

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

**Rubens Gabriel Caires Campos**

**CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA DE PSEUDOFRUTOS E  
CULTIVO *IN VITRO* DE HÍBRIDOS DE MORANGUEIRO**

**Montes Claros**

**2016**

**RUBENS GABRIEL CAIRES CAMPOS**

**CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA DE PSEUDOFRUTOS E CULTIVO *IN*  
VITRO DE HÍBRIDOS DE MORANGUEIRO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Vegetal, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Produção Vegetal.

Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Demerson Arruda Sanglard

Coorientadora: Dra. Luciana Cardoso Nogueira Londe

Montes Claros

2016

C198c  
2023

Campos, Rubens Gabriel Caires.

Caracterização agrônômica de pseudofrutos e cultivo *in vitro* de híbridos de morangueiro [manuscrito] / Rubens Gabriel Caires Campos. Montes Claros, 2016. 95 f.: il.

Dissertação (mestrado) – Área de concentração em Produção Vegetal. Universidade Federal de Minas Gerais/ Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador: Prof.º Demerson Arruda Sanglard.

Banca examinadora: Luciana Cardoso Nogueira Londe, Silvia Nietzsche, Leandro Silva de Oliveira, Fernando da Silva Rocha, Demerson Arruda Sanglard.

Inclui referências: f: 90-94.

1. Morango. 2. Frutas – Cultivo. 3. Propagação - *in vitro*. I. Sanglard, Demerson Arruda. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 634.1



Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Agrárias  
Mestrado em Produção Vegetal



### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 15 dias do mês de fevereiro de 2016, às 14 horas, sob a presidência do Professor Demerson Arruda Sanglard, D. Sc. (ICA/UFMG) e com a participação dos Professores Luciana Cardoso Nogueira Londe, D. Sc. (EPAMIG), Sílvia Nietzsche, D. Sc. (UNIMONTES), Leandro Silva de Oliveira, D. Sc. (ICA/UFMG) e Fernando da Silva Rocha, D. Sc. (ICA/UFMG), reuniu-se a banca de defesa de dissertação de **RUBENS GABRIEL CÁIRES CAMPOS**, aluno do Curso de Mestrado em Produção Vegetal. O resultado da defesa de dissertação intitulada:

"Caracterização Ecológica de Pseudofritas e fungos "in vitro" de tributos de Maranguape"

foi expresso pelo conceito "A" (nota 900), sendo o aluno considerado aprovado. E, para constar, eu, Professor Demerson Arruda Sanglard, presidente da banca, lavrei a presente ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da banca examinadora.

OBS.: O aluno somente receberá o título após cumprir as exigências do ARTIGO 89 do regulamento do Curso de Mestrado em Produção Vegetal, conforme apresentado a seguir:

**Art. 89 – Para dar andamento ao processo de efetivação do grau obtido, o candidato deverá, após a aprovação de sua Dissertação e a realização das modificações propostas pela banca examinadora, encaminhar à secretaria do colegiado do curso, com a anuência do orientador, 3 (três) exemplares da dissertação e 1 (um) CD, no prazo de 60 (sessenta) dias.**

Montes Claros, 15 de fevereiro de 2016.

  
Demerson Arruda Sanglard  
Orientador

  
Sílvia Nietzsche  
Membro

  
Fernando da Silva Rocha  
Membro

  
Luciana Cardoso Nogueira Londe  
Coorientadora

  
Leandro Silva de Oliveira  
Membro

*Dedico à minha família, amigos e à  
universidade.*

## AGRADECIMENTOS

Mais uma vitória sendo alcançada e, ao meu lado, várias pessoas especiais que acompanharam o término de um capítulo da minha história, logo tenho muito a agradecer.

Agradeço ao Professor Demerson Arruda Sanglard pela paciência e pelo conhecimento que me deu ao longo da orientação; aos professores do ICA/UFMG e todos aos funcionários por fazerem parte da minha conquista;

Agradeço à Dra. Luciana Cardoso Nogueira Londe pela coorientação, ensino e paciência ao longo do projeto e, por muitas vezes fez mais do que seu papel, em diferentes horas do dia, me orientado e depositando em mim plena confiança para executar as ações planejadas. Jamais me esquecerei minha amiga! Agradeço à Epamig pelo suporte técnico, em especial, aos membros do Laboratório de Biotecnologia.

A Ciene, Flávio, Natália, Rayane e Wallace que sempre estiveram comigo plantando, irrigando, colhendo, avaliando, rodando estatística, discutindo resultados, concluindo, escrevendo ou sofrendo e esses atos de companheirismo não tem mensura.

Aos meus pais, pelo amor, carinho, incentivo; aos meus irmãos e familiares que sempre me apoiaram nesta caminhada.

Meus sinceros agradecimentos aos meus irmãozinhos de orientação, Anna Regina e Jonas, que fizeram as aulas parecerem mais dinâmicas, as provas mais fáceis, os experimentos menos árduos e a escrita menos tensa.

Ao grupo Brachiaria do Mestrado (Isley, Gracielle, Letícia e Luis) por todo entretenimento, pelos açaís, pelas risadas e amizade!

Ao financiamento do projeto da Fapemig

Ao apoio financeiro da CAPES.

Agradeço à coordenação da pós-graduação pelo incentivo.

E todos que, de alguma forma, contribuíram para a conquista deste novo título. Obrigado!!!

# CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA DE PSEUDOFRUTOS E CULTIVO *IN VITRO* DE HÍBRIDOS DE MORANGUEIRO

## RESUMO GERAL

A região Norte de Minas Gerais tem demonstrado potencial ao cultivo do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.), pelo clima quente e seco, o que favorece o manejo fitossanitário. A obtenção de híbridos e o desenvolvimento de sistemas de propagação *in vitro* são estratégias fundamentais para a produção de mudas de alta qualidade. Os objetivos deste trabalho foram realizar a caracterização agronômica de pseudofrutos de 10 híbridos e micropropagar os genótipos superiores *in vitro* por 5 ciclos sucessivos. Os híbridos utilizados foram obtidos a partir de cruzamentos das variedades 'Aleluia', 'Caminho Real', 'Dover', 'Oso Grande', 'Sweet Charlie' e 'Toyonoka' no esquema de dialelo completo. Foram avaliados os seguintes caracteres número e massa fresca dos frutos comerciais e não comerciais, deformados e não deformados e que tivesse melhores aceitações comerciais segundo valores de pH, Sólidos Solúveis Totais (SST) e Acidez Titulável Total (ATT). Os materiais selecionados foram submetidos a ensaios de micropropagação, com avaliações da taxa de multiplicação (número de propágulo/explante em cada subcultivo), número de folhas por propágulo e comprimento das brotações. Todos os experimentos foram plotados em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com uma planta por parcela e 3 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. O híbrido OG.AL esteve dentro do grupo que apresentou melhores valores para as características fenotípicas desejáveis dentre eles massa fresca de frutos comerciais com médias superiores a seis gramas. Para a composição da qualidade físico-química dos frutos o híbrido OG.AL também apresentou valores significativamente superiores apresentando características organolépticas desejáveis ao mercado consumidor. No cultivo *in vitro* não houve diferença significativa entre os híbridos mas foram observadas diferenças significativas para o desenvolvimento dos explantes nos subcultivos avaliados. Houve diferença significativa quanto ao número médio de folhas para os híbridos exceto CR.SC e em relação ao tamanho médio dos propágulos queda no decorrer dos ciclos para os híbridos CR.SC e TO.SC. para o OG.AL não houve diferença estável e os demais diferenciaram aumentando o tamanho dos propágulos.

**Palavras-chave:** *Fragaria x ananassa*. Cultura de tecidos. Micropropagação. Dialelo completo. Cruzamentos.

# AGRONOMIC CHARACTERIZATION OF PSEUDOFRUITS AND IN VITRO CULTIVATION OF STRAWBERRY HYBRIDS

## GENERAL ABSTRACT

The northern region of Minas Gerais has shown potential for the cultivation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.), Due to the hot and dry climate, which favors phytosanitary management. Hybridization and the development of in vitro propagation systems are fundamental strategies for the production of high quality seedlings. The objectives of this work were to perform the agronomic characterization of 10 hybrids pseudofruits and to micropropagate the superior genotypes in vitro for 5 successive cycles. The hybrids used were obtained from crosses of the varieties 'Aleluia', 'Caminho Real', 'Dover', 'Oso Grande', 'Sweet Charlie' and 'Toyonoka' in the complete dialelo scheme. The following number and fresh mass characteristics of commercial and non-commercial fruits, deformed and undeformed, were evaluated and had better commercial acceptance according to pH, Total Soluble Solids (TSS) and Total Titratable Acid (ATT) values. The selected materials were submitted to micropropagation assays, with multiplication rate evaluations (propagule / explant number in each subculture), number of leaves per propagule and length of shoots. All experiments were plotted in a completely randomized design (DIC), with one plant per plot and 3 replicates. Data were submitted to analysis of variance and the means were compared by the Tukey test, at 5% probability. The OG.AL hybrid was within the group that presented the best values for the desirable phenotypic characteristics among them fresh mass of commercial fruits with means superior to six grams. For the composition of the physico-chemical quality of the fruits, the OG.AL hybrid also presented significantly higher values presenting desirable organoleptic characteristics to the consumer market. In the in vitro culture there was no significant difference between the hybrids but significant differences were observed for the development of the explants in the evaluated subcultures. There was a significant difference in the average number of leaves for the hybrids except CR.SC and in relation to the average size of the propagules falling during the cycles for the hybrids CR.SC and TO.SC. For the OG.AL there was no stable difference and the others differentiated by increasing the size of the propagules.

**Keywords:** *Fragaria x ananassa*. Tissue culture. Micropropagation.  
Complete dialelo. Crosses.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores médios para massa fresca de frutos comerciais com mais de 6 gramas (MFCMA); número de frutos comerciais com mais de 6 gramas (NFCMA); massa fresca de frutos comerciais com menos de 6 gramas (MFCME); número de frutos comerciais com menos de 6 gramas (NFCME); massa fresca de frutos deformados com mais de 6 gramas (MFDMA); massa de frutos deformados com menos de 6 gramas (MFDME); número de frutos deformados com menos de 6 gramas (NFDME); comprimento (COM) e diâmetro (DIAM) .....	32
Tabela 2 – Valores médios para o teor de Sólidos Solúveis Totais (SST) de dez híbridos de morango .....	34
Tabela 3 – Valores médios para a acidez titulável total (ATT) de dez híbridos de morango .....	35
Tabela 4 – Valores médios para o pH de dez híbridos de morango.....	36
Tabela 5 – Valores médios para o número de propágulos .....	44
Tabela 6 – Valores médios para o número de folhas .....	45
Tabela 7 – Valores médios para o tamanho dos propágulos (mm) .....	46

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1- REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>9</b>
1.1 INTRODUÇÃO .....	9
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	11
1.2.1 A cultura do morangueiro.....	11
1.2.2 Panorama da cultura.....	13
1.2.3 Cultivares .....	15
1.2.4 Cultura de tecidos (micropropagação).....	17
1.3 OBJETIVOS .....	24
1.3.1 Objetivo Geral .....	24
1.3.2 Objetivos Específicos.....	24
<b>CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS PSEUDOFRUTOS DE HÍBRIDOS DO MORANGUEIRO NO NORTE DE MINAS GERAIS .....</b>	<b>25</b>
2.1 INTRODUÇÃO .....	27
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	28
2.2.1 Caracterização Física dos Pseudofrutos .....	28
2.2.2 Caracterização Físico-Química dos Pseudofrutos .....	29
2.2.2.1 Sólidos Solúveis Totais.....	29
2.2.2.2 Acidez Titulável Total.....	29
2.2.2.3 pH.....	29
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30
2.3.1 Caracterização fenotípica de pseudofrutos de morangueiro.....	30
2.3.2 Caracterização Físico-Química de Pseudofrutos de Morangueiro..	34
2.4 CONCLUSÃO .....	37
<b>CAPÍTULO 3 – DESEMPENHO <i>IN VITRO</i> DE HÍBRIDOS DE MORANGUEIRO DURANTE CINCO SUBCULTIVOS .....</b>	<b>38</b>
3.1 INTRODUÇÃO .....	40
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	41
3.2.1 Coleta do material.....	41

3.2.2	Desinfestação dos estolões .....	41
3.2.3	Extração de meristemas .....	42
3.2.4	Estabelecimento <i>in vitro</i> .....	42
3.2.5	Multiplificação <i>in vitro</i> .....	42
3.2.6	Variáveis analisadas .....	43
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
3.4	CONCLUSÃO .....	48
	REFERÊNCIAS .....	49

## CAPÍTULO 1- REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 INTRODUÇÃO

Plantado em todos os continentes o morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) se desenvolveu em vários países. No Brasil a produção se expande a cada ano, destacando como maiores produtores os estados de Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e São Paulo, respectivamente (SILVEIRA; GUIMARÃES, 2014). É a espécie de maior expressão econômica dentro do grupo de pequenas frutas (PICIO, 2010) e embora seja uma cultura perene, é renovada anualmente devido ao acúmulo de doenças de um ciclo para o outro (DARROW, 1966; GIMENEZ, 2008).

No Brasil estima-se uma produção anual em área plantada de 3.718ha de 133.391 toneladas. Minas Gerais é detentora de 1.790ha espalhados em 30 municípios responsáveis por uma produção anual em 2012 de 72.716, (SILVEIRA; GUIMARÃES, 2014). Esta espécie apresenta grande importância sob o ponto de vista econômico e social já que a cultura é conduzida predominantemente por pequenas propriedades familiares (OLIVEIRA *et al.*, 2006). No Norte de Minas algumas variedades chegam a produzir mais de 50 toneladas por hectare. A região é apontada como destaque pois diferente do Sul do Brasil, o clima quente e seco desfavorece a incidência e/ou severidade de doenças e pragas, descartando a necessidade do uso contínuo de defensivos agrícolas, melhorando a qualidade do produto ao consumidor (DIAS, 2007), além de permitir a que a cultura se comporte de forma perene.

A conjugação de novas variedades, com maiores potencialidades agronômicas e adaptadas a condições edafo-climáticas distintas, com a diversidade dos sistemas de produção existentes permitiu que, hoje em dia, o morango se encontre disponível o ano inteiro. O emprego de sistemas sem solo e a utilização de mudas matrizes produzidas *in vitro* são alternativas indicadas para a produção de mudas de alta qualidade (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Na micropropagação do morangueiro altas concentrações de reguladores de crescimento são utilizadas e segundo Kumar, Barker e Reed

(1999) esses reguladores podem induzir alta proporção de variação somaclonal. Esse fenômeno pode ocasionar variações fenotípicas.

Assim, caracterizar o potencial produtivo dos híbridos, apontando os mais promissores e uso de ferramentas como cultivo *in vitro* são fundamentais para introdução de novos genótipos em uma determinada região proporcionando mais alternativas para cultivo, diversificando a fruticultura e agregando valor à economia local.

## 1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.2.1 A cultura do morangueiro

Após o século XIV, várias espécies de *Fragaria* foram retiradas do estado selvagem e cultivadas em jardins europeus, com finalidade ornamental e medicinal (PASSOS, 1999). Atualmente, o morangueiro cultivado é o híbrido octaplóide *Fragaria x ananassa* resultante de uma hibridação natural ocorrida entre as espécies também octaplóides, *F. chiloensis* e *F. virginiana* (LUBY *et al.*, 1992; RONQUE, 1998; CASTRO, 2004).

A cultura do morango se estabeleceu em 1945 no Brasil, no estado de São Paulo e em Minas Gerais só em 1958 (SILVEIRA; GUIMARÃES, 2014). Expandiu-se na década de 60 devido à introdução de novas técnicas e adaptação da cultivar Campinas (PASSOS, 1997). A partir de então, a cultura do morangueiro implantou-se em regiões de clima subtropical e temperado (SANTOS, 2003), representando um papel econômico e social importante nas regiões Sul e Sudeste do país (TOFOLI, 2007). Caracteriza-se por possuir um elevado rendimento por área (SANTOS, 2003) e por utilizar intensa mão-de-obra familiar ocupando pequenas áreas (ALVARENGA *et al.*, 1999).

O morangueiro pertence à família Rosaceae e subfamília Rosoideae (DARROW, 1966; USDA, 2006). As cultivares do gênero *Fragaria* L. são caracterizadas com base nas diferenças morfológicas da folha, da planta ou do fruto (CONTI *et al.*, 2002). As plantas que compõem o este gênero são herbáceas, apesar das raízes e dos caules com mais de um ano lignificarem-se parcialmente (BRANZANTI, 1989). Atingem de 15 a 30 cm de altura, podendo ser rasteiras, formando pequenas touceiras que aumentam de tamanho, à medida que a planta envelhece (RONQUE, 1998).

Suas raízes chegam a atingir 50 a 60 cm de profundidade e são constantemente renovadas (PIRES, 1999). O sistema radicular é formado por raízes longas, fasciculadas e fibrosas, que se originam na coroa e se dividem em primárias e secundárias (FILGUEIRA, 2003). As primárias são grandes e

perenes, com função de armazenar reservas, contribuindo também com a absorção de água e nutrientes. Já as secundárias são dispostas em camadas superpostas, ficando as camadas mais novas acima das mais velhas (PIRES, 2000). O processo de reposição radicular é de grande importância para a sobrevivência da planta, podendo ser influenciado por vários fatores como: disponibilidade de água, aeração, patógenos de raízes ou translocação de fotoassimilados (RONQUE, 1998).

O caule é um rizoma estolhoso, cilíndrico e retorcido, com entrenós curtos, em cujas gemas terminais nascem folhas, estolhos e inflorescências. A coroa é formada por um agregado de rizomas curtos, onde estão inseridas as folhas em roseta com um gomo foliar central, do qual se originam as ramificações (RONQUE, 1998).

As folhas do morangueiro são constituídas de um pecíolo longo e, geralmente, de três folíolos (QUEIROZ-VOLTAN *et al.*, 1996). A coloração do limbo varia de verde-clara até verde-escura, podendo apresentar-se brilhante a opaco e densamente piloso a glabro. Os folíolos são dentados e apresentam um grande número de estômatos (300 a 400 estômatos/mm<sup>2</sup>). Uma planta com dez folhas em pleno verão pode transpirar até ½ litro de água/dia (BRANZANTI, 1989; RONQUE, 1998). Durante a fase vegetativa a planta se multiplica por meio dos estolões, os quais são estruturas longilíneas dotadas de meristemas de crescimento nas extremidades e que dão origem a novas plantas, que se formam em série. Cada nova planta emitirá outro estolão que, por sua vez, dará origem a outra planta e assim sucessivamente. Essas novas plantas dependem dos nutrientes e da água fornecidos pela planta matriz até que seu próprio sistema radicular esteja suficientemente desenvolvido a ponto de desempenhar tais funções, o que ocorre aproximadamente entre 10 a 15 dias após a emissão das folhas (GIMENEZ, 2008).

Durante a série de transformações por que passa uma planta, existem diferenças marcantes entre as fases de crescimento vegetativo e reprodutivo. No florescimento, ocorre a diferenciação do meristema vegetativo para o floral, originando os componentes da flor (pétalas, estames, pistilos, etc), ao

invés dos típicos órgãos vegetativos como folhas, caule, estolhos, etc. (DUARTE FILHO *et al.*, 1999).

O morangueiro possui flores, em geral, hermafroditas. Em algumas cultivares as flores podem ser unissexuais masculinas ou femininas (BRANZANTI, 1989; RONQUE, 1998). De acordo com Branzanti (1989), as flores possuem cálice normalmente pentâmero ou 13 frequentemente composto por um número variável de sépalas e os estames estão dispostos em três verticilos, em números múltiplos de cinco. As flores estão agrupadas em inflorescências do tipo cimeira (RONQUE, 1998).

O número de inflorescências por planta é variável para uma mesma cultivar (BRANZANTI, 1989; QUEIROZ-VOLTAN *et al.*, 1996). Os frutos, do tipo aquênio, são diminutos, amarelos ou avermelhados, duros e superficiais, contendo uma única semente (RONQUE, 1998). Após a fecundação, os óvulos convertem-se em aquênios e estimulam o engrossamento do receptáculo que, uma vez transformado em carnosos constitui um pseudofruto ou infrutescência, que recebe o nome de morango (BRANZANTI, 1989). O receptáculo floral hipertrofiado é doce, carnosos e suculento, de tamanho e contornos regulares e uniformes, de polpa firme e coloração vermelha e rica em materiais de reserva (BRANZANTI, 1989; RONQUE, 1998).

### **1.2.2 Panorama da cultura**

A produção mundial de morangos vem crescendo em números absolutos nos últimos anos. No período de 2005 a 2011, a produção cresceu 20%, por outro lado a área plantada apresentou uma redução de 13%, indicando assim uma melhora na produtividade (FAO, 2011). A produção mundial de morango no ano de 2011 foi de 4.594.540 toneladas, em uma área total de 244.283 hectares, gerando uma produtividade de 18.808 quilos por hectare (FAO, 2011).

Dois continentes são responsáveis por 75% da produção mundial de morangos, Américas 38% e na Europa 37%, sendo o restante distribuído entre a Ásia 16%, a África 9%, e a Oceania 1%. Em relação a área total plantada a Europa corresponde a 65% da área total, as Américas 17%, a



África 4%, a Ásia corresponde a 13% e a Oceania 1% (FAO, 2011). No Brasil tem se observado nos últimos anos a expansão da cultura, estimando-se uma produção anual de 100 mil toneladas em mais de 3.500 ha (ANTUNES *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2011).

Embora o Brasil ainda não figure entre os grandes produtores mundiais, mas começa a se destacar, devido às condições ambientais favoráveis para o cultivo e pela produção em quase todos os meses do ano. Em 2006, o país produziu cerca de 100 mil toneladas, cultivando uma área próxima a 3.500 ha (ANTUNES; REISSER JÚNIOR, 2008). A produção é quase totalmente voltada para o mercado interno, sendo mais da metade desta destinada para o consumo *in natura* e o restante para indústria (GAMBARDELLA; PERTUZÉ, 2006). O rendimento por hectare é dependente das condições de clima e de solo do local, associadas ao uso de tecnologias de produção, e apresenta elevada variação, de 12 a 45 toneladas em média, com possibilidade de obter-se até 60 toneladas por hectare (NESI *et al.*, 2008).

O cultivo do morango está concentrado nos seguintes estados: Minas Gerais (54,5 %), Paraná (13,9 %), Rio Grande do Sul (11,2 %) e São Paulo (7,9 %) (SILVEIRA; GUIMARÃES, 2014). Randmann *et al.* (2006) citam que além desses quatro estados, outros como Goiás, Santa Catarina, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Distrito Federal também tem expressiva participação na produção do morango. Devido ao seu valor, a cultura constitui em ótima fonte de renda para os pequenos produtores. Sendo empregadora de grande número de pessoas durante a sua produção (GAMBARDELLA; PERTUZÉ, 2006).

Segundo Vieira (2001) a produção nacional é voltada para o mercado interno. As principais finalidades para a cultura no Brasil estão na obtenção de frutos frescos, doces, sorvetes, geléias, etc. O sistema de comercialização na exploração do morango, como na olericultura em geral, é bastante variável. Normalmente, o produtor entrega sua produção a um ou mais atacadistas, que podem ser uma entidade organizada pelos próprios agricultores (associações), atravessadores e, às vezes, direto ao consumidor, em mercados normalmente localizados em metrópoles, nas centrais de

abastecimento, nos mercados municipais de centros urbanos, ou mesmo para aqueles que vão até a propriedade buscar o produto. O mercado externo é pouco explorado, mas com grandes perspectivas de melhoria para o futuro (VIEIRA, 2001).

No âmbito da cadeia produtiva, o morangueiro tem proporcionado oportunidade de negócio para todos os segmentos da mesma, principalmente para os agricultores de base familiar que o exploram com mais intensidade e conseguem comercializar a produção de forma direta para os consumidores. Os produtores, que dependem de intermediários para a venda do produto enfrentam um problema característico de frutas perecíveis, a necessidade da comercialização rápida, sob pena de perdas do produto e prejuízos econômicos (MADAIL, 2008). Segundo Tsunechiro, *et al.*, (2011), a produção, preço médio e o valor da produção de morango, em São Paulo, apresentaram em geral, bons resultados econômicos nos anos 2007, 2008 e 2009. Em 2010 ocorreu uma queda na produção de (43,63 %), com relação à produção de 2009. No mesmo período os preços médios recebidos pelos produtores variaram positivamente, sendo: 2007 para 2008 de 10,05 %, 2008 para 2009 de 10,14 % e 2009 para 2010 de 64,27 %.

Segundo Donadelli *et al.*, (2012), o custo de produção orgânico é R\$ 18.967,04, índice de lucratividade de 60,74 %, produção média de 787 gramas por planta e custo de 1,90 R\$/planta. Este sistema de produção alcançou uma margem bruta de 154,74 %. Já para o cultivo convencional, o custo de produção foi de R\$ 22.010,76, índice de lucratividade de 49,46 %, produção média de 871 gramas por planta e o custo médio de 1,93 R\$/planta, ficando com uma margem bruta de 97,88 %.

### **1.2.3 Cultivares**

A produtividade e a qualidade dos frutos são influenciadas pelos elementos do clima e pelas práticas de manejo. Por este motivo, cada cultivar de morango difere-se pela adaptação regional, fazendo com que uma cultivar se desenvolva satisfatoriamente em uma região e não apresente o mesmo desempenho produtivo em outro local (UENO, 2004). A escolha da cultivar

possui importância relevante no sucesso do cultivo dessa espécie e pode ser limitante, devido, principalmente, as suas exigências em fotoperíodo, número de horas de frio e temperatura, fatores que influenciam de forma diferente cada material genético. O não atendimento a essas exigências implicará no insucesso do empreendimento. Além das exigências climáticas, existem aquelas referentes ao mercado consumidor, que a cada dia está mais exigente e devem ser observadas na seleção da cultivar, como por exemplo, a qualidade organoléptica e a aparência (DUARTE FILHO *et al.*, 2007).

Em razão da diversidade edafoclimática existente no Brasil, o pequeno número de cultivares disponível tem sido um dos principais obstáculos ao desenvolvimento da cultura do morangueiro, sendo importante incentivar os programas nacionais de melhoramento genético e de introdução de cultivares geradas em outros países (OLIVEIRA *et al.*, 2007). As principais cultivares hoje em dia utilizadas no Brasil provêm dos Estados Unidos, destacando-se Aromas, Camarosa, Camino Real, Diamante, Dover, Oso Grande, Sweet Charlie e Ventana (OLIVEIRA *et al.*, 2005). O grande problema da introdução destas cultivares é a falta de avaliações prévias desses materiais nas condições ecológicas das novas regiões de cultivo. Isso, muitas vezes, pode levar ao fracasso de alguns produtores, pois as características específicas de cada cultivar, quando submetidas às condições de cada área e região, somadas ao manejo adotado, é que determinarão a produtividade e a qualidade do produto final e até mesmo influenciar na comercialização, dada a preferência de alguns mercados por frutas com determinadas características (CARVALHO, 2006).

Por estes motivos, vários trabalhos têm sido desenvolvidos para avaliar o comportamento das cultivares. Ristow *et al.* (2009) ao estudarem diferentes cultivares de morango no Sul do Brasil, verificaram que “Camarosa” apresentou maior massa de frutos por planta e maior massa média por fruto. Antunes *et al.* (2010) avaliando a produção e qualidade de seis cultivares de morangueiro na região de Pelotas, observaram que a cultivar Camarosa apresentou o melhor desempenho, produzindo 877,51 g planta<sup>-1</sup>. Strassburger (2010) e Martins (2010) avaliando cultivares de

morangueiro observaram comportamento semelhante, sendo, “Camarosa” superior, demonstrando maior adaptabilidade que as demais cultivares.

Em função da resposta da planta ao fotoperíodo, as cultivares se classificam em cultivares de dias curtos, dias neutros e dias longos. Atualmente, as cultivares de dias longos não são utilizadas no Brasil (WREGGE *et al.*, 2007). Porém, independente do fotoperíodo, altas temperaturas constantes entre 28°C e 30°C inibem a indução floral tanto em cultivares de dias curtos como nas de dias neutros (OKIMURA; IGARASHI, 1997).

A maioria das cultivares de morangueiro atualmente utilizadas no Brasil se comportam como plantas de dia curto, isto é, necessitam que haja diminuição do fotoperíodo para iniciarem o florescimento e a frutificação. Em condições de temperaturas elevadas e de dias longos, as plantas emitem estolhos que emitem folhas e enraízam (RONQUE, 1998). Em função das cultivares plantadas no Brasil (plantas de dias curtos) e das condições climáticas brasileiras, o período mais propício para produção de frutos corresponde ao período de outono/inverno. Nesse período, as temperaturas são mais amenas e ocorre grande quantidade de dias ensolarados, sem tanta incidência de chuvas. Já durante o período de verão, as plantas passam a produzir estolhos, principalmente devido às altas temperaturas, interrompendo a emissão de flores, e conseqüentemente, a produção de frutos (RESENDE *et al.*, 1999). Segundo Camargo Filho *et al.* (1994), as regiões produtoras brasileiras iniciam o plantio durante os meses de março a maio, com a produção concentrando-se nos meses de junho a novembro. Segundo Janisch *et al.* (2008) avaliando quatro datas de plantio, relataram que a produção precoce foi superior no plantio realizado dia 15/03 do que nos dias 01/03, 01/04 e 15/04. Com relação a produção total, o plantio realizado dia 15 de março proporcionou melhores resultados do que em 01/03 e 15/04.

#### **1.2.4 Cultura de tecidos (micropropagação)**

A cultura de tecidos vegetais *in vitro* é uma técnica baseada no princípio da totipotência, teoria formulada por Schleiden e Schwann em

(1838), a qual enuncia que uma única célula é capaz de dividir-se, diferenciar-se e formar uma planta completa (GUERRA; NODARI, 2006). Esta técnica também denominada micropropagação *in vitro* possibilita a regeneração de novas plantas, contendo todas as informações genéticas da planta matriz, a partir de pequenos fragmentos de órgãos e tecidos, em um meio de cultivo artificial, sob condições assépticas e controladas.

A obtenção de plantas *in vitro* é possível através da cultura de tecidos desorganizados como calos e suspensões de células isoladas em meio líquido ou da cultura de tecidos organizados como ápices meristemáticos, ápices caulinares, segmentos nodais e embriões. A micropropagação de plantas compreende uma sequência de operações laboratoriais. Cada estágio deve ser identificado e as condições ótimas devem ser estabelecidas (MURASHIGE, 1974 citado por GUERRA; NODARI, 2006) que são listados a seguir:

- Estágio I – Consiste no estabelecimento da cultura. Neste estágio é feita a seleção do tipo de explante, desinfestação superficial e introdução em meio nutritivo em condições assépticas;
- Estágio II – Consiste em promover a liberação de gemas laterais pré-formadas ou indução de gemas adventícias, mediante subcultivos sucessivos em meio próprio para multiplicação;
- Estágio III – Preparação da plântula para a conversão das condições heterotróficas para autotróficas em ambiente natural. Nesta fase, busca-se o alongamento, a indução e iniciação radicular.

Com o estabelecimento dos explantes *in vitro* (estágio I), o passo seguinte é a multiplicação das brotações (estágio II), visando aumentar o número de plântulas, por meio de vários subcultivos para meio de cultura fresco em intervalos de quatro a seis semanas (GRAHAM, 2005). Neste estágio deve-se determinar o número e intervalo de subcultivos, bem como

determinar e otimizar a taxa de multiplicação (GUERRA; NODARI, 2006). A taxa média de multiplicação satisfatória com mínimo de variação entre explantes, além da qualidade e homogeneidade das partes aéreas produzidas, são aspectos qualitativos importantes que devem ser considerados na fase de multiplicação (GRATTAPAGLIA; MACHADO 1998). Estes mesmos autores relatam que a frequência ideal de subcultivos seria aquela, na qual, as plantas fossem repicadas durante a fase de crescimento ativo das partes aéreas, aliando o máximo vigor de crescimento com máxima taxa de multiplicação.

Embora a propagação das plantas do gênero *Fragaria* possa ser feita utilizando-se de sementes e estolões, a propagação por sementes não é adotada comercialmente, pois as mudas demoram mais tempo a frutificar quando se comparadas com as plantas propagadas por estolões. Além disto, o sistema de propagação por estolões fornece um número limitado de propágulos (BHATT; DHAR, 2000). Muitos produtores utilizam estolões das plantas que produziram frutos no ano anterior. No entanto, essas mudas serão menos produtivas, devido à ocorrência de viroses e doenças radiculares. Após sucessivas propagações ao longo dos anos utilizando estolões como mudas, poderá ser elevada a incidência de viroses. Neste caso, o agricultor deverá renovar o material de propagação, fazendo a substituição anual das lavouras, obtendo mudas isentas de viroses (FILGUEIRA, 2000).

O morangueiro é muito suscetível a doenças viróticas e a outros microrganismos. De acordo com Calvete *et al.* (2002), a disseminação de doenças ocorre principalmente durante a propagação vegetativa quando são utilizadas plantas infestadas. Visto que o tecido meristemático não possui um sistema vascular desenvolvido e que, a maioria dos vírus infecta as plantas de forma sistêmica, com a da técnica de culturas de tecidos utilizando como explante ápices caulinares, é possível obter-se mudas sadias sem maiores dificuldades (GOMIDE, 2004), complementando com o tratamento térmico, a termoterapia, que é utilizada quando não se dispõem de plantas matrizes ou básicas das cultivares desejadas de forma devidamente indexadas (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

No Brasil, o Instituto Agrônomo iniciou na primeira metade da década dos 70 uma nova tecnologia de produção de mudas de morangueiro livre de vírus, mediante indexação em plantas indicadoras, sendo alcançados aumentos de produtividade em até mais de 50 %, em relação às mudas comuns afetadas por vírus (BETTI *et al.*, 2000). Algumas instituições como a Embrapa Clima Temperado vêm aumentando a produção de matrizes de morangueiro, aprimorando os protocolos para a cultura de tecidos. Desde a sua introdução no setor produtivo, houve um grande aumento na produtividade na região Sul do Brasil, sendo anualmente disponibilizadas as matrizes produzidas para viveiristas e produtores de diferentes estados. Porém, ainda assim, é necessária a ampliação dessa atividade produtiva, pois a produção nacional de matrizes e de mudas é insuficiente para atender a demanda (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

A micropropagação de morangueiro tem sido usada para propagação de genótipos elite em larga escala comercial e para análise em um experimento com repetições de novos lançamentos (GRAHAM, 2005). De acordo com Oliveira *et al.* (2005), as cultivares de morangueiro são bastante responsivas *in vitro*, apresentando taxas de multiplicação superiores às de outras espécies de fruteiras, tais como banana e abacaxi, para as quais também existem empresas de produção de mudas micropropagadas estabelecidas no mercado. Brahm e Oliveira (2004) estudaram o potencial de multiplicação *in vitro* para várias cultivares de morangueiro e verificaram que as cultivares Aromas e Camarosa apresentam menores taxas médias de multiplicação do que as cultivares Dover, Milsei-Tudla e Vila Nova. Embora, no sistema de micropropagação avaliado essas taxas de multiplicação tenham sido elevadas, com mínimo nível de contaminação e oxidação das plântulas.

Segundo Betti *et al.* (2000), grande parte das mudas de morangueiro utilizadas no Brasil resulta de matrizes de laboratório. A principal vantagem de matrizes propagadas *in vitro* é a maior produção de mudas, contudo problemas ligados à variabilidade, algumas vezes associada à menor produtividade ou maior incidência de doenças, têm sido observados em cultivares comerciais, especialmente na cultivar Dover.

Durante o cultivo *in vitro*, a perda da capacidade organogênica pode ocorrer em sucessivos subcultivos o que pode representar uma limitação. As causas da perda da habilidade de regeneração são ainda pouco estudadas e podem variar (GASPAR *et al.*, 2002 citado por SOUZA *et al.*, 2006). Para o morangueiro é recomendado que sejam realizadas apenas cinco subcultivos de 20-30 dias (OLIVEIRA *et al.*, 2005), embora na Europa sejam toleradas até 10 etapas de multiplicação, não sendo aconselhável ultrapassar este valor (EPPO, 2008).

Gomide (2004) verificou que durante a fase de multiplicação *in vitro*, aumentando o número de subcultivos em até dez vezes, não foram observadas variações fenotípicas em brotações das cultivares Oso Grande e Vila Nova. Além disso, com seis subcultivos, foi possível transplantar as matrizes para o campo em tempo hábil para a produção de mudas. Na aclimatização, essas cultivares, quando subcultivadas por mais vezes, apresentaram maior massa fresca e seca da parte aérea e da raiz, bem como maior área foliar do que aquelas cultivadas em menor período. O aumento do número de subcultivos e da taxa de multiplicação, durante o processo de micropropagação, poderia aumentar a produção de brotações obtidas de ápices caulinares tornando o processo mais eficiente.

Vários ensaios de campo, realizados para comparar a produção de frutos de plantas sadias provenientes de cultura de tecidos com uma planta padrão, não mostraram qualquer diferença estatística. No entanto, algumas ocorrências esporádicas de frutos anormais foram observados em cultivares específicas. Um hábito de hiperflorescimento implicou em malformações e pequenos frutos, embora este problema tenha sido presente em cultivares específicas após inúmeros subcultivos. Portanto, foi decidido a partir de pesquisas em vários países como Estados Unidos, Holanda e outros países europeus um número limitado a 10 subcultivos para cada meristema (BOXUS, 1999).

Diversos fatores como, a composição do meio de cultura, a concentração de fitorreguladores, o tipo e idade fisiológica do explante, o genótipo, entre outros, interagem de diversas formas influenciando o sucesso da propagação *in vitro* de plantas, sendo quase impossível caracterizar um



único fator específico. Ainda existem dificuldades na compreensão dos mecanismos relacionados à morfogênese e a capacidade de regeneração de plantas *in vitro* (SOUSA, 2005).

Em relação ao tipo de explante utilizado, de acordo com Grattapaglia e Machado (1998), os mais indicados na propagação clonal *in vitro* são os ápices caulinares, gemas axilares e meristemas. Segundo D'Amato (1977), tecidos organizados oriundos de meristema apresentam maior estabilidade cromossômica e que, as estruturas que dão origem às plantas são compostas de poucas ou mesmo de uma célula. Isso significa menor risco de obtenção de plantas quiméricas e uma maior probabilidade de células mutantes expressarem a mutação no fenótipo. Durante o processo de cultivo a partir de meristema apical a organização desta estrutura permanece imperturbável. Segundo Karp (1994), este é o único sistema de cultura que pode ser considerado isento de variação somaclonal pois quanto maior a duração da fase de desorganização e maior emissão a partir de estruturas organizadas maiores as chances de variação.

Os tecidos meristemáticos, além de se desenvolverem mais rapidamente, são mais estáveis (SERRANO GARCÍA; PIÑOL SERRA, 1991 citados por SOUZA *et al.*, 2006a). Embora já existam diversos protocolos definidos para a multiplicação *in vitro* de morangueiro, alguns resultados são muitas vezes divergentes, sendo necessárias adaptações às necessidades de cada espécie e cultivar. Segundo Gomide (2004), visando melhorar a etapa de multiplicação durante o cultivo *in vitro*, diversos protocolos com diferentes balanços entre reguladores de crescimento no meio de cultura têm sido testados.

A multiplicação de plantas em escala comercial normalmente é maximizada com alta concentração de reguladores de crescimento, que pode induzir alta proporção de variação somaclonal (KUMAR *et al.*, 1999). Segundo D'Amato (1986), não se pode excluir que alguns fitorreguladores, a certas concentrações ou em combinações com outros fitorreguladores e/ou constituintes particulares do meio de cultivo, podem agir como agentes mutagênicos. Rancillac e Nourrisseau (1989) melhoraram a performance de plantas de morango micropropagadas reduzindo a concentração de citocinina

e limitando o número de subcultivos entre 10 e 15 ciclos. De acordo com BOXUS (1999), é possível reduzir a ocorrência de variações em plantas de morango através da redução da concentração de citocinina no meio de cultura de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  para 0,5 ou  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ . Dessa forma, um estoque de material de alta qualidade estará bem adaptado ao novo sistema de cultivo intensivo.

## 1.3 OBJETIVOS

### 1.3.1 Objetivo Geral

Caracterizar os componentes físico-químicos de pseudofrutos e cultivar *in vitro* híbridos de morangueiro obtidos por dialelo completo para fins de introdução no Norte de Minas

### 1.3.2 Objetivos Específicos

- Realizar a caracterização fenotípica dos pseudofrutos dos híbridos de morangueiro;
- Aferir qualidade da composição físico-química dos pseudofrutos dos híbridos de morangueiro;
- Avaliar a performance *in vitro* dos híbridos de morangueiro durante cinco subcultivos.

## CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS PSEUDOFRUTOS DE HÍBRIDOS DO MORANGUEIRO NO NORTE DE MINAS GERAIS

### RESUMO

O cruzamento visando reunir características desejáveis em um único organismo faz-se necessário para obtenção de novos genótipos. Assim, objetivou-se no presente estudo a caracterização fenotípica e composição de qualidade físico-química dos pseudofrutos de híbridos de morango obtidos pelo sistema de dialelo completo. Avaliaram 10 híbridos: Aleluia x Toyonoka (AL.TO), Dover x Oso Grande (DO.OG), Dover x Aleluia (DO.AL), Caminho Real x Sweet Charlie (CR.SC), Aleluia x Caminho Real (AL.CR), Oso Grande x Toyonoka (OG.TO), Toyonoka x Sweet Charlie (TO.SC), Oso Grande x Aleluia (OG.AL), Caminho Real x Toyonoka (CR.TO) e Aleluia x Sweet Charlie (AL.SC). O delineamento usado foi inteiramente casualizado com três repetições e uma planta por parcela. Para caracterização fenotípica as características avaliadas foram número de frutos por planta e massa média de pseudofrutos (g) comerciais e não comerciais, deformados e não deformados e para composição de qualidade físico-química foram avaliados o teor de sólido solúveis totais, acidez total titulável e pH. Os resultados foram submetidos à análise de variância e a comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade. Os resultados indicaram maior massa de pseudofrutos comerciais para os híbridos TO.SC, DO.AL, CR.TO, AL.CR e AL.SC enquanto que o híbrido OG.AL apresentou o maior número de pseudofrutos comerciais. Dos pseudofrutos deformados em massa acima de seis gramas TO.SC foi o que mais produziu e o DO.AL o que menos produziu e por planta foi o DO.OG. Para o número de frutos deformados com menos de 6 gramas DO.AL foi quem menos produziu e AL.CR, AL.SC, CR.SC e OG.TO os que mais produziram. O híbrido OG.AL demonstrou ser o mais atrativo para a região, apresentando características desejáveis ao mercado consumidor local.

**Palavras-chave:** *Fragaria x anassa* Duch. Qualidade de pseudofrutos. Hibridação.

## ABSTRACT

The crossbreeding aiming to gather desirable characteristics in a single organism is necessary to obtain new genotypes. Thus, the objective of this study was the phenotypic characterization and physicochemical quality composition of the pseudofruits of strawberry hybrids obtained by the complete diallel system. They evaluated 10 hybrids: Hallelujah x Toyonoka (AL.TO), Dover x Big Bear (DO.OG), Dover x Hallelujah (DO.AL), Royal Path x Sweet Charlie (CR.SC), Hallelujah Royal Path (AL. CR), Big Bear x Toyonoka (OG.TO), Toyonoka x Sweet Charlie (TO.SC), Great Bear x Hallelujah (OG.AL), Royal Path x Toyonoka (CR.TO) and Hallelujah x Sweet Charlie (AL. SC). The design was completely randomized with three replications and one plant per plot. For phenotypic characterization, the evaluated characteristics were number of fruits per plant and average mass of commercial and non-commercial, non-deformed and non-deformed pseudofruit (g) and for the composition of physicochemical quality the total soluble solids content, titratable total acidity and PH. The results were submitted to analysis of variance and the means comparison was performed by the Tukey test, at a 5% probability level. The results indicated a higher mass of commercial pseudofruits for the TO.SC, DO.AL, CR.TO, AL.CR and AL.SC hybrids while the OG.AL hybrid had the highest number of commercial pseudofruits. Of the pseudofruits deformed by mass over six grams TO.SC was the one that produced the most and DO.AL the one that produced the least and per plant was the DO.OG. For the number of deformed fruits with less than 6 grams DO.AL was the one who produced the most and AL.CR, AL.SC, CR.SC and OG.TO produced the most. The OG.AL hybrid proved to be the most attractive for the region, presenting characteristics that are susceptible to the local consumer market.

**Keywords:** *Fragaria x anassa* Duch. Pseudofruit quality. Hybridization.

## 2.1 INTRODUÇÃO

O morangueiro, cultivado tradicionalmente nos estados da região Sul do país, expandiu fronteiras agrícolas e hoje, encontra-se disseminado em estados das mais diversas condições edafo-climáticas. O gênero *Fragaria* compreende dezessete espécies silvestres, classificadas quanto ao nível de ploidia, com número cromossômico básico igual a sete ( $x=7$ ). A espécie *Fragaria x ananassa* Duch. é octaplóide ( $2n=8x=56$ ), resultado de uma hibridação interespecífica para reunir em um único indivíduo características desejáveis em várias espécies compatíveis.

O melhoramento por hibridação visa a gerar uma nova linhagem pura com alelos favoráveis presentes em dois ou mais genótipos, podendo apresentar características desejáveis, adaptadas à região.

A seleção fenotípica é o primeiro passo para indicar técnicas de Seleção Assistidas de Marcadores, MAS, para a exploração completa da genética que controla a característica de interesse. Como indicador de qualidade de produção, vários são os quesitos a ser analisados além da produtividade. Hortynski *et al.* (1991) consideram o tamanho do fruto uma das características mais importantes nas cultivares altamente produtivas, contrastando em seu trabalho autores que consideram o número de frutos. Comercialmente, o formato do fruto é decisivo.

A cultura do morangueiro tem-se destacado nos últimos anos como uma das principais hortaliças-fruto cultivadas e consumidas no Brasil e também em outros países, em resposta à crescente demanda desse produto nos mercados locais (ANTUNES *et al.*, 2007; FILGUEIRA, 2005). Segundo Giménez, Andriolo e Godoi (2008), o interesse comercial pelo morango é grande em muitos países, pelo seu aroma, sabor, coloração e propriedades nutricionais, que fazem do fruto um produto de elevado valor comercial e muito apreciado pelos consumidores.

Assim, objetivou-se neste trabalho realizar a caracterização físico-química de pseudofrutos de dez híbridos de morangueiro obtidos por hibridação, a fim de verificar o cruzamento de melhor recomendação para o mercado local.

## **2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2.1 Caracterização Física dos Pseudofrutos**

O experimento foi conduzido nas instalações da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, EPAMIG Norte em Nova Porteirinha, MG. A classificação do clima é Aw segundo a Köppen e Geiger (1928). Foram plantados mudas com três folhas definitivas e aproximadamente 15 cm de comprimento em vasos de 7 litros em casa de vegetação . Foram avaliados 10 híbridos obtidos pelos sistema de dialelo completo, são eles: Aleluia x Toyonoka (AL.TO), Dover x Oso Grande (DO.OG), Dover x Aleluia (DO.AL), Caminho Real x Sweet Charlie (CR.SC), Aleluia x Caminho Real (AL.CR), Oso Grande x Toyonoka (OG.TO), Toyonoka x Sweet Charlie (TO.SC), Oso Grande x Aleluia (OG.AL), Caminho Real x Toyonoka (CR.TO) e Aleluia x Sweet Charlie (AL.SC). O delineamento usado foi inteiramente casualizado com três repetições e uma planta por parcela. A irrigação foi utilizada sempre que necessária, por avaliação visual por microaspersores. A adubação e os tratos culturais pertinentes à cultura foram realizados de acordo com os utilizados na região produtora.

As características avaliadas foram número de frutos por planta e massa média do fruto (g) comerciais e não comerciais e número e massa fresca de pseudofrutos deformados e não deformados. As colheitas foram realizadas quando os pseudofrutos apresentaram mais da metade da superfície vermelha sendo realizada entre os meses, de Agosto a Dezembro de 2014. Os resultados foram submetidos à análise de variância e a comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade, utilizando o programa SAS.

## **2.2.2 Caracterização Físico-Química dos Pseudofrutos**

### **2.2.2.1 Sólidos Solúveis Totais**

A determinação do teor de sólidos solúveis totais (SST) foi efetuada utilizando 10 g de morango. A essas amostras foram adicionadas 90 ml de água destilada, com posterior agitação. Coletou-se uma subamostra dessa extração, a qual foi gotejada em refratômetro, determinando essa característica em °Brix.

### **2.2.2.2 Acidez Titulável Total**

Outra subamostra foi preparada e utilizada para quantificar a acidez titulável total (ATT) dos frutos de morango. Para isso, adicionaram-se três gotas de indicador fenolftaleína 1%, efetuando a titulação com NaOH 0,1mol/L. A ATT foi obtida considerando a quantidade de NaOH 0,1mol/L consumida na titulação da amostra, sendo expressa em percentagem de ácido cítrico.

### **2.2.2.3 pH**

O pH foi determinado com o auxílio de um peagâmetro. O experimento foi conduzido segundo o delineamento inteiramente casualizado, constituído de seis repetições. As análises estatísticas foram realizadas, utilizando-se o Programa Sisvar (FERREIRA, 1999). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e utilizados para o teste de médias, pelo teste Tukey, ao nível de 5% de significância estatística.



## **2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **2.3.1 Caracterização fenotípica de pseudofrutos de morangueiro**

Os híbridos que apresentaram pseudofrutos comerciais com massa fresca acima de seis gramas (MFCMA) foram TO.SC, DO.AL, CR.TO, AL.CR e AL.SC. Entretanto, o híbrido obtido a partir do cruzamento entre os genitores Dover e Oso Grande apresentou a menor médiapara massa fresca dos pseudofrutos bem como menor número de pseudofrutos comerciais com menos de seis gramas (NFCMA) (Tabela 1). Schuch e Barros (2010), em seu trabalho com as cultivares Dover, Campinas, Seascape e Camarosa, Oso Grande, Verão, Chandler e Vila Nova obteve média de massa de frutos com valor inferior a todos os híbridos variando entre 9,26 a 14,09 gramas, porém em relação ao número de pseudofrutos comerciáveis obteve maiores valores variando de 13,06 a 28,09g. Apenas o híbrido OG.AL, superou esta média com 34 frutos comerciais por planta.

Para a massa de pseudofrutos comerciais com massa fresca menor que seis gramas (MFCME) não foram observadas diferenças significativas entre os híbridos avaliados. Entretanto variações significativas entre os híbridos foram observadas para o número de frutos comerciais com massa menor que seis gramas por planta (NFCME) (Tabela 1). O híbrido OG.AL foi o que apresentou a maior média de número de frutos com massa inferior a seis gramas não deformados (Tabela 1). Schuch e Barros (2010), em seu trabalho observou que a cultivar Dover está no grupo das que mais produziram frutos não deformados com menos de 6 gramas, variando de 9,6 a 14,3 e que a Oso Grande caracterizou-se como a cultivar que apresentou a menor média. No presente estudo todos os híbridos avaliados cujo um dos parentais foi a cultivar Dover estiveram no grupo das que mais produziram número de frutos não deformado com menos de seis gramas. Dos frutos deformados os que excederam massa fresca de seis gramas por frutos (MFDMA) o híbrido TO.SC apresentou a maior média, enquanto que DO.OG foi o apresentou a maior média do número de frutos deformados com mais de seis gramas (NFDMA). Os híbridos não se diferenciaram quanto à massa de

frutos deformados com menos de 6 gramas (MFDME), comprimento (COM) e diâmetro (DIAM).

**Tabela 1** – Valores médios para massa fresca de frutos comerciais com mais de 6 gramas (MFCMA); número de frutos comerciais com mais de 6 gramas (NFCMA); massa fresca de frutos comerciais com menos de 6 gramas (MFCME); número de frutos comerciais com menos de 6 gramas (NFCME); massa fresca de frutos deformados com mais de 6 gramas (MFDMA); massa de frutos deformados com menos de 6 gramas (MFDME); número de frutos deformados com menos de 6 gramas (NFDME); comprimento (COM) e diâmetro (DIAM)

Híbridos	MFCMA	NFCMA	MFCME	NFCME	MFDMA	NFDMA	MFDME	NFDME	COM	DIAM
TO.SC	22,00a	15,34bcd	4,67a	7,34acbd	27,67a	10,34bcd	5,00a	7,33abc	4,00a	4,00a
DO.AL	21,67a	20,00bc	5,00a	9,34ab	10,67b	3,34e	5,00a	4,67c	4,00a	4,00a
CR.TO	21,34a	14,00cd	4,00a	5,34cd	18,34ab	12,67abc	4,00a	7,34abc	4,67a	3,34a
AL.CR	21,00a	11,34de	5,00a	4,67cd	17,67ab	9,34cd	4,34a	11,67a	4,34a	3,34a
AL.SC	20,00a	10,67de	5,00a	7,67abc	17,67ab	9,34cd	4,00a	11,67a	4,34a	3,34a
OG.AL	19,67ab	34,00a	5,00a	10,67a	15,34ab	6,67de	4,34a	9,34ab	4,00a	3,67a
AL.TO	18,00ab	20,67b	4,67a	6,00bcd	19,34ab	2,00e	5,00a	5,34bc	4,00a	4,00a
CR.SC	18,00ab	9,34de	5,00a	7,34abcd	20,67ab	14,67ab	4,34a	10,00a	4,00a	3,00a
OG.TO	17,34ab	6,00e	4,34a	3,67d	18,34ab	8,67cd	4,67a	10,00a	4,34a	3,34a
DO.OG	15,00b	6,00e	4,67a	6,67bcd	17,00ab	16,00a	4,34a	8,67abc	4,00a	3,34a
CV (%)	8,68	14,34	7,71	20,07	30,58	17,89	9,07	17,51	8,67	12,66

NOTA: Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor, 2016.

Otto *et al.* (2004) testando doses de nitrogênio em outras cultivares (Seascape, Diamante e Aromas) conseguiram 18 a 28 número de frutos por planta e peso médio dos frutos entre 12,24g a 16,22g no verão em Ponta Grossa-PR. Nesse trabalho foram observadas médias maiores para a variável número médio de frutos por planta com o híbrido OG.AL e para o peso obtiveram-se médias maiores para o híbridos DO.AL, OG.AL e AL.TO. Nesse trabalho não houve controle químico pois buscou verificar a viabilidade da produção sem intervenção de insumos químicos.

O híbrido OG.AL apresentou em média 646 g de massa fresca total em frutos comerciáveis. Dias *et al.* (2013) testando cultivares e número de linhas no Norte de Minas obteve para a cultivar Oso Grande 326,17 a 383,09 g dependendo do número de linhas e maiores valores para a cultivar Dover com 565,76 g. Calvete *et al.* (2008) realizaram estudo com oito cultivares na região de Passo Fundo, RS em 2005, a cultivar Camarosa (607 g planta<sup>-1</sup>) foi a mais produtiva, seguida da Dover (549 g planta<sup>-1</sup>), Oso Grande (536 g planta<sup>-1</sup>) e Tudla (443 g planta<sup>-1</sup>). A este fenômeno de superioridade manifestada na combinação híbrida Bos e Caligari (2011) chamam de heterose. Termo proposto por Shull (1908) a fim de tornar a observação livre de implicações genéticas e evitar confusão com o termo “vigor híbrido”, o qual foi relacionado com o Mendelismo.

Em estudo da divergência genética de 11 cultivares por meio de caracteres morfoagronômicos, Morales *et al.* (2011) relataram que os cruzamentos Dover x Sweet Charlie, Dover x Oso Grande, Dover x Tudla, Dover x Sweet Charlie, Dover x Camarosa e Tudla x Oso Grande apresentaram baixa similaridade, entretando, estes resultados não correlacionaram com a genealogia das cultivares. Contudo, estes cruzamentos possuem potencial para obtenção de progênes superiores. Em adição, os mesmo autores citaram que a cultivar Tudla possui menor similaridade entre todas as outras espécies do estudo e foi recomendada para utilização visando aumento da base genética em programas de melhoramento.

Castro *et al.* (2003) avaliando produtividade das cultivares Campinas, Dover e Princesa Isabel em sistema orgânico em Viçosa-MG tiveram peso

médio dos pseudofrutos de 7,76 a 9,5g e de 28 a 55 número de frutos por plantas, foram avaliados pseudofrutos com peso acima de 3,5 g e não deformados. Em nossos resultados não tivemos híbridos originados da cultivar Dover com número médio de pseudofrutos maiores, mas sim em relação ao peso médio.

### 2.3.2 Caracterização Físico-Química de Pseudofrutos de Morangueiro

Comparando-se os dez híbridos para característica de teor de sólidos solúveis totais (SST), os híbridos OG.AL, OG.TO e AL.TO apresentaram maiores valores de °Brix, tendo diferença significativa, quando comparado ao híbrido AL.SC, que apresentou menor SST, com média geral de 7,0 °Brix (TABELA 2). O híbrido OG.AL apresentou o maior SST, com 9,66 °Brix, sendo um indicativo para a concentração de açúcares presentes, estando esse teor, entre os demais híbridos avaliados, mais próximo do indicado por Chitarra e Chitarra (2005), o qual prevê uma concentração de sólidos para industrialização em torno de 11° Brix.

**Tabela 2** – Valores médios para o teor de Sólidos Solúveis Totais (SST) de dez híbridos de morango

Tratamento	SST (°Brix)
OG.AL	9,67a
OG.TO	9,34a
AL.TO	9,00a
DO.OG	8,67ab
CR.TO	8,34abc
TO.SC	8,34abc
DO.AL	7,34bc
AL.CR	7,34bc
CR.SC	7,34bc
AL.SC	7,00c

NOTA: Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor, 2016.

Fumis (2003), trabalhou com análise das cultivares Dover, Oso Grande, Sweet Charlie e Toyonoka, obtendo valores respectivamente para SST de 5,9; 6,3; 7,5 e 8,7°Brix. Guimarães (2009), avaliando as cultivares Dover e Oso Grande submetidos a compostos orgânicos para conservação pós-colheita e conseguiu em média, respectivamente, 6,46 e 6,94 °Brix. No presente estudo os híbridos avaliados apresentaram valores médios entre 7 e 9,67 °Brix, ou seja, valores superiores aos parentais.

Conforme a Tabela 3, os híbridos AL.TO e DO.AL revelaram um maior valor de ATT, sendo 3,00% de ácido cítrico em ambos, diferenciando estatisticamente dos híbridos de menores valores de ATT, como os AL.SC, CR.SC, OG.AL, TO.SC e AL.CR. A relação SST/ATT fornece um indicativo do sabor da fruta e seu balanço entre ácidos e açúcares, logo menores valores de ATT geram um quociente de maior valor, indicando estádios de maturação mais elevados e ideais ao consumo.

**Tabela 3** – Valores médios para a acidez titulável total (ATT) de dez híbridos de morango

<b>Tratamento</b>	<b>SST (°Brix)</b>
AL.TO	3,00a
DO.AL	3,00a
OG.TO	2,00ab
DO.OG	2,00ab
CR.TO	2,00ab
AL.SC	1,67b
CR.SC	1,67b
OG.AL	1,67b
TO.SC	1,34b
AL.CR	1,00b

NOTA: Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.  
Fonte: Do autor, 2016.

Para o pH (TABELA 4), os híbridos OG.TO, AL.TO e OG.AL apresentaram maiores valores médios, diferindo estatisticamente dos

híbridos OG.TO, AL.CR, CR.TO, TO.SC e CR.SC. Os valores de pH apontam o estágio de maturação de frutos, em que estes, com maior pH, apresentam-se mais básicos, indicando uma maturação mais elevada. Segundo Freitas et al. (2009), o pH abaixo de 4,5 auxilia de forma eficiente contra o *Clostridium botulinum* em sucos e polpas de morango.

**Tabela 4** – Valores médios para o pH de dez híbridos de morango

Tratamento	pH
DO.OG	4,00a
DO.AL	4,00a
OG.AL	4,00a
AL.SC	3,67ab
AL.TO	3,67ab
CR.SC	3,00b
TO.SC	3,00b
CR.TO	3,00b
AL.CR	3,00b
OG.TO	3,00b

NOTA: Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor, 2016.

Guimarães (2009), trabalhando com cultivares Oso Grande e Dover submetidos a aplicação de compostos orgânicos para avaliar propriedade da conservação pós colheita de pseudofrutos encontraram valores de pH 3,65 e 3,45, respectivamente. Fumis *et al.* (2003) avaliando cultivares de morango em Bauru-SP, dentre eles Dover, Oso Grande, Sweet Charlie e Toyonoka obtiveram valores de pH respectivamente 2,95; 3,19; 3,2 e 3,27. Valores de acidez muito baixos, como foi o caso da cultivar Dover muitas vezes não a indica para consumo *in natura* desagregando valor à cultura. No presente estudo nenhum dos híbridos advindos do cruzamento com a parental Dover apresentou essa característica.

## **2.4 CONCLUSÃO**

O híbrido OG.AL, apresenta características físicas e físico-químicas dos pseudofrutos superiores aos demais híbridos avaliados.



## CAPÍTULO 3 – DESEMPENHO *IN VITRO* DE HÍBRIDOS DE MORANGUEIRO DURANTE CINCO SUBCULTIVOS

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a performance *in vitro* de híbridos de morango submetidos a cinco subcultivos de micropropagação. Foram utilizados dez híbridos, os quais: Dover x Aleluia (DO.AL); Caminho Real x Sweet Charlie (CR.SC); Toyonoka x Sweet Charlie (TO.SC); Caminho Real x Toyonoka (CR.TO); Aleluia x Sweet Charlie (AL.SC); Aleluia x Toyonoka (AL.TO); Dover x Oso Grande (DO.OG) e Oso Grande x Aleluia (OG.AL). Foram colhidos meristemas apicais e introduzidos em meio MS suplementado com 10 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) no subcultivo I e nos ciclos II, III, IV e V foram suplementos apenas com 10 mg L<sup>-1</sup> de BAP, cada ciclo com duração de 30 dias. Foram avaliados número de propágulos, número de folhas e comprimento do explante. Os dez tratamentos foram dispostos em um delineamento inteiramente ao acaso, com três repetições, sendo as unidades experimentais constituídas por um frasco contendo cinco explantes. Os resultados foram submetidos às análises estatísticas de variância e a comparação das médias, por meio do teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Não houve interação significativa entre os híbridos e ciclos de subcultivos, apenas para os ciclos. Para o número de propágulos, observou-se que seis dos oito híbridos apresentaram variações significativas durante os cinco subcultivos. Para número de folhas todos os híbridos apresentaram variações significativas durante os cinco subcultivos. O híbrido DO.AL apresentou a maior média, com valor de 20,67 no quarto subcultivo. Para o tamanho dos propágulos, em todos os híbridos foi observado incremento no comprimento até o terceiro subcultivo. A variação observada entre híbridos indica a necessidade de realizar novos estudos e desenvolvimento de protocolos específicos para distintas variedades, visando assim maximizar a produção *in vitro* e a produção de mudas de qualidade.

**Palavras-chave:** Fragaria x anassa Duch. Micropropagação. Propágulos.

## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the in vitro performance of strawberry hybrids submitted to five micropropagation subcultures. Ten hybrids were used, which were: Dover x Hallelujah (DO.AL); Royal Path x Sweet Charlie (CR.SC); Toyonoka x Sweet Charlie (TO.SC); Real Path x Toyonoka (CR.TO); Hallelujah x Sweet Charlie (AL.SC); Hallelujah x Toyonoka (AL.TO); Dover x Big Bear (DO.OG) and Big Bear x Hallelujah (OG.AL). Apical meristem was collected and introduced in MS medium supplemented with 10 mg L<sup>-1</sup> of BAP (6-benzylaminopurine), 0.01 mg L<sup>-1</sup> of ANA (naphthaleneacetic acid) and 0.1 mg L<sup>-1</sup> of AG3 (gibberellic acid). In subculture I and in cycles II, III, IV and V were supplements with only 10 mg L<sup>-1</sup> of BAP, each cycle lasting 30 days. The number of propagules, number of leaves and length of the explant were evaluated. The ten treatments were arranged in a completely randomized design, with three replicates, the experimental units being constituted by a vial containing five explants. The results were submitted to the statistical analysis of variance and the comparison of means by means of the Tukey test, with a probability of 5%. There was no significant interaction between hybrids and subculture cycles, only for cycles. For the number of propagules, it was observed that six of the eight hybrids showed significant variations during the five subcultures. For leaf number, all hybrids showed significant variations during the five subcultures. The DO.AL hybrid presented the highest mean, with a value of 20.67 in the fourth subculture. For the size of the propagules, in all the hybrids was observed increase in the length until the third subculture. The observed variation between hybrids indicates the need to carry out new studies and development of specific protocols for different varieties, aiming at maximizing in vitro production and the production of quality seedlings.

**Keywords:** *Fragaria x anassa* Duch. Micropropagation. Propagules.

### 3.1 INTRODUÇÃO

Algumas frutíferas têm a via vegetativa como seu principal método de multiplicação, em função da baixa viabilidade ou esterilidade de suas sementes, ou para assegurar a fidelidade genotípica. No caso dos híbridos que ainda possuem identidade instável, permite que genótipos com características desejáveis sejam multiplicados e ainda fixando os ganhos genéticos pela captura dos componentes totais da variância genética (DALAGNOL, 2010).

A micropropagação de plantas, definida como a propagação clonal de um genótipo selecionado por técnicas de cultura *in vitro*, permite obter grande quantidade de matrizes/mudas em curto espaço de tempo e a multiplicação de materiais difíceis de serem obtidos por meios tradicionais. Teoricamente, esta clonagem é altamente fidedigna. Contudo, mutantes ou variantes podem ocorrer durante o processo (CHUANG *et al.*, 2009). Normalmente espera-se pouca probabilidade de ocorrência de variações, não sendo descartada a manifestação destas, ainda que por sucessivos ciclos clonais oriundos de única fonte.

Para Dalagnol (2010), a fidelidade genotípica é um dos fatores considerados quando se analisa a qualidade das mudas. Assim, conhecer este fenômeno tem não só um apelo científico, como também uma aplicação prática, de grande importância, uma vez que várias outras culturas são micropropagadas, sendo responsáveis por considerável volume na produção e na renda no setor. Dessa forma, o objetivo com este trabalho foi avaliar o desenvolvimento dos explantes *in vitro* dos híbridos do morangueiro por cinco subcultivos sucessivos.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da EPAMIG Norte, Campo Experimental do Gortuba, em Nova Porteirinha, MG. Foram utilizados oito híbridos interespecíficos obtidos por dialelo completo, os quais: Dover x Aleluia (DO.AL); Caminho Real x Sweet Charlie (CR.SC); Toyonoka x Sweet Charlie (TO.SC); Caminho Real x Toyonoka (CR.TO); Aleluia x Sweet Charlie (AL.SC); Aleluia x Toyonoka (AL.TO); Dover x Oso Grande (DO.OG) e Oso Grande x Aleluia (OG.AL). Para a realização dos processos de multiplicação e enraizamento das plântulas, foi seguido o protocolo para a produção de matrizes de morangueiro por meio de cultura de tecidos utilizado pela Embrapa Clima Temperado (OLIVEIRA *et al.*, 2005), adaptado.

### **3.2.1 Coleta do material**

Foram utilizadas gemas coletadas dos estolões obtidos via propagação em vaso em casa de vegetação para o primeiro subcultivo. Os explantes coletados foram os do ápice considerados primários. Foram retirados com auxílio de uma tesoura e acondicionados em placas de petri com água destilada e esterilizada, sem ao abrigo da luz. Os híbridos foram adequadamente identificados.

### **3.2.2 Desinfestação dos estolões**

Os explantes foram conduzidos ao laboratório e foi realizada a lavagem com água e detergente neutro, em seguida os explantes foram colocados em câmara de fluxo laminar e imersos em álcool 70% durante 15 segundos, seguido da imersão em solução de hipoclorito de sódio 1,0% durante 5 minutos e por último a tríplex lavagem com água deionizada esterilizada e solução de ácido ascórbico (0,5 g/L) por 15 minutos.

### 3.2.3 Extração de meristemas

A extração do meristema foi realizada no interior da câmara de fluxo laminar, com auxílio de pinça e bisturi, utilizando lupa estereoscópica. Os meristemas extraídos apresentaram um tamanho de 2mm, em seguida o explante foi introduzido em meio de cultura MS.

### 3.2.4 Estabelecimento *in vitro*

O meio de cultura utilizado foi composto por macronutrientes e micronutrientes conforme meio MS (Murashige; Skoog, 1962) suplementado com 10 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). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem. Utilizou-se tubos de ensaio de 15 mm de diâmetro por 150 mm de altura, contendo 6 mL de meio de cultura. Em seguida foi realizada a autoclavagem sob condições de temperatura a 121°C, à 1,5 atm, por 15 minutos. Cada tubo de ensaio recebeu um único explante.

Após introdução do explantes nos tubos, estes foram transferidos para sala de crescimento submetidos às primeiras 48 horas no escuro. Nos 28 dias restantes do subcultivo foram disponibilizados intensidade luminosa de 20 mE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas.

### 3.2.5 Multiplicação *in vitro*

O meio de cultura utilizado foi composto por macronutrientes, micronutrientes e vitaminas do meio MS suplementado com 10 mg L<sup>-1</sup> de BAP. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem. A introdução *in vitro* dos explantes foi feita em frascos com dimensões de 60 mm de diâmetro por 140 mm de altura contendo cinco explante cada frasco. Cada explante havia aproximadamente 2 a 3 mm. A quantidade de meio de cultura por frasco foi 40 mL. Em seguida foi realizada a autoclavagem sob condições de temperatura a 121°C, à 1,5 atm, por 15 minutos.

Após introdução do explantes nos tubos, estes foram transferidos para sala de crescimento submetidos diretamente à intensidade luminosa de  $20 \text{ mE m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas. A cada 30 dias a troca do meio foi realizada com plântulas do subcultivo anterior, este procedimento foi feito até o quinto subcultivo.

O experimento foi conduzido segundo delineamento inteiramente casualizado, constituído de 4 repetições (um frasco com 5 plântulas cada repetição). A cada troca apenas 3 dos 5 explantes eram avaliados descartando os de valores maiores e menores, foram escolhidos os de características medianas.

### **3.2.6 Variáveis analisadas**

Foram avaliados número de propágulos, número de folhas e comprimento de planta com a utilização de um paquímetro. Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente ao acaso, com três repetições, sendo as unidades experimentais constituídas por um frasco contendo cinco explantes. Os resultados foram submetidos às análises estatísticas de variância e de comparação de médias, por meio do teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o software estatístico SAS.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o número de propágulos, observou-se que os híbridos AL.TO, AL.SC, CR.SC e TO.SC não sofreram variações em relação aos demais durante os cinco ciclos. No híbrido CR.TO observou diminuição no segundo ciclo e o mesmo não se manteve. O mesmo efeito inverso foi observado nos DO.AL, DO.OG e OG.AL em que houve um aumento no terceiro ciclo e não se manteve nos cultivos subsequentes.

**Tabela 5** – Valores médios para o número de propágulos

Ciclos	Híbridos							
	AL.TO	AL.SC	CR.TO	CR.SC	DO.AL	DO.OG	OG.AL	TO.SC
1	2,00a	2,00a	3,33b	3,00a	1,33a	1,33ab	1,00a	1,67a
2	2,33a	3,33a	1,00a	2,33a	2,67a	1,00a	2,33ab	1,00a
3	3,33a	3,67a	2,00ab	2,67a	5,33b	3,00b	3,00b	2,00a
4	2,00a	2,00a	2,67ab	2,67a	3,00a	2,33ab	1,67ab	2,67a
5	2,00a	3,00a	2,00ab	2,33a	2,33a	1,67ab	2,00ab	2,33a

NOTA: Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor, 2016.

Calvete *et al.* (2009), também trabalhando com multiplicação *in vitro* em vários subcultivos com morangueiro com as cultivares Oso Grande e Vila Nova obtiveram valores médios de sete propágulos por explante no primeiro subcultivo, oito no segundo e terceiro ciclo e nos subcultivos subsequentes foi observada uma redução significativa, atingindo valores 1,6 e 1,7. Brham & Oliveira (2004), observou taxa de multiplicação, no terceiro subcultivo, de 4,1 e de 4,0 para as cultivares Oso Grande e Vila Nova, respectivamente.

Em relação ao número de folhas, os híbridos AL.TO, AL.SC, DO.AL, OG.AL, DO.OG e TO.SC apresentaram incremento significativo até o terceiro subcultivo. Apenas o híbrido DO.AL não apresentou redução significativa no número de folhas no quarto subcultivo.

Foi observada nos trabalhos de Calvete *et al.* (2009) interação significativa entre as cultivares e o número de subcultivos para o variável número de folhas por propágulo. O maior número de folhas foi obtido na

cultivar Vila Nova, no segundo e terceiro subcultivos, com média de 5,0 folhas/ propágulo. A partir do terceiro subcultivo também foram observadas reduções significativas.

**Tabela 6** – Valores médios para o número de folhas

Ciclos	Híbridos							
	AL.TO	AL.SC	CR.TO	CR.SC	DO.AL	DO.OG	OG.AL	TO.SC
1	5,33a	4,33a	5,00a	5,00a	3,33a	3,67a	2,00a	2,67a
2	7,33ab	8,67bc	4,00a	7,00ab	4,00a	4,00a	6,67b	3,00a
3	9,33b	11,67c	5,00a	6,33a	13,33b	10,67b	13,00c	13,00c
4	6,66ab	6,67ab	10,33b	10,00b	20,67c	10,67b	6,33b	8,67b
5	15,66c	11,67c	15,33c	8,00ab	18,67c	11,33b	6,00b	7,00b

NOTA: Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor, 2016.

Para a variável comprimento, nenhum dos híbridos avaliados apresentou variação entre os ciclos, ocorrendo variação apenas entre os híbridos. Em todos os híbridos houve aumento proporcional em cada ciclo até o terceiro subcultivo. No quarto ciclo todos os híbridos tiveram baixo tamanho médio dos propágulos observados e no quinto esse efeito não se manteve, voltando a elevar a média.

A quantidade de citocinina endógena pode ter ocasionado essa diferença de comportamento entre os subcultivos, visto que Pereira (2011) e Gomes (2012) em trabalhos anteriores com outras cultivares de morango mostraram que doses de até 4,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP não foram eficientes na micropropagação. A dose de BAP, aliada aos sucessivos subcultivos pode ter superexpressado esse hormônio e sua concentração pode ter sido fitotóxica para a plântula.



**Tabela 7** – Valores médios para o tamanho dos propágulos (mm)

Ciclos	Híbridos							
	AL.TO	AL.SC	CR.TO	CR.SC	DO.AL	DO.OG	OG.AL	TO.SC
1	8,00b	9,00b	11,33b	12,00c	7,33ab	7,67b	4,00a	10,67c
2	10,00bc	8,66b	14,33c	9,33bc	11,00c	5,33ab	8,33b	10,00c
3	11,33cd	9,67b	13,67bc	10,00bc	8,67bc	17,67c	15,67c	12,67c
4	3,33a	3,33a	4,67a	7,67b	4,67a	4,33a	3,67a	7,00b
5	13,67d	13,67c	11,67bc	2,33a	10,67c	8,00b	6,00ab	1,67a

NOTA: Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor, 2016.

Calvete *et al.* (2009) ao avaliar o comprimento das brotações também observou efeito significativo dos tratamentos de forma independente, com maiores brotações na cv. Oso Grande (1,2 cm). O autor também observou redução no comprimento até o subcultivo seis, quando, então, passaram a ser obtidos maiores crescimentos. Resultados contrários foram encontrados por Calvete *et al.* (2001), com a cv. Vila Nova apresentando maior desenvolvimento *in vitro* que a 'Oso Grande'.

O número pequeno de ciclos ainda não é suficiente para concluir se as alterações observadas para número de propágulos e número de folhas são constantes ou não, havendo necessidade de observar maior número de ciclos. Para a cultura do morango recomenda-se cinco subcultivos (DIAS *et al.*, 2014) embora sejam toleradas oito no Canadá (Nova Scotia Agriculture and Fisheries, 2004) e dez na Europa (EPPO, 2004). Na literatura, existem vários trabalhos sobre variantes somaclonais resultantes da cultura de tecidos de morangueiro (Kaushal *et al.*, 2004), portanto não é recomendável desprezar a presente recomendação.

De acordo com Boxus (1999), é possível reduzir a ocorrência de variações em plantas de morango através da redução da concentração de citocinina no meio de cultura de 1 mg L<sup>-1</sup> para 0,5 ou 0,25 mg L<sup>-1</sup>. Dessa forma, um estoque de material de alta qualidade estará bem adaptado ao novo sistema de cultivo intensivo.

Para Monfort *et al.* (2012), a quantidade disponível no meio de cultura, a interação e a concentração endógena de fitohormônios do explante determinam o processo morfogênético *in vitro*. Embora auxinas e citocininas sejam normalmente requeridas para o crescimento ou morfogênese, as auxinas podem inibir o acúmulo de citocininas, enquanto as citocininas podem inibir pelo menos alguma ação das auxinas. Os segmentos apicais são fontes de fitohormônios do grupo das auxinas, relacionados com a dominância apical.

Conforme Leshem *et al.* (1988) o uso de citocininas em níveis elevados pode ser tóxico, pois inibe o alongamento dos brotos. É provável que os segmentos caulinares acumulem concentrações diferentes destes reguladores de crescimento vegetal nas diferentes posições, resultando em diferentes respostas de desenvolvimento. Portanto a alteração no quarto ciclo deste trabalho pode ser explicada pelo acúmulo gerado devido à quantidade de BAP (citocinina) ter sido maior em relação ao protocolo original proposto por Oliveira *et al.* (2005), gerando acúmulo endógeno nos explante a cada ciclo a ponto gerar efeito tóxico inibindo momentaneamente o alongamento dos brotos.

### 3.4 CONCLUSÃO

Os híbridos AL.TO, AL.SC e DO.AL tiveram melhores resultados adaptativos ao protocolo adaptado. A variação observada entre híbridos nos induz à necessidade de realizar novos protocolos para a elaboração de meio de cultivo *in vitro* por híbrido e não por cultura, para que diminua esse efeito de variação entre os clones e para que as características desejadas dos genótipos não sejam perdidas nos próximos subcultivos clonais.

## REFERÊNCIAS

- ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA – AGRIANUAL. **MORANGO: balanço Mundial**. São Paulo, 2008. 419 p.
- AGRO 556. Morango: **Produção de outono em diferentes materiais de propagação vegetativa**. N4. 2007.
- ALVARENGA, D. A.; DUARTE FILHO, J.; CARVALHO, A. A. Coeficientes técnicos da produção de morango. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n.198, p. 20-21, 1999.
- ANTUNES, L. E. C.; DUARTE FILHO, J. D.; CALEGARIO, F. F.; COSTA, H.; REISSER JUNIOR, C. Produção integrada de morango (PIMo) no Brasil. In: Morango: conquistando novas fronteiras. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 28, n. 236, p. 34-39, jan./fev. 2007.
- ANTUNES, L. E. C.; REISSER JUNIOR, C. Produção integrada de morango: oportunidade de mercado. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 4.; Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul, 3., 2008, Pelotas, RS. **Anais...** Pelotas, 2008. p. 15-20.
- ANTUNES, L. E. C. *et al.* Yield and quality of strawberry cultivars. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 222- 226, 2010.
- BAIRU, M. W.; FENNEL, C. W.; STADEN, J. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (Musa AAA cv. 'Zelig'). **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 4, p. 347-351, 2006.
- BETTI, J. A.; PASSOS, F. A.; TANAKA, M. A. de S. Produção de mudas sadias de morangueiro. In: TANAKA, M. A. de S.; BETTI, J. A.; PASSOS, F. A. **Manejo integrado de pragas e doenças do morangueiro**. Campinas: Cati, 2000. p. 55-61. (Manual Técnico. Série Especial, 5).
- BESPALHOK, C. F. Uso e conservação do germoplasma. In: BESPALHOK, J. C. F., GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. **Melhoramento de plantas**. Disponível em: < [www.bespa.agrarias.ufpr.br/conteudo](http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/conteudo) >. Acesso em: 28 dez. 2016.
- BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, London, v. 447, n. 7143, p. 396-398, 2007.
- BHATT, I. D.; DHAR, U. Micropropagation of Indian wild strawberry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 60, n. 2, p. 83-88, 2000.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, Georgia, v. 19, p. 209-215, 2001.

BOS, I; CALIGARI, P. **Selection methods in plant breeding**. London: Chapman & Hall, 2011. 354 p.

BOXUS, P. Micropropagation of strawberry via axillary shoot proliferation. In: HALL, R. D. (Ed.). **Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology**, Totowa, NJ, v. 111, 421 p., 1999.

BRAHM, R. U.; OLIVEIRA, R. P. Potencial de multiplicação in vitro de cultivares de morangueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 26, n. 3, p. 507-510, 2004.

BRAZANTI, E. C. **La fresa**. Madri: Mundi-Prensa, 1989.

BRUNELLO, A. E. M. **Clonagem**: variação somaclonal em frutíferas perenes. 2002. Disponível em: < <http://www.ufv.br/dbg/BIO240/C017.htm> >. Acesso em: 12 jun. 2014.

CABRAL, J. R. S; SOUZA, J. da S.; FERREIRA, F. R. Variabilidade genética e melhoramento do abacaxi. In: QUEIROS, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 1999.

CALVETE, E. O.; SUZIN, M.; KRYZANSKI, A. Multiplicação *in vitro* de dois genótipos de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 2, 2001.

CALVETE, E. O.; KÄMPF, A. N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento in vitro de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 2, 2002.

CALVETE, E. O. *et al.* Fenologia, produção e teor de antocianinas de cultivares de morangueiro e ambiente protegido. **Revista Brasileira de fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, 2008.

CALVETE, E. O.; GRANDO, M. F.; GOMIDE, D. G.; MARAN, R. E.; SUZIN, M.; NIENOW, A. A.; CECCHETTI, D. Desempenho in vitro e agrônômico de cultivares micropropagadas de morangueiro em vários subcultivos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 3, n. 4, p. 943-94. 2009.

CARVALHO, S. P. **Boletim do Morango: cultivo convencional, segurança alimentar, cultivo orgânico**. Belo Horizonte: FAEMG, 2006. 160 p.

CASSELLS, A. C.; CURRY, R. F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 64, p. 145-157, 2001.

CASTRO, R. L. Melhoramento genético do morangueiro: avanços no Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 2.; Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas, 1., 2004, Pelotas. **Palestras...** Pelotas: Embrapa Clima

Temperado, p. 21-35, 2004. (Embrapa Clima Temperado, Documentos, 124).

CASTRO, R. L.; CASALI, V. W. D.; BARRELLA, P. T.; SANTOS, R. H. S.; CRUZ, C. D.. Produtividade de cultivares de morangueiros em sistema de cultivo orgânico. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21 n. 2, p. 227-230, abr./jun. 2003.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.

CHUANG, S. J.; CHEN, C. L.; CHEN, J. J.; CHOU, W. Y.; SUNG, J. M. Detection of somaclonal variation in micro-propagated *Echinacea purpurea* using AFLP marker. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 120, n. 1, p. 121-126, 2009.

CONTI, J. H.; MINAMI, K.; TAVARES, F. C. A. Comparação de caracteres morfológicos e agrônômicos com moleculares em morangueiros cultivados no Brasil. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 419-423, 2002.

CONTI, J. H.; MINAMI, K.; TAVARES, F. C. A. Produção e qualidade de frutos de morango em ensaios conduzidos em Atibaia e Piracicaba. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n.1, p. 10- 17. 2002.

COSTA, R. C. da *et al.* Telas de sombreamento na produção de morangueiro em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 29, n.1, p. 98-102, 2011.

D' AMATO, F. Spontaneous mutations and somaclonal variation. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Nuclear techniques and in vitro culture for plant improvement, 1986, Vienna, Austria. **Proceedings...** Vienna, Austria, 1986. p. 3-10.

DALAGNOL, G. L. **Caracterização da variação genética e epigenética em plantas de macieira e morangueiro obtidas por meio de propagação vegetativa convencional e micropropagação** 2010. 156 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2010.

DAMASCO, O. P.; SMITH, M. K.; ADKINS, S. W.; GODWIN, I. D. Use of SCARbased marker for early detection of dwarf off-types in micropropagated 'Cavendish' bananas. **Acta Hort.**, v. 461, p. 157-164. 1998

DARROW, G. M. **Strawberry**: history, breeding and physiology. New York: Holt, Rinehart and Winston, 1966. 447 p.

DEBERGH, P. C.; READ, P. E. Micropropagation. In: DEBERGH, P. C.; READ, P. E. eds. **Micropropagation technology and application**. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 1-13.

DEGANI, C.; ROWLAND, L. J.; SAUNDERS, J. A.; HOKANSON, S. C.; OGDEN, E. L.; GOLAN-GOLDHIRSH, A.; GALLETTA, G. J. A comparison of genetic relationship measures in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) based on AFLPs, RAPDs, and pedigree data. **Euphytica**, v. 117, p.1-12, 2001.

DIAS, M. S. C. *et al.* Desempenho e cultivares de morangueiro em canteiros com diferentes tipos de mulching e disposição de plantas no semiárido mineiro. In: CONGRESSO IBÉRICO DE AGROINGENIERÍA Y CIÊNCIAS HORTÍCOLAS, 7. 2013, Madri, Espanha. **Anais...** Madri, Espanha: Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, 2013.

DIAS, M. S. C.; PADUA, J. G.; SILVA, A. F.; LONDE, L. N.; REIS, J. R. S.; JESUS, A. M. Morango: tecnologias de produção ambientalmente corretas. **Informe agropecuário**, v. 35, n. 279, 2014.

DONADELLI, A.; KANO, C.; JUNIOR, F. F. Estudo de caso: Análise econômica entre custo de produção de morango orgânico e convencional. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 9, n. 2, 2012.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

DUARTE FILHO, J.; ANTUNES, L. E. C.; PÁDUA, J. G. Cultivares. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 28, n. 236, p. 20-23, 2007.

DUARTE FILHO, J.; CUNHA, R. J. P.; ALVARENGA, D. A.; PEREIRA, G. E.; ANTUNES, L. E. C. Aspectos do florescimento e técnicas empregadas objetivando a produção precoce em morangueiros. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n.198, p. 30-35, 1999.

European and Mediterranean Plant Protection Organization – EPPO. **Certification schemes for strawberry**. Paris: EPPO, 2008. 11 p.

EVANS, D. A.; BRAVO, J. E. Phenotypic and genotypic stability of tissue culture plants. In: ZIMMERMAN, R. H.; GRIESBACH, I. L.; HAMMERSCHLAG, F. A.; FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores RAPD e RFLP em Análise Genética**. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEM, 1995. 220 p.

FERREIRA, D. F. **Sistema para análise de variância para dados balanceados (SISVAR)**. Lavras: UFLA, 1999. 92p.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de Olericultura**: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa: UFV, 2005. 402p.

FREITAS, A. A.; SILVA, D. M.; HASHIMOTO, G. H. M. H.; CORRÊA, L. M.; SANTOS, W. R. Avaliação química de morangos visando seu potencial para produção de geléia, polpas e sucos. In: CONCCEPAR, 3., 2009.

FUMIS, T. de F.; SAMPAIO, A. C.; PALLAMI N. M. L.; OLIVEIRA, O. M. Avaliação Tecnológica de nove cultivares de morango de Bauru – SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 43., 2003, Recife, PE. **Anais...** Revista Horticultura Brasileira, Recife, PE, v. 21, p. 321- 321, 2003.

FURLANETTO, C.; CAFÉ FILHO, A. C.; TOMITA, C. K.; CAVALCANTI, M. H. Doenças do morangueiro e aspectos da produção no Distrito Federal. **Horticultura Brasileira**, v. 14, p. 218-220, 1996.

GAMBARDELLA, M.; PERTUZÉ, R. Strawberry production in South America. **Acta Horticulturae**, n. 708, p. 419-424, 2006.

GAUDEUL, M.; TABERLET, P.; TILL-BOTTRAUD, I. Genetic diversity in an endangered alpine plant, *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae), inferred from Amplified Fragment Length Polymorphism Markers. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1625-1637, 2000.

GIMÉNEZ, G.; ANDRIOLO, J.; GODOI, R. Cultivo sem solo do morangueiro. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 1, p. 273-279, jan./fev. 2008.

GIMÉNEZ, G. **Seleção e propagação de clones de morangueiro (Fragaria x ananassa Duch.)**. 2008. 119 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

GOMES, I. C. P. **Cultura de calos a partir de explantes foliares de híbridos de morango**. Monografia (Agronomia) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 2012.

GOMIDE, D. G. **Influência do número de subcultivos na multiplicação in vitro e na aclimatização de plantas micropropagadas de morangueiro**. 2004. 93 f. Dissertação (Mestrado Agronomia/Produção Vegetal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2004.

GOULD, A. R. **Factors controlling variability in vitro**. In: VASIL I. K. (Ed.) Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. **Academic press**, New York, v. 3, p. 549-567, 1986.

GRAHAM, J. *Fragaria* strawberry. In: LITZ, R.E. (Ed.). **Biotechnology of Fruit and Nut Crops**. Florida: CABI Publishing, 2005. cap. 24, p 456-474.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In. TORRES, A. C.; CALDAS. L. S.; BUSO, J. A. (Org.). **Cultura de tecidos e transformação de genética de plantas**. 1. ed. Brasília: SPI., 1998. v. 1, p. 183-260.

GUERRA, M. P.; NODARI R. O. **Apostila de Biotecnologia-CCA/UFSC**. Florianópolis: Ed. Steinmacher, 2006. 40 p.



GUIMARÃES, F. A. **Comportamento pós-colheita dos frutos de moranguiro mantidos sob temperatura refrigerada após a aplicação pré-colheita de produtos biológicos**. 2009. 32 f. Dissertação (Produção Vegetal) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 2009.

HARDING, K. Approaches to assess the genetic stability of plants recovered from in vitro culture. In: NORMAH, M. N.; NARIMAH, M. K.; CLYDE, M. M. (Eds.). In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON IN VITRO CONSERVATION OF PLANT GENETIC, 1996. **Proceedings...** 1996.

HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. Surto de antracnose em morangueiro no Distrito Federal. **Horticultura Brasileira**, v. 8, n. 1, p. 28, 1990.

IBGE. **Censo agropecuário 2009**: lavoura permanente e temporária. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=rs>> Acesso em: 30 jan. 2017.

JAIN, S. M. Plant biotechnology and mutagenesis for sustainable crop improvement. In: BEHL, R. K.; SINGH, D. K.; LODHI, G. P. (Eds.). **Crop Improvement for Stress Tolerance, CSHAU**. New Delhi, India: Hissar & MMB, 1998. p. 218-232.

JAIN, S. M. Tissue culture-derived variation in crop improvement. **Euphytica**, v. 118, p. 156-166, 2001.

KARP, A. Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In: VASIL, I. K.; THORPE, T. A. (Eds.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 7, p.1 39-151, 1994.

KRAUSS, S. K. Accurate genetic diversity estimates from amplified fragment length polymorphism. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1241-1245, 2000.

KUMAR, M. B; BARKER, R. E.; REED, B. M. Morphological and molecular analysis of genetic stability in micropropagated *Fragaria x ananassa* cv. Pocahontas. **In vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v. 35, p. 254-258, 1999.

LAWSON, R.H. (Eds) **Tissue Culture as a Plant Production System for Horticultural Crops**. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1986. p 73-94.

LESHEM, B. *et al.* The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. **Annals of Botany**, v. 62, p. 271-6, 1988.

LOPES, H. R. D.; SILVA, B.C.; NASCIMENTO, E.F.; RAMOS, L. X.; PEREIRA, M.; CARNEIRO, R. G. **A cultura do morangueiro no Distrito Federal**. Brasília: EMATER, 2005. 76p.

LUBY, J. J.; HENCOCK JUNIOR, J. F.; BALLINGTON. J. R. Collection of native strawberry germplasm in the pacific northwest and northern rocky

mountains of the United States. **Hortscience**, Alexandria, v. 27, n. 1, p. 12-17, jan. 1992.

MADAIL, J. C. M. Sistema de produção de morango desenvolvido na Serra Gaúca, município de Caxias do Sul, transição para a produção integrada. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 4.; Encontro Sobre Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul, 3., 2008, Pelotas. **Palestras...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. p. 23-28.

MIÑANO, H. S.; GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; MARTÍN, C. Molecular characterization and analysis of somaclonal variation in chrysanthemum cultivar using RAPD markers. **Scientia Horticulturae**, v. 122, p. 238-243, 2009.

MONFORT, L. E. F., PINTO, J. E. B. P., BERTOLUCCI, S. K. V., ROSSI, Z. T. T.; SANTOS, F. M. Efeito do BAP no cultivo in vitro de *Ocimum selloi* Benth. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v. 14, n. 3, p. 458-463, 2012.

MORALES, R. G. F. *et al.* Divergências genética em cultivares de morangueiro baseada em caracteres morfoagronômicos. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 58, n. 3. 2011.

MUELLER, U. G.; WOLFENBARGER, L. L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Trees**, v. 14, n. 10, p. 389-394, 1999.

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

NEHRA, S. N.; KARTHA, K. K.; STUSHNOFF, C.; GILES, K. L. Effect of in vitro propagation methods on field performance of two strawberry cultivars. **Euphytica**, v. 76, p. 107-115, 1994.

NEHRA, S. N.; KARTHA, K. K.; STUSHNOFF, C.; GILES, K. L. The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 29, p. 257-268, 1992.

NESI, C. N.; VERONA, L. A. F.; GROSSI, R. A produção de morangos em Santa Catarina no ano de 2006. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 4.; Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul, 3., 2008, Pelotas, RS. **Anais...** Pelotas, RS: 2008. 100p.

OKIMURA, M.; IGARESHI, I. Effects of photoperiod and temperature on flowering in everbearing strawberry seedlings. **Acta Horticulturae**, n. 439, p. 605-607, 1997.

OLIVEIRA, R. P.; NINO, A. F. P.; SCIVITTARO, W. B. Mudanças certificadas de morangueiro: maior produção e melhor qualidade da fruta. **A Lavoura**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 655, p. 35-38, 2005.

OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B.; CASTRO, L. A. S. Novas Cultivares de Morangueiro para a Região de Pelotas. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, n. 55, 2007. (Embrapa Clima Temperado).

PASSOS F. A. Nutrição, adubação e calagem do morangueiro. In: DUARTE FILHO J.; REGINA, M. A.; ANTUNES, L. E. C.; FADINI, M. A. M. (Coord.). **Morango: tecnologia de produção e processamento**. Caldas, MG: Epamig, 1999. p. 159-167.

PASSOS, F. A. **Influência de sistemas de cultivo na cultura do morango (Fragaria x ananassa Duch.)**. 1997. 105f. Tese (Doutorado) – ESALQ/USP, Piracicaba.

PEREIRA, D. F. G. **Micropropagação de genótipos de morangueiro adaptados ao norte de Minas**. 2012. Monografia (Agronomia) – Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 2012.

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

PIERIK, R. L. M. In vitro culture of higher plants. **Martinus Nijhoff Publishers**, Dordrecht, 1987.

PIRES, R. C. M.; FOLEGATTI, M. V.; PASSOS, F. A.; AMBROSANO, G. M. B.; MINAMI, K. Profundidade efetiva do sistema radicular do morangueiro sob diferentes coberturas do solo e níveis de água. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 4, p. 793-799, 2000.

PIRES, R. C. M.; PASSOS, F. A.; TANAKA, M. A. Irrigação do morangueiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 198, p. 52-58, 1999.

POLANCO, C.; RUIZ, M. L. AFLP analysis of somaclonal variation in Arabidopsis thaliana regenerated plants. **Plant Science**, v. 162, p. 817-824, 2002.

PRADO, M. J.; GONZALEZ, M. V.; ROMO, S.; HERRERA, M. T. Adventitious plant regeneration on leaf explants from adult male kiwifruit and AFLP analysis of genetic variation. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 88, p. 1-10, 2007.

QUEIROZ-VOLTAN, R. B.; JUNG-MENDAÇOLLI, S. L.; PASSOS, F. A.; SANTOS, R. R. Caracterização botânica de cultivares de morangueiro. **Bragantia**, Campinas, v. 55, n. 1, p. 29-44, 1996.

RANCILLAC, N. J.; NOURRISSEAU, J. G. Micro propagation and strawberry plant quality. **Acta Horticulturae**, v. 265, p. 123-128, 1989.

RANDMANN, E. B.; BIANCHI, V. J.; OLIVEIRA, R. P. de; FACHINELLO, J. C. Caracterização e diversidade genética de cultivares de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n.1, p. 84-87, 2006.

RANI, V.; RAINA, S. N. Genetic fidelity of organized meristem derived micropropagated plants: a critical reappraisal. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant**, v. 36, p. 319-330, 2000.

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.

RICHARDS, E. J. Inherited epigenetic variation-revisiting soft inheritance. **Nature Review Genetics**, London, v. 7, n. 5, p. 395-401, 2006.

ROMANO, E. Extração de DNA em tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI / Embrapa-Cenargen, 1998. p. 163-178.

RONQUE, E. R. V. **A cultura do morangueiro**. Curitiba: Emater, 1998. 206p.

OLIVEIRA, R. P.; NINO, A. F. P.; SILVA, F. O. X.; BRAHM, R. V. **Produção de matrizes de morangueiro por meio de cultura de tecidos**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005. 34 p.

OTTO R. F.; MORAKAMI R. K.; REGHIN M. Y.; CAIRES E. F. Cultivares de morango de dia neutro: produção em função de doses de nitrogênio durante o verão. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 217-221, 2009.

SANTOS, A. M. Cultivares. In: SANTOS, A. M.; MEDEIROS, A. R. M. (Eds.). **Morango: produção**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 24-30, 2003. (Frutas do Brasil, 40).

SANTOS, C. C. C.; RODRIGUES, P. H. V. Variação somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira, cultivar Pacovan. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 2, p. 201-205, 2004.

SEAG. **Qualidade do morango das montanhas capixabas incentiva o agroturismo na região**. Disponível em: <<http://www.saeg.es.gov.br/?p=1882&print=1>>. Disponível em: 8 jul. 2014.

SHULL, G. H. The composition of field of maize. **American Breeding Association Report**, Chicago, v. 4, 1908.

SILVEIRA, G. S. R.; GUIMARAES, B. C. Morango: tecnologias de produção ambientalmente corretas. **Informe Agropecuário**, v. 35, n. 279, 2014.

SOUZA, A. S.; COSTA, M. A. P. C.; SANTOS-SEREJO, J. A.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, F. V. D. Introdução à Cultura de Tecidos de Plantas. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. (Eds). **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006a. p. 11-35.

SOUZA, C. M. **Otimização de protocolos para a propagação in vitro de gébera (Gerberajamesonii)**. 2005. 75 f. Dissertação (Mestrado Fitotecnia/Produção Vegetal) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2005.

SOUZA, F. V. D.; JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; COSTA, M. A. P. C. Micropropagação. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. (Eds). **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006b. p. 38-50.

TERO, N.; ASPI, J., SIIKAMÄKI, P.; JÄKÄLÄNIEIMI, A.; TUOMI, J. Genetic structure and gene flow in a metapopulation of an endangered plant species, *Silenetatarica*. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 2073-2085, 2003.

TOFOLI, J. G.; DOMINGUES, R. J. **Morango**: controle adequado. Disponível em: < [HTTP://www.biologico.sp.gov.br/artigos\\_tecnicos/morango.htm](http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_tecnicos/morango.htm) >. Acesso em: 3 jul. 2016.

TSUNECHIRO, A. *et al.* Valor da produção agropecuária e florestal do Estado de São Paulo em 2009. **Informações Econômicas**, SP, v. 41, n. 5, p. 71- 83, maio 2011.

TYRKA, M.; DZIADCZYK, P.; HORTYŃSKI, J.A. Simplified AFLP procedure as a tool for identification of strawberry cultivars and advanced breeding lines. **Euphytica**, v. 125, p. 273-280, 2002.

USDA. Agricultural Research Service. National Program Germplasm System. **Germoplasm Resources Information Network**, Beltsville, Maryland, 2006. [Base de dados]. Disponível em: <<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/exsplist.pl>>. Acesso em: 15 jul. 2016

VARGA A.; THOMA, L. H.; BRUINSMA, J. Effects of auxins and cytokinins on epigenetic instability of callus-propagated *Kalanchoeblossfeldianapollen*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 15, p. 223-231, 1988.

VEILLEUX, R. E.; JOHNSON, A. A. T. Somaclonal variation: Molecular analysis, transformation, interaction, and utilization. **Plant Breed Rev.**, v. 16, p. 229-268, 1998.

VIEIRA, F. C. V. A cultura do morangueiro. **Fruticultura**: preços agrícola. Piracicaba, 2001.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.V.; HORNES, M.; FRIJETERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprint. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WILLIAMS, L.; COLLINS, H. A. Growth and cytology of celery plants derived from tissue culture. **Ann. Bot.**, Londres, v. 40, p. 333-338, 1976.

WREGGE, M. S.; REISSER JUNIOR, C.; ANTUNES, L. E. C.; OLIVEIRA, R. P.; HERTER, F. G. **Zoneamento agroclimático para produção de mudas de morangueiro no Rio Grande do Sul**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. 27 p. (Documento, 187).