomada, gerando células não diferenciadas. Por fim, pode-se considerar a terceira etapa quando podem surgir meristemóides, onde serão formados traqueídeos e elementos de tubo crivado, primórdios de raízes ou gemas. Porém a regeneração dessas células nem sempre ocorre (NARAYANASWAMY, 1994; TERMIGNONI, 2005).

Os experimentos de cultura de calos *in vitro* de lúpulo foram iniciados com Griffin e Coley-Smith (1968), objetivando o estudo do processo de infecção do fungo *Pseudoperonospora humuli* em condições assépticas. A maior parte dos estudos com calos para lúpulo tem como objetivo final a obtenção de plantas saudáveis livres de doenças. A indução a formação de calos nodulares verdes foi feita para ocorrer a regeneração, sendo assim uma tentativa de seleção para resistência à doença *Verticillium albo-atrum* (CONNEL et al. 1986). Mas também foram feitos estudos para verificar a regeneração de calos provindos de diferentes explantes. A melhor resposta de regeneração foi sempre notada a partir de calos esverdeados. Dependente também do explante inicial, onde já se obteve a partir de explante foliar, segmento internodal e segmento de pecíolo (MOTEGI, 1976; FARAGÓ et al., 1996). Foi estabelecido protocolo de regeneração para duas variedades: Nugget e Brewers Gold (GURRIARÁN et al. 1999). Com o aumento no número de pesquisas em relação aos compostos medicinais presentes no lúpulo (ZANOLI; ZAVATTI, 2008), a cultura de calos também foi realizada para verificação e como forma alternativa para fabricação de metabólitos secundários (PŠENÁKOVÁ et al., 2009).

REFERÊNCIAS

ADAMS, A. N. Elimination of viruses from the hop (*Humulus lupulus*) by heat and meristem culture. **Journal of Horticultural Science**, v. 50, p. 151-160, 1975.

ALVES, L. M. F. **Análise físico-química de cervejas tipo *pilsen* comercializadas em Campina Grande na Paraíba**. TCC – Química Industrial. Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, 2014.

AYNALEM, H. M.; RIGHETTI, T. L.; REED, B. M. Iron formulation affects *in vitro* storage of hops - An image analysis. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 42, p. 405-410, 2006.

BATISTA, D.; FONSECA, S.; SERRAZINA, S.; FIGUEIREDO, A.; PAIS, M.S. Efficient and stable transformation of hop (*Humulus lupulus* L.) var. Eroica by particle bombardment. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 1185-1196, 2008.

BECKER, J. **Untersuchungen zur *in vitro* regeneration und genetischen transformation von hopfen (*Humulus lupulus* L.)**. Traduzido: Estudos sobre regeneração *in vitro* e transformação genética de lúpulo (*Humulus lupulus* L.). Dissertação, University of Kaiserslautern, Kaiserslautern, Alemanha, 2000.

BEER & HEALTH DOSSIERS – Hop Properties of the hop plant, 2001 (Disponível em: <http://www.bierengezondheid.com/properties-of-the-hop-plant/>).

BENITEZ, J. L.; FORSTER, A.; DE KEUKELEIRE D.; MOIR, M.; SHARPE, F. R.; VERHAGEN, C. L. **Hops and Hop Products**. European Brewery Convention, Manual of Good Practice, Westwood, p. 19-22. 2001.

BREMER, B.; BREMER, K.; CHASE, M. W.; REVEAL, J. L.; SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; STEVENS, P. F.; ANDERBERG, A. A.; FAY, M. F.; GOLDBLATT, P.; JUDD, W.S.; KALLERSJO, M.; KAREHED, J.; KRON, K. A.; LUNDBERG, J.; NICKRENT, D. L.; OLMSTEAD, R. G.; OXELMAN, B.; PIRES, J. C.; RODMAN, J. E.; RUDALL, P. J.; SAVOLAINEN, V.; SYTSMA, K. J.; VAN DER BANK, M.; WURDACK, K.; XIANG, J. Q. Y.; ZMARZTY, S. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 399-436, 2003.

CANBAS, A.; ERTEN, H.; OZASAHIN, F. The effects of storage temperature on the chemical composition of hop pellets. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 1053-1058, 2001.

CANHOTO, J. M. **Biotecnologia Vegetal: da Clonagem de Plantas à Transformação Genética**. Imprensa da Universidade de Coimbra, p. 107-123, 2010.

CARVALHO, A. **Etnobotánica del Parque Natural de Montesinho. Plantas tadicion y saber popular en um território del Nordeste de Portugal**. Tese, Madri, 2005.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M.J.L. **Fatores inerentes à micropropagação**. Campina Grande. EMBRAPA, v. 148, p. 11-25, 2006.

CASTROVIEJO, S.; AEDO, C.; CIRUJANO, S.; LAÍNIZ, M.; MONTSERRAT, P.; MORALES, R.; MUÑOZ, F. G.; NAVARRO, C.; PAIVA, J.; SORIANO, C. **Flora Ibérica: plantas vasculares de la Peninsula Ibérica e Islas Baleares**. Editora Real Jardín Botánico, Madrid, v. 3, p. 257-258. 1993.

CHADWICK, L. R.; PAULI, G. F.; FARNSWORTH, N. R. The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties. **Phytomedicine**, v. 13, p. 119-131, 2006.

CHAWLA, H.S. Introduction to plant biotechnology. **Science Publishers**, p. 538, 2002.

COLLIN, H.A. Secondary product formation in plant tissue cultures. **Plant Growth Regulators**, v. 34, p. 119-134, 2001.

CONNELL, S. A.; HEALE, J. B. Development of an *in vitro* selection system for novel sources of resistance to *Verticillium wilt* in hops. **Tissue culture and agriculture**, p. 451- 459, 1986.

CONNELL, S. A.; HEALE, J. B. *In vitro* use of *Verticillium albo-atrum* culture filtrates to select for disease resistance in regenerating callus cultures of hop (*Humulus lupulus* L.). "Nuclear techniques and *in vitro* culture for plant improvement", Vienna, p. 309-313, 1986.

DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Multiplicação fotoautotrófica de mirtilo através do uso de luz natural. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 482-487, 2008.

DANILOVA, T. V.; KARLOV, G. I. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism for detection of sex-specific molecular markers in hop (*Humulus lupulus* L.). **Euphytica**, v. 151, p. 15-21, 2006.

DE CLEENE M.; DE LEY, J. The host range of crown gall. **The Botanical Review**, v. 42, p. 389- 466, 1976.

FARAG, M. A.; WESSJOHANN, L. A. Metabolome classification of commercial *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) preparations via UPLC-qTOF-MS and chemometrics. **Planta Medica**. p. 488–496, 2012.

FARAGÓ, J.; NEŠŤÁKOVÁ, M. Kultivácia meristémov v *in vitro* kultúre a produkcia bezvírusovej sadby pri chmeli obyčajnom (*Humulus lupulus* L.) [Cultivation of meristems in *in vitro* culture and production of virus-free stock plants in hop (*Humulus lupulus* L.)]. Traduzido: Cultivo de meristemas em cultura *in vitro* e produção de plantas propagadas sem vírus em lúpulo (*Humulus lupulus* L.). **Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín** (traduzido: Novas descobertas da genética e da criação de plantas agrícolas), v. 4, p. 29-31, 1998.

FARAGÓ, J.; BATISTA, D.; SOUSA, M. J.; PAIS, M. S. Plant regeneration from stem and petiole-derived callus of *Humulus lupulus* L. (hop) clone Branganca and var. Brewers's Gold. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 32, p. 37-41, 1996.

FARAGÓ, J.; HUDCOVICOVÁ, M.; LAJCHOVÁ, Z.; VIDOVÁ, B.; VOJTEKOVÁ, P.; FARAGOVÁ, N. *In vitro* storage of hop (*Humulus lupulus* L.) germplasm derived from meristem culture. **Use of Genetic Resources of Cultivated Plants**, Czech Republic, p. 22-25, 2008.

FARAGÓ, J.; PŠENÁKOVÁ, I.; FARAGOVÁ, N. The use of biotechnology in hop (*Humulus lupulus* L.) improvement. **Nova Biotechnologia**, v. 3, p. 279-283, 2009.

FISHER, J.; FISHER, D. **The homebrewer's garden: How to easily grow, prepare, and use your own, hops, malts, brewing herbs**. Massachusetts, 1998.

FLETCHER, P.J.; FLETCHER, J.D.; GROSS, R.J. Potato germplasm: *in vitro* storage and virus eradication. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 26, p. 249-252, 1998.

FURZE, J.M.; RHODES, M.J.C.; ROBBINS, R.J. The use of agarose bead culture for the regeneration of single-derived colonies from protoplasts isolated from suspension cultures of *Humulus lupulus*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 8, p. 17-25, 1987.

GATICA-ARIAS, A.; FARAG, M. A.; STANKE, M.; MATOUSEK, J.; WESSJOHANN, L.; WEBER, G. Flavonoid production in transgenic hop (*Humulus lupulus* L.) altered by PAP1/MYB75 from *Arabidopsis thaliana* L. **Plant Cell Reports**, v. 31, p. 111-119, 2013.

GEORGE, E. F. The components of Plant Tissue Media II. **Plant Propagation by Tissue Culture**, v. 1, p. 115-174, 2008.

GERHÄUSER, C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 1941-1954, 2005.

GIPPERT, R.; SCHMIDT, H.E.; SCHMELZER, K. **Einige Ergebnisse mit Spitzenmeristemkulturen bei hopfen (*Humulus lupulus* L.)**. Traduzido: Alguns resultados com as principais culturas de meristemas no lúpulo (*Humulus lupulus* L.) Arch. Pflanzensch., v. 10, p. 7-13, 1974.

GOESE, M.; KAMMHUBER, K.; BACHER, A.; ZENK, M.H.; EISENREICH, W. Biosynthesis of bitter acids in hops. **European Journal of Biochemistry**, v. 263, p. 447- 454, 1999.

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

GRIFFIN, M.J.; COLEY-SMITH, J.R. The establishment of hop tissue cultures and their infection by *Pseudoperonospora humuli* under aseptic culture. **Journal of General Microbiology**, v. 53, p. 231-236, 1968.

GURRIARÁN, M.J.; REVILLA, M.A.; TAMÉS, R.S. Adventitious shoot regeneration in cultures of *Humulus lupulus* L. (Hop) cvs. Brewers Gold and Nugget. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 1007-1011, 1999.

HAUNOLD, A.; NICKERSON, G.B.; GAMPERT, U.; WHITNEY, P.A.; HAMPTON, R.O. Agronomic and quality characteristics of native North American hops. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 51, p. 133-137, 1993.

HEALE, J.B.; LEGG, T.; CONNELL, S. *Humulus lupulus* L.: *In vitro* culture; attempted production of bittering components and novel disease resistance. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, v. 7, p. 264-285, 1989.

HILLER, S.; GRINGRICH, A. G.; HAUNOLD, A. **Growing Hops - In the Home Garden**. v. 19. 1996.

HILTON, J. F. **Hops 2002**. Hopsteiner. 2002.

HORLEMANN, C.; SCHWEKENDIEK, A.; HÖHNLE, M.; WEBER, G. Regeneration and Agrobacterium-mediated transformation of hop (*Humulus lupulus* L.). **Plant Cell Reports**, v. 22, p. 210-217, 2003.

IONKOVA, I. Biotechnological approaches for the production of lignans. **Pharmacognosy Reviews**, v. 1, p. 57-68, 2007.

IHGC, **International Hop Growers' Convention**, 2017 (Disponível em: <http://www.hmelj-giz.si/ihgc/act.htm>) 2017.

KAEPLER, S.M.; PHILLIPS, R.L. DNA methylation and tissue culture induced variation in plants. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 29, p. 125-130, 1993.

KNEEN, R. **Small scale and organic hops production**. Columbia, 2003 (Disponível em: www.crannogales.com/manual%20final.pdf).

KRALJ, D.; HAUNOLD, A. The breeding potential of native hops (*Humulus lupulus* L.) from Yugoslavia. **Monatsschrift für Brauwissenschaft**, v. 40, p. 287-293. 1991.

KRIŠTÍN, J. Siličnaté rastliny. Traduzido: Plantas de Sílica. **Technológia rastlinnej výroby**, p. 96-111, 1987.

KUBO, S.; KAGAMI, Y.; NONAKA, K. Culture of stem tips of the hop and elimination of virus symptoms. **Rep Research Laboratories Kirin Brewing**, v. 18, p. 55-62, 1975.

LANGER, R. H. M.; HILL, G. D. **Agricultural Plants**. Cambridge University Press, Cambridge, U.K. 1982.

LANGEZAAL, C.R.; SCHEFFER, J.J.C. Initiation and growth characterization of some hop cell suspension cultures. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 30, p. 159-164, 1992.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Editora Atheneu, 1ª ed., 2009.

LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Influência do meio de cultura, tipo e concentração de citocininas na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n.2, p. 352-360, 2010.

LORENZO, J. C.; GONZALES, B. L.; ESCALONA, M. TEISSON, C.; ESPINOSA, P.; BORROTO, C. Sugarcane shoot formation in na improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 58, p. 197 – 200, 1998.

MARCOS, J. A. M.; NADAL, J. L. O.; ANDIÓN, J., P.; ALONSO, J. V.; RAMISQUIDO, J. M. G. P.; PAZ, J. F. **Guia del cultivo del lúpulo**. Galícia, 2011(Disponível em: <http://www.lutega.com/pdf/guiacultivo.pdf>).

MILLIGAN, S.R.; KALITA, J.C.; HEYERICK, A.; RONG, H.; DE COOMAN, L.; DE KEUKELEIRE, D. Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, p. 2249-2252, 1999.

MIRANDA, C.L.; STEVENS, J.F.; HELMRICH, A.; HENDERSON, M.C.; RODRIGUEZ, R.J.; YANG, Y.H.; DEINZER, M.L.; BARNES, D.W.; BUHLER, FARAGÓ, J.; D.R.X. Anti-proliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids

from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 271-285, 1999.

MOIR, M. Hops - A Millennium review. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 58, p. 131- 146, 2000.

MOTEGI, T. Induction of redifferentiated plants from hop leaf *callus* culture. **Crop Science Society of Japan**, v. 45, p. 175-176, 1976.

MURASHIGE, T.; SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, p. 473 – 479, 1962.

MURCH, S. J., COX, P. A., BANACK, S. A. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 101, 2004.

MURAKAMI, A., DARBY, P., JAVORNIK, B., PAIS, M.S.S., SEIGNER, E., LUTZ, A., SVOBODA, P. Microsatellite DNA analysis of wild hops, *Humulus lupulus* L. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 53, p. 1553-1562, 2006.

NARAYANASWAMY, S. **Plant cell and tissue culture**. Nova Delhi: Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited, 1994.

NEVE, R.A. **Hops**. Chapman and Hall, New York, p. 266, 1991.

OKADA, Y.; SAEKI, K.; INABA, A.; SUDA, N.; KANEKO, T.; ITO, K. Construction of gene expression system in hop (*Humulus lupulus* L.) lupulin gland using valerophenone synthase promoter. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 1101-1108, 2003.

ORINIAKOVÁ, P., MATOUŠEK, J. Viroid infection of hop (*Humulus lupulus* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and conditions for hop transformation. **Rostl. Výr.**, v. 52, p. 233-239, 1996.

PAULS, K.P. Plant biotechnology for crop improvement. **Biotechnology Advances**, v. 13, p. 673-693, 1995.

PENCHEL, R. M., OTONI, W. C., XAVIER, A. Tecnologia de biorreatores e propagação *in vitro*. **Biotecnologia Florestal**, p.75-92, 2007.

PERAGINE, J. N. **The Complete Guide to Growing your own hops, malts, and brewing herbs**. Ocala, 2011.

PEREDO, E. L.; REVILLA, M. A.; ARROYO-GARCÍA, R. Assessment of genetic and epigenetic variation in hop plants regenerated from sequential subcultures of organogenic *calli*. **Plant Physiology**, v. 163, p. 1071-1079, 2006.

POPOV, V.I.; VYSOTSKII, V.A.; TUKTAGULOV, I.M. Conditions of cultivation of isolated hop apices for clonal micropropagation. **Soviet plant physiology**, v. 32, p. 1191- 1195, 1985.

PROBASCO, G.; WINSLOW, S. The use of shoot-tip culture to eliminate viruses from hop varieties grown in the United States. **MBAA Technical Quarterly**, v. 23, p. 26-31, 1986.

PŠENÁKOVÁ, I.; GAŠPÁRKOVÁ, L. ; FARAGÓ, J. **Polyphenol and flavonoid contents of hop callus and cell suspension cultures**. Internacional Hop Growers' Convention, León, Espanha, 109, 2009 (Disponível em: https://www.lfl.bayern.de/mam/cms07/ipz/dateien/hopfen_polyphenol_flavonoid_calls.pdf).

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. S. **Manual de Procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Embrapa Amazônia Ocidental**. Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus, 2008.

RAKOUSKÝ, S.; MATOUŠEK, J. Direct organogenesis in hop – a prerequisite for an application of *A. tumefaciens*-mediated transformation. **Biologia Plantarum**, v. 36, p. 191-200, 1994.

REED, B.M.; OKUT, N.; D'ACHINO, J.; NARVER, L.; DeNOMA, J. Cold storage and cryopreservation of hops (*Humulus lupulus* L.) shoot cultures through application of standard protocols. **Cryo-Letters**, v. 24, p. 389-396, 2003.

REVILLA, M.A.; MARTÍNEZ, D. Cryopreservation of *Humulus lupulus* L. (Hop). In: TOWILL, L. E.; BAJAJ, Y. P. S.: *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Cryopreservation of Plant Germplasm II.*, v. 50, p. 136-150, 2002.

RIBEIRO J. M.; BASTOS, D. C. **Biorreatores: aspectos gerais e sua utilização para cultura de tecidos vegetais.** Embrapa Semi-árido, Petrolina, 2008.

ROBBINS, R.J.; RATCLIFFE, R.G. Intracellular distribution of phosphate in cultured *Humulus lupulus* cells growing at elevated exogenous phosphate concentrations. **Plant Cell Reports**, v. 3, p. 234-236, 1984.

ROBBINS, R.J.; FURZE, J.M.; RHODES, M.J.C. Alpha-acid degradation by suspension culture cells of *Humulus lupulus*. **Phytochemistry**, v. 24, p. 709-714, 1985.

ROBERTS, M.T.; LEWIS, A.C. Rapid Characterization of Hop Essential Oils Using Gas Chromatography-Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 60, p. 116-121, 2002.

RODRIGUES, M. A.; MORAIS J. S.; CASTRO J. P. M. **Jornada de lúpulo e cerveja: novas oportunidades de negócios.** Bragança, Livro de Atas, 2015.

ROY, A.T.; LEGGETT, G.; KOUTOULIS, A. Development of a shoot multiplication system for hop (*Humulus lupulus* L.). **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 37, p. 79-83, 2001.

RYBÁČEK, V. **Chmelařství.** Traduzido: Lúpulo. Státní zemědělské nakladatelství Praha (traduzido: Publicação Agrícola Estadual de Praga), n. 426, 1980.

SCHEIDT, G. N. **Desenvolvimento e validação de um biorreator do tipo imersão por bolhas para micropropagação de plantas.** Tese em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SCHONBERGER, C.; ENGELHARD, B.; LUTZ, A.; BIENDL, M.; MITTER, W.; FORSTER, A.; GAHR, A.; SCHMIDT, R. **Hops. Their Cultivation, Composition and Usage.** Brauwelt Knowledge. Fachverlag, Hans Carl, p. 18-25, 2014.

SCHWEKENDIEK, A.; SPRING, O.; HEYERICK, A.; PICKEL, B.; PITTSCH, N.T.; PESCHKE, F.; DE KEUKELEIRE, D.; WEBER, G. Constitutive expression of a grapevine stilbene synthase gene in transgenic hop (*Humulus lupulus* L.) yields resveratrol and its derivatives in substantial quantities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7002-7009, 2007.

SKOOG, F., MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 11, p. 118-131, 1957.

SMALL, E. A numerical and nomenclatural analysis of morpho-geographic taxa of *Humulus*. **Systematic Botany**, v. 3, p. 37-76, 1978.

SMÝKALOVÁ, I.; LIPAVSKÁ, H.; ORTOVÁ, M.; PATZAK, J. Efficient *In vitro* Micropropagation and Regeneration of *Humulus Lupulus* on Low Sugar, Starch-Gelrite Media. **Biologia Plantarum**, v. 44, p. 7-12, 2001.

SOUSA, M. J. A. C., **Obtenção de plantas de *Humulus lupulus* L. resistentes a vírus**. Tese em Biotecnologia Vegetal, Universidade de Lisboa, 2005.

STAJNER, N.; SATOVIC, Z.; CERENAK, A.; JAVORNIK, B. Genetic structure and differentiation in hop (*Humulus lupulus* L.) as inferred from microsatellites. **Euphytica**, v. 161, p. 301-311, 2008.

STEVENS, J.F.; MIRANDA, C.L.; BUHLER, D.R.; DEINZER, M.L. Chemistry and biology of hop flavonoids. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 56, p. 136-145, 1998.

STEVENS, J.F.; TAYLOR, A.W.; DEINZER, M.L. Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 832, p. 97-107, 1999.

ŠKOF, S.; LUTHAR, Z. Detection of the reporter and selection genes in transformed hop (*Humulus lupulus* L.). **Acta agriculturae Slovenica**, v. 85, p. 351-358, 2005.

TEISSON, C.; ALVARD, D. A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: temporary immersion. **Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology**, p. 105-110, 1995.

TEIXEIRA, J. B. **Produções de mudas clonais em biofábricas e uso de biorreator**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, 2006.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**. Porto Alegre, 182, 2005.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, Embrapa, 1990.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A.; SÁ, M. F. G.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. de M.; PINHO, E. R. C. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Embrapa Hortaliças, Brasília, 2000.

TREVISAN, M.T.S.; SCHEFFER, J.J.C.; VERPOORTE, R. Effect of elicitation on the peroxidase activity in some cell suspension cultures of hop, *Humulus lupulus*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 48, p. 121-126, 1997.

VILLACORTA, N. F.; FERNÁNDEZ, H.; PRINSEN, E.; BERNAD, P. L.; REVILLA, M. A. Endogenous hormonal profiles in hop development. **Journal Plant Growth Regulator**, v. 27, p. 93-98, 2008.

VILLALOBOS, V.M.; ENGELMANN, F. Ex situ conservation of plant germplasm using biotechnology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 375-382, 1995.

VINE, S.J.; JONES, O.P. The culture of shoot tips of hop (*Humulus lupulus* L.) to eliminate viruses. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 44, p. 281-284, 1969.

WATT, M.P.; THOKOANE, N.L.; MYCOCK, D.; BLAKEWAY, F. *In vitro* storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 61, p. 161-164, 2000.

WILSON, D.G. Plant remains from the Graveney boat and the early history of *Humulus lupulus* L. in W. Europe. **New Phytologist Journal**, v. 75, p. 627-648, 1975.

WU, C. K. **Formação de Mudas e Microtubérculos de Batata (*Solanum tuberosum* L.) em Sistemas Biorreatores**. Mestrado em Agronomia, Instituto Agronômico, Campinas, 2007.

YCHHOPS, **YAKIMA CHIEF - HOPUNION**, 2017 (Disponível em: <https://ychhops.com/>).

ZANOLI, P.; ZAVATTI, M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 383-396, 2008.

ZIV, M. Organogenic plant regeneration in biorreactors. **Plant biotechnology and in vitro biology in the 21st century**, p. 673-676, 1999.

2 MICROPROPAGAÇÃO DE LÚPULO VAR. CHINOOK

RESUMO

O lúpulo, *Humulus lupulus L.*, possui interesse econômico mundial, principalmente devido à utilização pela indústria cervejeira. O Brasil é um dos maiores produtores de cerveja, porém o lúpulo utilizado provém de importação, pois ainda não existe produção em nível comercial. A variedade Chinook é uma das variedades cultivadas em larga escala no mundo e resultados preliminares indicam a possibilidade de cultivo nas condições do sul do Brasil. Entre as técnicas disponíveis para a propagação vegetal da espécie, a cultura de tecidos vegetais permite, a partir de uma pequena quantidade vegetal inicial, a multiplicação rápida de mudas livres de patógenos. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um protocolo de micropropagação da variedade Chinook de lúpulo, possibilitando a obtenção de mudas e trabalhos futuros com material vegetal micropropagado. Para introduzir o material vegetal *in vitro* foi realizado um experimento de assepsia, onde foi avaliado o efeito da imersão em álcool 70%, hipoclorito de sódio 7% e Tween 20 0,01% e em hipoclorito de sódio 10% na sobrevivência dos explantes. Para multiplicação *in vitro*, avaliou-se o efeito de citocininas (0,1mg/L BAP e 0,1mg/L KIN) em explantes contendo um ou dois pares de folhas, o efeito de diferentes fontes luminosas (luz fluorescente branca fria e luz LED Green Power) com um ou dois pares de folhas e o efeito da imersão temporária em biorreator (imersão direta e 4, 8 e 12 vezes ao dia). A partir de plantas multiplicadas *in vitro*, microestacas de 2,5 cm foram inseridas em tubetes com diferentes doses de fertilizante de liberação lenta (Basacote Mini 6M) e doses proporcionais de NPK (ureia, superfosfato simples e cloreto de potássio) misturados no substrato Tropstrato. As microestacas ficaram 15 dias sob nebulização intermitente, posteriormente foi feita rega manual diária durante 60 dias e o efeito da utilização de fertilizantes na aclimatização em casa de vegetação foi avaliado. A assepsia com hipoclorito de sódio 10% proporcionou maior sobrevivência de gemas apicais e laterais (95% e 90%, respectivamente), porém ambos os métodos de assepsia não foram eficientes quando a folha com corte longitudinal foi utilizada como explante. Os resultados obtidos na multiplicação *in vitro* de lúpulo não foram satisfatórios para a concentração utilizada das citocininas, a média de número de folhas geradas foi superior com 2 pares de folhas em meio de cultura MS semi-sólido e quando cultivada sob luz LED Green Power (110,625 folhas). A multiplicação de explantes de lúpulo var. Chinook em biorreator de imersão temporária demonstrou a possibilidade de propagação com meio de cultura MS líquido e rendimento de massa superior no tratamento com imersão do meio de cultura 4 vezes ao dia (2,645). O comprimento de raízes, o número de raízes principais formadas, o volume e a massa seca de raízes geradas não geraram padrão de resultados superiores para todas análises de raízes formadas. A utilização de fertilizantes misturados no substrato se demonstrou superior à testemunha em todas variáveis analisadas da parte aérea. A altura da parte aérea, a quantidade de folhas formadas, a área foliar e a massa seca das folhas apresentaram melhores resultados com 12,48 g de ureia, 14,4 g de superfosfato simples e 11,52 g de cloreto de potássio misturados em 4800 cm³ de substrato Tropstrato. A partir dos resultados foi estabelecido um protocolo de micropropagação

para variedade Chinook de lúpulo e mudas para a realização de outros trabalhos foram obtidas através da utilização do protocolo desenvolvido.

Palavras-chave: *Humulus lupulus* L. Produção de mudas. Biorreator de Imersão Temporária.

HOP VAR. CHINOOK MICROPROPAGATION

ABSTRACT

The hop, *Humulus lupulus* L., have worldwide economic interest, mainly due to the use by the brewing industry. Brazil is one of the largest beer producers, but the hop used come from imports, as there is still no commercial production. The Chinook variety is one of the varieties cultivated on a large-scale in the world and preliminary results indicate the possibility of cultivation in southern Brazil. Among the techniques available for plant propagation of the species, plant tissue culture allows, from a small initial plant quantity, fast multiplication of pathogen free seedlings. The objective of this work was the development of a micropropagation protocol of the hop Chinook variety, making it possible to obtain seedlings and future works with micropropagated plant material. In order to introduce the plant material *in vitro* an asepsis experiment was carried out, where the effect of immersion in 70% alcohol, 7% sodium hypochlorite and 0.01% Tween 20 and 10% sodium hypochlorite in the explants survival was evaluated. For *in vitro* multiplication, the effect of cytokinins (0.1 mg/L BAP and 0.1 mg/L KIN) on explants containing one or two pairs of leaves was evaluated, the effect of different light sources (cold white fluorescent light and LED Green Power light) with one or two pairs of leaves and the effect of temporary immersion in bioreactor (direct immersion and 4, 8 and 12 times a day). From *in vitro* plants multiplied, 2.5 cm microcuttings were inserted in tubes with different doses of slow release fertilizer (Basacote Mini 6M) and proportional doses of NPK (urea, single superphosphate and potassium chloride) mixed in the Tropstrato substrate. The microcuttings were under intermittent nebulization for 15 days, and then daily manual irrigation for 60 days and the effect of the fertilizers use on acclimatization under greenhouse conditions was evaluated. The asepsis with 10% sodium hypochlorite provided higher apical and lateral buds survival (95% and 90%, respectively), but both methods were not efficient when the leaf longitudinal cut was used as an explant. The *in vitro* multiplication of hop was not satisfactory for the concentration of cytokinins used, the leaves generated average number was higher with 2 pairs of leaves in semi-solid MS culture medium and when grown under LED Green Power light (110.625 leaves). The hop explants var. Chinook multiplication in a temporary immersion bioreactor demonstrated the possibility of propagation with liquid MS culture medium and higher mass yield in the treatment with immersion of the culture medium 4 times a day (2.645). Root length, number of main roots formed, volume and dry mass of roots generated did not generate a higher result pattern for all roots analyzes. The use of mixed fertilizers in the substrate was shown to be superior to the control in all aerial analyzed variables. Leaf height, leaf number, leaf area and leaf dry mass presented the best results with 12.48 g of urea, 14.4 g of single superphosphate and 11.52 g of potassium chloride mixed in 4800 cm³ of Tropstrate substrate. From the results were established a micropropagation protocol for hop Chinook variety and seedlings for the accomplishment of other works were obtained using the protocol developed.

Key-words: *Humulus lupulus* L. Seedling production. Temporary Immersion Bioreactor. Fertilizer.

2.2 INTRODUÇÃO

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.), pertencente à família Cannabaceae, apresenta interesse econômico mundial devido principalmente à utilização pela indústria cervejeira. A flor feminina produz altos teores de lupulina, que contém alfa e beta-ácidos e óleo essencial, responsáveis por conferir aroma e amargor característicos da cerveja.

Segundo dados obtidos na Internacional Hop Growers' Convention (2017), os maiores produtores de lúpulo em 2016 foram Alemanha e Estados Unidos, a Alemanha produziu 42.766.000 kg, sendo 22.214.000 kg de lúpulo de aroma e 20.552.000 kg de lúpulo de alfa-ácidos, e os Estados Unidos produziram 40.206.000 kg, sendo 29.421.000 kg de lúpulo de aroma e 10.785.000 kg de lúpulo de alfa-ácidos.

A exportação de lúpulo geralmente ocorre em forma de pellets dos cones (flores femininas). O Brasil ficou colocado como terceiro país no ranking mundial de produção de cerveja (CERVBRASIL, 2017) e importou 1.724.049 kg de cones de lúpulo moídos, triturados ou em pellets (ALICEWEB, 2017) no ano de 2016, pois ainda não possui produção em nível comercial e todo lúpulo utilizado é advindo de importação.

A micropropagação é uma forma de propagação vegetativa, que possui como vantagem a produção rápida e livre de patógenos de uma grande quantidade de mudas (CARVALHO et al., 2006). A produção de mudas por meio da aclimatização de lúpulo micropropagado é uma alternativa viável para início do cultivo em larga escala no Brasil, por não se tratar de uma espécie nativa.

Embora existam pesquisas quanto ao tipo de explantes, reguladores vegetais, meios de culturas e outros fatores *in vitro* para algumas variedades de lúpulo, o desenvolvimento de protocolo específico para variedade Chinook é necessário. A variedade demonstra bons resultados preliminares para a possibilidade de produção em larga escala nas condições do sul do Brasil, os quais ainda não foram publicados.

O sucesso na produção de mudas a partir da micropropagação depende da etapa de aclimatização. A saída do material vegetal *in vitro* para o plantio é uma etapa crítica e fertilizantes podem ser testados para facilitar esse processo,

aumentando a disponibilidade de nutrientes no substrato. Além da fertilização por NPK, existem fertilizantes de liberação lenta, os quais têm uma forma de ação onde a disponibilidade de nutrientes é prolongada por ter liberação fracionada para aumentar a absorção de nutrientes pelas plantas (TRENKEL, 1997).

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um protocolo de micropropagação da variedade Chinook de lúpulo, possibilitando a obtenção de mudas e trabalhos futuros com material vegetal micropropagado.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.2 LOCALIZAÇÃO E MATERIAL VEGETAL

Os experimentos de micropropagação de lúpulo var. Chinook foram realizados no Laboratório de Micropropagação de Plantas, do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (Curitiba – PR).

O estabelecimento *in vitro* ocorreu no início de 2016. As plantas matrizes de lúpulo da variedade Chinook foram transferidas da Área de Plantas Medicinais da Fazenda Experimental Canguiri (Pinhais – PR) para vasos e mantidas na casa de vegetação Estufa 1 no Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

O experimento de aclimatização foi instalado no final do ano de 2016. O lúpulo var. Chinook estava estabelecido *in vitro* e mantido em frascos de vidro com 40 mL de meio de cultura MS na sala de cultura de tecidos vegetais do laboratório de Micropropagação de Plantas. As estacas de 2,5 cm feitas de lúpulo micropropagado foram aclimatizadas na casa de vegetação Estufa 2, localizada no Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (Curitiba – PR).

2.3.3 ASSEPSIA E ESTABELECIMENTO *IN VITRO*

Gemas apicais, gemas laterais e folhas em corte longitudinal de lúpulo da variedade Chinook, estabelecidas em vasos e cultivadas em casa de vegetação, foram excisadas e lavadas com água deionizada. Esses explantes foram desinfetados em dois tipos de assepsia: A1 e A2.

A assepsia A1 consistiu na imersão dos explantes (gemas apicais, gemas laterais e folhas em corte longitudinal) em etanol 70% por um período de 5 minutos e subsequentemente no hipoclorito de sódio 7% e 2 gotas de Tween 20 - 0,01% por

um período de 10 minutos. Foram feitas três lavagens de um minuto com água destilada autoclavada (HORLEMANN et al., 2003), em câmara de fluxo laminar sob condições assépticas. A assepsia A2 consistiu na imersão dos explantes em hipoclorito de sódio 10% por um período de 24 minutos, seguido de quatro lavagens com água destilada autoclavada, em câmara de fluxo laminar sob condições assépticas.

Após passarem pelo processo de assepsia em câmara de fluxo laminar, os explantes foram introduzidos em frascos de vidro com 10 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) semi-sólido (Anexo A), previamente autoclavado a 121°C por um período de 20 minutos.

O material introduzido *in vitro* foi distribuído em delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial 3x2, em sala asséptica de crescimento para cultura de tecidos sob luz fluorescente branca fria, com densidade de fluxo de fótons de 20 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ com fotoperíodo de 16 horas e temperatura a 25 ± 2 °C.

Os tratamentos consistiram na combinação dos fatores: tipo de explante (gemas apicais, gemas laterais e corte longitudinal de folhas) e tipo de assepsia (A1 e A2) utilizada. O experimento foi composto de quatro repetições (cinco explantes, cada) por tratamento, totalizando 120 explantes.

A avaliação foi referente à taxa de sobrevivência dos explantes livres de contaminação 20 dias após o início do experimento. O material vegetal inviabilizado por oxidação foi descartado e o material vegetal sadio foi cultivado *in vitro* e utilizado em outros experimentos. O experimento foi repetido duas vezes para a confirmação dos resultados e utilização dos explantes em outros experimentos *in vitro*.

2.3.4 MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO*

Após 30 dias do estabelecimento *in vitro* das gemas apicais e laterais de lúpulo var. Chinook, houve crescimento vertical (primário), aparecimento de raízes e brotações. Os explantes passaram por dois subcultivos em meio MS semi-sólido (Anexo A), posteriores ao estabelecimento, para a realização dos experimentos de multiplicação.

2.3.3.1 Experimento I

O primeiro experimento de multiplicação *in vitro* teve como tratamentos a combinação dos fatores: tipo de citocinina (testemunha, BAP e CIN) com o número de pares de folhas (um e dois pares de folhas) dos explantes de lúpulo var. Chinook.

Explantes com um e dois pares de folhas foram inseridos em meio MS semi-sólido com adição de 4,44 μM da citocinina BAP (6-benzilaminopurina), 4,65 μM da citocinina CIN (cinetina) e sem regulador vegetal (testemunha).

Os frascos de vidro de contendo 40 mL de meio de cultura com os explantes de lúpulo var. Chinook conforme tratamentos foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial 3x2, em sala de crescimento de cultura de tecidos, sob condições assépticas e controladas.

O experimento consistiu em quatro repetições por tratamento, com dez explantes por repetição, totalizando 240 explantes. As avaliações do número de folhas geradas e o número de raízes foram realizadas 30 dias após o início do experimento.

2.3.4.1 Experimento II

Para a realização do segundo experimento de multiplicação *in vitro*, os tratamentos foram a combinação dos fatores: número de pares de folhas (um e dois pares de folhas) dos explantes de lúpulo var. Chinook com tipo de fonte de luz utilizada (luz fluorescente branca fria e luz LED Green Power) na sala de crescimento de cultura de tecidos.

Explantes de lúpulo var. Chinook contendo um e dois pares de folhas foram excisados e inseridos em frascos de vidro contendo 40 mL de meio de cultura MS semi-sólido (Anexo A), sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar. O material foi distribuído em delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial 2x2, em sala asséptica de crescimento para cultura de tecidos sob dois tipos de fontes luminosas: luz fluorescente branca fria e luz LED Green Power da marca Philips. Os dois tipos de fonte luminosa com fotoperíodo de 16 horas e temperatura a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

O experimento consistiu em cinco repetições por tratamento, com dez explantes por repetição, totalizando 200 explantes. O número de folhas geradas e o número de raízes foram avaliados 30 dias após o início do experimento, porém os tratamentos não demonstraram diferença estatística significativa para o número de raízes formadas.

2.3.4.2 Experimento III

Explantes com dois pares de folhas foram inseridos no Biorreator de Imersão Temporária, patenteado pela Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia, e a variável testada foi a quantidade de vezes que o meio MS líquido (Anexo 2) foi transferido, a fim de imergir os explantes. O delineamento experimental utilizado foi o delineamento de blocos ao acaso com quatro tratamentos, seis repetições por tratamento (14 explantes por repetição), totalizando 336 explantes.

O primeiro tratamento (T1) foi a testemunha, onde os explantes ficaram 24 horas em meio de cultura MS líquido. No segundo tratamento (T2), houve a imersão do meio de cultura MS líquido quatro vezes ao dia, 360 minutos de tempo entre cada imersão. No terceiro tratamento (T3), oito vezes ao dia, o meio de cultura MS líquido entrou em contato com os explantes, 180 minutos de tempo entre cada imersão. Por fim, no quarto tratamento (T4), doze vezes ao dia de imersão de meio de cultura líquido MS, 120 minutos de tempo entre cada imersão.

Para entrada do meio de cultura nos frascos (tratamentos T2, T3 e T4) o tempo foi de 30 segundos para todos os tratamentos. O período que os explantes permaneceram em imersão no meio de cultura foi de cinco minutos para os tratamentos T2, T3 e T4. O tempo de saída do meio de cultura dos frascos foi de um minuto nos tratamentos T2, T3 e T4. O ar foi renovado nos frascos dos tratamentos T2, T3 e T4 a cada 60 minutos, por um período de dez segundos. O Biorreator está localizado na sala de crescimento de culturas do laboratório de Micropropagação, em condições controladas assépticas e teve o seu fotoperíodo ajustado para ser igualado à sala de crescimento de culturas. Os explantes no frasco foram cultivados sob luz fluorescente branca fria, com densidade de fluxo de fótons de $20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ com fotoperíodo de 16 horas e temperatura a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

A avaliação do experimento de multiplicação em biorreator de imersão temporária foi feita pela diferença entre a massa final (após 15 dias de cultivo) e a massa inicial dos 14 explantes inseridos nos frascos do biorreator por repetição. A diferença foi denominada rendimento e as médias dos rendimentos foram comparadas.

2.3.5 ACLIMATIZAÇÃO

Estacas de 2,5 cm de comprimento com um par de folhas foram feitas a partir de explantes de lúpulo da variedade Chinook estabelecidos e multiplicados *in vitro* por um período de três meses. Os tratamentos consistiram na inserção de estacas em tubetes de 120 cm³ com diferentes concentrações de fertilizante de liberação lenta (Basacote Mini 6M) e equivalentes de NPK (a partir de ureia, superfosfato simples e cloreto de potássio) misturadas em 4800 cm³ de substrato Tropstrato. Os tratamentos consistiram nas seguintes concentrações de fertilizantes:

- T1 (Testemunha): os tubetes foram preenchidos apenas com substrato;
- T2: 14,4 g de fertilizante de liberação lenta;
- T3: 28,8 g de fertilizante de liberação lenta;
- T4: 43,2 g de fertilizante de liberação lenta;
- T5: 4,16 g de ureia (N), 4,8 g de superfosfato simples (P) e 3,84 g de cloreto de potássio (K);
- T6: 8,32 g de ureia (N), 9,6 g de superfosfato simples (P) e 7,68 g de cloreto de potássio (K);
- T7: 12,48 g de ureia (N), 14,4 g de superfosfato simples (P) e 11,52 g de cloreto de potássio (K).

O experimento de aclimatização consistiu de 7 tratamentos com 5 repetições, 8 estacas por repetição, totalizando 280 estacas. Os tubetes foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado em suportes plásticos e mantidos por um período de 15 dias em casa de vegetação com nebulização intermitente (5 segundos a cada 30 minutos). A taxa de sobrevivência das estacas foi avaliada após esse período.

Os tubetes foram transferidos para casa de vegetação sem nebulização, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, com controle dos dados de

temperatura (máxima e mínima) e umidade (máxima e mínima). As estacas de lúpulo var. Chinook foram regadas diariamente no período da manhã durante 60 dias.

O comprimento das raízes, o número de raízes principais, o volume de raízes, a massa seca de raízes, a altura da parte aérea, o número de folhas geradas, a área foliar e a massa seca de folhas foram avaliados 75 dias após o início do experimento. O volume de raízes e a área foliar foram avaliados com auxílio do equipamento WinRhizo.

2.3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variâncias dos tratamentos foram avaliadas quanto a sua homogeneidade pelo teste de Bartlett. Os dados dos experimentos os quais apresentaram muitos resultados nulos foram transformados para possibilitar a aplicação do teste de Bartlett. As variáveis cujas variâncias mostraram-se homogêneas tiveram os efeitos dos tratamentos testados por meio do teste F da de variância. As médias foram comparadas pelo teste de comparação de médias Tukey a 1% de probabilidade. Para aplicação das análises foi utilizado o programa ASSISTAT® (SILVA; AZEVEDO, 2016).

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

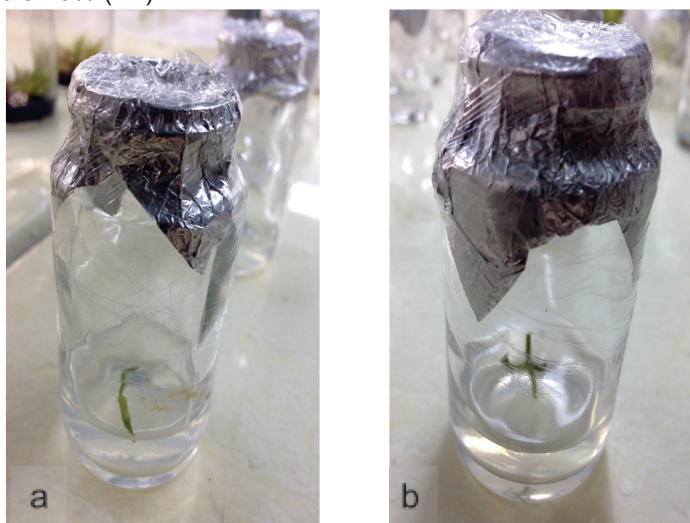
2.4.2 ASSEPSIA E INTRODUÇÃO *IN VITRO*

As análises dos dados demonstraram que houve interação significativa entre os fatores tipo de explante e assepsia para taxa de sobrevivência (Anexo 2 - tabela a). As gemas apicais e laterais de lúpulo var. Chinook (Figura 2) apresentaram taxas de sobrevivência de 95% e 90%, respectivamente, e não diferiram estatisticamente quando utilizada a assepsia A2. A taxa de sobrevivência da folha em corte longitudinal não pôde ser estabelecida, pois não houve sobrevivência de explantes na utilização dos dois tipos de assepsia (Tabela 1). Os dados foram transformados para aplicação do teste de Bartlett em razão da quantidade de respostas nulas, as quais impossibilitam a realização da análise.

A inviabilidade causada pela assepsia A1, pode ter-se dado pela utilização do etanol 70% e Tween 20 os quais podem ter sido nocivos na concentração e / ou no período em que ficaram em contato com os explantes, diferindo dos resultados obtidos por Horlemann et al. (2003) para a variedade Tettnanger de lúpulo. A adição de um tecido vegetal em determinados agentes desinfetantes pode gerar a morte celular e assim não existe um procedimento padrão a ser adotado, a forma de assepsia deve ser adaptada para diferentes variedades e tecidos vegetais. O estabelecimento *in vitro* só tem início a partir da assepsia correta, tendo assim explantes saudáveis para cultura de tecidos (SMITH, 2000). O etanol pode gerar a desidratação dos tecidos vegetais e é geralmente utilizado em concentrações de 70 e 80% (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O tempo de imersão dos explantes e a concentração do hipoclorito de sódio foram estimados por testes prévios para a criação da assepsia A2. Os resultados foram satisfatórios, não ocorrendo contaminação e deixando os explantes viáveis. O sucesso da assepsia A2 pode ter se dado pelo fato do hipoclorito de sódio não apresentar alta taxa de toxicidade a alguns tipos explantes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Figura 2 – a)Gema apical e b) lateral de lúpulo var. Chinook *in vitro*, após passarem pela assepsia com hipoclorito de sódio 10% (A2).



Fonte: A autora (2016).

O tipo de explante folha em corte longitudinal de lúpulo var. Chinook não apresentou desenvolvimento e teve morte celular na totalidade avaliada. O insucesso da introdução com o uso de corte longitudinal de folha, pode ter se dado pela dificuldade apresentada em ser feita a assepsia em um tecido vegetal maior e mais tenro ou pela técnica desempenhada de forma não satisfatória, tendo em vista a sua complexidade.

Tabela 1. Taxa de sobrevivência de explantes de lúpulo var. Chinook em diferentes tipos de assepsia para introdução *in vitro*.

EXPLANTE	TAXA DE SOBREVIVÊNCIA (%)			
	Assepsia A1		Assepsia A2	
Gema apical	0	a B	95	a A
Gema lateral	0	a B	90	a A
Folha em corte longitudinal	0	a A	0	b A
C.V. (%) = 12,93				

** significativo ao nível de 1% de probabilidade no teste de Tukey. Letras minúsculas – colunas; letras maiúsculas – linhas. Assepsia A1: Etanol 70% (5 min.); hipoclorito de sódio 7% + 2 gotas Tween 20 - 0,01% (10 min.); 3 lavagens (1 min. cada) água destilada autoclavada (HORLEMANN et al., 2003). Assepsia A2: Hipoclorito 10 – 12% (24 min.); 4 lavagens (1 min. cada) água destilada autoclavada.

2.4.3 MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO*

2.4.2.1 Experimento I

O número de folhas geradas no primeiro experimento de multiplicação *in vitro* de lúpulo var. Chinook não apresentou interação significativa entre os fatores (citocinina x nº de pares de folhas) (Anexo 2 – tabela b) e as médias de cada fator foram analisadas separadamente.

A média de número de folhas geradas foi superior na testemunha (Tabela 2), os explantes apresentaram alongamento de caule e foi observado que não existe a necessidade da utilização de reguladores vegetais para o cultivo *in vitro* de lúpulo da variedade Chinook.

A concentração de 4,44 µM da citocinina BAP induziu a formação de calos em todos explantes, quando adicionada ao meio de cultura MS, o que pode ter contribuído para o atraso do aparecimento de novas folhas e o menor alongamento de caule. A organogênese indireta deve ser evitada quando se buscam maiores taxas de multiplicação de explantes. A formação de calos geralmente gera a variação somaclonal, sendo indesejada em micropropagação (DODDS; ROBERTS, 1985).

A formação de calos também ocorreu com a concentração de 4,65 µM da citocinina CIN, mas atingiu menos explantes. O equilíbrio do balanço hormonal auxina / citocinina gera a formação de calos (SKOOG; MILLER, 1957). O balanço endógeno de auxinas / citocininas no lúpulo é promotor de rizogênese espontânea (SOUSA, 2005), indicando uma concentração superior de auxina endógena com adição de citocinina exógena, o que provavelmente aproximou-se do equilíbrio de concentrações e formou calos.

Tabela 2. Médias do número de folhas geradas na multiplicação *in vitro* lúpulo var. Chinook com o fator tipos de citocinina.

TIPO DE CITOCININA	MÉDIA DO NÚMERO DE FOLHAS GERADAS POR EXPLANTE
Testemunha	8,53125 a
4,44 µM BAP	5,45000 b
4,65 µM CIN	6,47500 b
C.V. (%) = 15,11	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade no teste de Tukey.

Explantos com dois pares de folhas apresentaram média superior de número de folhas geradas, quando comparados a explantes com um par de folhas (Tabela 3). A multiplicação *in vitro* de lúpulo é feita por cortes do caule com pares de folhas, sendo assim, a maior quantidade de folhas geradas e o alongamento do mesmo aumentam o poder de repicagem.

Tabela 3. Médias do número de folhas geradas na multiplicação *in vitro* lúpulo var. Chinook com o fator número de pares de folhas no explante.

NÚMERO DE PARES DE FOLHAS	MÉDIA DO NÚMERO DE FOLHAS GERADAS POR EXPLANTE
1 par de folha	5,41667 b
2 pares de folhas	8,22083 a
C.V. (%) = 15,11	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade no teste de Tukey.

A formação de raízes para a multiplicação *in vitro* não necessita expressar altos valores, pois nos subcultivos essa parte será descartada, além de ter sido observado que a rizogênese em lúpulo da variedade Chinook é rápida e espontânea.

A interação entre os fatores tipo de citocinina e número de pares de folhas foi significativa na avaliação da formação de raízes (Anexo 2 – tabela c).

As maiores quantidades de raízes formadas foram visualizadas quando utilizados 1 par de folhas sem citocinina e 2 pares de folhas com 4,65 μ M da citocinina CIN, os quais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Tabela 4).

Tabela 4. Médias do número de raízes geradas na multiplicação *in vitro* lúpulo var. Chinook com o fator tipos de citocinina.

	Médias do número de raízes geradas por explante			
	1 PAR DE FOLHAS		2 PARES DE FOLHAS	
Testemunha	4,3125	a A	2,6875	b B
4,44 μ M BAP	2,3000	c A	2,5000	b A
4,65 μ M CIN	3,8500	b B	4,3500	a A
C.V. (%) = 5,01				

** significativo ao nível de 1% de probabilidade no teste de Tukey. Letras minúsculas – colunas; letras maiúsculas – linhas.

O enraizamento com o uso de 4,65 μ M da citocinina CIN foi direto. Embora tenha sido observada a formação de calos para esse tratamento, o novo sistema radicular surgiu a partir dos próprios explantes. Já com o uso de 0,01 mg/L da citocinina BAP, foi indireto. As raízes formadas com a utilização de BAP adicionado

ao meio de cultura surgiram a partir das estruturas dos calos. Como ocorreu uma organogênese indireta, o tempo para formação de raízes foi maior, pois antes passaram pela calogênese. O maior tempo para formação pode ter sido uma explicação para redução no enraizamento.

A fim de evitar ou reduzir a organogênese indireta na multiplicação *in vitro* de explantes de lúpulo var. Chinook, pode-se buscar um balanço hormonal auxina / citocinina menor com a adição de uma concentração maior de citocinina.

Roy et al. (2001) testaram diferentes concentrações de auxinas e citocinas em conjunto para a multiplicação de brotações da variedade H138 de lúpulo. A formação de calos teve alta expressão, não encontrada apenas na utilização de baixas concentrações das auxinas NAA (ácido naftalenoacético) e IAA (ácido indolil-3-butírico) em conjunto com diferentes concentrações da citocinina BA (benziladenina).

2.4.3.1 Experimento II

No segundo experimento de multiplicação *in vitro*, ocorreu a interação significativa entre os fatores pares de folhas com tipo de fonte luminosa para número de folhas geradas (Anexo 2 – tabela d).

A fonte de luz fluorescente branca é comumente utilizada para cultura de tecidos, porém, com o avanço das pesquisas de cultura de tecidos e o crescimento da necessidade de mudas mais rápidas criaram a luz LED Green Power. A luz LED Green Power é uma fonte luminosa que objetiva diminuir o consumo e aumentar as taxas de crescimento.

Os explantes com dois pares de folhas apresentaram maiores quantidades de folhas geradas quando inseridos nos dois tipos de fontes luminosas, uma média de aproximadamente 7 a 11 folhas novas por explante.

A utilização da luz LED Green Power (Philips) apresentou médias superiores de número de folhas geradas, aproximadamente 8 a 11 folhas novas por explante (Tabela 5).

Tabela 5. Médias do número de folhas geradas na multiplicação *in vitro* lúpulo var. Chinook com diferentes fontes luminosas.

EXPLANTE	MÉDIAS DO NÚMERO DE FOLHAS GERADAS POR EXPLANTE			
	Luz fluorescente branca		Luz LED Green Power	
1 par de folhas	6,875	b B	8,625	b A
2 pares de folhas	7,500	a B	11,0625	a A
C.V. (%) = 2,17				

** significativo ao nível de 1% de probabilidade no teste de Tukey. Letras minúsculas – colunas; letras maiúsculas – linhas.

A interação que gerou resultados superiores para crescimento de lúpulo var. Chinook foi a com os explantes de dois pares de folhas cultivados sob luz LED Green Power.

A utilização da luz LED Green Power (Philips) gerou aumento do crescimento possivelmente devido a essa fonte luminosa ter sido desenvolvida com comprimentos de onda os quais possibilitam o aumento da taxa fotossintética. As fontes luminosas LED desenvolvidas para cultura de tecidos proporcionam maior taxa de multiplicação dos explantes, maior comprimento das brotações e aumento do número de clorofilas e carotenoides (SHIN et al., 2008).

O efeito benéfico da fonte luminosa LED na micropropagação vegetal foi relatado para diferentes espécies como crisântemo (KIM et al., 2004), videira (POUDEL et al., 2008), morangueiro (ROCHA et al., 2010) e amoreira (ROCHA et al., 2013).

Os explantes com dois pares de folhas cultivadas sob a luz LED Green Power demonstraram resultados de crescimento superiores, provavelmente devido ao maior número inicial de tecidos que realizam fotossíntese. O comprimento de onda, variável regulada para aumentar a taxa fotossintética na fonte luminosa LED Green Power, é um dos fatores importantes para a eficiência na fotossíntese (VICTÓRIO et al., 2007).

As luzes emitidas por lâmpadas fluorescentes apresentam comprimentos de onda que emitem luzes em mais de um espectro. Mas não há a utilização em sua totalidade por também emitirem luzes no espectro de luz ultravioleta, sendo essa maléfica à cultura de tecidos *in vitro* (ROCHA et al., 2013).

2.4.3.2 Experimento III

A propagação de lúpulo var. Chinook por biorreator de imersão temporária foi possível e foi observado crescimento acelerado dos explantes. Os explantes tiveram taxa de crescimento visivelmente superior quando comparados aos explantes micropropagados em frascos de vidros.

O maior crescimento pode ser explicado pela maior área dos frascos do biorreator quando comparados aos frascos de vidro ou por ser feita a renovação do ar.

O tratamento de transferência de meio de cultura 4 vezes ao dia demonstrou bons resultados de rendimento (Tabela 6), embora todos resultados tenham apresentado taxa de multiplicação visivelmente superior quando comparados ao cultivo normal *in vitro* em frascos de vidro com meio de cultura MS semi-sólido.

A diferença entre os tratamentos não foi elevada e significativa, possivelmente, pois o período de cultivo no biorreator foi reduzido a apenas 15 dias. O subcultivo de lúpulo var. Chinook em frascos de vidro contendo meio MS semi-sólido é feito de 25 a 30 dias. Os pré-testes realizados indicam que um período maior provavelmente geraria maiores diferenças entre os tratamentos no rendimento da multiplicação em biorreator de imersão temporária.

A diminuição gradual dos rendimentos inversamente proporcional a quantidade de vezes de imersão de meio de cultura pode ter sido ocasionada devido aos explantes de lúpulo var. Chinook serem pequenos e frágeis, os quais em parte podem ter sido levados juntamente aos meios de cultura nas transferências. Para evitar esse problema que pode ter ocorrido, podem ser colocados filtros de modo a impedir a passagem ou o fechamento da passagem dos canos do biorreator pelos explantes.

Tabela 6. Rendimento da diferença de massa final para massa inicial na multiplicação *in vitro* lúpulo var. Chinook em biorreator de imersão temporária.

TRATAMENTO	RENDIMENTO (MASSA)
T1 – Testemunha	2,5680 ab
T2 - 4 vezes ao dia	2,6450 a
T3 - 8 vezes ao dia	2,4783 bc
T4 - 12 vezes ao dia	2,3995 c
C.V. (%) = 3,78	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade no teste de Tukey.

2.4.4 ACLIMATIZAÇÃO

A aclimatização é uma fase determinante e cautelosa para as plantas micropropagadas *in vitro*, pois há a necessidade de adaptação a um novo ambiente (FRANCA, 2016). Após 15 dias sob nebulização, verificou-se a taxa de sobrevivência das microestacas de lúpulo var. Chinook (Figura 3).

Figura 3 – Plantas micropropagadas 15 dias após a instalação do experimento de aclimatização de lúpulo var. Chinook.



Fonte: A autora (2016).

O tratamento T2 apresentou a maior taxa de sobrevivência das microestacas, com 14,4 g de fertilizante de liberação lenta (Basacote Mini) misturado no substrato Tropstrato (Tabela 7).

Tabela 7. Taxa de sobrevivência (%) de estacas de lúpulo var. Chinook com fertilizantes.

TRATAMENTO	Taxa de Sobrevivência (%)
T1	77,5 c
T2	100 a
T3	75 c
T4	60 d
T5	87,5 b
T6	60 d
T7	72,5 c
C.V. (%) = 5,17	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade no teste de Tukey. T1 – testemunha. T2 - 14,4 g Basacote Mini 6M. T3 - 28,8 g Basacote Mini 6M. T4 - 43,2 g Basacote Mini 6M. T5 - 4,16 g N, 4,8 g P e 3,84 g K. T6 - 8,32 g N, 9,6 g P e 7,68 g K. T7 - 12,48 g N, 14,4 g P e 11,52 g K.

As maiores doses de fertilizante de liberação lenta (T3 e T4) podem ter representado um aumento de toxicidade para as microestacas, por aumento ou diminuição de nutrientes, podendo acarretar mudanças no pH ou competição por ligantes no metabolismo da planta (FAGERIA, 2001).

O acesso à água também pode ter sido limitado, componente importantíssimo na aclimatização, pois o fertilizante de liberação lenta possui grânulos revestidos com polímeros, os quais absorverem água do solo para desempenhar seu mecanismo de ação (GUARESCHI et al., 2011).

A fertilização com doses de ureia, superfosfato simples e cloreto de potássio apresentou porcentagem de sobrevivência superior ao fertilizante de liberação apenas no tratamento T7. Isso pode ter ocorrido devido à menor disponibilidade de nutrientes nos tratamentos T5 E T6 quando comparados aos tratamentos T2 E T3, pois o fertilizante de liberação lenta apresenta um mecanismo de ação diferente na liberação de nutrientes.

Após 60 dias, foi realizada a análise dos resultados do experimento de aclimatização e as médias dos tratamentos foram comparadas (Tabela 8 e 9).

Tabela 8. Análises de comprimento (cm), volume (cm³), massa seca (g) e número de raízes principais formadas em estacas de lúpulo var. Chinook com fertilizantes.

Tratamento	Análises de raízes			
	Comprimento (cm)	Nº de raízes principais	Volume (cm ³)	Massa seca (g)
T1	17,9200 a	1,0000 d	0,16525 d	0,01763 e
T2	17,9050 a	2,3725 b	1,07400 a	0,15158 c
T3	14,9550 b	2,5800 a	0,79950 c	0,13393 d
T4	15,8100 ab	2,4875 ab	1,10200 a	0,16055 bc
T5	17,3825 ab	2,1775 c	0,93550 b	0,15693 bc
T6	16,5550 ab	2,5175 a	0,95450 b	0,17985 a
T7	17,4275 ab	2,5625 a	1,11400 a	0,16433 b
C. V. (%) = 6,75		C. V. (%) = 2,43	C. V. (%) = 2,18	C. V. (%) = 3,64

** significativo ao nível de 1% de probabilidade no teste de Tukey. T1 – testemunha. T2 - 14,4 g Basacote Mini 6M. T3 - 28,8 g Basacote Mini 6M. T4 - 43,2 g Basacote Mini 6M. T5 - 4,16 g N, 4,8 g P e 3,84 g K. T6 - 8,32 g N, 9,6 g P e 7,68 g K. T7 - 12,48 g N, 14,4 g P e 11,52 g K.

O comprimento de raiz formada na aclimatização de lúpulo var. Chinook micropropagado foi superior nos tratamentos T1 (testemunha) e T2 (14,4 g de fertilizante de liberação lenta). Os tratamentos T1 e T2 não apresentaram diferenças estatísticas e formaram raízes com comprimento de aproximadamente 17,9 cm (Tabela 8).

As raízes podem apresentar maior desenvolvimento quando algumas doses do fertilizante de liberação lenta são utilizadas, pois o mesmo foi desenvolvido para disponibilizar maior número de nutrientes no substrato ao longo do tempo (GOMES, 2017).

A testemunha (T1) apresentou o menor número de raízes principais formadas, provavelmente por fazer a maior absorção de nutrientes em um substrato com menor disponibilidade em uma raiz principal e não despende energia para a formação de novas raízes, apenas para ramificação da principal para aumentar área de absorção.

Os tratamentos T3, T6 e T7 não apresentaram diferença estatisticamente significativa e apresentaram maior média de número de raízes principais formadas, aproximadamente 3 raízes principais por explante em cada tratamento (Tabela 11).

O volume das raízes formadas foi maior nos tratamentos T2, T4 e T7, os quais não diferiram entre si estatisticamente. Os tratamentos T5 e T6 também não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si para volume de raiz, nem para comprimento de raiz (Tabela 8).

A massa seca de raiz foi maior em todas as doses de fertilização a partir de NPK (T5, T6 e T7), em comparação à dose correspondente na fertilização à base de fertilizante de liberação lenta (T2, T3 e T6) (Tabela 8). Isso pode sugerir a maior influência do volume das raízes na massa seca do que o número de raízes principais e o comprimento das mesmas.

Todos os tratamentos com fertilizantes foram superiores ao controle, de aproximadamente 5,6 vezes, da menor altura, à 13,5 vezes maiores, da maior altura da parte aérea (Tabela 9).

O aumento do número de nutrientes disponíveis ao longo do tempo com o uso de algumas doses de fertilizante de liberação lenta, pela sua forma de ação, pode ter contribuído com o alongamento do caule, como para o tratamento T2, que foi superior ao tratamento de dose equivalente de NPK (T5) (Tabela 9). Rossa et al. (2015) obteve aumento da altura em mudas de *Eucalyptus grandis* com a utilização desse tipo de fertilizante, em comparação a fertilizante comum.

O fertilizante de liberação lenta pode apresentar menores perdas de compostos essenciais necessários à planta (COMPO EXPERT BRASIL FERTILIZANTES), por esse motivo pode ter ocorrido uma melhor disponibilidade de potássio, o qual tem ação associada com ácido giberélico nos mecanismos de alongamento de caule (GUARDIA; BENLLOCH, 1980; GOMES, 2017). O possível acúmulo de potássio na parte aérea de lúpulo pode ter se demonstrado diretamente proporcional à altura da mesma (OLIVEIRA, 2016).

O aumento da disponibilidade no tratamento T3, com fertilizante de liberação lenta, pode ter acarretado um efeito inibitório e tóxico para a variedade Chinook de lúpulo. O efeito tóxico pode ter se dado pela mudança no pH do substrato, fator importante no desenvolvimento de lúpulo.

Tabela 9. Análises de altura de parte aérea (cm), número de folhas, área foliar (cm²) e massa seca de folhas (g) em estacas de lúpulo var. Chinook com fertilizantes.

Tratamento	Análises de raízes				
	Altura de parte aérea (cm)	Nº de folhas	Área foliar (cm ²)	Massa seca de folhas (g)	
T1	3,0275 f	4,2500 c	7,56975 g	0,01763 f	
T2	23,3900 c	13,7100 b	163,0927 e	0,27138 d	
			0		
T3	16,9675 e	14,4750 b	127,6365 f	0,39803 a	
			0		
T4	27,2525 b	17,6750 a	200,3887 c	0,37330 b	
			0		
T5	20,1050 d	13,9325 b	176,11300 d	0,30975 c	
T6	23,5650 c	14,3525 b	224,3652 b	0,21960 e	
			0		
T7	40,9950 a	16,8725 a	254,6087 a	0,40740 a	
			0		
C. V. (%) = 1,64		C. V. (%) = 3,85	C. V. (%) = 1,89	C. V. (%) = 1,51	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade no teste de Tukey. T1 – testemunha. T2 - 14,4 g Basacote Mini 6M. T3 - 28,8 g Basacote Mini 6M. T4 - 43,2 g Basacote Mini 6M. T5 - 4,16 g N, 4,8 g P e 3,84 g K. T6 - 8,32 g N, 9,6 g P e 7,68 g K. T7 - 12,48 g N, 14,4 g P e 11,52 g K.

A maior altura de parte aérea foi de aproximadamente 41 cm, encontrada no tratamento T7, o qual consiste nas maiores doses de NPK em comparação aos tratamentos T5 e T6. O lúpulo pode ter respondido melhor a fertilização a partir de ureia, superfosfato simples e cloreto de potássio por apresentar os nutrientes diretamente disponíveis no substrato, sem transferência de uso de água no substrato.

O número de folhas gerado foi semelhante nas doses correspondentes nas duas formas de fertilização. As doses de fertilizante de liberação lenta dos tratamentos T2, T3 e T4 correspondem, respectivamente, as doses de fertilização por fontes de NPK dos tratamentos T5, T6 e T7. Os maiores números de folhas observadas foram nos tratamentos com maiores doses de ambos os fertilizantes, não apresentando diferença estatística significativa (Tabela 9).

A testemunha formou aproximadamente 4 folhas por planta e nos tratamentos T4 e T7 foram geradas aproximadamente 18 folhas e 17 folhas por planta, respectivamente, diferenciando expressivamente o uso da fertilização na aclimatização.

O lúpulo apresenta respostas positivas com a adição de nitrogênio, o qual tem ação na divisão e expansão celular das folhas (CHAPIN, 1980). O aumento da área foliar diretamente proporcional ao aumento das doses de fertilizante de liberação lenta dos tratamentos T2 e T4 e ao aumento de todas as doses de NPK (T5, T6 e T7) pode ocorrer como consequência do aumento gradual da quantidade de nitrogênio (Tabela 9).

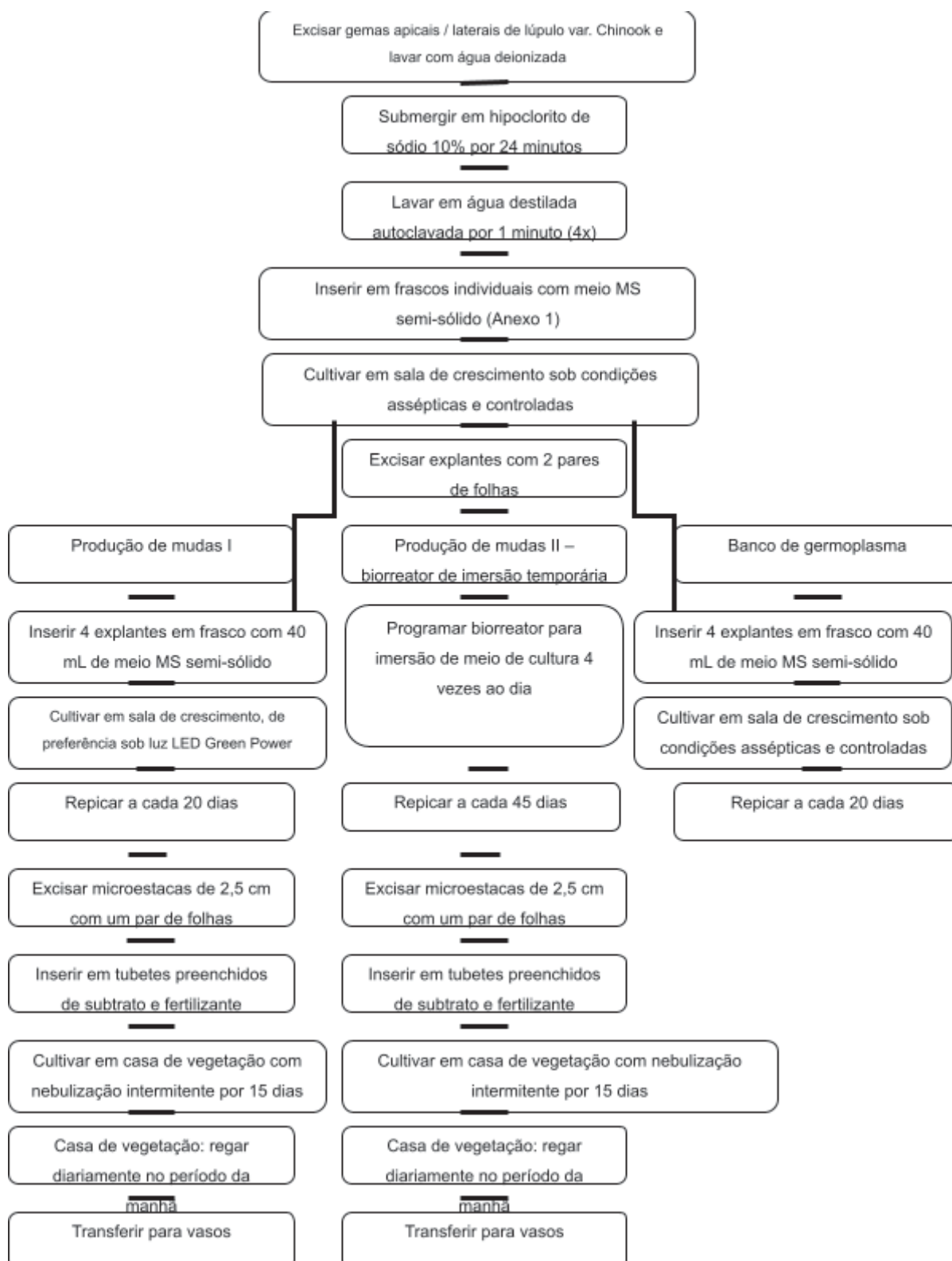
A área foliar tem relação com a massa seca das folhas, pois quando há aumento na área fotossintética, a captação de luz e fixação de CO₂ são aumentadas. Dessa forma, o aumento da taxa fotossintética gera uma disponibilidade maior de energia, ocorrendo expansão e divisão celular, diretamente proporcional à massa seca de folhas (GOMES, 2017).

Na avaliação com a variedade Chinook de lúpulo, a massa seca das folhas teve comportamento semelhante à área foliar, diferindo apenas no tratamento T6 para os dois tipos de fertilizantes (Tabela 9). O uso da dose de 28,8 g de fertilizante de liberação lenta pode ter influenciado no volume, mais especificamente na espessura das folhas. Tendo em vista que a área foliar foi maior para o fertilizante NPK do que para o fertilizante de liberação lenta, e como os dois parâmetros costumam ser diretamente proporcionais, o fertilizante de liberação lenta no tratamento T6 (28,8 g) pode ter aumentado a espessura das folhas geradas. Esse fato pode ter ocorrido pela diminuição na disponibilidade de água, pelo modo de ação do mesmo, podendo se estabelecer uma cutícula, para diminuição por evapotranspiração.

2.5 CONCLUSÃO

O desenvolvimento do presente trabalho possibilitou a criação de um protocolo para a micropropagação de lúpulo var. Chinook. Na introdução *in vitro* é possível concluir que existe a necessidade de uma assepsia específica para a variedade Chinook, pois ao utilizar um tipo de assepsia estabelecida para outra variedade de lúpulo, encontrada na literatura, não houve sucesso. A concentração de citocininas utilizadas para a multiplicação *in vitro* não é favorável, contudo, é necessário testar outras concentrações a fim de buscar uma forma para aumentar o poder de repicagem em um menor tempo. A utilização da luz LED Green Power, da marca Philips, e o biorreator de imersão temporária, patenteado pela Embrapa, são observados como alternativas para acelerar a multiplicação *in vitro* de lúpulo, refletindo positivamente no processo de obtenção de mudas e promissoras para o cultivo da espécie. Na fase de aclimatização, os resultados demonstram que a utilização de fertilizantes contribui satisfatoriamente para o crescimento e desenvolvimento das mudas de lúpulo. A dose de NPK com 12,48 g de ureia, 14,4 g de superfosfato simples e 11,52 g de cloreto de potássio demonstra bons resultados para a parte aérea da variedade Chinook de lúpulo e pode ser considerada uma melhoria para as mudas aclimatizadas. O protocolo de micropropagação desenvolvido para a variedade Chinook de lúpulo possibilita a obtenção de mudas saudáveis para utilização em outros projetos de pesquisa com a espécie vegetal, além de proporcionar o início do banco de germoplasma de lúpulo no Laboratório de Micropropagação de Plantas da Universidade Federal do Paraná.

2.6 ORGANOGrama DO PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO DE LÚPULO VAR. CHINOOK



2.7 REFERÊNCIAS

ALICEWEB, (Disponível em: <http://aliceweb.mdic.gov.br/>), 2017.

CARVALHO, M. F. C.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. **Fatores inerentes à micropropagação**. EMBRAPA Algodão, Campina Grande, 2016.

CERVBRASIL, **Associação Brasileira da Indústria da Cerveja**, 2017. (Disponível em: <http://www.cervbrasil.org.br/paginas/index.php>)

CHAPIN, F. S. The mineral nutrition of wild plants. **Annual review of ecology and systematics**, v. 11, n. 1, p. 233 – 260, 1980.

COMPO EXPERT BRASIL FERTILIZANTES. **Basacote Mini 6M**. (Disponível em: <http://www.compo-expert.com/br/produtos/fertilizantes-de-liberacao-controlada-crf.html>).

DODDS, J. H.; ROBERTS, L. W. **Experiments in Plant Tissue Culture**. Cambridge, University Press, 1985.

FAGERIA, V. D. Nutrient interacions in crop plants. **Journal of Plant Nutrition**, v. 24, p. 1269-1290, 2001.

FRANCA, M. A. **Micropropagação de cana-de-açúcar cultivar RB966928. Curitiba**. Dissertação em Agronomia, Universidade Ferderal do Paraná, Curitiba, 2016.

GOMES, E. N. **Aspectos fisiológicos, morfológicos e nutrição mineral no acúmulo de biomassa e glicosídeos diterpênicos em *Stevia rebaudiana* Bertoni**. Dissertação em Agronomia, Universidade Ferderal do Paraná, Curitiba, 2017.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. MICROPROPAGAÇÃO. IN TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **CULTURA DE TECIDOS E TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE PLANTAS**. BRASÍLIA, EMBRAPA, V. 1, P. 183-260, 1998.

GUARDIA, M. D. D.; BENLLOCH, M. Effects of potassium and gibberellic acid on stem growth of whole sunflower plants. **Physiologia Plantarum**, v.49, p. 443-448, 1980.

GUARESCHI, R. F.; GAZOLLA, P. R.; PERIN, A.; SANTINI, J. M. K. Adubação antecipada na cultura da soja com superfosfato triplo e cloreto de potássio revestidos por polímeros. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 643-648, 2011.

HORLEMANN, C.; SCHWEKENDIEK, A.; HÖHNLE, M.; WEBER, G. Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of hop (*Humulus lupulus* L.). **Plant Cell Reports**, v. 22, p. 210-217, 2003.

International Hop Growers' Convention. 2017 (Disponível em <http://www.hmelj-giz.si/ihgc/act.htm>).

KIM, S. J., HAHN E. J., HEO J. W., PAEK K. Y. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v. 110, p. 143-151, 2004.

LIANG, R.; LIU, M. Preparation and Properties of a Double-Coated Slow-Release and Water-Retention Urea Fertilizer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p. 1392-1398, 2006.

OLIVEIRA, M. V. R. **Crescimento do lúpulo influenciado por calagem e fornecimento de fósforo**. Dissertação em Ciências do Solo, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2016.

POUDEL, P. R.; KATAOKA, I.; MOCHIOKA, R. EFFECT OF RED AND BLUE LIGHT EMITTING DIODES ON GROWTH AND MORPHOGENESIS OF GRAPES. **PLANT CELL, TISSUE AND ORGAN CULTURE**, V. 92, P. 147-153, 2008.

ROCHA, P. S. G.; OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B.; SANTOS, U. L. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1922-1928, 2010.

ROCHA, P. S. G. D.; OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B. Micropropagação de cana-de-açúcar com diodos emissores de luz e ajuste da concentração de sacarose do meio de cultivo. **Ciência Rural**, v. 43, p. 1168-1173, 2013.

ROCHA, P. S. G.; OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B. Diodos emissores de luz e concentrações (LEDs) na micropropagação de amoreira-preta cv. Tupy. **Horticultura Argentina**, v. 32, p. 14-19, 2013.

ROSSA, Ü. B.; ANGELO, A. C.; BOGNOLA, I. A.; WESTPHALEN, D. J. MILANI, J. E. F. Fertilizante de liberação controlada no desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus grandis*. **Floresta**, v. 45, p. 85-96, 2015.

ROY, A. T.; LEGGETT, G.; KOUTOULIS, A. Development of a shoot multiplication system for hop (*Humulus lupulus* L.). **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 37, p. 79-83, 2001.

SHIN, K. S.; MURTHY, H. N.; HEO, J. W.; HAHN, E. J.; PAEK, K.Y. The effect of light quality on the growth and development of *in vitro* cultured *Doritaenopsis* plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, p. 339-343, 2008.

SMITH, R. H. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. 2 ed., San Diego, CA: Academic Press, 2000.

SOUSA, M. J. A. C., **Obtenção de plantas de *Humulus lupulus* L. resistentes a vírus**. Tese em Biotecnologia Vegetal, Universidade de Lisboa, 2005.

TRENKEL, M.E. **Improving fertilizer use efficiency: controlled-release and stabilized fertilizers in agriculture**. Paris: International Fertilizer Industry Association, p. 151, 1997.

VICTÓRIO, C.P.; KUSTER, R. M.; LAGE, C. L. S. Qualidade de luz e produção de pigmentos fotossintéticos em plantas *in vitro* de *Phyllanthus tenellus* Roxb. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 213-215, 2007.

WU, L.; LIU, M. Preparation and properties of chitosan-coated NPK compound fertilizer with controlled-release and water-retention. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, p. 240-247, 2008.

ZAHRANI, S. Utilization of polyethylene and paraffin waxes as controlled delivery systems for different fertilizers. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 39, p. 367-371, 2000.

3 ORGANOGÊNESE DE LÚPULO VAR. CHINOOK

RESUMO

Humulus lupulus L., popularmente conhecido como lúpulo, é uma espécie pertencente à família Cannabaceae, utilizado principalmente pela indústria cervejeira e de grande interesse econômico mundial. A importância da espécie e a demanda pelo mercado brasileiro fazem com que sejam necessários estudos para o início do cultivo comercial de lúpulo no Brasil, com isso o melhoramento genético vegetal é uma ferramenta importante na exploração da espécie que não é nativa. O melhoramento de lúpulo pode ser feito com a utilização de calos *in vitro*, porém há a necessidade de um protocolo específico de organogênese para cada variedade, pois estudos demonstram que a regeneração dos calos é um desafio por apresentar baixos índices, quando alcançada. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo de organogênese para a variedade Chinook de lúpulo. O efeito dos explantes (folha, segmento internodal e segmento de raiz) com diferentes reguladores vegetais (4,4 μ M TDZ, 4,4 μ M BAP, 0,06 μ M IAA e 4,4 μ M BAP+ 0,06 μ M IAA), adicionados ao meio de cultura MS semi-sólido, na indução a formação e na regeneração de calos foram avaliados. A porcentagem de formação de calos (93,75%) e o diâmetro dos calos formados (0,6125 cm) no explante raiz com meio de cultura suplementado de TDZ foram inéditos, pois se trata de um tipo explante ainda não abordado para organogênese em lúpulo. A média superior de porcentagem de brotações formadas foi encontrada quando se utilizou o explante segmento internodal com TDZ (69,58%). O enraizamento avaliado na interação do explante segmento internodal com a auxina IAA (média 34,37%) foi o com porcentagem superior. As plantas regeneradas foram cultivadas *in vitro* em meio MS semi-sólido sem regulador vegetal e foram multiplicadas com sucesso.

Palavras-chave: *Humulus lupulus* L. Calos. Reguladores vegetais. Regeneração.

HOP VAR. CHINOOK ORGANOGENESES

ABSTRACT

Humulus lupulus L., popularly known as hop, is a species belonging to the Cannabaceae family, used mainly by the brewing industry and of great economic interest worldwide. The species importance and the demand from Brazilian market makes it necessary to study for the beginning of commercial hop cultivation in Brazil, so that plant genetic improvement is an important tool in the exploration of the species that is not native. The hop improvement can be done with the use of calli *in vitro*, however, there is a necessity for a specific organogenesis protocol for each variety, since studies show that callus regeneration is a challenge because it presents low rates when it is reached. The objective of this work was to establish an organogenesis protocol for hop Chinook variety. The effect of the explants (leaf, internodal segment and root segment) with different plant regulators (4.4 μ M TDZ, 4.4 μ M BAP, 0.06 μ M IAA and 4.4 μ M BAP + 0.06 μ M IAA), added to the semi-solid MS culture medium, in the induction of callus formation and regeneration were evaluated. The callus formation percentage (93.75%) and the calli formed diameter (0.6125 cm) in the root explant with TDZ supplemented culture medium were unpublished, since it is an explant type not yet addressed for organogenesis in hop. The internodal segment explant with TDZ shows the sprouting upper average percentage (69.58%). The rooting evaluated in the interaction of the internodal segment explant with the auxin IAA (34.37%) was the highest percentage. The regenerated plants were cultured *in vitro* in semi-solid MS medium without plant regulator and were successfully multiplied.

Key-words: Hop. Callus. Plant Regulator. Regeneration.

3.2 INTRODUÇÃO

O lúpulo é uma espécie vegetal de enorme importância comercial mundial, principalmente por ser um item essencial na fabricação de uma das bebidas alcoólicas mais consumidas: cerveja. A importância econômica faz com que haja interesse em aprimorar o cultivo da espécie e em realizar processos de melhoramento.

A organogênese possibilita a aplicação de técnicas de manipulação genética visando o melhoramento genético vegetal, como a transformação por biobalística ou por *Agrobacterium tumefaciens* (LITZ; HAMMERSCHLAG, 1992).

A cultura de calos de lúpulo se iniciou para verificar infecção fungíca (GRIFFIN; COLEY-SMITH, 1968). Teve diversas pesquisas para contornar doenças (CONNELL; HEALE, 1986), como eliminação de vírus (ADAMS, 1975), bem como para o estabelecimento (LANGEZAAL; SCHEFFER, 1992) e regeneração (HEALE et al., 1989) de calos verdes (SKOF et al., 2007) provindos de diferentes explantes: segmentos de folhas, segmentos de pecíolos e segmentos internodais.

A regeneração de plantas a partir de calos do lúpulo foi relatada para as variedades Shinshawase, Italy-2 (MOTEGI, 1979), Bragança, a partir de calos derivados do caule e do pecíolo, Brewers Gold, de calos derivados do pecíolo (BATISTA et al., 1996), Challenger, Eastwell Golding, Earlybird Golding (CONNELL; HEALE, 1986; HEALE et al., 1989), Nugget, de calos provenientes de segmento internodal (GURRIARÁN et al., 1999).

Os trabalhos de organogênese em lúpulo são escassos e não abordam todas as variedades encontradas, tendo em vista que cada variedade necessita de um protocolo diferente a ser seguido, com requisitos específicos para possibilitar a regeneração dos calos (GURRIARÁN et al., 1999).

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um protocolo de organogênese para a variedade Chinook de lúpulo.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.2 LOCALIZAÇÃO E MATERIAL VEGETAL

Os experimentos de organogênese de lúpulo var. Chinook foram desenvolvidos em 2017, a partir de plantas propagadas *in vitro*, e realizados no laboratório de Micropropagação de Plantas, localizado no Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (Curitiba – PR).

3.3.3 INDUÇÃO A FORMAÇÃO DE CALOS *IN VITRO*

Os experimentos de organogênese foram iniciados a partir de explantes de lúpulo da variedade Chinook estabelecidos e multiplicados *in vitro* por um período de três meses, sob condições controladas e assépticas. Segmentos internodais de 1 cm, segmentos de raízes de 1 cm e folhas de aproximadamente 1 cm, foram adicionados em frascos de vidro contendo 40 mL de apenas meio de cultura MS semi-sólido (Anexo 1) e meio de cultura MS semi-sólido com diferentes reguladores vegetais. Os reguladores vegetais utilizados separadamente foram 4,4 μM de TDZ (thidiazuron), 4,4 μM de BAP (6-benzilaminopurina), 0,06 μM de IAA (ácido indolacético) e 4,4 μM de BAP com 0,06 μM de IAA.

Os tratamentos foram caracterizados pela combinação entre os fatores regulador vegetal (testemunha, TDZ, BAP, IAA e BAP + IAA) e tipo de explante (segmento internodal, segmento de raiz e folha). Os tratamentos foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial 5x3, em sala de cultura de tecidos vegetais, sob condições controladas.

O experimento consistiu em quatro repetições por tratamento, com dez explantes por repetição, totalizando 600 explantes. A formação de calos e a coloração dos mesmos foram avaliadas após um período de 30 dias da instalação do experimento.

3.3.4 PROLIFERAÇÃO E REGENERAÇÃO DE CALOS *IN VITRO*

Para proliferar os calos de lúpulo var. Chinook *in vitro* foi feito um subcultivo 30 dias após o início do experimento de formação de calos, repetindo o delineamento e a formulação dos meios de cultura onde se encontravam (descrito no tópico 3.3.2).

O experimento consistiu em quatro repetições por tratamento, com dez explantes por repetição, totalizando 600 explantes. O diâmetro dos calos formados foi avaliado 30 dias após o subcultivo, sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar.

A avaliação da regeneração *in vitro* dos calos de lúpulo var. Chinook consistiu na análise da formação de brotações e de raízes a partir das estruturas dos calos 60 dias após o início do experimento. As raízes provenientes do explante inicial não foram consideradas e as brotações formadas foram retiradas e inseridas em frascos de vidros com 40 mL de meio de cultura MS semi-sólido e cultivadas com facilidade em sala de cultura de tecidos vegetais, sob condições controladas.

3.3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variâncias dos tratamentos foram avaliadas quanto a sua homogeneidade pelo teste de Bartlett. Os dados dos experimentos os quais apresentaram muitos resultados nulos foram transformados para possibilitar a aplicação do teste de Bartlett. As variáveis cujas variâncias mostraram-se homogêneas tiveram os efeitos dos tratamentos testados por meio do teste F da de variância. As médias foram comparadas pelo teste de comparação de médias Tukey a 1% de probabilidade. Para aplicação das análises foi utilizado o programa ASSISTAT® (SILVA; AZEVEDO, 2016).

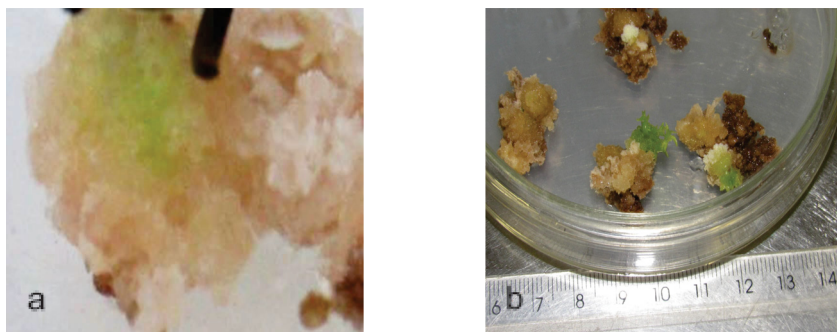
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos experimentos de organogênese de lúpulo var. Chinook demonstraram interação estatística entre os fatores regulador vegetal (testemunha, TDZ, BAP, IAA e BAP + IAA) e tipo de explante (folha, segmento internodal e segmento de raiz) em todas as avaliações feitas (Anexo 2 – tabelas g / h).

3.4.1 INDUÇÃO A FORMAÇÃO DE CALOS *IN VITRO*

Os diferentes explantes de lúpulo adicionados nos diferentes reguladores vegetais geraram dois tipos de calos, os calos que se tornaram esverdeados e os calos amarelados (Figura 4). Batista et al. (2000) também descreveram a formação dessas duas diferentes colorações de calos para a variedade Eroica de lúpulo, o qual denominou GONCs os calos esverdeados e YGCCs os amarelados.

Figura 4 – Coloração de calos de lúpulo var. Chinook formados: a) calos esverdeados; b) calos amarelados.

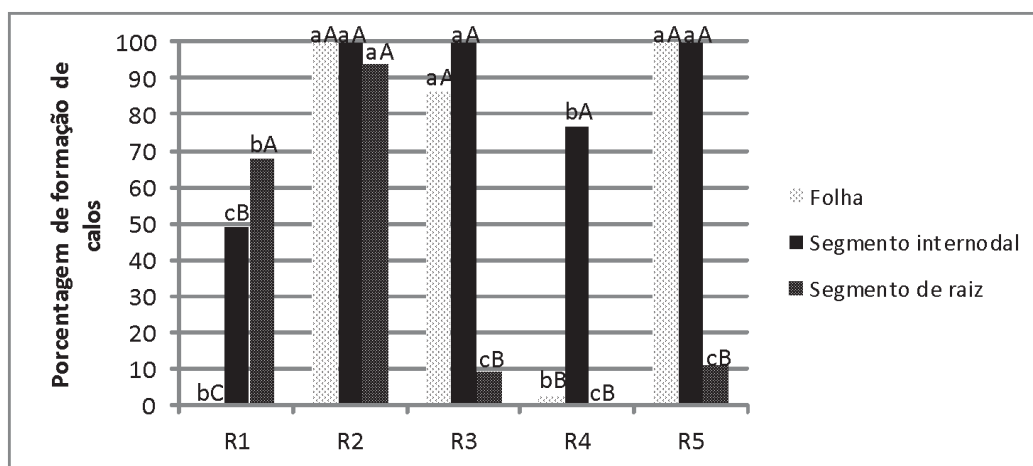


Fonte: A autora (2017).

Na primeira avaliação, realizada 30 dias após a instalação do experimento, o meio de cultura MS suplementado com 4,4 μ M de TDZ apresentou porcentagens de formação de calos que não diferiram estatisticamente e foram satisfatórias para todos os tipos de explantes – folha, segmento internodal e segmento de raiz. A adição do TDZ (thidiazuron) ao meio de cultura MS gerou médias superiores de porcentagem de formação de calos e revelou que existe a possibilidade do explante

segmento de raiz de lúpulo formar calos, até então não explorado na literatura (Figura 5).

Figura 5 – Porcentagem de formação de calos de lúpulo var. Chinook.



** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$) teste de Tukey. Letras minúsculas – reguladores vegetais; letras maiúsculas – explantes. C.V. (%) = 5,77. R1 – Testemunha; R2 - 4,4 μ M TDZ; R3 - 4,4 μ M BAP; R4 - 0,06 μ M IAA; R5 4,4 μ M BAP + 0,06 μ M IAA.

O TDZ é utilizado como um regulador vegetal que, dependendo da concentração, tem ação similar a uma citocinina. Para algumas espécies, este regulador tem a capacidade de estimular a divisão celular e o aumentar o crescimento de calos dependentes de citocininas (PETRI et al., 1992; LU, 1993). Murthy et al. (1998), em uma revisão sobre TDZ, citou a superioridade na proliferação de tecido calogênico do TDZ em relação a outros reguladores vegetais.

A indução de calos é dependente de um balanço hormonal equilibrado de concentrações de auxinas e citocininas e, no caso do lúpulo, provavelmente, o fornecimento da fenilureia (TDZ) utilizada em baixa concentração e de ação similar a citocinina, no meio de cultura foi suficiente para se aproximar ao conteúdo endógeno de auxinas do explante. O conteúdo endógeno de auxina em lúpulo é estimado maior do que a concentração endógena de citocinina, pois no balanço auxina / citocinina natural ocorre a rizogênese espontânea (SOUSA, 2005).

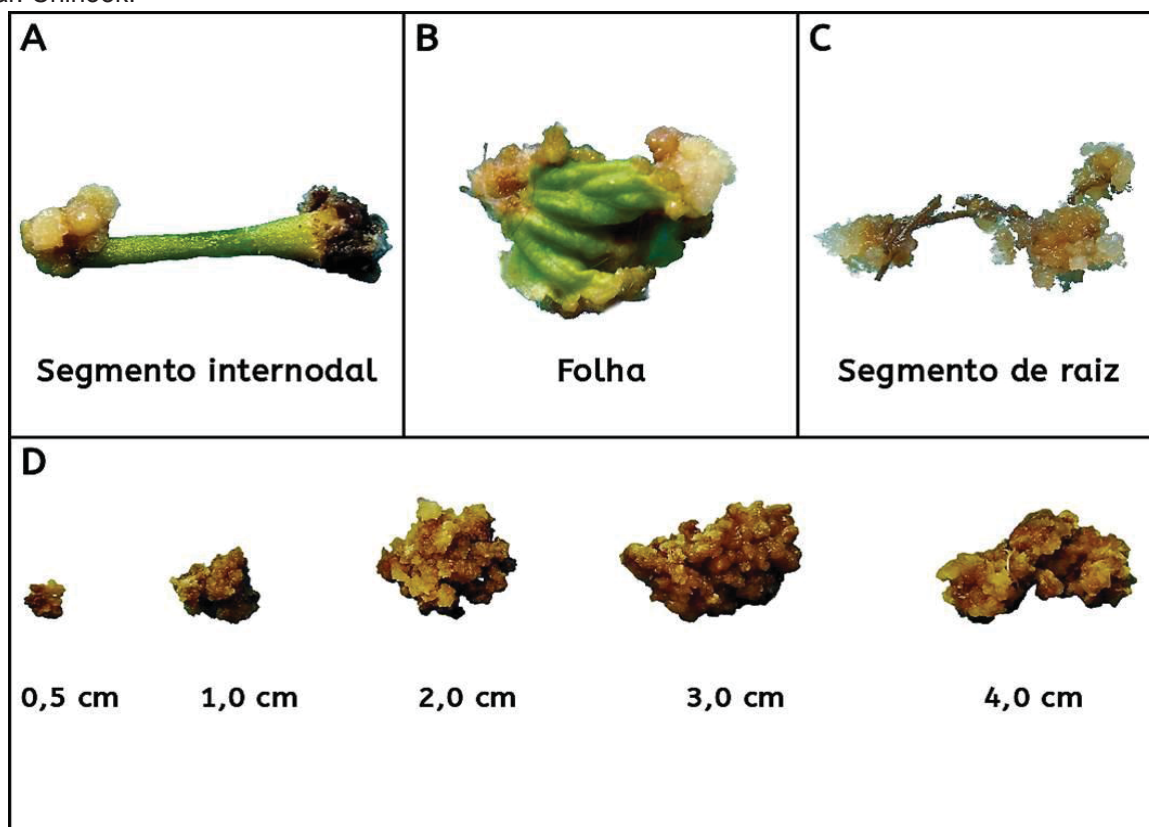
O meio de cultura MS suplementado com 4,4 μ M de BAP, 0,06 μ M de IAA e 4,4 μ M de BAP + 0,06 μ M de IAA não demonstraram diferença estatística com o explante segmento de raiz, resultados insatisfatórios para a formação de calos.

Os explantes folha e segmento internodal com citocinina (TDZ e BAP) presente no meio de cultura tiveram resultados de médias superiores de porcentagens na indução à formação de calos e não diferiram estatisticamente (Figura 5). A concentração de citocinina foi provavelmente suficiente para, em conjunto com a auxina endógena, e, no meio de cultura com reguladores vegetais BAP e IAA, com a baixa concentração de auxina inserida no meio de cultura, um balanço citocinina / auxina equilibrado.

O explante folha adicionado ao meio MS suplementado com auxina (IAA) gerou formação de calos foi muito inexpressiva, provavelmente porque mesmo sendo adicionada em baixa concentração (0,06 μM), o IAA somou-se a concentração endógena de auxina da folha e pode ter proporcionado uma elevada concentração deste regulador em relação à citocinina endógena.

3.4.2 PROLIFERAÇÃO DE CALOS *IN VITRO*

Figura 6 – Formação e diâmetros de calos provenientes de diferentes tipos de explantes de lúpulo var. Chinook.



Fonte: A autora, editado por Marília Machado (2017).

Tabela 10. Diâmetros de calos (cm) formados de lúpulo var. Chinook a partir de diferentes reguladores vegetais e tipos de explantes.

Vegetative e tipos de explantes:									
	Folha			Segmento internodal			Segmento de raiz		
Testemunha	0,0000	c	A	0,2525	c	A	0,0200	b	A
TDZ (4,4 µM)	2,0594	a	A	1,9482	ab	A	0,6125	a	B
BAP (4,4 µM)	1,0365	b	B	1,6413	b	A	0,0150	b	C
IAA (0,06 µM)	0,0400	c	B	0,5450	c	A	0,0000	b	B
BAP (4,4 µM) + IAA (0,06 µM)	1,7000	a	B	2,0975	a	A	0,0200	b	C
CV% = 10,31									

** significativo ao nível de 1% de probabilidade no teste de Tukey. Letras minúsculas – colunas; letras maiúsculas – linhas.

O explante segmento internodal apresentou maiores diâmetros de calos formados quando adicionado ao meio MS suplementado com BAP + IAA, TDZ e BAP (Tabela 10).

O explante folha no meio de cultura sem regulador vegetal e o explante segmento de raiz no tratamento do meio de cultura MS suplementado com auxina (IAA) apresentaram diâmetro de calos igual à zero, pois não ocorreu formação de calos nestes.

As diferenças na formação dos calos são observadas, pois os tipos de explantes podem apresentar variações em sensibilidade quando em contato com reguladores de crescimento vegetal e/ou devido aos teores endógenos de hormônios que existem em cada parte da planta (KARP, 1995) (Figura 6).

3.4.3 REGENERAÇÃO DE CALOS *IN VITRO*

Não foi constatada uma relação entre classe de reguladores de crescimento com a formação de brotos e raízes, é possível que esse efeito esteja relacionado com a concentração endógena de hormônios dos próprios explantes (VALLE, 2003).

Os calos formados de coloração clara tornaram-se esverdeados e formaram brotações. Os calos de coloração amarelados tornaram-se marrons, com aspecto de calos oxidados, multiplicaram, porém não foi possível a regeneração dos mesmos. Sousa (2005) obteve resultados diferentes para calos amarelados da variedade Bragança de lúpulo, os quais posteriormente apresentaram aspecto necrótico, se desagregaram e morreram.

A regeneração dos calos de lúpulo var. Chinook ocorreu com taxa superior no explante segmento internodal no meio de cultura suplementado com TDZ (Tabela 11;

Figura 7). A indução da organogênese nessa interação gerou brotações 60 dias após a instalação do experimento e aproximadamente 30 dias após o surgimento de calos esverdeados. Gubis et al. (2003), testaram os efeitos de diferentes citocininas em *Humulus lupulus* L. e também obtiveram maior resultado de regeneração a partir de TDZ.

Tabela 11. Porcentagem de formação de brotações (%) provenientes de calos de lúpulo var. Chinook a partir de diferentes reguladores vegetais e tipos de explantes.

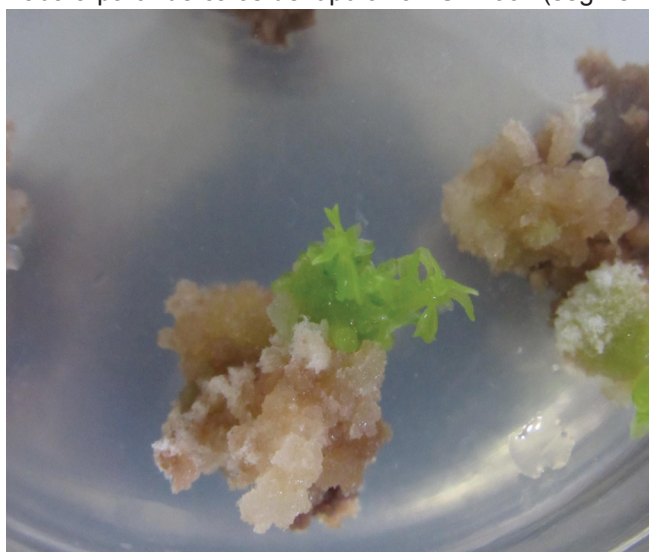
	Folha (%)			Segmento internodal (%)			Segmento de raiz (%)		
Testemunha	0	a	A	0	b	A	0	a	A
TDZ (4,4 µM)	3,13	a	B	69,58	a	A	0	a	B
BAP (4,4 µM)	0	a	A	4,35	b	A	0	a	A
IAA (0,06 µM)	0	a	A	1,73	b	A	0	a	A
BAP (4,4 µM)+IAA (0,06 µM)	0	a	A	8,33	b	A	0	a	A

C. V. (%) = 9,15

** significativo ao nível de 1% de probabilidade no teste de Tukey. Letras minúsculas – colunas; letras maiúsculas – linhas.

Devido ao TDZ ser uma fenilureia utilizada como citocinina, sugere-se que esse fato acrescido ao tipo de explante segmento internodal geraram um balanço hormonal favorável, e a ação da citocinina possibilitou a emissão de brotações. Pois a organogênese é controlada pela concentração de reguladores vegetais e pelo balanço citocinina/auxina presentes no meio de cultura (HANDRO; FLOH, 1990).

Figura 7 – Brotação formada a partir de calos de lúpulo var. Chinook (segmento internodal, TDZ).



Fonte: A autora (2017).

A citocinina BAP pode não ter sido de eficiência semelhante por consequência de o TDZ ser mais potente que as aminopurinas e ambas terem sido utilizadas em concentrações equimolares, como sugerido por Huetteman e Preece (1993) para conduções de experimentos preliminares. A fenilureia apresenta estrutura diferente das citocininas naturais pela ausência da base nitrogenada (adenina) (LAMEIRA et al., 1997). O meio de cultura suplementado com TDZ pode ter sido o único eficiente devido à capacidade de estimular ou reduzir o metabolismo de degradação de citocininas, o que gera diferença nas concentrações endógenas de citocininas na planta (FLORES et al., 2009).

O TDZ é considerado uma citocinina a base de ureia e, por isso, as enzimas CK oxidases não conseguem degradá-lo, podendo permanecer no tecido das plantas nas quais foi inserido (ZAYED; ELBAR, 2015).

Segundo Cato et al. (2006), muitos estudos têm mostrado que citocininas do tipo fenilureia, como o thidiazuron (TDZ), são inibidores eficientes da atividade da enzima a qual degrada citocininas. Análises da cinética da proteína codificada pelo gene de oxidase de citocinina demonstraram que as fenilureias atuam como inibidores competitivos de citocininas para o sítio ativo da referida enzima (KERBAUY; PERES, 2004).

Aparentemente, o desempenho superior do TDZ pode ser devido à relação mais favorável da atividade citocinina em concentrações equimolares e/ou a forma de ação diferir de outros tipos de citocininas no processo de desdiferenciação e rediferenciação celular (KANEDA et al., 1997). Também, como citado por Murthy et al. (1995) em um trabalho feito com amendoim (*Arachis hypogaea*), pela possibilidade de deter a acumulação de auxinas e citocininas endógenas na planta.

A não ocorrência da regeneração dos calos formados a partir do explante segmento de raiz pode ter sido devido à ação e a concentração endógena de auxina na raiz, nas quais são altas por serem locais de produção. O aumento na concentração de citocinina exógena, do tipo fenilureia, aplicada ao meio de cultura, tem a possibilidade de ocorrer regeneração.

Os calos provenientes do explante folha não apresentaram potencial regenerativo para o meio de cultura sem regulador vegetal, com BAP, com IAA e com BAP + IAA. Embora não tenham apresentado diferença estatística, quando inseridos no meio de cultura com TDZ, os calos apresentaram uma baixa porcentagem de regeneração. Mesmo apresentando média baixa (3,13%), supõe-se

que caso ocorra o aumento da concentração de thidiazuron, a resposta seja favorável.

Os calos provenientes do explante segmento internodal, quando inseridos no meio de cultura MS sem regulador vegetal, não apresentaram regeneração, demonstrando a necessidade da adição de regulador vegetal para que haja a formação de brotações proveniente de calos.

Tabela 12. Porcentagem de formação de raiz (%) proveniente de calos de lúpulo var. Chinook a partir de diferentes reguladores vegetais e tipos de explantes.

	Folha			Segmento internodal			Segmento de raiz		
Testemunha	0	a	A	0	c	A	0	a	A
TDZ (4,4 μ M)	0	a	A	0	c	A	0	a	A
BAP (4,4 μ M)	1,04	a	A	1,04	c	A	0	a	A
IAA (0,06 μ M)	0	a	B	34,37	a	A	0	a	B
BAP (4,4 μ M) + IAA (0,06 μ M)	0	a	B	8,75	b	A	0	a	B
C. V. (%) = 2,12									

** significativo ao nível de 1% de probabilidade no teste de Tukey. Letras minúsculas – colunas; letras maiúsculas – linhas.

A emissão de raízes a partir dos calos formados foi observada no explante segmento internodal, diferindo estatisticamente apenas quando o explante foi inserido nos meios de cultura MS suplementados com auxina, IAA e BAP + IAA (Tabela 12).

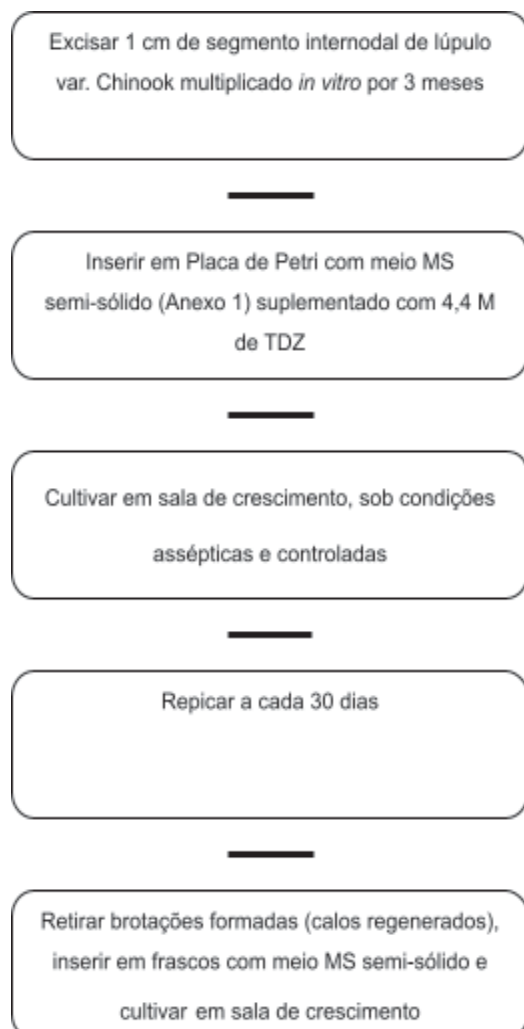
A formação de raízes apresentou resultados superiores quando em contato com auxina, no tratamento do meio MS suplementado com IAA, isso pode ser explicado devido à necessidade de ocorrer um balanço hormonal auxina-citocinina na planta, onde a auxina, neste caso, deverá ser superior. Também pode demonstrar o papel da auxina no enraizamento. Quando associada à concentração 4,4 μ M da citocinina BAP, a porcentagem decresce aproximadamente para um quarto da porcentagem de formação de raízes obtidas a partir da inserção no meio apenas com auxina.

A rizogênese direta, proveniente dos explantes iniciais e não proveniente dos calos formados, não foi considerada na avaliação.

3.5 CONCLUSÃO

O desenvolvimento do presente trabalho possibilitou a criação de um protocolo para a organogênese em lúpulo var. Chinook. Os resultados positivos na regeneração dos calos obtidos a partir do explante segmento internodal no meio de cultura MS suplementado com TDZ (4,4 μ M) permitem encontrar um regulador eficiente para a variedade, tendo em vista que existe a necessidade de ser específico. Porém, são necessários testes com concentrações maiores de outras citocininas que também podem vir a ser utilizadas. O desenvolvimento do protocolo de organogênese com a variedade Chinook de lúpulo possibilita a utilização para futuros projetos de melhoramento genético vegetal.

3.6 ORGANOGRAMA DO PROTOCOLO DE ORGANOGÊNESE DE LÚPULO VAR. CHINOOK



3.7 REFERÊNCIAS

BATISTA, D.; ASCENSÃO, L.; SOUSA, M. J.; PAIS, M. S. Adventitious shoot mass production of hop (*Humulus lupulus* L.) var. Eroica in liquid medium from organogenic nodule cultures. **Plant Science**, v. 151, p. 47-57, 2000.

CATO, Stella C.; CASTRO, Paulo R. C. Redução da estatura de plantas de soja causada pelo ácido 2,3,5 - triiodobenzóico. **Ciência Rural**, v.36, n. 3, 2006.

CONNELL, S.A.; HEALE, J.B. *In vitro* use of *Verticillium albo-atrum* culture filtrates to select for disease resistance in regenerating *callus* cultures of hop (*Humulus lupulus* L.). **Nuclear techniques and *in vitro* culture for plant improvement**, Vienna, p. 309-313, 1986.

FLORES, R.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J.; GARLET, T. M. B. Benzylaminopurine (BAP) and thidiazuron (TDZ) on *in vitro* propagation of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, p. 292-299, 2009.

GRIFFIN, M.J.; COLEY-SMITH, J.R. The establishment of hop tissue cultures and their infection by *Pseudoperonospora humuli* (Miy. & Tak.) Wilson under aseptic culture. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 53, p. 231-236, 1968.

GUBIS, J.; LAJCHOVA, Z.; FARAGO, J.; JUREKOVA, Z. Effect of genotype and explant type on shoot regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *in vitro*. **Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 39, p. 9-14, 2003.

HANDRO, W.; FLOH, E.I.S. **Aspectos básicos do controle da morfogênese *in vitro***. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas. Empraba, Brasília, p. 203-212, 1990.

HEALE, J.B.; LEGG, T.; CONNELL, S. *Humulus lupulus* L.: *In vitro* culture; attempted production of bittering components and novel disease resistance. **Medicinal and Aromatic Plants II**, v. 7, p. 264-285, 1989.

HUETTEMAN, C. A.; PREECE, J. E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 33, p. 105-109, 1993.

KANEDA, Y.; TABELI, Y.; NISHIMURA, S.; HARADA, K.; AKIHAMA, T.; KITAMURA, K. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans [*Glycine max*(L.) Merr.]. **Plant Cell Reports**, v.17, p. 8-12, 1997.

KARP, A. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. **Euphytica**, v. 85, p. 395-302, 1995.

KERBAUY, G.B.; PERES, L. E. P. **Fisiologia Vegetal**, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.

LAMEIRA, O. A.; PINTO, J. E. B. P.; CARDOSO, M. G.; GAVILANES, M. L. Efeito de thidiazuron na indução e manutenção de calos de erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.). **Ciência Rural**, v.27, p. 47-49, 1997.

LANGEZAAL, C.R.; SCHEFFER, J.J.C. Initiation and growth characterization of some hop cell suspension cultures. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 30, p. 159-164, 1992.

LITZ, E. D. S.; HAMMERSCHLAG, R. E. **Biotechnology of perennial fruit crops**, CAB International, Wallingford, p. 229-262, 1992.

LU, C. Y. The use of thidiazuron in tissue cultures. **In vitro, Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 29, p. 92-96, 1993.

MOTEGI, T. Induction of redifferentiated plants from hop leaf callus culture. Crop Science Society of Japan, v. 45, p. 175-176, 1976. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

MURTHY, B. N. S.; MURCH, S. J.; SAXENA, P. K. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. **In vitro Cellular and Development Biology - Plant**, v. 34, p.267-275, 1998.

MURTHY, B. N. S.; MURCH, S. J.; SAXENA, P.K. Thidiazuron- induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. **Physiologia Plantarum**, v.94, p. 268-276, 1995.

PŠENÁKOVÁ, I.; GAŠPÁRKOVÁ, L.; FARAGÓ, J. Polyphenol and flavonoid contents of hop *callus* and cell suspension cultures. **Proceeding of science**, p. 109, 2009.

PETRI, J. L.; ARGENTA, L. C.; SUZUKI, A. Efeito do Thidiazuron no tamanho e desenvolvimento das frutas da macieira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 14, p. 127-134, 1992.

ROY, A. T.; LEGGETT, G.; KOUTOULIS, A. Development of a shoot multiplication system for hop (*Humulus lupulus* L.). **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 37, p. 79-83, 2001.

SŤKOF, S.; BOHANEK, B.; KASTELEC, D.; LUTHAR, Z. Spontaneous induction of tetraploidy in hop using adventitious shoot regeneration method. **Plant Breeding**, v. 126, p. 416-421, 2007.

SOUSA, M. J. A. C., **Obtenção de plantas de *Humulus lupulus* L. resistentes a vírus**. Tese em Biotecnologia Vegetal, Universidade de Lisboa, 2005.

VALLE, R. C. S C. **Estratégias de cultivo de células de Pimenta longa (*Piper hispidinervum*) e determinação de parâmetros cinéticos**. Tese em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

ZANOLI, P.; ZAVATTI, M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 383-396, 2008.

ZAYED, E. M. M.; ELBAR, O. H. A. Morphogenesis of immature female inflorescences of date palm *in vitro*. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 60, p.113-120, 2015.

**ANEXO 1 – PARA 1 LITRO DE MEIO DE CULTURA MS (MURASHIGE
& SKOOG, 1962)**

SOLUÇÃO ESTOQUE A	NH ₄ NO ₃ (82,5 g/L)	20 mL
SOLUÇÃO ESTOQUE B	KNO ₃ (95 g/L)	20 mL
SOLUÇÃO ESTOQUE C	H ₃ BO ₃ (1,24 g/L) KH ₂ PO ₄ (34 g/L) KI (0,166 g/L) Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (0,05 g/L) CaCl ₂ .6H ₂ O (0,005 g/L)	5 mL
SOLUÇÃO ESTOQUE D	CaCl ₂ .2H ₂ O (88 g/L)	5 mL
SOLUÇÃO ESTOQUE E	MgSO ₄ .7H ₂ O (74 g/L) MnSO ₄ .4H ₂ O (3,38 g/L) ZnSO ₄ .7H ₂ O (1,72 g/L) CuSO ₄ .5H ₂ O (0,005 g/L)	5 mL
SOLUÇÃO ESTOQUE F	Na ₂ EDTA (7,45 g/L) Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O (5,5 g/L)	5 mL
TIAMINA	50 mg / 1000 mL	2 mL
ÁCIDO NICOTÍNICO	50 mg / 1000 mL	10 mL
PIRIDOXINA	50 mg / 1000 mL	10 ml
GLICINA	200 mg / 1000 mL	10 mL
MIO-INOSITOL	100 mg	
SACAROSE	30 g	
ÁGAR	6 g	

ANEXO 2 – TABELAS DE ANÁLISES DE VARIÂNCIA

Tabela a. Resumo da análise de variância para taxa de sobrevivência de explantes de lúpulo var. Chinook em diferentes tipos de assepsia para introdução *in vitro*

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrados Médios
Explante	2	11,43333**
Assepsia	1	45,63333**
Int. (ExplanteXAssepsia)	2	11,43333**
Tratamentos	5	18,27333**
Resíduo	24	0,08333

** significativo ao nível de 1% de probabilidade no teste de Tukey. Explantes: Gema apical, gema lateral e folha em corte longitudinal. Assepsias: Etanol 70% (5 min.); hipoclorito de sódio 7% + 2 gotas Tween 20 - 0,01% (10 min.); 3 lavagens (1 min. cada) água destilada autoclavada (HORLEMANN et al., 2003) // Hipoclorito 10 – 12% (24 min.); 4 lavagens (1 min. cada) água destilada autoclavada. Int.: interação.

Tabela b. Resumo da análise de variância para número de folhas e número de raízes geradas na multiplicação de lúpulo var. Chinook no experimento I (nº de pares de folhas X citocinina)

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	
		Nº DE FOLHAS	Nº DE RAÍZES
Nº de pares de folhas	1	58,97513**	0,71302**
Citocinina	2	24,62148**	7,43333**
Int. (NPF X Citocinina)	2	1,10169 ^{ns}	3,30677**
Tratamentos	5	22,08430**	4,43865**
Resíduo	24	1,06133	0,02786

** significativo ao nível de 1% de probabilidade no teste de Tukey; ^{ns}: não significativo. Int.: interação; NPF: número de pares de folhas.

Tabela c. Resumo da análise de variância para número de folhas geradas na multiplicação de lúpulo var. Chinook no experimento II (nº de pares de folhas X fonte luminosa)

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrados Médios
Nº de pares de folhas	1	11,72363**
Fonte luminosa	1	35,27832**
Int. (NPF X LUZ)	1	4,10645**
Tratamentos	3	17,03613**
Resíduo	16	0,03418

** significativo ao nível de 1% de probabilidade no teste de Tukey. Int.: interação; NPF: número de pares de folhas.

Tabela d. Resumo da análise de variância para rendimento de massa na multiplicação de lúpulo var. Chinook no experimento III (biorreator de imersão temporária)

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrados Médios
Blocos	5	0,00740 ^{ns}
Tratamentos	3	0,06802**
Resíduo	15	0,00909

** significativo ao nível de 1% de probabilidade no teste de Tukey; ^{ns}: não significativo.

Tabela e. Resumo da análise de variância para comprimento (L), volume (V), massa seca (MSR) e número de raízes principais (NRP) formadas na aclimatização com fertilizantes de lúpulo var. Chinook

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrados Médios			
		L	NRP	V	MSR
Tratamentos	6	**	1,27793**	0,44508**	0,01200**
Resíduo	21		0,00297	0,00036	0,00232

** significativo ao nível de 1% de probabilidade no teste de Tukey.

Tabela f. Resumo da análise de variância para altura de parte aérea (H), área foliar (AF), massa seca de folhas (MSF) e número de folhas (NF) geradas na aclimatização com fertilizantes de lúpulo var. Chinook

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrados Médios			
		H	AF	MSF	NF
Tratamentos	6	520,94039**	26075,70751**	0,07474**	77,46085**
Resíduo	21	0,13281	9,71261	0,00002	0,27400

** significativo ao nível de 1% de probabilidade no teste de Tukey.

Tabela g. Resumo da análise de variância para porcentagem de formação de calos (FC) e diâmetros de calos (DC) formados na organogênese de lúpulo var. Chinook

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	
		FC	DC
Regulador vegetal	4	0,94079**	4,94806**
Explante	2	1,20381**	7,19067**
Int. (R X E)	8	0,51937**	0,85434**
Tratamentos	14	0,73755**	2,92917**
Resíduo	45	0,00849	0,03438

** significativo ao nível de 1% de probabilidade no teste de Tukey. Int.: interação; R: regulador vegetal; E: explante.

Tabela h. Resumo da análise de variância para porcentagem de formação de brotações (FB) e de raízes (FR) formadas na organogênese de lúpulo var. Chinook

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	
		FB	FR
Regulador vegetal	4	0,12866**	0,02846**
Explante	2	0,18137**	0,05082**
Int. (R X E)	8	0,11217**	0,02927**
Tratamentos	14	0,12677**	0,03212**
Resíduo	45	0,00938	0,00048

** significativo ao nível de 1% de probabilidade no teste de Tukey. Int.: interação; R: regulador vegetal; E: explante.

ANEXO 3 – FORMULAÇÃO DO FERTILIZANTE DE LIBERAÇÃO LENTA BASACOTE

Basacote® Mini 3M e 6M			
Macronutrientes (%)	Nitrogênio (N)	Total	13
		Nítrico (NO ₃)	5
		Amoniacal (NH ₄)	8
	Fósforo (P ₂ O ₅)		6
	Potássio (K ₂ O)		16
	Magnésio (MgO)		2
	Enxofre (SO ₄)		10
Micronutrientes (%)	Ferro (Fe)		0,26
	Boro (B)		0,02
	Zinco (Zn)		0,02
	Cobre (Cu)		0,05
	Manganês (Mn)		0,06
	Molibdênio (Mo)		0,015
	Diâmetro do Grânulo (mm)		1,5 – 2,5

Disponibilizado pelo fabricante.