CESAR PEREIRA TEIXEIRA

OBTENÇÃO IN VITRO DE MUDAS DE MORANGUEIRO (*Fragaria x ananassa* Duch) VIA CULTURA DE MERISTEMA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do grau de "MESTRE".

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS
LAVRAS - MINAS GERAIS
1 9 8 5

CESAR PEREIRA TEIXEIRA

OBTENÇÃO IN VITRO DE MUDAS DE MORANGUEIRO (Fragaria x ananassa Duch.) VIA CULTURA DE MERISTEMA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do curso de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração Fitotecnia, para obtenção do grau de "MESTRE".

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS
LAVRAS - MINAS GERAIS
1 9 8 5

OBTENÇÃO IN VITRO DE MUDAS DE MORANGUEIRO (*Fragaria x ananassa* DUCH) VIA CULTURA DE MERISTEMA.

APROVADA: Em 23 de maio de 1985.

Prof. MARCOS PAIVA
Orientador

Prof. MAURÍCIO DE SOUZA

Prof. FABIO DE BORJA PORTELA

Aos familiares e amigos

em especial ao AMARAL (*in memorian*)

OFEREÇO

Aos meus pais,

Helena e Antonio

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura de Lavras pela oportunidade concedida para a realização do curso de Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos, durante o curso de mestrado.

Ao professor Marcos Paiva, a quem muito devo pela minha formação científica, pela eficiente orientação, dedicação, incentivo e apoio amigo depositado.

Ao professor Maurício de Souza pela amizade e, valiosas sugestões apresentadas no decorrer da pesquisa.

A professora Antonia dos Reis Filgueira, pelas contribuições no aprimoramento técnico.

Aos professores Fábio de Borja Portela e José Eduardo Brasil P. Pinto pelo auxílio na fase final desta pesquisa.

À laboratorista Valéria A. Fernandes e todos os funcionários do Departamento de Agricultura, pela valiosa ajuda recebida.

Aos funcionários do Pomar da ESAL, pela colaboração e apoio constante.

Aos colegas de curso, em especial ao Renato de Oliveira Resende e Jorge S. Freire, pelo apoio e amizade.

A Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária (EMCAPA), pela oportunidade de continuar contribuindo com a pesquisa agrícola.

A minha sincera gratidão, para com todos que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

CÉSAR PEREIRA TEIXEIRA, filho de Antonio Resende Teixeira e Helena Pereira Teixeira, nasceu em Lavras, Minas Gerais, a 25 de outubro de 1956.

Obteve o título de Engenheiro Agrônomo pela Escola Superior de Agricultura de Lavras, Minas Gerais, no ano de 1980.

De março de 1981 a fevereiro de 1983 trabalhou para a Secretaria de Estado da Agricultura de Minas Gerais - Superintendencia de Cooperativismo - SUDECOOP.

Em março de 1983, iniciou o curso de pós-graduação em Agronomia a nível de Mestrado, na Escola Superior de Agricultura de Lavras.

Atualmente é técnico da EMCAPA - Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE QUADROS

LISTA DE FIGURAS

Figura

Página

Figura

Página

1. INTRODUÇÃO

O morangueiro cultivado *Fragaria x ananassa* Duch provem da hibridação natural das espécies *Fragaria chiloensis* Duch de origem chilena e *Fragaria virginiana* Duch de origem norte americana SCOTT & LAWRENCE (48). O morangueiro é cultivado mundialmente, notadamente nas regiões temperadas e subtropicais, e o fruto é considerado produto de grande aceitação para o consumo "in natura" e industrializado sob a forma de frutos congelados, geléias, sucos e compotas. No Brasil sua distribuição é ampla no centro sul do país, com exploração através de mão-de-obra familiar propiciando renda aos pequenos produtores rurais com uma produção nacional de cerca de 12.000 t/ano pelas estimativas de 1980.

O sucesso da cultura do morangueiro está intimamente relacionado ao aspecto fitossanitário das mudas, devido a sua propagação comercial ser exclusivamente via vegetativa através de estolons, o que concorre para a perpetuação e transmissão de doenças, principalmente viróticas, como o mosqueado, faixa de nervuras e clorose marginal, que podem reduzir a produção em mais de 50%, principalmente quando associadas.

As viroses são eliminadas em parte pela termoterapia, método de eficiência limitada diante de determinados virus; recentemente pesquisadores como ADAMS (1) e MULLIN et alii (40) utilizando o método de cultura de meristema *in vitro* de morangueiro, conseguiram obter plantas livres de virus com excelentes resultados no vigor e produtividade destas 'novas' plantas.

Os objetivos deste trabalho são:

a) testar as operações envolvidas no cultivo *in vitro* de meristema do morangueiro;

b) testar meios de cultura para otimizar o desenvolvimento *in vitro* dos meristemas;

c) avaliar o comportamento de cultivares de morangueiro diante da técnica;

d) testar condições de aclimatação e produção de mudas de morangueiro;

e) realizar testes preliminares de indexação de virus do morangueiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A obtenção e multiplicação de mudas com alta sanidade podem ser consideradas como determinante no sucesso da cultura do morangueiro. BETTI (8) observou que mudas com sanidade comprovada chegam a aumentar em até 100% a produção de frutos em relação às produções obtidas com mudas comuns da cultivar Campinas (IAC-2712).

Este aumento de produtividade está relacionado com a ausência de patógenos nas mudas, principalmente de virus e varia com o decorrer do cultivo de ano para ano, CONVERSE & MARTIN (16), BETTI et alii (10), BARRITT & LOO (5), HORN & CARVER (28). Estudos feitos por CARVALHO & COSTA (15) com amostras de morangueiros de variedades cultivadas tradicionalmente no Estado de São Paulo, mostraram que todas elas são portadoras de pelo menos o virus do 'mosqueado' e, provavelmente de outros, sem apresentar sintomas perceptíveis na maioria das variedades cultivadas, KITAJIMA et alii (32). Devido as plantas de morangueiro serem propagadas vegetativamente existe tendência a acumular virus a medida do envelhecimento do clone, e certos virus, como o virus do mosqueado do morangueiro disseminam mais rapidamente do que o virus da

faixa de nervuras do morangueiro, conforme BETTI (7) em levantamentos realizados entre 1970 e 1974 no Estado de São Paulo.

AERTS (2) através de um estudo amplo em diversos pai - ses, listou 54 virus e 8 micoplasmas, que causam danos no morangueiro, observando ainda que a ação de complexos viróticos são mais danosas à planta, e os virus do 'mosqueado' e da 'clorose marginal' são os mais danosos na cultura do morangueiro.

Os métodos utilizados para obtenção de mudas sadias consistem no uso de produtos químicos (quimioterapia) como as tetraciclinas e virazole, BOXUS et alii (12), NORRIS (44) e WALKEY (54). Porém a quimioterapia não é eficiente na eliminação de todas partículas virais notadamente no estadio avançado de infecção viral. Outro processo é o uso de calor (termoterapia), que baseia-se em tratar as mudas em água quente (46°C) por 10 minutos, ou em camaras de circulação de ar quente (37-38°C) por 1 a 4 semanas, QUAK (46) e BOXUS et alii (12). Contudo os resultados deste tratamento dependem da cultivar, do estado fitossanitário das plantas, principalmente no que se refere a presença de virus. Algumas estirpes do virus do 'encrespamento' e 'clorose marginal' são difíceis de serem eliminadas pela termoterapia, além disto, este método requer o mínimo de 3 anos para se obter grande quantidade de material com sanidade comprovada.

A cultura de meristema *in vitro* vem sendo o método rápido e eficiente na obtenção de plantas sadias. Os primeiros pesquisadores a recomendarem a eliminação dos virus em morangueiro,

através da cultura de meristema foram BELKENGREN & MILLER (6) em 1962 e um ano mais tarde já publicaram resultados com a metodologia aplicada nas cultivares comerciais de *Fragaria* x *ananassa* Duch, MILLER & BELKENGREN (37).

As hipóteses que tentam explicar a ausência de partículas virais nos tecidos meristemáticos estão relacionadas com o rápido desenvolvimento do meristema, sua desconecção vascular e a inativação das partículas virais durante o cultivo *in vitro* de acordo com KASSANIS & VARMA (31), MELLOR & STACE-SMITH (36), MATTHEWS (34). Portanto, quando se extrai uma pequena porção de meristema (0,2 a 0,4 mm) geralmente haverá ausência de partículas virais. Holling & Stone, citados por LANGHANS et alii (33), estudando o tamanho do meristema do cravo para eliminar o virus do 'mosqueado', retiraram meristemas com 5 tamanhos (0,1; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 mm), destes 33, 60, 87, 89 e 100 por cento respectivamente, estavam infectados com virus. Através deste resultado, nota-se que quanto menor o tamanho do meristema melhor será a obtenção de plantas livres de virus.

Quando certos virus não são eliminados pela cultura de meristema realizada isoladamente, antes de se reiniciar esse processo, usa-se um pré-tratamento com calor para garantir a eficiência na eliminação dos virus, VINE (53), ADAMS (1), MULLIN et alii (38), McGREW (35) e OEHL & HUGHES (45). Tal metodologia é definida como uma ação conjugada que facilita a eliminação dos virus.

Nas condições de cultivo *in vitro*, o meio da cultura é fundamental na regeneração da planta. Conforme MURASHIGE & SKOOG (42), é necessário que o meio contenha macro e micronutrientes, vitaminas e principalmente hormônios, que são os responsáveis pela diferenciação e crescimento. SHABDE & MURASHIGE (49) pesquisando a organogênese em *Dianthus caryophyllus* L. observaram que o balanço de substâncias hormonais é o mecanismo fundamental que regula a iniciação foliar e enraizamento nos cultivos *in vitro* de meristemas. Segundo A. RODRIGUEZ et alii (3) em estudos com mandioca, as citocininas (6-benzilaminopurina-BAP e 6-furfuril-amonopurina-Kinetina) em altas concentrações favorecem o desenvolvimento de gemas e inibem o enraizamento; por outro lado, as auxinas (ácido naftaleno acético-ANA, ácido indol acético-AIA e ácido indol butírico-AIB) em baixas concentrações estimulam a diferenciação em raízes, e as giberelinas (ácido giberélico-GA_3) em níveis médios estimulam os primórdios foliares do meristema. ASSIS (4) observou que a suplementação de citocinina (BAP) em 5 mg/l promoveu maior desenvolvimento de meristemas do morangueiro e o uso de baixas concentrações de BAP (até 0,01 mg/l) foi o que promoveu melhor enraizamento. TORREY (52) pesquisando a ação dos fitohormônios no enraizamento das plantas pela ação endógena, observou que existe maior concentração de auxinas nas raízes das plantas em geral, e que as citocininas estão concentradas nos tecidos meristemáticos.

A utilização de ágar para tornar o meio líquido em semi-sólido, favorece o desenvolvimento do meristema segundo VINE

(53). O pH do meio de cultura deve ser ajustado em torno de 5,7 a 5,9 de acordo com BOXUS et alii (12) e DRIESSEN (18).

As condições ambientais da sala de crescimento são também fundamentais para o cultivo *in vitro* e já se estabeleceu alguns fatores considerados ideais como a intensidade luminosa em torno de 2000 lux com controle de 16 horas de luz/dia, temperatura de 25°C ± 2° constante, conforme trabalhos realizados por MURASHIGE (41), BOXUS et alii (12).

Com relação a extração dos meristemas, HOOF (27), observou ser possível obter 2 a 3 meristemas na extremidade de cada estolon, semelhantes na qualidade, e que os meristemas situados na roseta (coroa) da planta adulta são difíceis de serem extraídos, além de apresentarem maior ocorrência de infecções internas. Um tratamento químico de desinfecção dos estolons deve ser realizado, conforme HARTMAN & KESTER (24). Pode-se usar hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos e posterior eliminação do excesso de hipoclorito com água destilada e autoclavada, DRIESSEN (18). Todos os cuidados ao introduzir o meristema no tubo de ensaio, são importantes para evitar contaminações durante o cultivo *in vitro*.

No cultivo *in vitro* ocorrem transformações na porção meristemática e é denominado organogenese; e segundo NARAYANASWAMY (43) a primeira fase, caracterizada pela formação de "callus" tem continuidade pela ação dos fitohormônios exógenos e endógenos e outros fatores físicos, variando com o genótipo e origem do teci

do. Com o desenvolvimento desses callus, aumentando em massa e emitindo grande quantidade de pequenas gemas, passa-se a denominar callus organogênico.

Com a obtenção de callus organogênico *in vitro* proveniente de meristema, é possível multiplicá-lo através de técnica conhecida como micropropagação. As gemas do callus organogênico se formam na base de cada folíolo através da ação dos reguladores de crescimento, especialmente as citocininas de acordo com BOXUS et alii (12), aumentando portanto em número, e são divididos e levados para a presença do ácido giberélico (GA_3) que é promotor do alongamento, em estudos realizados com batata, JARRET (29) e RESENDE (47). Uma vez alongado os tufos de parte aérea, estes são separados novamente e levados para o meio de enraizamento com baixo nível de citocinina, ASSIS et alii (4), ou na presença de auxinas TORREY (52), possibilitando obter grande quantidade de plântulas, que podem ser armazenadas *in vitro* para distribuição de germoplasma na forma clonal, de acordo com HENSHAW (25) e MULLIN & SCHLEGEL (39).

Na transferência destas plântulas desenvolvidas *in vitro* para as condições *in vivo*, devem-se considerar cuidados com o substrato (solo desinfectado), com a umidade para não ocorrer dissecação e a intensidade luminosa que deve favorecer o desenvolvimento foliar, BOXUS et alii (12). O uso de solução nutritiva na transferência para o substrato é fundamental para a nutrição das plantas, MURASHIGE (41). Tão logo que a planta se adapte às condições da casa de vegetação, deverá passar aos 'telados' para a indexa-

ção conforme metodologia descrita por BETTI & COSTA (9), CARVA - LHO & COSTA (15), utilizando plantas indicadoras (*Fragaria vesca* L.) e afídios vetores. Com a identificação dos clones livres de virus pode-se fazer a manutenção e distribuição de mudas num processo integrado entre a instituição de pesquisa e os viveiristas, de acordo com HOLLINGS (26).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Escola Superior de Agricultura de Lavras, Minas Gerais, nos anos de 1984/85.

3.1. Cultivares

Foram utilizados nesta pesquisa cinco cultivares: Monte Alegre, Lassen, Tioga, Aiko e Konvoy-Cascata. As duas primeiras cultivares (de estado fitossanitário desconhecido) são provenientes de produtores da região de Pouso Alegre, estado de Minas Gerais. As demais cultivares sadias são provenientes do Centro Nacional de Pesquisa de Fruteiras de Clima Temperado, CNPFT - EMBRAPA - Pelotas, RS.

As mudas de estolons foram plantadas na casa de vegetação em sacos plásticos (20 x 30 cm), contendo mistura de terra e composto orgânico, com adubação fosfatada (800 g/m^3 de P_2O_5) conforme SOUZA (50). Os tratos culturais constaram de regas periódicas e adubação nitrogenada de cobertura em intervalos de 14 di

as de acordo com CAMARGO (13), SOUZA et alii (51), DECKER (17) e FILGUEIRA (22), para promover maior desenvolvimento vegetativo (produção de estolons) os quais foram utilizados para fornecimento de meristemas para o cultivo *in vitro*. Tratamentos fitossanitários foram realizados de acordo com GALLO et alii (23) e CARDOSO (14) como no controle de afídios e doenças fúngicas.

Para estimular a produção de estolons, no período de abril a setembro, meses de dias curtos, as plantas foram submetidas às condições de dias longos, através de iluminação artificial com lâmpadas incandescentes de 60W, pois vários cultivares de morangueiro respondem ao fotoperíodo, DURNER (19).

3.2. Remoção dos meristemas

Quando as mudas das cultivares apresentaram número de estolons suficientes, a porção terminal (2 a 3 cm) dos estolons (Figura 1) foi removida e devidamente acondicionada em placas de petri umedecidas e levadas para o laboratório onde foram desinfectadas com hipoclorito de sódio a 1%, por um período de 10 minutos, e enxaguadas três vezes com água destilada e autoclavada com a finalidade de remover o desinfectante. A remoção do meristema foi realizada na cabine de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool 70%, numa placa de petri umedecida e autoclavada, com o auxílio de uma lupa estereoscópica com aumento de até 40 vezes, utilizando uma pinça de ponta média e bisturis cirúrgicos. As folhas que envolvem a porção terminal do estolon fo

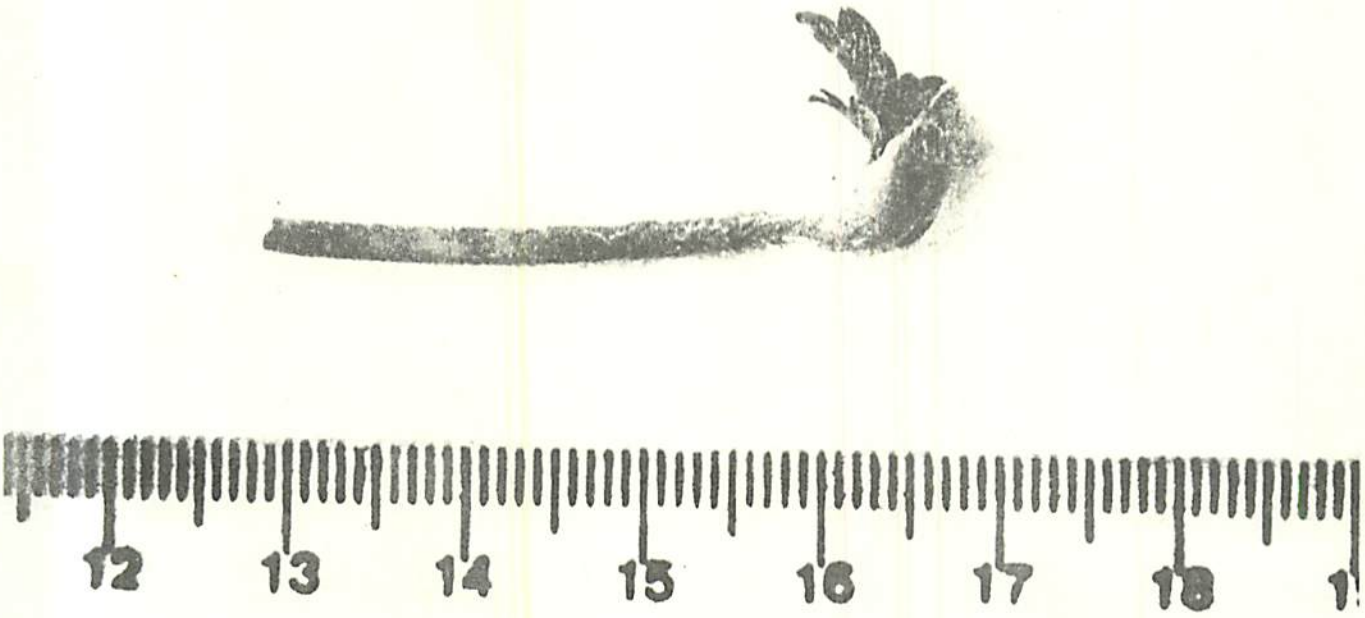


FIGURA 1 - Estolon da planta de morangueiro utilizada para a remoção do meristema

ram retiradas cuidadosamente até se localizar o meristema contendo os dois primórdios foliares (Figura 2).

O tamanho do meristema foi determinado com o auxílio de uma escala milimétrica de precisão, colocada ao lado da porção meristemática. O corte do meristema foi realizado sempre utilizando-se outra lâmina da que tenha sido manipulada em contacto com o tecido do estolon, para evitar a disseminação de patógenos. O tamanho do meristema (Figura 2) foi sempre inferior a 0,4 mm. Após a remoção, o meristema foi imediatamente colocado em tubo de ensaio (18 x 150 mm) contendo meio de cultura. Os tubos de ensaio contendo um meristema foram levados para a sala de crescimento em ambiente com luz e temperatura controlada, onde permaneceram até posterior desenvolvimento.

3.3. Meio de cultura e condições ambientais

Foi utilizado o meio de cultura básico de MURASHIGE & SKOOG (42) com os respectivos componentes e concentrações apresentados no Quadro 1. Para melhor operacionalidade na preparação dos diferentes meios de cultura, soluções estoques de todos os componentes do meio de cultura básico, fitohormônios, vitaminas e glicina foram preparados previamente e armazenados em geladeira a 4°C, exceto a sacarose e o ágar, que foram adicionados no momento de preparo de cada meio. A adição de solventes foi necessária na preparação de soluções estoques de hormônios. As auxinas e giberelinas foram dissolvidas com auxílio de 2-3 ml de

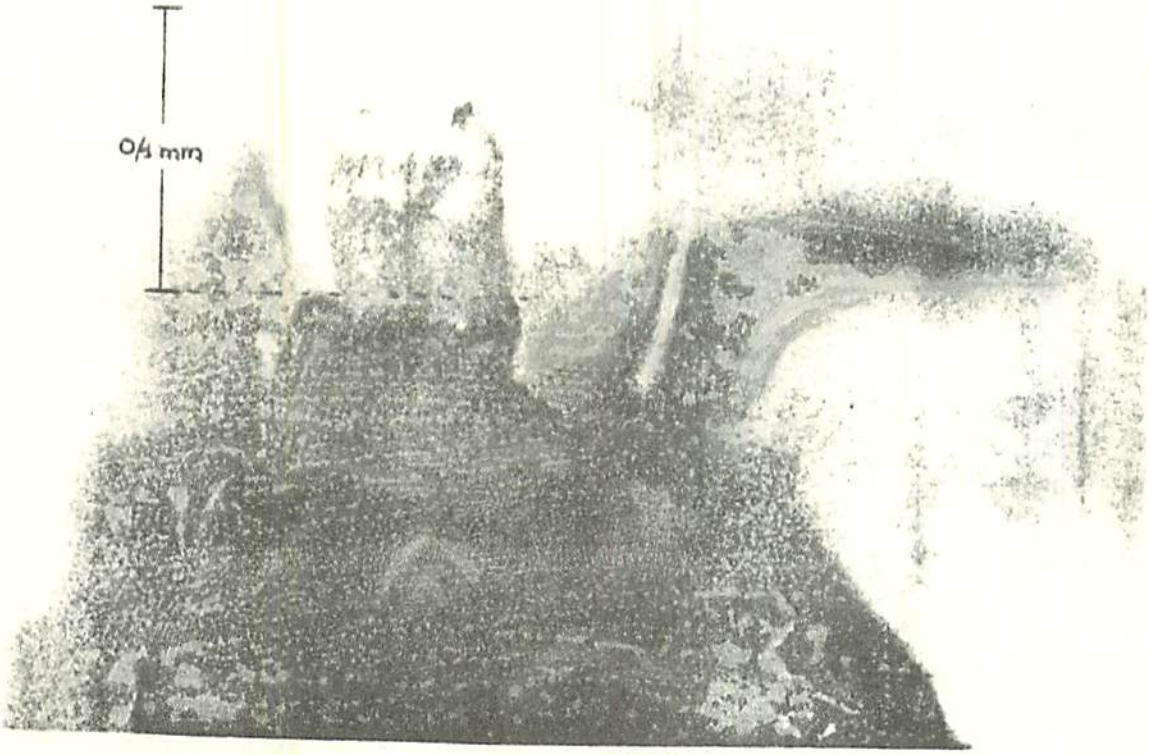


FIGURA 2 - Meristema de morangueiro contendo primórdios foliares

QUADRO 1 - Composição do meio de cultura de Murashige e Skoog (MS) modificado, com vitaminas, carboidrato, ágar e aminoácido

Solução estoque	Compostos	Concentração final do meio de cultura (mg/l)
A	NH_4NO_3	1.650,0
B	KNO_3	1.900,0
C	H_3BO_3	6,2
	KH_2PO_4	170,0
	KI	0,83
	$Na_2MoO_4 . H_2O$	0,25
	$CoCl_2 . 6 H_2O$	0,025
D	$CaCl_2 . 2 H_2O$	440,0
E	$MgSO_4 . 7 H_2O$	370,0
	$MnSO_4 . 4 H_2O$	22,3
	$ZnSO_4 . 7 H_2O$	8,6
	$CuSO_4 . 5 H_2O$	0,025
F	Na_2 EDTA	37,25
	$FeSO_4 . 7 H_2O$	27,85
Vitaminas	Tiamina	0,5
	Piridoxina	0,5
	Ácido nicotínico	0,5
	Mio-inositol	100,0
Carboidrato	Sacarose	30.000,0
	Ágar	8.000,0
Aminoácido	Glicina	2,0

solução de NaOH a 0,5 N e as citocininas com 2-3 ml de solução de HCl a 0,5 N.

O pH de todos os meios de cultura foi ajustado para 5,7 ± 0,1, utilizando-se solução de NaOH ou HCl. Após o ajuste do pH, o meio de cultura foi acrescido de ágar a 0,8%, dissolvido por aquecimento e distribuido nos tubos de ensaio (10 a 15 ml/tubo), tampados com papel alumínio e autoclavados a uma temperatura de 120°C a 1 atm por 20 minutos.

Cada tubo de ensaio recebeu um meristema e foi colocado em porta tubos e estes levados para a sala de crescimento, onde permaneceram a uma temperatura de 24°C ± 2°C e com iluminação de intensidade aproximada de 3.000 lux, utilizando-se combinação de lâmpadas Gro-Lux e Branca Fria, com regime de 16 horas luz/dia.

O processo de produção de plântulas completas *in vitro* foi dividido em três fases: isolamento, multiplicação/alongamento e enraizamento.

3.4. Fase de isolamento

Esta fase, compreendeu o período desde a remoção do meristema até um período de aproximadamente 40 dias de cultivo *in vitro*. Avaliou-se o comportamento das cultivares e a melhor época de repicagem dos callus formados para o meio de multiplicação/alongamento, sendo que parte do material (1/3) foi conservada neste meio como fonte de material para manutenção *in vitro*. Utili-

zou-se nesta fase o meio de cultura composto do meio básico, suplementado com 1 mg/l de BAP, 0,01 mg/l ANA e 0,1 mg/l de GA_3. Preparado o meio, colocou-se 10 ml em cada tubo de ensaio (18 x 150 mm), utilizando quantidade superior a dez tubos por variedade como medida de garantia contra possíveis perdas por contaminação ou oxidação dos meristemas. Avaliou-se o desenvolvimento dos meristemas de cada cultivar em duas épocas, determinando-se taxas de crescimento através de observações visuais periódicas, empregando-se um sistema de notas onde: 0 - meristema não desenvolvido; 1 - início da formação de callus (2 mm ϕ); 2 - callus desenvolvido (4 mm ϕ); 3 - formação de callus organogênico (6 mm ϕ); e 4 - callus organogênico (10 mm ϕ).

3.5. Fase de multiplicação/alongamento

A fase de multiplicação e alongamento simultâneo das pequenas gemas, advindas do callus organogênico obtido da fase anterior, compreendeu o período até a obtenção de tufos de parte aérea com desenvolvimento adequado, transcorrendo 40 dias pós repicagem.

Com base nas pesquisas do princípio da ação alongadora dos tecidos vegetais pela ação do GA_3, descrito por vários pesquisadores, JARRET (29), RESENDE (47) e MURASHIGE & SKOOG (42) utilizou-se três níveis de GA_3 em combinação com citocinina, suplementando o meio básico com as seguintes composições: MB + 5mg/l BAP; MB + 5mg/l BAP + 0,1mg/l GA_3 e MB + 5mg/l BAP + 1,0 mg/l GA_3. Os callus organogênicos formados na primeira fase de isolamento

foram divididos até ficarem com o diâmetro de 3 mm e transferi - dos para tubos de ensaio contendo os meios de multiplicação/alongamento num mínimo de 10 tubos por cultivar. Para a avaliação realizada 40 dias após o início desta fase utilizou-se um sistema de notas onde: 1 - sem desenvolvimento (3 mm ϕ); 2 - formação de callus organogênico (6 mm ϕ); 3 - callus organogênico (10 mm ϕ); 4 - formação de "roseta" (16 mm ϕ); 5 - "roseta" (20 mm ϕ).

3.6. Fase de enraizamento

As plântulas com parte aérea e ausência de raízes, advindas de gemas axilares do callus organogênico formando a "roseta" foram separadas em partes, contendo no mínimo, três folhas, geralmente unifoliadas, e repicadas para cinco meios de cultura, utilizando-se controle (MB); MB + 0,005 mg/l BAP; MB + 0,01 mg/l BAP; MB + 0,1 mg/l AIB e MB + 1,0 mg/l AIB. Após 30 dias as plântulas foram avaliadas pela formação ou ausência de raízes. Foram repicadas 30 plântulas em cada tratamento.

3.7. Aclimatação e transplantio

As plantas jovens com raízes e folhas desenvolvidas foram transferidas para três substratos: solo esterilizado; solo esterilizado + vermiculita (2:1), vermiculita. Sendo regadas inicialmente com solução nutritiva contendo os sais de MURASHIGE & SKOOG. Durante a fase de aclimatação as plântulas permanecer - ram em bandejas com tubetes na sala de crescimento sob cobertura

plástica transparente, temperatura controlada e alta umidade, recebendo regas constantes. Foi avaliada a percentagem de mudas desenvolvidas após 12 dias, e transplantadas para casa de vegetação em sacos de polietileno (13 x 28 cm), com substrato descrito anteriormente para as plantas fornecedoras de estolons, recebendo os tratos culturais necessários.

3.8. Testes de indexação

Através da utilização da planta teste *Fragaria vesca* var. *Semperflorens* Duch (Serr.) e dos afídios vetores *Chaetosiphon fragaefolii* (Cockerrel) e *Pentatrichopus fragaefolii*, foram realizados testes preliminares com as plantas advindas da cultura de meristema da cultivar Lassen devidamente identificadas com o mesmo clone mantido *in vitro*. Simultaneamente testou-se as plantas fornecedoras de meristemas provenientes de plantios comerciais em telados individuais, onde foram colocados pulgões provenientes de colonias mantidas em plantas sadias, e permaneceram em livre contacto, entre a planta a ser testada e a planta teste indicadora. Após uma semana procurou-se observar os sintomas, através de mudanças características nas folhas da planta teste, de acordo com metodologia proposta por CARVALHO & COSTA (15) e BETTI & COSTA (9).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Condução das plantas em casa de vegetação

Um fator que mostrou ser fundamental no controle da capacidade vegetativa foi o fotoperíodo (Figura 3). O uso da iluminação artificial foi altamente eficiente para reduzir a floração e induzir a produção de estolons, dos quais retiraram-se os meristemas para o cultivo *in vitro*.

O manejo adequado das plantas em casa de vegetação, permitiu a obtenção de 2 a 9 estolons por planta, variando conforme a cultivar, sendo as cultivares Monte Alegre, Konvoy-Cascata e Lassen de maior produção de estolons (5 a 9 estolons/planta) e os cultivares Aiko e Tioga com menor produção (2 a 4 estolons/planta) a partir de um período inicial de plantio de 4 meses.

Outros cuidados, como a rega diária e adubações periódicas foram importantes para o desenvolvimento vegetativo das plantas, observando que o morangueiro é uma planta sensível a ausência de água, principalmente em temperatura elevada (>28°C).

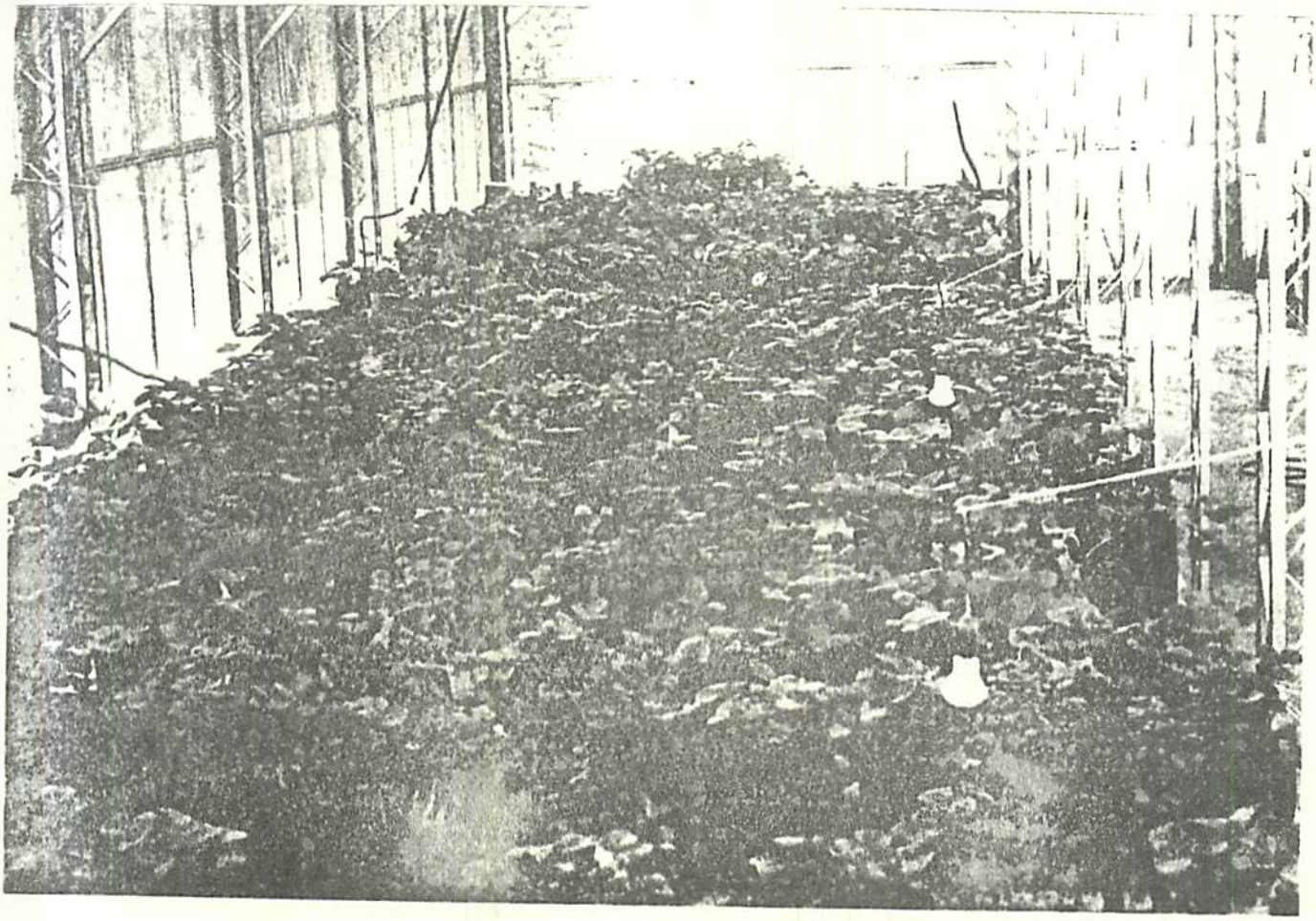


FIGURA 3 - Vista interna da casa de vegetação com as cultivares de morango sob iluminação natural e artificial no período noturno

4.2. Remoção dos meristemas

O estádio de desenvolvimento dos estolons foi importante para o sucesso da remoção dos meristemas, sendo adequado, quando na porção terminal do estolon estiver presente apenas uma pequena folha (Figura 1) antes da emissão de raízes. O início da remoção do meristema deve ser realizado com um menor aumento (10x) e com o decorrer da operação deve-se aumentar até 40 vezes na lupa estereoscópica.

A presença de pilosidades no estolon foi generalizada, e o número de meristemas encontrados variou entre 1 a 3 por estolon, semelhante para todas cultivares em estudo.

4.3. Desenvolvimento *in vitro* do meristema do morangueiro

Em todas cultivares de morangueiro estudadas, o processo de desenvolvimento *in vitro* do meristema, foi caracterizado por estádios distintos, desde o início da formação de callus até o desenvolvimento completo em plântulas com raízes e parte aérea normais.

O desenvolvimento inicial foi lento e as primeiras transformações puderam ser observadas a partir da primeira semana com a formação de callus e pela acentuação da coloração verde. Transcorridas mais duas semanas (aproximadamente aos 21 dias após o isolamento) já se observou a presença de uma massa de callus não

friável, granulada e de cor verde intenso envolvendo o meristema. Quando atingiu-se 6 semanas de cultivo *in vitro* pôde-se observar a diferenciação de tecidos, com a emissão de inúmeras brotações advindas da massa de callus. Observações semelhantes são apresentadas por BOXUS et alii (12) e KARTHA et alii (31), denominado callus organogênico.

As brotações advindas do callus organogênico ao recebe rem suplementação com meios de cultura com maior concentração de BAP e GA_3 desenvolveram-se em uma estrutura expandida com a formação de tufos de parte aérea, denominada de "roseta", que se desenvolveram depois de transcorrer 10 semanas (70 dias) de cultivo *in vitro* (Figura 4).

Quando repicou-se estas "rosetas", dividindo-as em plântulas sem raízes e em meio de cultura adequado para a regeneração em planta completa, começou a ocorrer rapidamente (20 a 30 dias) a emissão de raízes, dando formação a plantas completamente desenvolvidas, aptas ao desenvolvimento *in vitro* sob condições naturais, uma vez tomados os devidos cuidados de aclimatação.

A Figura 5 mostra os diversos estádios de desenvolvimento *in vitro* do meristema do morangueiro. Estes estádios podem ser definidos em três fases distintas, caracterizando todo o processo de desenvolvimento em função da variação dos fitohormônios nos meios da cultura básicos, sendo: fase de isolamento, de multiplicação/alongamento e enraizamento.

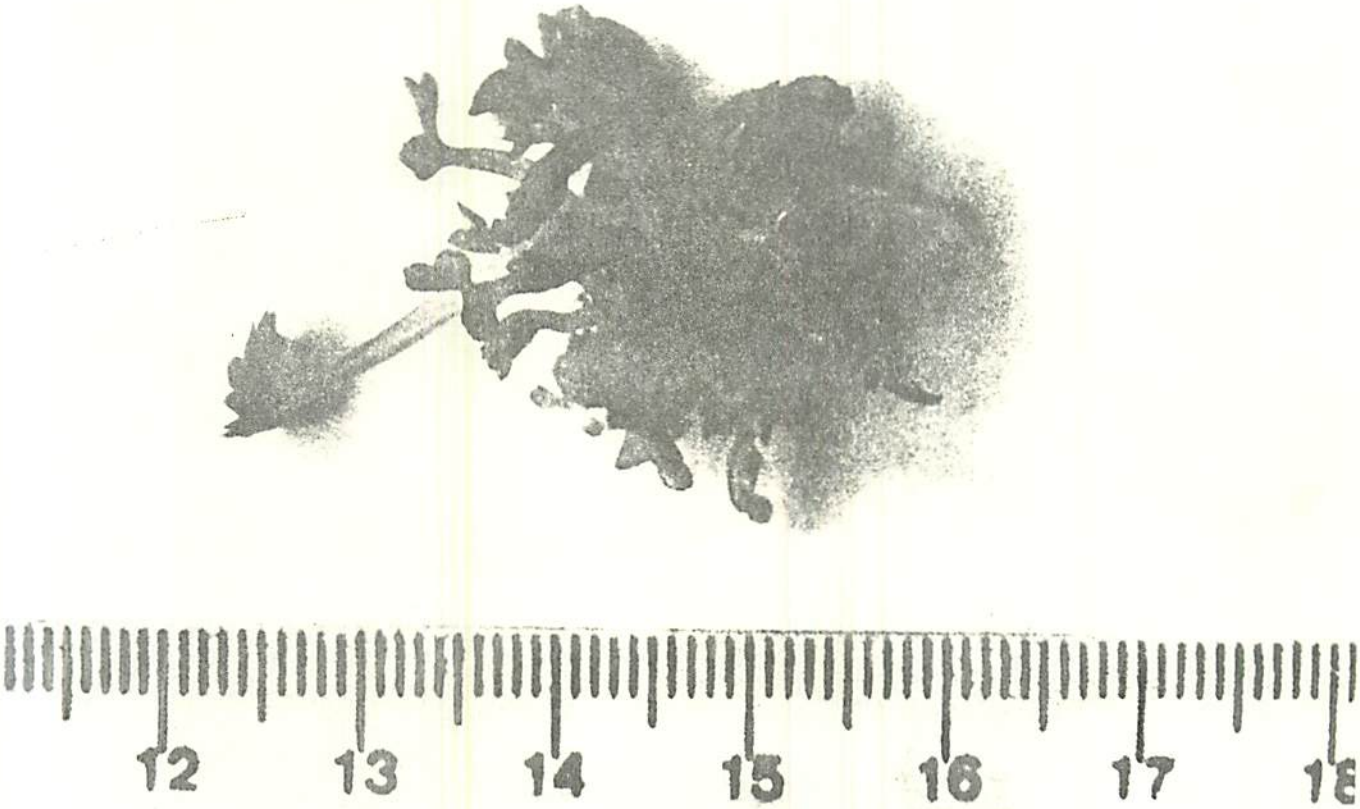


FIGURA 4 - "Roseta" onde se obtem tufos de parte aérea

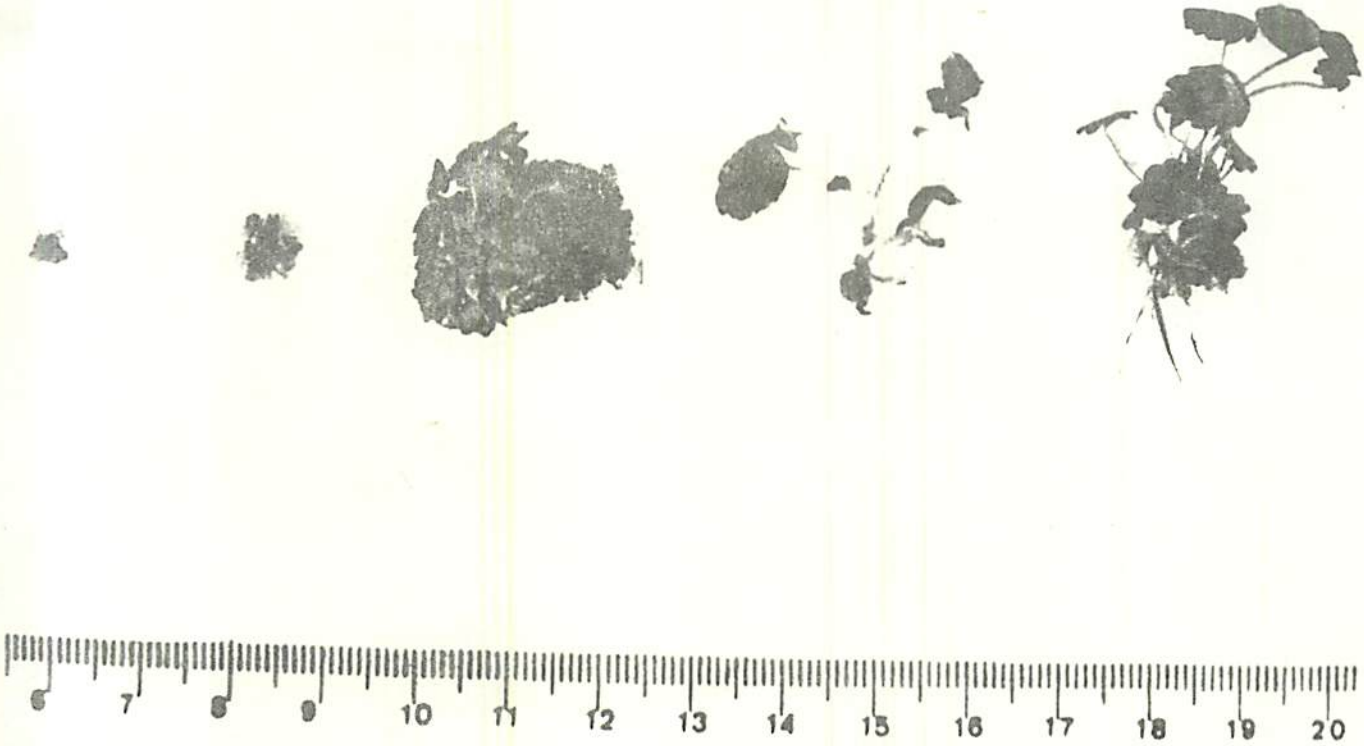


FIGURA 5 - Estádios de desenvolvimento *in vitro* de meristema de morangueiro. Da esquerda para a direita: iniciação e crescimento do callus organogênico, "roseta", plântula e plântula enraizada

4.3.1. Fase de isolamento

Na fase de isolamento observou-se o desenvolvimento de cada cultivar em duas épocas, com os resultados apresentados no Quadro 2.

Pode-se observar que um maior período de cultivo, aumentou consideravelmente a formação do callus de um diâmetro médio de aproximadamente 3 mm para 5 mm. Aumentando assim a quantidade de gemas presentes nesta estrutura intermediária de callus organogênico. Organogênese semelhante foi encontrada por BOXUS (11) em cultivos de ápices caulinares de morangueiro, utilizando-se a combinação auxina-citocinina, e por EARLE & LANGHANS (20) em *Crysantemum*.

Das cultivares observadas, a 'Lassen' apresentou um índice médio de callus, equivalente a aproximadamente 6 mm de diâmetro em média, sensivelmente superior às demais cultivares, que apresentaram médias em torno de 4,5 mm de diâmetro. Tal fato pode estar relacionado ao vigor fisiológico da cultivar, e/ou a aspectos ainda não esclarecidos.

4.3.2. Fase de multiplicação/alongamento

Os resultados observados na fase de multiplicação/alongamento, onde avaliou-se o desenvolvimento de cada cultivar em três condições de meios de cultura, estão apresentados no Quadro 3.

QUADRO 2 - Desenvolvimento comparativo de cinco cultivares de morangueiro em duas épocas durante a fase de isolamento do meristema

Cultivares	Nº de meristemas avaliados	Avaliação* período I	Avaliação* período II
Lassen	10	2,6	3,4
Tioga	10	1,4	2,3
Konvoy-Cascata	10	1,4	2,5
Aiko	10	1,5	2,3
Monte Alegre	10	1,2	2,2
Média		1,6	2,5

* Período I = 30 dias pós repicagem.
II = 40 dias pós repicagem.

* Nota média: 0 - meristema não desenvolvido;
1 - início da formação de callus (2 mm ϕ);
2 - callus desenvolvido (4 mm ϕ);
3 - formação de callus organogênico (6 mm ϕ);
4 - callus organogênico (10 mm ϕ).

QUADRO 3 - Desenvolvimento comparativo de cinco cultivares de morangueiro, 40 dias pós repicagem, em três meios de cultura, com diferentes concentrações de GA_3

Meios de cultura	Cultivares	Nº de callus avaliado	Nota média[1/]
MB + BAP5	Lassen	10	1,9
	Tioga	10	1,4
	Konvoy-Cascata	10	1,5
	Aiko	10	1,6
	Monte Alegre	10	1,5
MB + BAP5 + 0,1 GA_3	Lassen	10	3,3
	Tioga	10	2,4
	Konvoy-Cascata	10	2,6
	Aiko	10	2,8
	Monte Alegre	10	2,6
MB + BAP5 + 1,0 GA_3	Lassen	10	3,6
	Tioga	10	2,1
	Konvoy-Cascata	10	2,6
	Aiko	10	2,6
	Monte Alegre	10	2,5

[1/] Notas* médias: 1 - Sem desenvolvimento (3 mm ϕ);
2 - formação callus organogênico (6 mm ϕ);
3 - callus organogênico (10 mm ϕ);
4 - formação "roseta" (16 mm ϕ);
5 - "roseta" (20 mm ϕ).

* Notas apresentadas na Figura 6.

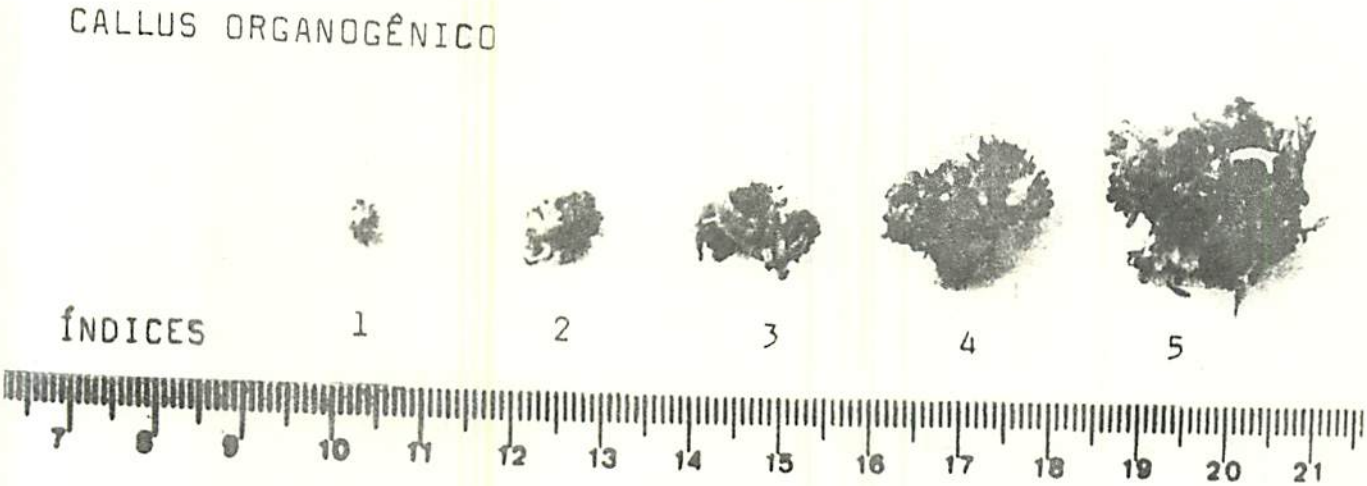


FIGURA 6 - Índices comparativos do desenvolvimento *in vitro* de morangueiro durante a fase de multiplicação/alongamento: 1 - sem desenvolvimento (3 mm ϕ); 2 - formação do callus organogênico (6 mm ϕ); 3 - callus organogênico (10 mm ϕ); 4 - formação "roseta" (16 mm ϕ); 5 - "roseta" (20 mm ϕ)

O estudo do comportamento dos cultivares *in vitro* indicou, como na fase de isolamento, um desenvolvimento mais rápido da cultivar Lassen atingindo em média diâmetro de aproximadamente 12 mm, quando cultivada em meio básico suplementado com BAP + GA_3, e menor diâmetro (6 mm) na ausência de GA_3 (Figura 7). As demais cultivares apresentaram desenvolvimentos semelhantes, porém com tamanho inferior à média observada para a cultivar Lassen (Figura 8).

Os meios de cultura que apresentaram as maiores taxas de desenvolvimento foram aqueles suplementados com GA_3, em combinação com BAP ao nível de 5,0 mg/l, promovendo a formação de "roseta" onde se agrupam tufos de parte aérea (Figura 4), importantes na produção em larga escala de mudas de morangueiro.

A menor formação de callus e a diferenciação em "roseta" se deve, primeiro pela ausência de auxinas no meio de cultura, concordando com observações de MURASHIGE (41), e segundo, pela ação provavelmente sinergística do BAP e GA_3 que promoveu alongamento rápido e vigoroso das gemas do callus organogênico, de acordo com observações de RESENDE (47) em batata.

A manutenção das "rosetas" por maior período em meios da cultura contendo elevada concentração de BAP (5,0 mg/l) promoveu a clorose podendo resultar até na morte das plântulas. Para a manutenção do material *in vitro* deve-se retirar as folhas velhas e retornar no meio de isolamento contendo 1,0 mg/l BAP, e após aproximadamente 2 semanas o material rejuvenece pela emissão

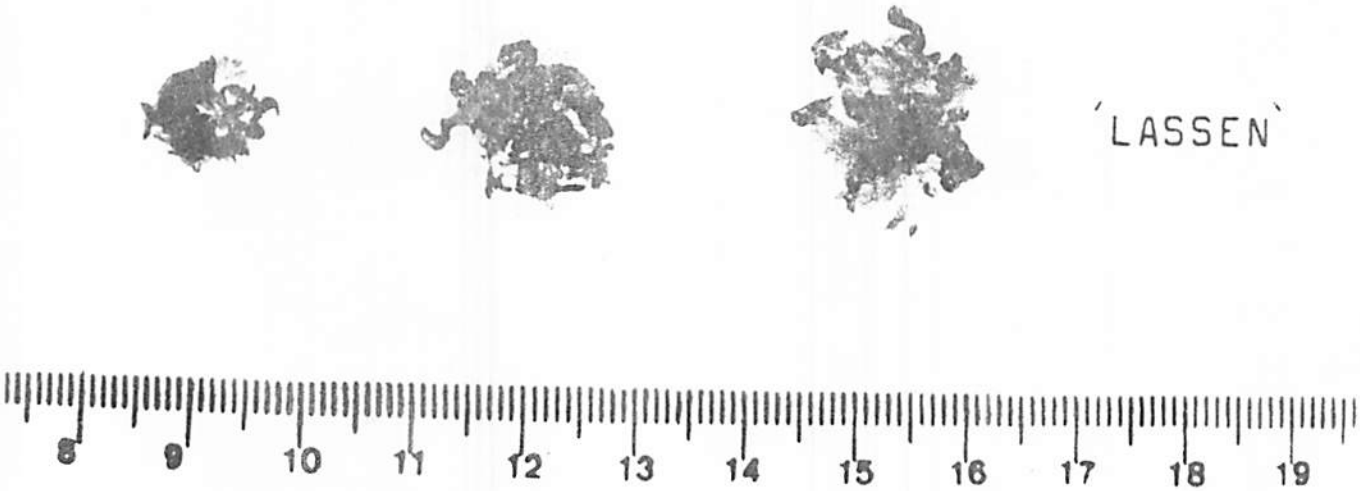


FIGURA 7 - Desenvolvimento médio comparativo da cultivar Lassen em três meios de cultura, sendo a esquerda: MB + 5 mg/l BAP; centro: MB + 5 mg/l BAP + 0,1 mg/l GA_3; direita: MB + 5 mg/l BAP + 1,0 mg/l GA_3

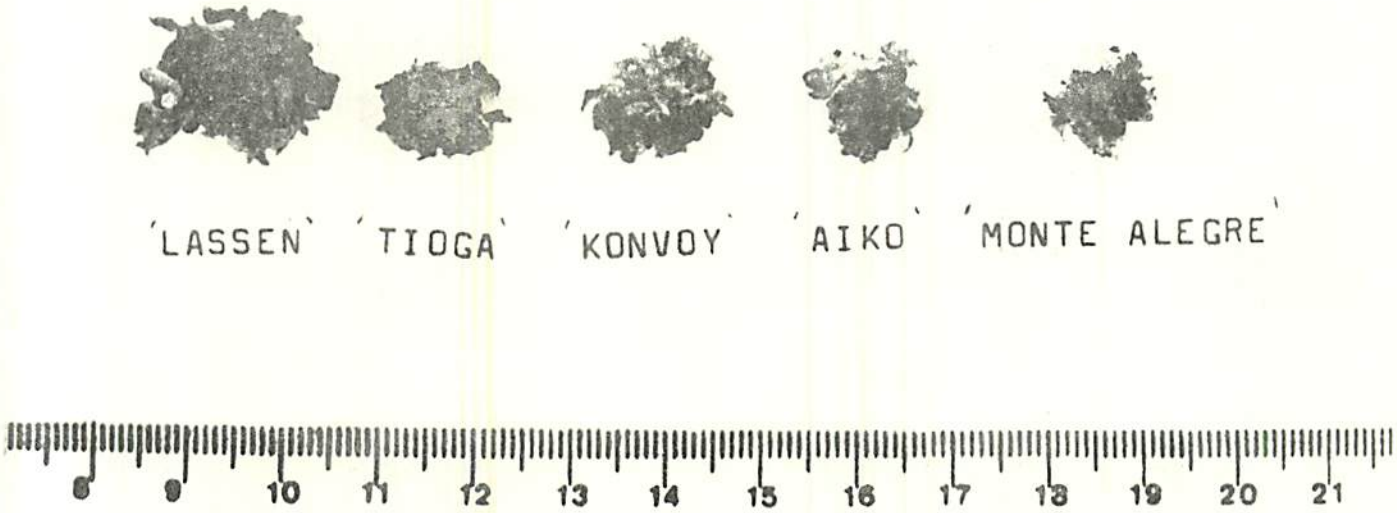


FIGURA 8 - Desenvolvimento médio comparativo entre os cinco cultivares de morangueiro, aos 80 dias de cultivo em meio básico com 5 mg/l BAP + 1,0 mg/l GA_3

de gemas axilares que aparecem da parte inferior do pecíolo das folhas velhas, crescendo rapidamente, emitindo novas gemas. Pelo controle dos níveis de BAP torna-se possível obter milhares de plantas de um único meristema dentro de um ano de cultivo *in vitro*.

4.3.3. Fase de enraizamento

Como se comentou anteriormente, a presença de citocinina (BAP) em diversos níveis é importante para o cultivo *in vitro* do morangueiro. Os resultados obtidos nesta fase, onde avaliou-se o desenvolvimento de raízes das plântulas sem raízes (Figura 9a) são apresentados no Quadro 4.

Observa-se que a ausência de fitohormônios no meio de cultura favoreceu o enraizamento das plântulas do morangueiro, tal fato, está de acordo com BOXUS et alii (12), e provavelmente é devido a presença endógena dos fitohormônios necessários ao enraizamento TORREY (50). O início do desenvolvimento de raízes (Figura 9b) se deu a partir do 10º dia de cultivo.

Os meios de cultura com baixas concentrações de BAP promoveram enraizamento em torno de 60,0%, com emissão de raízes mais longas e vigorosas do que na presença de AIB ou ausência de BAP.

Quanto a presença da auxina (AIB), mesmo sendo indicada para o enraizamento de certos cultivos *in vitro*, como no en-

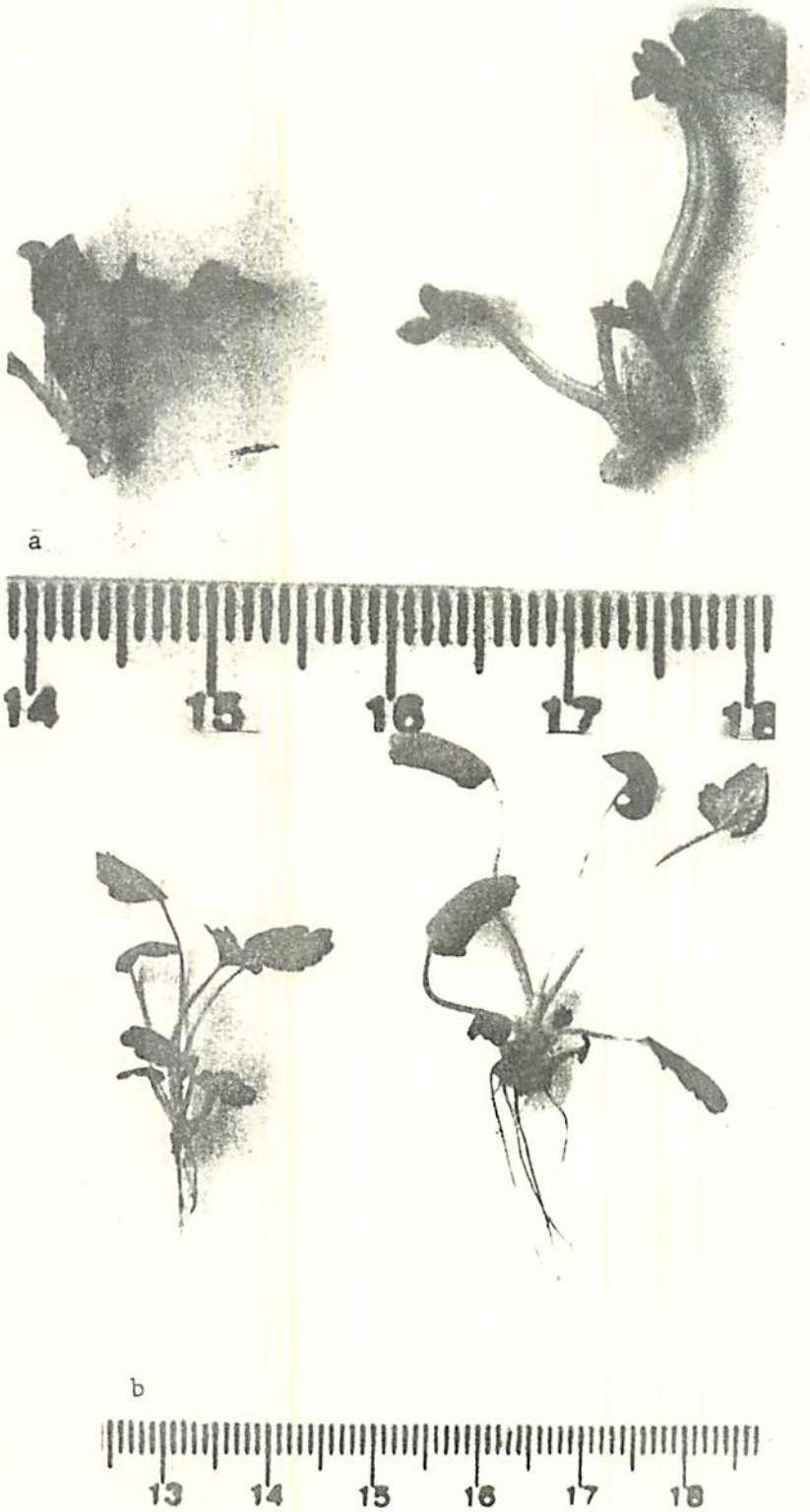


FIGURA 9 - Plântulas obtidas *in vitro*: a - plântulas sem raiz; b - plântulas enraizadas

QUADRO 4 - Avaliação do efeito do BAP e do AIB no enraizamento do morangueiro cultivado *in vitro*

Meios de cultura	Nº de plântulas avaliadas	Nº de plântulas enraizadas*	Rendimento (%)
M.B.	30	25	83,3
M.B. + BAP 0,005 mg/l	30	19	63,3
M.B. + BAP 0,01 mg/l	30	18	60,0
M.B. + AIB 0,1 mg/l	30	12	40,0
M.B. + AIB 1,0 mg/l	30	14	46,6

* Avaliação 30 dias pós repicagem.

raizamento de pereira por FELICIANO & ASSIS (21); no caso o morangueiro apresentou percentagens de enraizamento inferiores, a 50% nos dois níveis testados, não sendo portanto eficiente o uso de AIB no enraizamento de plântulas de morangueiro *in vitro*.

4.4. Fase de aclimatação

A fase de aclimatação corresponde o desenvolvimento das plântulas produzidas *in vitro* transplantadas para tubetes (Figura 10) contendo três substratos cujos resultados são apresentados no Quadro 5.

A mistura de vermiculita com solo foi o substrato que mais favoreceu a sobrevivência das plântulas *in vivo* (92%), certamente pela maior retenção e manutenção de água próxima às raízes das plântulas.

O uso isolado de vermiculita proporcionou um rendimento intermediário, provavelmente devido a presença de espaços vazios entre as estruturas que compõe este substrato e pela característica da vermiculita fixar nutrientes, como o nitrogênio disponível às plântulas.

O solo, em uso isolado apresentou menor rendimento, de apenas 53%, provavelmente devido a menor retenção de água e dificuldade de penetração das raízes devido a compactação.

O transplantio das plântulas para os sacos de polietileno foi bem sucedido, pois houve a emissão de novas raízes, e si

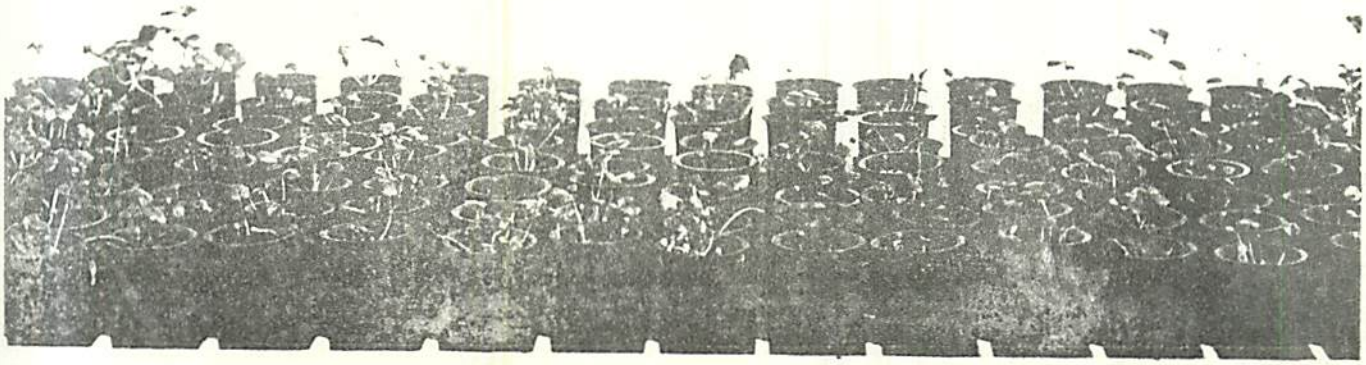


FIGURA 10 - Bandeja com tubetes contendo plântulas de morangueiro de diversas cultivares, aclimatadas após 12 dias de cultivo

QUADRO 5 - Rendimento do processo de aclimatação das mudas de morangueiro produzidas *in vitro* em três substratos

Substratos	Nº de plântulas transplantadas	Nº de plântulas sobreviventes*	Rendimento (%)
Vermiculita	60	47	78
Solo/vermiculita (2:1)	60	55	92
Solo	60	32	53

* Avaliação 12 dias pós transplantio.

multaneamente na parte aérea houve emissão de novas brotações, e em 3 a 4 meses já produziram estolons dando formação a novas mudas. A Figura 11 compara o vigor da cultivar Lassen proveniente de cultivo comercial com sanidade desconhecida, com uma planta da mesma cultivar produzida por cultura de meristema *in vitro*.

4.5. Testes de indexação

Os resultados preliminares do teste de plantas adultas da cultivar Lassen, proveniente de cultivos comerciais, com plantas indicadoras, expressaram a presença de vírus, através de sintomas como redução no tamanho de folíolos, crespeira e sensibilização com murcha da planta indicadora em estágio mais avançado (Figura 12), enquanto que dois clones da cultivar Lassen produzidos *in vitro*, também testados pela mesma metodologia, não apresentaram nenhum sintoma de sensibilização nas plantas indicadoras utilizadas (Figura 13).

Estes testes preliminares permitem observar em concordância com pesquisas realizadas por CARVALHO & COSTA (15), BETTI & COSTA (9), ASSIS et alii (5), que cultivares comerciais após cultivo consecutivo apresentam infecção viral, e a técnica de cultura de meristema *in vitro* permite a "limpeza" deste material que uma vez indexado e confirmada a ausência de vírus pode ser micropropagado *in vitro* em grande quantidade, produzindo milhares de plantas matrizes para distribuição a viveiristas e posteriormente aos produtores, com ganho na produtividade destas 'novas' mudas.

FIGURA 11 - Comparação do vigor de uma planta proveniente de cultivo comercial (esquerda) de sanidade desconhecida, com uma planta proveniente do cultivo *in vitro* (direita)

FIGURA 12 - Planta adulta de morangueiro cultivar Lassen (direita) proveniente de cultivo comercial, testada com planta indicadora (esquerda) apresentando características de sensibilização

FIGURA 13 - Planta adulta de morangueiro cultivar Lassen, proveniente de cultivo de meristema *in vitro* apresentando características de ausência de virus.

5. CONCLUSÕES

Esta pesquisa mostrou a viabilidade da obtenção de grande quantidade de mudas de morangueiro, das diversas cultivares: Lassen, Tioga, Konvoy-Cascata, Aiko e Monte Alegre via cultura de meristema *in vitro*.

O desenvolvimento *in vitro* de todas cultivares estudadas foi caracterizado por três fases: isolamento do meristema, multiplicação/alongamento e enraizamento das plântulas.

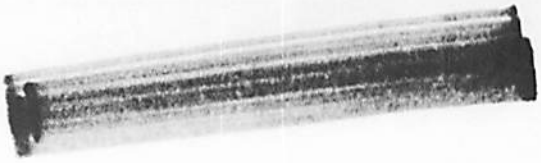
Na fase de isolamento do meristema ocorreu a formação de callus e início de produção de brotações (callus organogênico), favorecida pela maior permanência no meio de cultura com auxina-citocinina-giberelina. Na fase de multiplicação/alongamento a combinação giberelina-citocinina produziu maior desenvolvimento nas brotações iniciais da fase anterior. O enraizamento das plantas apresentou maior rendimento quando repicadas para o meio básico sem fitohormonios, ou com baixas concentrações de citocinina (BAP).

A cultivar Lassen apresentou os maiores índices de desenvolvimento nas duas primeiras fases, seguida das demais culti

vares que tiveram desenvolvimento semelhante. Na fase de enraizamento todas as cultivares tiveram o mesmo comportamento.

Durante a aclimatação, a umidade foi fundamental para a sobrevivência das plântulas, e o substrato solo/vermiculita (2:1) apresentou maior rendimento na obtenção das mudas. A transferência das plantas para o solo em casa de vegetação foi realizada com sucesso aos 12 dias após o início da aclimatação.

Os testes preliminares de indexação através de planta indicadora, com transmissão por afídios vetores, mostraram que os clones produzidos *in vitro* não sensibilizaram a planta indicadora, e a planta fornecedora de meristema sensibilizou a planta indicadora, característica de presença de virus.



6. RESUMO

Mudas de morangueiro de cinco cultivares, Lassen, Tioga, Konvoy-Cascata, Aiko e Monte Alegre foram obtidas *in vitro* através da técnica de cultura de meristema, no Laboratório de Cultura de Tecidos da Escola Superior de Agricultura de Lavras, no período de 1984/1985.

O trabalho iniciou-se com a produção de estolons das mudas na casa de vegetação para obtenção de meristemas, retirados sempre com tamanho inferior a 0,4 mm. O desenvolvimento *in vitro* de todas cultivares estudadas foi caracterizado por três fases, cada uma requerendo meio de cultura específico.

Na fase de isolamento utilizou-se o meio de cultura composto do meio básico de MURASHIGE & SKOOG (MS) suplementado com 1,0 mg/l de BAP, 0,1 mg/l de GA_3 e de 0,01 mg/l de ANA. Nesta fase o meristema desenvolveu-se em callus, chegando a iniciar a organogênese, emitindo brotações.

Na fase de multiplicação/alongamento a combinação giberelina-citocinina (0,1-1,0 mg/l GA_3 e 5,0 mg/l BAP) promoveu o maior desenvolvimento das brotações dos callus obtidos na fase ante-

rior.

Na fase de enraizamento, a utilização de meio básico na ausência de fitohormonios, apresentou taxas de rendimento de 83,3% na emissão de raízes das plântulas avaliadas. Baixas concentrações de citocinina (0,005 e 0,01 mg/l BAP), produziram raízes em 63,3 e 60,0% das plântulas. E o uso de AIB (0,1 e 1,0 mg/l), teve rendimento de 40,0 e 46,6%, respectivamente.

O comportamento da cultivar Lassen foi de maior desenvolvimento que as demais cultivares nas duas primeiras fases, e desenvolvimento semelhante a partir da fase de enraizamento.

A aclimatação foi realizada com controle de umidade, fundamental para a sobrevivência das plântulas. O transplantio foi realizado em três substratos, e o substrato solo/vermiculita (2:1) apresentou maior sobrevivência das plântulas (92%), enquanto que o uso de vermiculita teve rendimento de 78%, e solo esterilizado 53%.

Testes preliminares de indexação foram realizados com planta indicadora (*Fragaria vesca* var. *Semperflorens* Duch), utilizando afídios vetores. Testou-se a cultivar Lassen, proveniente de cultivos comerciais, que produziu sensibilização da planta teste, característica da presença de virus, enquanto que dois clones produzidos *in vitro* não sensibilizaram a planta teste.

7. SUMMARY

Complete strawberry plantlets of the cultivars Lassen, Tioga, Konvoy-Cascata, Aiko and Monte Alegre were regenerated *in vitro* in a sequential procedure from a single meristem isolated from shoot tip. During the development *in vitro* the meristem whent through three stages: culture initiation, growth/proliferation and rooting. The medium in each stage that provided the best development was for culture initiation: MURASHIGE - SKOOG (MS) basal components suplemented with 1,0 mg/l of BAP, 0,1 mg/l of GA_3 and 0,01 mg/l of NAA; growth/proliferation stage: MS supplemented with 5,0 mg/l of BAP and 0,1-1,0 mg/l of GA_3; and rooting stage: MS basal components only.

Adaptation of young plants to normal conditions of culture had the best survival rate when plants were transplanted on a mixture of soil/vermiculite (2:1), keep under constant moisture.

A preliminary test with an indicator host and aphids showed that plants obtained through meristem did not sensitize the indicator, whereas the meristem donor plant did sensitize the indicator.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, A.N. An improved medium for strawberry meristem culture. Journal of Horticultural Science, Ashford, 47:263-4, 1972.

2. AERTS, J. Survey of viruses and mycoplasmas in strawberry. Netherlands Journal of Plant Pathology, Meerle, Belgium, 80:215-27, Sept. 1974.

3. A. RODRIGUEZ, J.; ROA, J. & BELTRAN, J. El cultivo de meristemas de yuca. Cali, CIAT, 1980. 40p.

4. ASSIS, M. Micropropagation of fruit crops with emphasis on strawberry. Madison, University of Wisconsin, 1978. 80p. (Tese MS).

5. BARRITT, B.H. & LOO, H.Y.S. Effect of mottle, crinkle and mild yellow-edge viruses on growth and yield of Hood and North West strawberries. Canadian Journal of Plant Science. 53:605-7, 1973.

6. BELKENGREN, R.O. & MILLER, P.N. Culture of apical meristems of *Fragaria vesca* strawberry plants as a method of excluding latent A virus. Plant Disease Reporter, Oregon, 46(2):119-21, Feb. 1962.

7. BETTI, J.A. Estudos sobre a incidência, disseminação e controle de viroses do morangueiro no Estado de São Paulo. Campinas, UNICAMP, 1976. 69p. (Tese Doutorado).

8. _____. Produção de mudas certificadas de morangueiro isentas de virus. Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, Campinas, 5:129-30, 1972.

9. _____ & COSTA, A.S. Efeito da idade da folha na aquisição dos virus do mosqueado e da faixa-das-nervuras do morangueiro pelo afidio vetor. Fitopatologia Brasileira, Campinas, 5(1):25-30, fev. 1980.

10. _____; _____ & PASSOS, F.A. Produção e uso de material básico de morangueiro testado para virus no estado de São Paulo. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 3, Jaboticabal, 1980. Resumo dos trabalhos... Jaboticabal, UNESP, 1980. p.63.

11. BOXUS, P. The production of strawberry plants by *in vitro* micropropagation. The Journal of Horticultural Science, London, 49:209-10, 1974.

12. BOXUS, P.H.; QUOIRIN, M. & LAINE, J.M. Large scale propagation of strawberry. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Berlin, Springer Verlag, 1977. Cap.1. p. 130-43.

13. CAMARGO, L.S. Efeito do tipo de mudas na produção de morangueiro. Bragantia, Campinas, 33(3):23-31, mar. 1974.

14. CARDOSO, C.O.N. Doenças do morangueiro. In: GALLI, F. Manual de fitopatologia, São Paulo, Ceres, 1980. V.2, Cap. 28, p.392-403.

15. CARVALHO, A.M.B. & COSTA, A.S. Ocorrência do virus do mosqueado do morangueiro no Estado de São Paulo. Bragantia, Campinas, 20(19):563-78, maio 1961.

16. CONVERSE, R.H. & MARTIN, L.W. Strawberry cultivars compared for virus content, runner and fruit production. Journal of the American Society of Horticultural Science, Mount Vernon, 99(2):163-6, Mar. 1974.

17. DECKER, J.S. Cultura do morangueiro. 3.ed. São Paulo, Melhoramentos, 1962. 30p. (ABC do Lavrador Prático, 16).

18. DRIESSEN, A.C. Estágio de capacitação desenvolvido no laboratório de cultura de tecidos da unidade de execução de pesquisa de âmbito estadual de Cascata - UEPAE/CASCATA. Pelotas, EMPASC, 1983. 15p. (Mimeografado).

19. DURNER, E.F.; BARDEN, J.A.; HIMELRICK, D.G. & POLING, E.B. Photoperiod and temperature effects on flower and runner development in day-neutral, junebearing and everbearing strawberries. Journal of the American Society of Horticultural Science, Mount Vernon. 109(3):396-400. 1984.

20. EARLE, E.D. & LANGHANS, R.W. Propagation of *Crisantemum* in vitro. I. Multiple plantlets from shoot tips and the establishment of tissue cultures. Journal of the American Society Horticultural Science, Mount Vernon, 99(2):128-32, Mar. 1974.

21. FELICIANO, A.J. & ASSIS, M. *In vitro* rooting of shoots from embryo-cultured peach seedlings. Hortscience, St. Joseph, 18(5):705-6, Oct. 1983.

22. FILGUEIRA, F.A.R. Manual de olericultura; cultura e comercialização de hortaliças. São Paulo, Ceres, 1972. 451p.

23. GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S.S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.E.; FILHO, E.B.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. & ALVES, S. B. Manual de entomologia agrícola. São Paulo, Ceres, 1978. 531p.

24. HARTMANN, H.T. & KESTER, D.E. Plant propagation: principles and practices. 2.ed. Englewood Cliffs, Pontice-Hall, 1968. 702p.

25. HENSHAW, G.C. Plant tissue culture: its potential for dissemination of pathogen-free germoplasm and multiplication of planting material. In: EBBELS, D.L. & KING, J.E. Plant health. Oxford, Blackwell Scientifc, 1979. p.139-47.

26. HOLLINGS, M. Disease control through free stock. Annual Review Phytopathology, Palo Alto, 3:367-96, 1965.

27. HOOF, V. Methode pratique de culture de meristems de fraisiers. Bulletin Societe Royale Botanique de Belgique, Bruxelas, 107:5-8, 1974.

28. HORN, N.L. & CARVER, R.G. Effect of three viruses on plant production and yield of strawberries. Plant Disease Reporter, 46:762-5. 1962.

29. JARRET, R.L.; HASEGAWA, P.M. & BRESSAN, R.A. Gibberellic acid regulation of adventitious shoot formation from tuber discs of potato. In Vitro, Gaithensburg, 17(9):825-30, Sept. 1981.

30. KARTHA, K.K.; LEUNG, N.L.; PAHL, K. Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. Journal of the American Society of Horticultural Science. Mount Vernon, 105(4):481-4, Jul. 1980.

31. KASSANIS, B. & VARMA, A. The production of virus-free clones of some british potato varieties. Annals Applied Biology, London, 59:447-50, 1967.

32. KITAJIMA, E.W.; BETTI, J.A. & COSTA, A.S. Isometric, virus-like particles in leaf tissues of *Fragaria vesca* L. infected with strawberry mottle-virus. Ciência e Cultura, São Paulo, 23(5):649-55, maio 1971.

33. LANGHANS, R.W.; HORST, R.K. & EARLE, E.D. Disease-free plants via tissue culture propagation. HortScience, St. Joseph, 12(2):149-50, Apr. 1977.

34. MATTHEWS, R.E.F. Replication and movement. In: ____. Plant virology. New York, Academic Press, 1970. Cap.7, p.165-225.

35. McGREW, J.R. Erradication of latent C virus on the Suwannee variety of strawberry by heat plus excised runner-tip culture. Phytopathology, St. Paul, 55(4):480-1, Apr. 1965.

36. MELLOR, F.C. & STACE-SMITH, R. Virus-free potatoes by tissue culture. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Berlin, Springer-Verlag, 1977. Cap.5, p.616-46.

37. MILLER, P.W. & BELKENGREN, R.O. Elimination of yellow edge, crinkle and vein-banding viruses and certain other virus complexes from strawberries by excision and culturing of apical meristems. Plant Disease Reporter. 47:298-300. 1963.

38. MULLIN, R.H.; FRAZIER, N.W. & SCHLEGEL, D.E. Meristem culture of *Fragaria chiloensis* Duch infected with strawberry pallidosis. Plant Disease Reporter, Oregon, 59(3):268, 1975.

39. _____; SCHLEGEL, D.E. Cold storage maintenance of strawberry meristem plantlets. HortScience, St. Joseph, 11(2):100-1, Apr. 1976.

40. _____; SMITH, S.H.; FRAZIER, N.W.; SCHLEGEL, D.E. & McCALL, S.R. Meristem culture frees strawberries of mild yellow edgs, pallidosis and mottle diseases. Phytopathology, California, (Lasc.) 64(11):1425-9, Nov. 1974.

41. MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. Annual Review of Plant Physiology. Palo Alto, 25:135-66, 1974.

42. _____ & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, Copenhagen, 15(3):473-97, 1962.

43. NARAYANASWAMY, S. Regeneration of plants from tissue cultures. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ cultu re. Berlin, Springer Verlag, 1977. Cap.1, p.179-206.

44. NORRIS, D.A. Development of virus-free stock of green mountain by treatment with malachite green. Australian Journal of Agriculture Research, Melbourne, 5:658-63, 1954.

45. OEHL, H. & HUGHES, H.M. The field performance of a clone of Cambridge prizewinner strawberry, freed from latent virus A by meristem culture. Journal of Horticultural Science. London, 55(1):79-82, 1980.

46. QUAK, F. Meristem culture and virus-free plants. In: REINERT, J. & BAJAJ, Y.P.S. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Berlin, Springer Verlag. 1977. Cap.5, p.598-615.

47. RESENDE, R.O. Cultura *in vitro* de meristema de batata (*Solanum tuberosum* L.). Lavras, ESAL, 1985. 55p. (Tese MS).

48. SCOTT, D.H. & LAWRENCE, F.J. Strawberries. In: JANICK, J. & MOORE, N.M. Advances in fruit breeding. Indiana, Purdue University Press. 1979. p.71-92.

49. SHABDE, M. & MURASHIGE, T. Hormonal requeriments of excide *Dianthus caryophyllus* L. shoot apical meristem *in vitro*. American Journal of Botany, California, 64(4):443-8, Apr. 1977.

50. SOUZA, M. Nutrição e adubação para produzir mudas frutífe - ras. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 9(102):40-3, jun. 1983.

51. SOUZA, A.F.; HAAB, H.F.; SARRUGE, J.R.; OLIVEIRA, G.O. & MI-NAMI, K. Nutrição mineral de hortaliças. XXIX. Absorção de macronutrientes por quatro cultivares de morangueiro (*Fragaria* spp). Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 33:647-83, 1976.

52. TORREY, J.G. Root hormones and plant growth. Annual Review of Plant Physiology, Palo Alto, 27:435-59, 1976.

53. VINE, S.J. Improved culture of apical tissues for production of virus free strawberries. Journal of Horticultural Science, Ashford, 43:293-7. 1968.

54. WALKEY, D.G.A. Production of virus-free plants by tissue culture. In: INGRAM, D.S. & HELGESON, J.P. Tissue Culture Methods for Plant Pathologists. Oxford, Blackwell Scientific, 1980. Cap.3, p.109-17.