

ISSN 1516-8840

Novembro, 2012

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Clima Temperado
Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documento 345

Protocolos de Micropropagação de Plantas IV - Morangueiro

Leonardo Ferreira Dutra
Natália Dias Gomes da Silva
Lorena Pastorini Donini
Antonio Fernando Pacheco Nino
Francisco Osmi Xavier da Silva
Francisco Carlos Budjjarck Vieira

Embrapa Clima Temperado
Pelotas, RS
2012

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Clima Temperado
BR 392 Km 78
Caixa Postal 403, CEP 96010-971- Pelotas, RS
Fone: (53) 3275-8199
Fax: (53) 3275-8219 – 3275-8221
Home Page: www.cpact.embrapa.br
e-mail: sac@cpact.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: Ariano Martins de Magalhães Júnior
Secretária - Executiva: Joseane Mary Lopes Garcia
Membros: Márcia Vizzotto, Ana Paula Schneid Afonso, Giovani Theisen, Luis Antônio
Suíta de Castro, Flávio Luiz Carpena Carvalho, Regina das Graças Vasconcelos dos Santos.
Suplentes: Isabel Helena Verneti Azambuja e Beatriz Marti Emygdio.

Supervisão editorial: Antônio Luiz Oliveira Heberlê
Revisão de texto: Ana Luíza Barragana Viegas
Normalização bibliográfica: Fábio Lima Cordeiro
Editoração eletrônica e arte da capa: Fernando Jackson

1ª edição

1ª impressão (2012): 50 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei N° 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Clima Temperado

Protocolos de micropropagação de plantas IV: morangueiro / Leonardo
Ferreira Dutra...[et al.]. -- Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2012.
... p. -- (Embrapa Clima Temperado. Documentos,).

ISSN 1516-8840

Morango– Mudas – Produção – Micropropagação – Cultura in vitro.

I. Dutra, Leonardo Ferreira. II. Série.

CDD 634.75

Autores

Leonardo Ferreira Dutra

Eng. Agrônomo, D.Sc. em Agronomia,
pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS,
leonardo.dutra@cpact.embrapa.br

Natália Dias Gomes da Silva

Bióloga, mestranda em Fisiologia Vegetal,
Embrapa Clima Temperado/UFPel, Pelotas, RS,
nataliadiasgomes@hotmail.com

Lorena Pastorini Donini

Bióloga, D.Sc. em Agronomia,
bolsista DTI-1/CNPq,
Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS,
lorenadonini@yahoo.com.br

Antonio Fernando Pacheco Nino

Assistente de pesquisa da Embrapa Clima Temperado,
Pelotas, RS,
nino.antonio@cpact.embrapa.br

Francisco Osmi Xavier da Silva

Assistente de pesquisa da Embrapa Clima Temperado,
Pelotas, RS,
osmi.silva@cpact.embrapa.br

Francisco Carlos Budjiarck Vieira

Assistente de pesquisa da Embrapa Clima Temperado,
Pelotas, RS,
carlos.vieira@cpact.embrapa.br

Apresentação

O morango é, dentre as espécies do grupo de pequenas frutas, a mais apreciada e rentável e cuja produção no Brasil tem aumentado significativamente nos últimos anos. Possui forte inserção na agricultura familiar e pode ser destinado tanto para o mercado de frutas frescas quanto para a indústria.

Sua propagação é realizada vegetativamente por meio de estolões ou via micropropagação. Embora a propagação por estolões ainda seja utilizada, permite a transmissão de vírus, os quais causam redução de vigor de plantas. Em contrapartida, a obtenção de material básico, a partir de matrizes oriundas da cultura de meristemas, proporciona a obtenção de mudas de alta qualidade genética e sanitária.

Embora o protocolo de micropropagação tenha sido definido desde o final da década de 1970 pela Embrapa Clima Temperado, não há uma descrição passo a passo do processo. Desta forma, a Embrapa Clima Temperado disponibiliza o presente documento contendo, resumidamente, a descrição do protocolo de micropropagação de morangueiro.

Clênio Nailto Pillon
Chefe Geral
Embrapa Clima Temperado

Sumário

Introdução.....	09
Metodologia.....	11
Resultados: pontos identificados.....	14
Considerações Finais.....	16
Referências bibliográficas.....	19

Protocolos de Micropropagação de Plantas IV - Morangueiro

Leonardo Ferreira Dutra

Natália Dias Gomes da Silva

Lorena Pastorini Donini

Antonio Fernando Pacheco Nino

Francisco Osmi Xavier da Silva

Francisco Carlos Budjjarck Vieira

O morango (*Fragaria ananassa*) é produzido e apreciado nas mais variadas regiões do mundo, sendo a espécie do grupo de pequenas frutas de maior apreciação e grande retorno econômico (ROCHA et al., 2009). A sua produção no Brasil tem aumentado significativamente nos últimos anos e, segundo a EMATER (2012), já superou as 130 mil toneladas, numa área de aproximadamente 3,7 mil ha. Esta produção é quase toda voltada para o mercado doméstico, sendo cerca de 70% destinada ao consumo in natura e 30% industrializada de diversas formas (ANTUNES; REISSER JUNIOR, 2007).

As principais cultivares utilizadas no Brasil provêm dos Estados Unidos, destacando-se 'Camarosa' e 'Oso Grande' (ANTUNES, 2003).

Esta espécie é produzida predominantemente em propriedades familiares, destacando-se pela alta rentabilidade por área, podendo sua produção ser destinada ao mercado de frutas frescas e/ou à fabricação de doces e conservas (OLIVEIRA; SCIVITTARO, 2009).

O morangueiro é propagado vegetativamente por meio de estolões

ou via micropropagação. Embora a propagação vegetativa por estolões ainda seja muito difundida, esta permite a transmissão de vírus entre gerações, os quais causam redução de vigor de plantas.

As viroses podem ser causadas por um único ou um complexo de vírus transmitidos à cultura, destacando-se o vírus do mosqueado, vírus da clorose marginal, vírus da faixa nas nervuras, vírus do encrespamento e vírus 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).

A micropropagação apresenta como vantagens a produção de mudas em larga escala e curto espaço de tempo, além da possibilidade de produzir mudas livres de doenças.

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. Estas mudas devem ser produzidas em viveiro-telado, a partir de matrizes provenientes da cultura de meristemas realizada em laboratórios de micropropagação.

A cultura de meristemas é a técnica empregada para a produção de mudas de alta qualidade genética e sanitária. Consiste na excisão de ápices meristemáticos, estrutura que possui pequenas dimensões (0,1- 0,3 mm), e está anatomicamente localizada em regiões pouco vascularizadas, possibilitando assim o isolamento de vírus. Diversos trabalhos foram realizados demonstrando que as

virose da cultura não são transmitidas por meio da utilização deste método. Segundo Assis (1978), a cultura de meristemas pode ser empregada isoladamente ou combinada com a termoterapia.

No processo normal de isolamento de meristemas algumas etapas são seguidas. Dentre estas, há a etapa de diferenciação dos meristemas, que varia de 45 a 60 dias, dependendo da cultivar. Após este período, o material diferenciado é transferido para meio de multiplicação, seguido do enraizamento e aclimatização, processos que estão descritos a seguir.

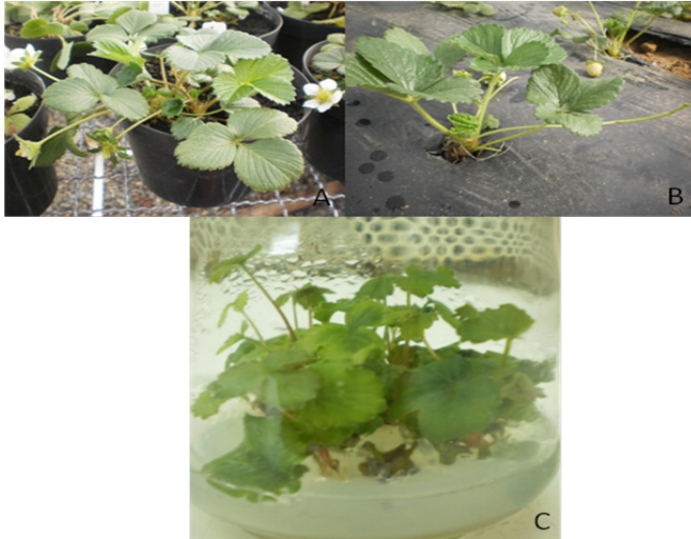
O Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Clima Temperado tem trabalhado com micropropagação de morangueiro desde 1979, e chegou a produzir até 80 mil matrizes por ano. Atualmente o objetivo é a produção de material básico para atender ao programa de melhoramento genético da Embrapa Clima Temperado.

O protocolo a seguir descreverá a micropropagação utilizada para a cultura do morangueiro na Embrapa Clima Temperado:

Protocolo

Origem do material vegetal

Para produção de mudas de morangueiro isentas de virose, as fontes de explantes podem ser: plantas em casa de vegetação (Figura 1A), campo (Figura 1B), ou plantas estabelecidas *in vitro* (Figura 1C).



Fotos: Natália Dias Gomes da Silva.

Figura 1: Plantas de morangueiro, cultivadas em casa de vegetação (A), a campo (B), e in vitro (C).

- Plantas no campo ou em casa de vegetação:

Porções terminais de brotações são coletadas com aproximadamente 5 cm de comprimento (Figura 2A), são retiradas as folhas, e os segmentos são acondicionados em recipiente com água destilada (Figura 2B).



Fotos: Natália Dias Gomes da Silva.

Figura 2: Coleta dos explantes para posterior inoculação in vitro. Porção terminal da brotação (A), retirada das folhas e segmentação do ramo seguida de imersão em água destilada (B).

Posteriormente, são levados ao laboratório onde passam pelo processo de desinfestação. Inicialmente o material permanece imerso em álcool 70% por 10 segundos, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio 1%, adicionado de três gotas de detergente comercial por 10 minutos, sob agitação constante. Após isso, os explantes são lavados por três vezes em água destilada e autoclavada, em câmara de fluxo laminar.

O ápice caulinar de aproximadamente 0,1 a 0,3 mm é extraído com auxílio de pinça e bisturi utilizando-se lupa estereoscópica (Figura 3). Posteriormente, é inoculado em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), suplementado com 1 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina); 0,01 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftaleno acético); 0,1 mg L⁻¹ GA₃ (ácido giberélico); 0,8 g L⁻¹ de carvão ativado; 30 g L⁻¹ de sacarose e 7,5 g L⁻¹ de ágar, sob condições de escuro durante 30 dias. O pH do meio de cultura é ajustado

em 6,2 antes da autoclavagem. A composição do meio MS está descrita na Tabela 1.

Decorrido o tempo de desenvolvimento no escuro, os meristemas são mantidos sob intensidade luminosa de 45-55 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 25 ± 3 °C e fotoperíodo de 16 horas. O desenvolvimento dos ápices caulinares até a primeira multiplicação é de aproximadamente 60 dias.

Tabela 1. Composição do meio de cultura MS.

NOME COMPOSTO	FÓRMULA	CONCENTRAÇÃO
		FINAL (g L ⁻¹)
Nitrato de amônio	NH ₄ NO ₃	1,65
Nitrato de potássio	KNO ₃	1,90
Sulfato de magnésio	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,37
Sulfato de manganês	MnSO ₄ .H ₂ O	0,0169
Sulfato de zinco	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0086
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,00025
Cloreto de cálcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,441
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	0,0062
Fosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	0,17
Iodeto de potássio	KI	0,00083
Molibdato de sódio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,025
Cloreto de cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,000025
Sódio EDTA	Na ₂ .EDTA	0,03725
Sulfato de ferro	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,02785
Cloridrato de tiamina	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS	0,0005
Cloridrato de piridoxina	C ₈ H ₁₂ ClNO ₂	0,0005
Ácido nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	0,0005
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	0,002
Mio-inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	0,1
Sacarose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	30
Ágar		7,5



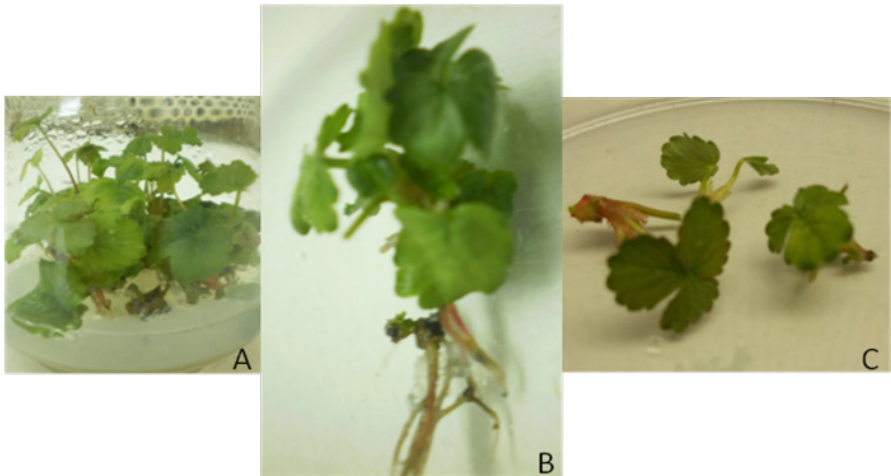
Foto: Natália Dias Gomes da Silva.

Figura 3: Ápice meristemático utilizado para a produção de plantas isentas de viroses.

- Plantas estabelecidas in vitro:

As plantas que já estão in vitro são multiplicadas em meio de cultura MS, acrescido de 1 mg L^{-1} de BAP; 30 g L^{-1} de sacarose e $7,5 \text{ g L}^{-1}$ de ágar, com o pH do meio de cultura ajustado em 6,2 antes da autoclavagem. A multiplicação é realizada até a obtenção da quantidade de plantas desejada. O tempo médio entre as repicagens de gemas apicais e axilares (Figura 4) é de aproximadamente 20 dias; posteriormente passarão para a fase de enraizamento. A taxa de multiplicação normalmente obtida em plântulas de morangueiro por subcultivo é de cinco a sete explantes, em média, dependendo da cultivar. Para a cultura do morangueiro

é recomendável realizar no máximo cinco repicagens, durante a fase de multiplicação, por meristema, para evitar a ocorrência de variação somaclonal, levando à obtenção de plantas distintas das originais.



Fotos: Natália Dias Gomes da Silva.

Figura 4: Passos da repicagem dos explantes de morangueiro. Explantes desenvolvidos (A); tufo de brotações formadas a partir de apenas um segmento (B); segmentação das brotações cultivadas in vitro (C).

Durante a fase de enraizamento, os explantes são transferidos de meio de cultura, passando para meio MS suplementado com $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP; 30 g L^{-1} de sacarose e $7,5 \text{ g L}^{-1}$ de ágar. Durante esta fase, os explantes são expostos a condições de escuro (Figura 5), onde permanecem por quatro dias. Concluído este período as plantas retornam para intensidade luminosa $45\text{-}55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas, por mais 30 dias.



Foto: Natalia Dias Gomes da Silva.

Figura 5: Explantes de morango submetidos ao escuro durante o enraizamento.

Com esta etapa do processo de micropropagação concluída, os explantes são cuidadosamente lavados em água corrente para a remoção do meio de cultura, visando à aclimatização.

Em casa de vegetação, as plantas são transplantadas para bandejas de isopropileno com 72 células (Figura 6). O tempo médio para aclimatização é de 30 dias, e a umidade relativa do ambiente deve ser cuidadosamente controlada. Após este período o material já pode ser encaminhado para o viveirista.



Foto: Natália Dias Gomes da Silva.

Figura 6: Aclimatização de mudas de morangueiro, oriundas da cultura de tecidos.

Ao final do processo de produção das matrizes recomenda-se a indexação, visando o monitoramento da presença de patógenos. A indexação para viroses pode ser realizada via testes sorológicos, como o ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*); moleculares, como o PCR (*Polymerase Chain Reaction*); por microscopia eletrônica; ou pela enxertia de tecido da planta matriz a ser testada em folhas de clones sensíveis de *Fragaria vesca* e *F. virginiana*.

Para evitar que haja misturas de cultivares, cuidados devem ser tomados durante a multiplicação de matrizes em laboratório, o que exige rigoroso controle da posição e identificação dos frascos na sala de cultivo. Como é difícil diferenciar cultivares

de morangueiro nos estádios in vitro e durante a aclimatização, o controle da fidelidade genética pode ser realizado por meio de marcadores RAPD (OLIVEIRA et al., 2005).

Referências

ASSIS, M. de. **Micropropagation of fruit crops with emphasis on strawberry**. 1978. 80 p. Dissertação (Mestrado em Plant pathology). University of Wisconsin, Madison.

ANTUNES, L. E. C. (Ed.) **Sistema de produção de morango**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005. (Embrapa Clima Temperado. **Sistemas de produção**, 5).

Disponível em: < <http://www.cpact.embrapa.br/sistemas/morango/index.php>>. Acesso em: 15 set. 2011

ANTUNES, L. E. C.; REISSER JÚNIOR, C. Fragole, i produttori brasiliani mirano all´esportazione in Europa. **Rivista di Frutticoltura**, Bologna, v. 69, n. 5, p. 60-65, 2007.

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.

EMATER-MG. **Dados confirmam que cultivo de morango cresce cada vez mais na agricultura familiar**. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_tpl_paginas_internas&id=7916>. Acesso em: 15 set. 20011.

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

OLIVEIRA, R. P.; NINO, A. F. P.; SILVA, F. O. X.; BRAHM, R. U. Produção de matrizes de morangueiro por meio de cultura de tecidos. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005. 34 p. (Embrapa Clima Temperado. **Sistemas de produção**, 7). Disponível em:<http://www.cpact.embrapa.br/sistemas/matrizes_morangueiro/index.htm>. Acesso em: 15 set. 2011.

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

ROCHA, P. S. G.; OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B.; SANTOS, U. L. **Novas fontes de luz para a micropropagação de morangueiro**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. 5 p. (Embrapa Clima Temperado. Comunicado técnico, 219).

SECCHI, V. A. **Controle integrado de pragas e doenças do morangueiro**. 3. ed. Porto Alegre: EMATER-RS, 1992. 66 p.