

# POTENCIAL DE MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE CULTIVARES DE MORANGUEIRO<sup>1</sup>

RAFAEL UCKER BRAHM<sup>2</sup> & ROBERTO PEDROSO DE OLIVEIRA<sup>3</sup>

**RESUMO** - Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o potencial de multiplicação *in vitro* de dez cultivares de morangueiro: Aromas, Bürkley, Camarosa, Campinas, Dover, Milsei-Tudla, Oso Grande, Santa Clara, Sweet Charlie e Vila Nova. Utilizou-se protocolo similar ao dos laboratórios comerciais. A desinfestação dos estolões foi realizada em soluções à base de álcool e hipoclorito de sódio; a cultura dos meristemas em meio semi-sólido MS com 1 mg L<sup>-1</sup> BAP, 0,01 mg L<sup>-1</sup> ANA e 0,1 mg L<sup>-1</sup> AG<sub>3</sub>; e a multiplicação em meio MS com 1 mg L<sup>-1</sup> BAP, à 25 ± 4°C, 20 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas. Partiu-se de 10 meristemas de cada cultivar, avaliando-se a taxa de multiplicação e os níveis de contaminação, vitrificação e oxidação durante as fases de estabelecimento (30 dias) e de multiplicação (quatro subcultivos). O número estimado de plântulas obtidas por meristema foi: 559 de 'Aromas'; 569 de 'Bürkley'; 516 de 'Camarosa'; 517 de 'Campinas'; 3.907 de 'Dover'; 1.841 de 'Milsei-Tudla'; 943 de 'Oso Grande'; 350 de 'Santa Clara'; 298 de 'Sweet Charlie', e 1.132 de 'Vila Nova'. A quantificação dessa variabilidade genética é importante para o planejamento da produção de matrizes de cada cultivar nos laboratórios de micropropagação.

**Termos para indexação:** *Fragaria x ananassa*, limpeza de patógenos, micropropagação, produção de mudas

## *IN VITRO* MULTIPLICATION POTENTIAL OF STRAWBERRY CULTIVARS

**ABSTRACT** - The objective of this research work was to evaluate the *in vitro* multiplication potential of ten strawberry cultivars: 'Aromas', 'Bürkley', 'Camarosa', 'Campinas', 'Dover', 'Milsei-Tudla', 'Oso Grande', 'Santa Clara', 'Sweet Charlie', and 'Vila Nova'. The procedures used for this purpose were similar to those found in the protocol observed by commercial micropropagation laboratories. The disinfection of the scions was made by dipping them in an alcohol and sodium hypochlorite solution, the meristem culturing in a semisolid medium containing 1 mg of BAP, 0.01 mg of NAA, and 0.1 mg of G<sub>3</sub>A per liter and the scions multiplication in an MS medium containing 1 mg of BAP at 25° ± 4° C, 20 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> and a photoperiod of 16 hours. Each cultivar was represented by 10 scions and for each one the multiplication rate, the levels of contamination, the vitrification and the oxidation were evaluated during the establishment (30 days) and multiplication phases (4 subcultures). The estimated number of seedlings per scion from each cultivar was: 559 for 'Aromas', 569 for 'Bürkley', 516 for 'Camarosa', 517 for 'Campinas', 3,907 for 'Dover', 1,841 for 'Milsei-Tudla', 943 for 'Oso Grande', 350 for 'Santa Clara', 298 for 'Sweet Charlie', and 1,132 for 'Vila Nova'. The quantification of this genetic variability helps in the planning of the matrilineal plants production of each cultivar which takes place in commercial micropropagation laboratories.

**Index terms:** *Fragaria x ananassa*, pathogen cleaning, micropropagation, runner plants production

## INTRODUÇÃO

O morango é cultivado e apreciado nas mais variadas regiões do mundo. Produzido predominantemente em propriedades familiares, destaca-se pela alta rentabilidade por área, podendo a produção ser destinada ao mercado de frutas frescas e/ou à fabricação de doces e conservas (Resende et al., 1999).

A espécie cultivada, *Fragaria x ananassa* Duch., é um híbrido entre espécies originárias da América (*Fragaria virginiana* x *Fragaria chiloensis*), obtida há mais de 300 anos na Europa. Atualmente, algumas cultivares também incluem genes de *Fragaria ovalis*.

A produção mundial de morango é de 3,1 milhões de toneladas por ano (Oliveira Jr. & Manica, 2003), sendo os Estados Unidos, Espanha, Polônia e Japão os maiores produtores (Agriannual, 2003). A produção anual brasileira é de 40 mil toneladas, destacando-se os Estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (Oliveira Jr. & Manica, 2003).

As principais cultivares utilizadas no Brasil provêm dos Estados Unidos, destacando-se a 'Aromas', 'Camarosa', 'Dover', 'Milsei-Tudla', 'Oso Grande' e 'Sweet Charlie', ou dos programas de melhoramento genético da Embrapa Clima Temperado ('Bürkley', 'Santa Clara' e 'Vila Nova') e do Instituto Agrônomo - IAC ('Campinas').

Várias doenças, causadas por diferentes espécies de fungos, bactérias, vírus, viróides e micoplasmas, afetam a cultura do morangueiro. Em relação às viroses, estas podem ser causadas por um único ou um complexo de vírus transmitidos por pulgões que atacam a cultura, destacando-se o vírus do mosqueado, vírus da clorose marginal, vírus da faixa das nervuras, vírus do encrespamento e vírus do ondulado (Secchi, 1992).

A implantação de lavouras com mudas de qualidade é a melhor medida que o agricultor pode adotar para o controle dessas doenças (Betti et al., 2000). Com mudas sadias, os agricultores podem utilizar

menos ou até mesmo nenhum defensivo químico, havendo aumento da produção e melhoria da qualidade da fruta. Além disso, a utilização de mudas sadias consiste no ponto de partida para a obtenção de um melhor nível de resposta a qualquer tecnologia empregada no processo produtivo do morangueiro.

As mudas livres de patógenos devem ser produzidas em viveiros-telado, a partir de matrizes provenientes da cultura de meristemas realizada em laboratórios de micropropagação. No Brasil, existe quase uma dezena de laboratórios comerciais, distribuídos em vários Estados, porém produzindo quantidade insuficiente de matrizes para atender à demanda nacional. Em consequência, mais de 80% das mudas de morangueiro utilizadas no Rio Grande do Sul provêm do Chile e da Argentina.

Embora a metodologia de micropropagação de cultivares de morangueiro seja bastante conhecida, pouco se conhece sobre o potencial de multiplicação *in vitro* das cultivares, o que é importante para o planejamento da produção de matrizes em laboratório.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi quantificar o potencial de multiplicação *in vitro* das cultivares de morangueiro Aromas, Bürkley, Camarosa, Campinas, Dover, Milsei-Tudla, Oso Grande, Santa Clara, Sweet Charlie e Vila Nova.

## MATERIALE MÉTODOS

O trabalho foi realizado no laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado, situado em Pelotas-RS, utilizando 10 cultivares de morangueiro: Aromas, Bürkley, Camarosa, Campinas, Dover, Milsei-Tudla, Oso Grande, Santa Clara, Sweet Charlie e Vila Nova.

Estolões das cultivares foram coletados em propriedades rurais selecionadas nos municípios de Pelotas e Turuçu-RS, considerando-se as melhores características de sanidade e produtividade.

<sup>1</sup> (Trabalho 015/2004). Recebido: 12/02/2004. Aceito para publicação: 25/10/2004. Financiada pelo CNPq e FAPERGS.

<sup>2</sup> Estudante do curso de Ecologia da Universidade Católica de Pelotas, 96010-000, Pelotas-RS. Bolsista da FAPERGS. Tel. (53) 275 8100. Email: rafaelubrahm@bol.com.br

<sup>3</sup> Eng. Agr., D.S., Pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Cx.P. 403, 96001-970, Pelotas-RS. Bolsista do CNPq. Tel. (53) 275 8100. E-mail: rpedroso@cpact.embrapa.br

**TABELA 1** - Taxa média de multiplicação por subcultivo de cultivares de morangueiro (*Fragaria ananassa* Duch.) durante a micropropagação.

Cultivar	Subcultivo					Taxa média multiplicação
	0	1	2	3	4	
Aromas	0,9	3,7	5,0	3,0 cde	12,0 ab	4,9
Bürkley	1,0	4,5	5,1	4,0 bc	6,2 c	4,2
Camarosa	0,9	6,0	4,4	3,5 bcd	6,2 c	4,2
Campinas	1,0	4,3	5,8	2,8 de	7,4 bc	4,3
Dover	1,0	6,0	6,0	6,7 a	16,2 a	7,2
Milsei-Tudla	1,0	7,2	3,8	5,8 a	11,6 b	5,9
Oso Grande	1,0	5,0	5,0	4,1 bc	9,2 bc	4,9
Santa Clara	1,0	3,5	3,7	2,5 de	10,8 bc	4,3
Sweet Charlie	1,0	7,2	2,4	2,1 e	8,2 bc	4,2
Vila Nova	1,0	5,8	4,0	4,0 bc	12,2 ab	5,4
Média	1,0	5,3	4,5	3,9	10,0	5,0
CV (%)	1,4	11,6	11,3	16,3	15,1	8,7

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Na análise estatística, os valores foram transformados em  $(x+0,5)^{1/2}$ .

A desinfestação dos estolões foi realizada mergulhando os ponteiros em soluções compostas por álcool 70%, durante 10-15 segundos, e hipoclorito de sódio a 1%, durante 10 minutos. Em seguida, foram realizadas três lavagens com água destilada e autoclavada, sob condições assépticas.

Dez meristemas ( $\pm 0,2$  mm) de cada cultivar foram isolados em câmara de fluxo laminar, sob lupa estereoscópica com aumento de até 40 vezes, utilizando pinça e bisturi. Em seguida, esses meristemas foram inoculados (Subcultivo 0), individualmente, em tubos de ensaio (15 mm x 150 mm) contendo 6 mL de meio semi-sólido composto pelos sais de MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 0,5 mg L<sup>-1</sup> de piridoxina, 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 2 mg L<sup>-1</sup> de glicina, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de myo-inositol, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar, 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina), 0,01 mg L<sup>-1</sup> de ANA (ácido naftalenoacético) e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> (ácido giberélico). Após a adição de ágar, o pH do meio de cultura foi ajustado para 5,9. A autoclavagem foi realizada a uma temperatura de 121°C à 1,5 atm, por 15 minutos. Os meristemas inoculados foram mantidos em câmara escura, por 36 horas, para evitar oxidação. Posteriormente, foram conduzidos à sala de cultura com intensidade luminosa de 20  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperatura de 25  $\pm$  2°C e fotoperíodo de 16 horas.

Após 30 dias, os meristemas foram transferidos para frascos de vidro (120 mm de altura x 50 mm de diâmetro) contendo 40 mL do meio de cultura MS suplementado com 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, sendo inoculados cinco explantes de 2-3 mm por frasco. O ajuste do pH, a autoclavagem e as condições de cultivo foram realizados da mesma forma relatada anteriormente. Desta maneira, foram conduzidos três subcultivos de 30 dias e um de 40 dias, avaliando-se as taxas de multiplicação e de contaminação dos explantes, os níveis de oxidação e de vitrificação e o estado geral das plântulas. Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente ao acaso, com dez repetições, sendo as unidades experimentais constituídas por um frasco contendo cinco explantes. As taxas de multiplicação das cultivares, nos subcultivos 3 e 4, foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, mediante prévia transformação dos dados para  $(x+0,5)^{1/2}$ . A estimativa do número de plântulas obtidas de cada cultivar foi realizada multiplicando-se as taxas de multiplicação obtidas nos quatro subcultivos.

O alongamento e o enraizamento das plântulas foram realizados *in vitro*, utilizando meio de cultura semi-sólido MS básico sem reguladores de crescimento. Para esta fase, foram utilizadas todas as plântulas maiores que 5 mm, as quais foram individualizadas. Após 25 dias, as plântulas que se desenvolveram, foram transplantadas em bandejas de isopor de 72 células, contendo substrato comercial Plantmax HT®. As bandejas foram dispostas em túnel plástico no interior de casa de vegetação com controle de temperatura (25-30°C) e de irrigação. Gradativamente, a cobertura plástica foi sendo removida até completar a aclimatização.

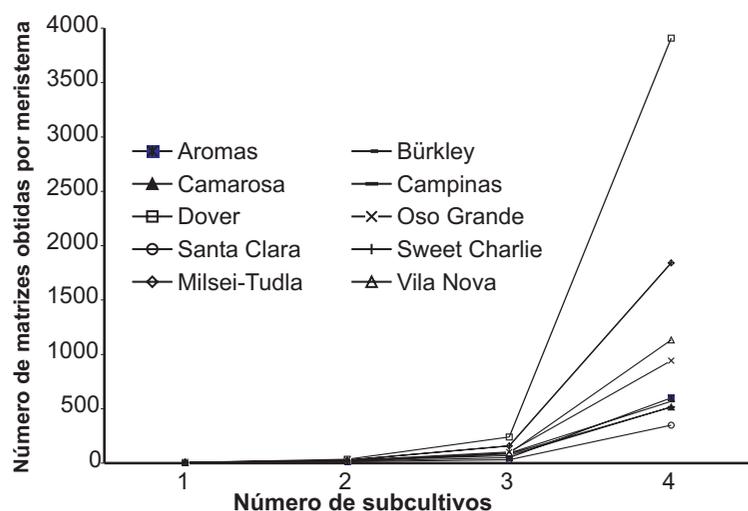
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Independentemente da cultivar, houve desenvolvimento de plântulas a partir de 98% dos meristemas introduzidos, e a taxa média de multiplicação foi de 5,0 plântulas por subcultivo ao longo do experimento (Tabela 1). Este resultado, ao se comparar com os obtidos por Cárdenas-Navarro et al. (1992), evidencia o adequado ajuste do meio e das condições de cultura e a facilidade da micropropagação do morangueiro, fatores estes decisivos para viabilizar a multiplicação comercial de matrizes. Ainda assim, a quantidade de matrizes produzidas no País, que é de aproximadamente 760 mil por ano (Farias, 1997), é insuficiente para atender à demanda nacional. No Rio Grande do Sul, por exemplo, mais de 80% das mudas utilizadas são importadas e ainda existem agricultores utilizando mudas provenientes da lavoura, embora Daniels & Assis (1983) tenham demonstrado que a possibilidade de infecção das plantas por vírus é de até 60% durante um ciclo de produção no campo.

No presente trabalho, verificou-se efeito pronunciado da cultivar no desenvolvimento *in vitro* das plântulas de morangueiro (Tabela 1, subcultivos 3 e 4). As taxas médias de multiplicação por subcultivo foram: 'Dover' (7,2); 'Milsei-Tudla' (5,9); 'Vila Nova' (5,4); 'Aromas' (4,9); 'Oso Grande' (4,9); 'Campinas' (4,3); 'Santa Clara' (4,3); 'Bürkley' (4,2); 'Camarosa' (4,2), e 'Sweet Charlie' (4,2). Esse efeito do genótipo na taxa de multiplicação já havia sido descrito por Boxus et al. (1977), ao trabalharem com produção de mudas de algumas cultivares de morangueiro sob condições *in vitro*, e por Cárdenas-Navarro et al. (1992) e Tessarioli Neto (2001), ao trabalharem sob telado.

Destacadamente, a cultivar Dover apresentou o maior potencial de multiplicação *in vitro*, possibilitando a obtenção de 3.907 matrizes por meristema inicial, após três subcultivos de 30 dias e um de 40 dias (Figura 1). Isto ficou evidenciado pelos resultados do teste de Tukey, a 5% de probabilidade, ao se compararem as taxas médias de multiplicação das cultivares nos subcultivos 3 e 4 (Tabela 1). Desta forma, para esta cultivar, existe necessidade de introdução de um número menor de meristemas para se atingir o mesmo número final de matrizes. Ortigoza (1999) e Tessarioli Neto (2001) já haviam citado o destacado potencial de produção de mudas dessa cultivar em experimentos no campo, a qual chegou a produzir até 50% mais mudas do que outras cultivares.

Além da cultivar Dover, as cultivares 'Milsei-Tudla' (1.841 matrizes) e 'Vila Nova' (1.132) apresentaram os maiores potenciais de multiplicação *in vitro*, enquanto os menores ocorreram com as cultivares 'Bürkley' (569); 'Campinas' (517); 'Camarosa' (516); 'Santa Clara' (350), e 'Sweet Charlie' (298) (Figura 1). Esse desempenho foi consequência das taxas médias de multiplicação nos subcultivos 3 e 4, que foram de 6,7 e 16,2 para 'Dover'; 5,8 e 11,6 para 'Milsei-Tudla', e 4,0 e 12,2 para 'Vila Nova', respectivamente (Tabela 1). Desta forma, as cultivares mais rústicas, destinadas exclusivamente à indústria ('Bürkley', 'Santa Clara' e 'Vila Nova'), necessariamente não apresentam maior potencial de



**FIGURA 1** - Número estimado de matrizes de dez cultivares de morangueiro (*Fragaria ananassa* Duch.), micropropagadas ao longo de quatro subcultivos.

multiplicação *in vitro* do que as cultivares de dupla finalidade - mesa e indústria ('Aromas', 'Camarosa', 'Campinas', 'Dover', 'Oso Grande', 'Sweet Charlie' e 'Milsei-Tudla').

As plântulas cultivadas *in vitro* não apresentaram formação de calos, o que é desejável para minimizar a ocorrência de variantes somaclonais (Roca & Mroginski, 1991). As matrizes produzidas não apresentaram sintomas visuais de variação somaclonal, o que, em parte,

deve ter sido proporcionado pelo número reduzido de subcultivos.

Aproximadamente 1% das plântulas apresentaram sintomas de oxidação e/ou de vitrificação, o que pode ser considerada uma porcentagem satisfatória dentro de um sistema de produção de matrizes. A ocorrência de baixas temperaturas externas ao ambiente de cultivo (< 10°C), dificultando o seu controle na sala de crescimento, pode ser atribuída como uma das causadoras do maior nível de vitrificação das plântulas das cultivares estudadas no quarto subcultivo (Tabela 2).

Independentemente da cultivar e do subcultivo, a porcentagem média de contaminação obtida ao longo do experimento foi inferior a 1% (Tabela 2). Esses níveis reduzidos de contaminação podem ser atribuídos aos explantes terem sido coletados de plantas cultivadas sobre plástico em época de pouca umidade e ao elevado nível de assepsia empregado durante a micropropagação.

A eficiência do processo de aclimatização das plântulas foi em torno de 97%, sem haver variação entre as cultivares. As matrizes apresentaram crescimento vigoroso em casa de vegetação, evidenciando a eficiência do sistema utilizado para alongamento, enraizamento, pegamento e desenvolvimento das plantas.

Em síntese, adotando-se a metodologia descrita e assumindo-se os mesmos índices de eficiência obtidos durante o processo de micropropagação, pode-se estimar como sendo necessários, respectivamente, 17; 18; 19; 19; 3; 11; 29; 34; 5 e 9 meristemas das cultivares Aromas, Bürkley, Camarosa, Campinas, Dover, Milsei-Tudla, Oso Grande, Santa Clara, Sweet Charlie e Vila Nova para produção de 10.000 matrizes de morangueiro.

**TABELA 2** - Porcentagem de perda de explantes por subcultivo (SC) de cultivares de morangueiro (*Fragaria ananassa* Duch.) por contaminação de fungos e/ou bactérias (C), vitrificação (V) e oxidação (O) durante a micropropagação.

Cultivar	SC 0			SC 1			SC 2			SC 3			SC 4			Média		
	C	V	O	C	V	O	C	V	O	C	V	O	C	V	O	C	V	O
Aromas	0	0	10	0	0	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3
Bürkley	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0	1	0
Camarosa	0	0	10	0	0	2	0	0	3	0	0	0	2	1	0	0	0	3
Campinas	0	0	0	0	0	2	1	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	1
Dover	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	1	0
Milsei-Tudla	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	2	5	0	1	1	1
Oso Grande	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0	1	0
Santa Clara	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	9	0	0	0	2	1
Sweet Charlie	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0	0	0	9	0	0	1	2	1
Vila Nova	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Média	0	0	2	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	4	0	0	1	1

## CONCLUSÕES

1) As cultivares de morangueiro apresentam variabilidade genética pronunciada quanto ao potencial de multiplicação *in vitro*.

2) A cultivar Dover apresenta o maior potencial de multiplicação *in vitro*, seguida por 'Milsei-Tudla', 'Vila Nova', 'Aromas', 'Oso Grande', 'Campinas', 'Santa Clara', 'Bürkley', 'Camarosa' e 'Sweet Charlie'.

3) O sistema de micropropagação avaliado proporciona níveis elevados de multiplicação de várias cultivares de morangueiro, com níveis mínimos de contaminação e oxidação das plântulas.

## REFERÊNCIAS

AGRIANUAL 2003: anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & AgroInformativos, 2004. 544p.  
 BETTI, J.A.; PASSOS, F.A.; TANAKA, M.A.S. Produção de mudas sadias de morangueiro. In: TRANI, P.E.; MACEDO, A.C. (Ed.) **Manejo integrado de pragas e doenças do morangueiro**. São Paulo: Secretaria da Agricultura e Abastecimento, 2000. p.55-61. (Manual Técnico, Série Especial).

BOXUS, P.H.; QUOIRIN, M.; LAINE, J.M. Large scale propagation of

strawberry. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag, 1977. cap.1, p.130-143.

CÁRDENAS-NAVARRO, R.; MANZO-GONZÁLEZ, A.; MURATALLA-LÚA, A. Propagación de siete cultivares de Fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en el Valenciano. **Revista Chapingo**, Valencia, v.16, n.78, p.100-113, 1992.

DANIELS, J.; ASSIS, M. **Re-infecção de morangueiros por vírus no município de Pelotas-RS**. Pelotas: Embrapa-UEPAE Cascata, 1983. 5p. (Comunicado Técnico, 36).

FARIAS, C.A. **Produção e qualidade de mudas de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) sob diferentes níveis de irrigação em Pelotas-RS**. 1997. 53f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1997.

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

OLIVEIRA JÚNIOR, M.E.; MANICA, I. Principais países produtores de frutas no ano de 2002. **Jornal da Fruta**, Lages, v. 11, n.127, p.14, abril 2003.

ORTIGOZA, L.E.R. **Comportamento de diferentes cultivares de**

- morangueiro na produção de mudas de campo.** 1999. 43f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.
- RESENDE, L.M.A.; MASCARENHAS, M.H.T.; PAIVA, B.M. Panorama da produção e comercialização de morango. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.20, n.198, p.5-19, 1999.
- ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. **Cultivo de tejidos en la agricultura:** fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT, 1991. 969p.
- SECCHI, V.A. **Controle integrado de pragas e doenças do morangueiro.** 3.ed. Porto Alegre: EMATER/RS, 1992. 66p.
- TESSARIOLINETO, J. **Produção de mudas de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) sob cultivo protegido.** 2001. 75f. Tese (Livre-Docente em Produção Vegetal) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.