

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

DISSERTAÇÃO

**Estabilidade genética de plantas de diferentes
genótipos de morango (*Fragaria x ananassa*Duch)
micropropagadas submetidas a diferentes
números de subcultivos**

Andréa Pereira da Fonseca

2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

Estabilidade genética de plantas de diferentes genótipos de morango (*Fragaria x ananassa*Duch) micropropagadas submetidas a diferentes números de subcultivos

ANDRÉA PEREIRA DA FONSECA

Sob a Orientação da professora
Ana Lúcia Cunha Dornelles

e Co-orientação do professor
Ricardo Motta Miranda

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, Área de Concentração em Fisiologia da Produção.

Seropédica, RJ
Abril de 2010

634.75
F676e
T

Fonseca, Andréa Pereira da, 1978-
Estabilidade genética de plantas de
diferentes genótipos de morango (*Fragaria*
*x ananassa*Duch) micropropagadas submetidas
a diferentes números de subcultivos/
Andréa Pereira da Fonseca. - 2010.
65f. : il.

Orientador: Ana Lúcia Cunha Dornelles.
Dissertação (mestrado)- Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de
Pós-Graduação em Fitotecnia.
Bibliografia: p. 58-65.

1. Morango - Cultivo - Teses. 2.
Morango - Genética - Teses. 3. Morango -
Mudas - Teses. 4. Morango - Qualidade -
Teses I. Dornelles, Ana Lúcia Cunha, 1957-
II. Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro, Curso de Pós-Graduação em
Fitotecnia. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

ANDRÉA PEREIRA DA FONSECA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-graduação em Fitotecnia, área de Concentração em Fisiologia da Produção.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/04/2010

Dra. Ana Lúcia Cunha Dornelles
(Orientadora)

Dra. Márcia Soares Vidal
(EMBRAPA – Agrobiologia – RJ)

Dr. Maurício Ballesteiro Pereira
UFRRJ

Aos Meus Pais,

José Nivaldo da Fonseca e Maria de Jesus Pereira da Fonseca,

Que sempre me incentivaram a buscar meus objetivos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela minha vida e pelas oportunidades que tens me outorgado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela oportunidade e pela confiança;

À Dra. Ana Lúcia Cunha Dornelles pela orientação, incentivo, amizade e, por ter acreditado no meu trabalho e potencial;

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, José Fausto, Leonardo e Murilo, pelas suas preciosas colaborações;

Ao pesquisador Roberto Pedroso de Oliveira da Embrapa Clima Temperado por ter cedido os materiais vegetais utilizados nos experimentos propostos nesta Dissertação;

Ao professor Maurício Ballesteiro Pereira pelas inúmeras conversas, ensinamentos e riquíssimas colaborações nesta Dissertação;

À equipe do Laboratório de Melhoramento Vegetal, Felipe Vitório, Dayane, Érika, Ana Luiza, Paulo, Giovanna, Renata, Leonardo, Guilherme, Raphael e William;

À Mayara, estagiária do Programa de Jovens Talentos – Faperj, que se mostrou muito atenciosa, dedicada e comprometida, colaborando muito neste trabalho;

Ao meu amigo Anderson V. S. Martins, que mesmo sem nenhum conhecimento na área científica, doou seus preciosos dias férias de trabalho para me ajudar na aclimatização das mudas;

À minha mãe que foi também mãe da minha filha durante os dois anos de mestrado. Agradeço pelo seu apoio, estímulo e pela compreensão nos momentos em que estive ausente por estar me dedicando exclusivamente ao trabalho;

Ao João Paulo Aguilar, pelas “dicas”, incentivos, amizade e pelos materiais cedidos que auxiliaram na execução de algumas etapas deste trabalho;

Ao professor Abboud por ter cedido a área na casa de vegetação para a implantação do experimento de campo;

Às minhas amigas e companheiras Elisabete P. Alves e Elisa YumiTogashi pela valiosa ajuda nas avaliações;

À Eliza Viola, estagiária do Laboratório de Genética Vegetal, pela dedicação na execução das avaliações moleculares;

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram na realização desta Dissertação.

BIOGRAFIA

ANDRÉA PEREIRA DA FONSECA, filha de José Nivaldo da Fonseca e Maria de Jesus Pereira da Fonseca, nasceu em 13 de fevereiro de 1978 na Cidade do Rio de Janeiro. Graduiu-se em Engenharia Agrônoma na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no ano de 2007. Durante a graduação foi estagiária do laboratório de Anatomia Vegetal de 2003 a 2005, e posteriormente, bolsista de iniciação científica da Faperj, na área de Cultura de Tecidos Vegetais, de fevereiro a dezembro de 2006. Em março de 2008 ingressou no Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia na UFRRJ, como bolsista da Capes.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Cultura do morangueiro	3
2.2. Micropropagação	4
2.3. Variação Somaclonal	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Multiplicação e enraizamento <i>in vitro</i> de plântulas de morangueiro	12
3.2. Aclimatização das mudas	14
3.3. Avaliação a campo de variação somaclonal com caracteres morfológicos de morango - características quantitativas	17
3.4. Avaliação a campo de variação somaclonal com marcadores morfológicos e agrônômicos de morango - características qualitativas	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1. Multiplicação e enraizamento <i>in vitro</i> de plântulas de morangueiro	22
4.2. Aclimatização das mudas	26
4.3. Avaliação a campo de variação somaclonal com caracteres morfológicos de morango - características quantitativas	28
4.4. Avaliação a campo de variação somaclonal com marcadores morfológicos e agrônômicos de morango - características qualitativas	33
5. CONCLUSÕES	57
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Número de frascos com brotos apresentando sintomas de hiperhidricidade (H) e formação de calo para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real a partir do 6º subcultivo da primeira etapa. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.....	23
Tabela 2. Número de frascos com brotos apresentando sintomas de hiperhidricidade (H) e formação de calo para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real na segunda etapa. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.	24
Tabela 3. Valores médios da altura da parte aérea de plântulas após a fase de aclimatização das cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real submetidas a três e doze subcultivos. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.....	26
Tabela 4. Valores médios do comprimento da raiz de plântulas após a fase aclimatização das cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real submetidas a três e doze subcultivos. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.....	27
Tabela 5. Valores das variâncias dentro das cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real e dos subcultivos três e doze e teste F para as características altura da parte aérea (APA) e comprimento da raiz (CR) das plântulas após a fase de aclimatização. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.....	27
Tabela 6. Valores médios de massa fresca da parte aérea de plantas das cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real em avaliação a campo após serem submetidas a três e doze subcultivos. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.....	28
Tabela 7. Valores médios de massa seca da parte aérea de plantas das cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real em avaliação a campo após serem submetidas a três e doze subcultivos. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.....	28
Tabela 8. Valores médios de massa fresca da raiz de plantas das cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real em avaliação a campo após serem submetidas a três e doze subcultivos. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.....	29
Tabela 9. Valores médios de massa seca da raiz de plantas das cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real em avaliação a campo após serem submetidas a três e doze subcultivos. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.....	29
Tabela 10. Valores médios da altura da parte aérea de plantas das cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real em avaliação a campo após serem submetidas a três e doze subcultivos. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.....	30
Tabela 11. Valores médios do comprimento da raiz de plantas das cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real em avaliação a campo após serem submetidas a três e doze subcultivos. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.	30
Tabela 12. Valores médios do número de estolões das cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real em avaliação a campo após serem submetidas a três e doze subcultivos. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.....	31
Tabela 13. Valores das variâncias dentro das cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real e dos subcultivos três e doze e teste F para as características massa fresca da parte aérea (MFPA); massa seca da parte aérea (MSPA); massa fresca da raiz (MFR); massa seca da raiz (MSR); altura da parte aérea (APA), comprimento da raiz (CR); número de estolões (NE). UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.....	32
Tabela 14. Frequência da característica forma da planta, tipo globosa (G) ou globosa achatada (GA), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos, e o valor correspondente de χ^2	34
Tabela 15. Frequência da característica forma da planta, tipo globosa (G) ou globosa achatada (GA), para as cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real e o valor correspondente de χ^2	35

Tabela 16. Frequência da característica forma da planta, tipo globosa (G) ou globosa achatada (GA), para os subcultivos três e doze e o valor correspondente de χ^2	35
Tabela 17. Frequência da característica forma da planta, tipo globosa (G) ou globosa achatada (GA), dentro dos genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos e os valores correspondentes de χ^2	36
Tabela 18. Frequência da característica densidade da planta, fraca (3), média (5) ou forte (7), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos, e o valor correspondente de χ^2	36
Tabela 19. Frequência da característica densidade da planta, fraca (3), média (5) ou forte (7), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real e o valor correspondente de χ^2	37
Tabela 20. Frequência da característica densidade da planta, fraca (3), média (5) ou forte (7), para os subcultivos três e doze e o valor correspondente de χ^2	37
Tabela 21. Frequência da característica densidade da planta, fraca (3), média (5) ou forte (7), dentro dos genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos e os valores correspondentes de χ^2	38
Tabela 22. Frequência da característica vigor da planta, fraco (3), médio (5) ou forte (7), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos, e o valor correspondente de χ^2	38
Tabela 23. Frequência da característica vigor da planta, fraco (3), médio (5) ou forte (7), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real e o valor correspondente de χ^2	39
Tabela 24. Frequência da característica vigor da planta, fraco (3), médio (5) ou forte (7), para os subcultivos três e doze e o valor correspondente de χ^2	39
Tabela 25. Frequência da característica vigor da planta, fraco (3), médio (5) ou forte (7), dentro dos genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos e os valores correspondentes de χ^2	40
Tabela 26. Frequência da característica cor da página superior da folha, verde-médio (3) e verde-escuro (4), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos, e o valor correspondente de χ^2	40
Tabela 27. Frequência da característica brilho cor da página superior da folha, verde-médio (3) e verde-escuro (4), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real e o valor correspondente de χ^2	41
Tabela 28. Frequência da característica cor da página superior da folha, verde-médio (3) e verde-escuro (4), para os subcultivos três e doze e o valor correspondente de χ^2	41
Tabela 29. Frequência da característica cor da página superior da folha, verde-médio (3) e verde-escuro (4), dentro dos genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos e os valores correspondentes de χ^2	41
Tabela 30. Frequência da característica forma da secção transversal da folha, muito côncava (1) ou ligeiramente côncava (3), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos, e o valor correspondente de χ^2	42
Tabela 31. Frequência da característica forma da secção transversal da folha, muito côncava (1) ou ligeiramente côncava (3), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real e o valor correspondente de χ^2	42
Tabela 32. Frequência da característica forma da secção transversal da folha, muito côncava (1) ou ligeiramente côncava (3), para os subcultivos três e doze e o valor correspondente de χ^2	43

Tabela 33. Frequência da característica forma da secção transversal da folha, muito côncava (1) ou ligeiramente côncava (3), dentro dos genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos e os valores correspondentes de χ^2	43
Tabela 34. Frequência da característica ondulação da folha, nula ou muito fraca (1) e fraca (3), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos e o valor correspondente de χ^2	44
Tabela 35. Frequência da característica ondulação da folha, nula ou muito fraca (1), fraca (3) ou média (5), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real e o valor correspondente de χ^2	44
Tabela 36. Frequência da característica ondulação da folha, nula ou muito fraca (1), fraca (3) ou média (5), para os subcultivos três e doze e o valor correspondente de χ^2	45
Tabela 37. Frequência da característica ondulação da folha, nula ou muito fraca (1), fraca (3) ou média (5), dentro dos genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos e os valores correspondentes de χ^2	45
Tabela 38. Frequência da característica brilho da folha, fraco (3) e médio (5), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos, e o valor correspondente de χ^2	46
Tabela 39. Frequência da característica brilho da folha, fraco (3) e médio (5), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real e o valor correspondente de χ^2	46
Tabela 40. Frequência da característica brilho da folha, fraco (3) e médio (5), para os subcultivos 3 e 12 e o valor correspondente de χ^2	47
Tabela 41. Frequência da característica brilho da folha, fraco (3) e médio (5), dentro dos genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos e os valores correspondentes de χ^2	47
Tabela 42. Frequência da característica relação comprimento/largura do folíolo terminal, tão comprida como larga (2) ou mais comprida do que larga (3), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos, e o valor correspondente de χ^2	48
Tabela 43. Frequência da característica relação comprimento/largura do folíolo terminal, tão comprida como larga (2) ou mais comprida do que larga (3), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real e o valor correspondente de χ^2	48
Tabela 44. Frequência da característica relação comprimento/largura do folíolo terminal, tão comprida como larga (2) ou mais comprida do que larga (3), para os subcultivos três e doze e o valor correspondente de χ^2	49
Tabela 45. Frequência da característica relação comprimento/largura do folíolo terminal, tão comprida como larga (2) ou mais comprida do que larga (3), dentro dos genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos e os valores correspondentes de χ^2	49
Tabela 46. Frequência da característica forma da base do folíolo terminal, tipos acuneada (1) ou obtusa (2), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos, e o valor correspondente de χ^2	50
Tabela 47. Frequência da característica forma da base do folíolo terminal, tipos acuneada (1) ou obtusa (2), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real e o valor correspondente de χ^2	50

Tabela 48. Frequência da característica forma da base do folíolo terminal, tipos acuneada (1) ou obtusa (2), para os subcultivos três e doze e o valor correspondente de χ^2	51
Tabela 49. Frequência da característica forma da base do folíolo terminal, tipos acuneada (1) ou obtusa (2), dentro dos genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos, e os valores correspondentes de χ^2	51
Tabela 50. Frequência da característica pigmentação antociânica da estípula, ausente ou muito fraca (1) ou fraca (3), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos, e o valor correspondente de χ^2	52
Tabela 51. Frequência da característica pigmentação antociânica da estípula, ausente ou muito fraca (1) ou fraca (3), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real e o valor correspondente de χ^2	52
Tabela 52. Frequência da característica pigmentação antociânica da estípula, ausente ou muito fraca (1) ou fraca (3), para os subcultivos três e doze e o valor correspondente de χ^2	53
Tabela 53. Frequência da característica pigmentação antociânica da estípula, ausente ou muito fraca (1) ou fraca (3), dentro dos genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos e os valores correspondentes de χ^2	53
Tabela 54. Frequência da característica pigmentação antociânica dos estolões, média (5) ou forte (7), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos, e o valor correspondente de χ^2	54
Tabela 55. Frequência da característica pigmentação antociânica dos estolões, média (5) ou forte (7), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real e o valor correspondente de χ^2	54
Tabela 56. Frequência da característica pigmentação antociânica dos estolões, média (5) ou forte (7), para os subcultivos três e doze e o valor correspondente de χ^2	55
Tabela 57. Frequência da característica pigmentação antociânica dos estolões, média (5) ou forte (7), dentro dos genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos e os valores correspondentes de χ^2	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Separação dos brotos (a); Inoculação e número de brotos por frasco (b); Frascos vedados com filme plástico PVC (c) e; Frascos na sala de crescimento (d).....	13
Figura 2. Retirada da plântula do frasco (a); Raízes lavadas em água corrente (b); Plântula enraizada <i>in vitro</i> (c); Transplantio em bandeja com substrato comercial (d) e; Bandeja de polipropileno com plântulas enraizadas <i>in vitro</i> (e).....	15
Figura 3. Aclimatização das plântulas enraizadas <i>in vitro</i> em casa de vegetação sob túnel plástico transparente.....	16
Figura 4. Mudanças aclimatizadas após 45 dias. Cultivares Aromas (a), Camarosa (b) e Camino Real (c) submetidas a três ciclos de subcultivos.....	16
Figura 5. Transplantio das mudas aclimatizadas para canteiros em casa de vegetação com irrigação através de mangueiras de gotejamento.....	17
Figura 6. Cobertura do solo (<i>mulching</i>) com plástico de polietileno preto após uma semana do transplantio das mudas.....	18
Figura 7. Brotos da cultivar Camino Real no 9º ciclo de subcultivo apresentando sintomas de hiperhidricidade.....	22
Figura 8. Formação de calo na cultivar Camarosa no 6º ciclo de subcultivo.....	23
Figura 9. Plântulas da cultivar Camarosa submetidas a doze subcultivos apresentando enraizamento em meio MS sem a adição de fitorreguladores.....	25
Figura 10. Planta da cultivar Aromas submetida a três subcultivos apresentando a forma da planta do tipo globosa achatada (a) e; Planta da cultivar Camarosa submetida a doze subcultivos apresentando a forma da planta do tipo globosa (b).....	34

RESUMO

FONSECA, Andréa Pereira. **Estabilidade genética de plantas de diferentes genótipos de morango (*Fragaria x ananassa* Duch) micropropagadas submetidas a diferentes números de subcultivos**. Seropédica: 2010. 65p. (Dissertação, Mestrado em Fitotecnia).

A cultura do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) é uma atividade agrícola de grande importância sócio-econômica. Nos últimos anos, o seu cultivo tem aumentado no Brasil devido à introdução de novas cultivares, sendo a produção de mudas de qualidade um dos fatores que afetam a expansão da produção. A propagação vegetativa de plantas do gênero *Fragaria* além de fornecer um número limitado de propágulos, pode disseminar doenças viróticas e radiculares. A produção de mudas sadias pode ser obtida através da cultura de meristemas. Considerando que cultivares de morangueiro são responsivas a propagação *in vitro*, através desta técnica é possível obter o maior número de plantas, aumentando o número de subcultivos, contudo, este acréscimo pode induzir a ocorrência de variação somaclonal. A fim de ampliar a disponibilidade de mudas sadias de morangueiro e com garantia de identidade genética, este trabalho teve como objetivo analisar, a partir do uso de marcadores morfológicos, o número de subcultivos que permita a multiplicação do morangueiro em larga escala, sem que ocorra a perda da identidade genética dos clones submetidos a este processo. No Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, explantes das cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real, foram submetidos em uma primeira etapa a doze ciclos de subcultivos e, no ano seguinte, os explantes das mesmas cultivares provenientes das mesmas plantas matrizes foram subcultivados por três ciclos. A aclimatização e avaliação das plantas a campo foram realizadas em estufa no Setor de Horticultura do Instituto de Agronomia da UFRRJ. O delineamento experimental foi em blocos casualizados em esquema fatorial 3x2, sendo um fator os três genótipos e o outro, os dois níveis de subcultivos. Durante a fase de multiplicação *in vitro*, nos dois níveis de subcultivos, foi observado um maior número de frascos com brotações com sintoma de hiperhidricidade na cultivar Camino Real e formação de calos na cultivar Camarosa. Após a fase de aclimatização foi observado que plantas submetidas a doze subcultivos apresentaram maior altura média da parte aérea, entretanto, para o comprimento médio da raiz não foi observada diferença significativa entre os dois níveis de subcultivos. Na avaliação a campo das demais características quantitativas, não foram observadas diferenças significativas entre os dois níveis de subcultivos. Com doze subcultivos *in vitro* de plantas de morangueiro, das cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real, é possível obter maior número mudas micropropagadas sem perda da estabilidade genética. A cultivar Camarosa apresentou valores médios superiores para altura da parte aérea após a fase de aclimatização e a campo e, massas fresca e seca da parte aérea, quando submetida a doze ciclos de subcultivos. As cultivares Camarosa e Camino Real apresentaram maior número de características quantitativas com variação entre os dois níveis de subcultivos, sendo as maiores variações observadas em plantas submetidas a três subcultivos. A cultivar Camino Real seguida da 'Camarosa' apresentaram um maior número de características qualitativas com variação na distribuição das frequências entre os dois níveis de subcultivos. A cultivar Aromas apresentou uma maior estabilidade genética em relação às características quantitativas e qualitativas.

Palavras-chave: variação somaclonal, caracteres quantitativos, caracteres qualitativos.

ABSTRACT

FONSECA, Andréa Pereira. **Genetic stability of micropropagated plants of different genotypes of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) subjected to increasing cycles of subcultures**. Seropédica: 2010. 65p. (Dissertation, Master Science in Fitotecnia).

The culture of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) is an agricultural activity of great socio-economic importance. In recent years, its production has increased in Brazil due to the introduction of new cultivars and use of quality plants. The vegetative propagation by stolons, usual in the species of the genus *Fragaria* also provide a limited number of plants and can spread viral diseases. The production of healthy plants can be obtained by meristem culture. Been strawberry cultivars in vitro responsive, with this technique it is possible to obtain a greatest number of plants. However the increase in the number of subcultures may induce somaclonal variation. In order to expand the availability of healthy plants of strawberry with genetic identity guarantee, this study aimed to analyze, with the use of morphological and molecular markers, with precision, the number of subcultures that allows large scale multiplication of strawberry, without loss of genetic identity. Explants of the cultivars Aromas, Camarosa and Camino Real, at the Laboratory of Plant Tissue Culture, in a first step, was submitted to twelve cycles of subculture, and in the following year, explants of the same cultivars, from the same mother plants, were subcultured for three cycles. The acclimatization and evaluation of the plants in the field were conducted in a greenhouse at Horticulture Sector of the Instituto de Agronomia of UFRRJ. The experimental design was randomized blocks in a factorial scheme 3x2, with the three genotypes being a factor and the two subculture levels other factor. In the Laboratory of Molecular Genetics of the Instituto de Biologia of UFRRJ, extraction of DNA was proceeded from leaves of regenerated in vitro plantlets of the three cultivars submitted to three, five and twelve subcultures and of the mother plants that were not produced by tissue culture. During the in vitro multiplication, in two levels of subcultures, we observed a greater tendency of hyperhydricity in Camino Real cultivar and a higher frequency of callus production in 'Camarosa'. After the acclimatization, plants exposed to twelve subcultures showed a higher average height. However, the average root length was not significantly different between the two levels of subcultures. In the field evaluation, for other quantitative traits, there were no significant differences between the two levels of subcultures. Cultivars Camarosa and Camino Real showed the highest number of characteristics with a variation between the two levels of subcultures, with the greatest variations observed in plants subjected to three subcultures. Analysing the field qualitative characteristics, the variation observed between the third and 12th subcultures, was present only the frequency distribution of leaf brightness, length and width of terminal leaflet.

Key-words: somaclonal variation, quantitative characters, qualitative characters.

1. INTRODUÇÃO

A produção mundial de morango foi de cerca de 4,1 milhões de toneladas no ano de 2008, sendo os Estados Unidos, Espanha, Turquia e México os maiores produtores. Nesta classificação, o Brasil ocupa a 53ª posição (FAO, 2010). Segundo dados do IBGE, no ano de 2006 a produção no Brasil foi de cerca de 70 mil toneladas. A produção na Região Sudeste esteve em torno de 50 mil toneladas, sendo os estados de Minas Gerais e São Paulo os maiores produtores. No estado do Rio de Janeiro, o município de Nova Friburgo destaca-se com uma produção de 57 toneladas (IBGE, 2010).

A Região Serrana do Estado do Rio de Janeiro possui características climáticas bastante favoráveis ao cultivo do morango. Uma das poucas cidades produtoras é Nova Friburgo, onde alguns produtores iniciaram no ano de 2007 o cultivo da ‘Camino Real’, uma cultivar muito utilizada na Região Sul do Brasil, em substituição a cultivar Dover tradicionalmente cultivada, porém muito frágil (NUNES, 2007).

A introdução de novas mudas no mercado nacional, incentiva os agricultores a investirem na cultura dessa fruta. As principais cultivares de morangueiro utilizadas no Brasil são provenientes dos Estados Unidos, destacando-se a ‘Aromas’, ‘Camarosa’, ‘Dover’, ‘Oso Grande’ e ‘Sweet Charlie’, da Espanha como a ‘Milsei-Tudla’, dos programas de melhoramento genético da Embrapa Clima Temperado, a ‘Bürkley’, ‘Santa Clara’ e ‘Vila Nova’ e do Instituto Agronômico de Campinas, a ‘Campinas’ (BRAHMET *et al.*, 2005).

O Brasil possui uma grande diversidade de clima e solo e um imenso potencial de cultivo de espécies com diferentes exigências e origens (PAGOT & HOFFMANN, 2003). Nos últimos anos produção de morangos em diferentes estados vem aumentando devido à adaptabilidade das diferentes cultivares utilizadas em clima subtropical e temperado (SPECHT & BLUME, 2009). O morango é uma fruta atraente muito apreciada pelos consumidores por possuir um sabor agradável. De acordo com MADAIL *et al.* (2007), a produção nacional é quase toda voltada para o mercado interno, sendo cerca de 70% destinada ao consumo *in natura* e 30% ao processamento, aumentando seu consumo e sua importância sócio-econômica. A cultura do morango representa um segmento da produção agrícola de extrema importância para a economia. Além de gerar muitos empregos diretos e indiretos, a cultura é típica da agricultura familiar, sendo cultivado em reduzidas extensões (CENCI, 2008). Segundo RESENDE *et al.* (1999), a cultura tem um caráter social, em função da grande necessidade de mão-de-obra nas suas operações, sendo conduzida, prioritariamente, em pequenas propriedades familiares, além de a produção poder ser destinada ao mercado de frutas frescas bem como à industrialização. Entretanto, a expansão da produção tem sido limitada por diversos fatores na sua produção, comercialização, industrialização e principalmente na produção de mudas de qualidade, sendo um dos fatores limitantes a alta suscetibilidade a doenças, que podem ser provocadas por fungos, vírus, bactérias, viróides e fitoplasmas (DIAS *et al.*, 2007). Produzir e utilizar mudas sadias é o fator mais importante para a produção de frutas de alta qualidade, sendo então o ponto de partida para a obtenção de uma melhor resposta às tecnologias empregadas no processo produtivo (OLIVEIRA & SCIVITTARO, 2006).

Para a obtenção de mudas de qualidade e, dessa forma, contribuir para o incremento significativo da produtividade deve ser feita a eliminação de viroses do material vegetativo. A limpeza das mudas pode ser processada com a cultura de meristemas (GOMIDE, 2004).

A principal vantagem de matrizes propagadas *in vitro* é a maior produção de mudas através de subcultivos para meio de cultura fresco em intervalos de quatro a seis semanas, contudo problemas ligados à variabilidade têm sido observados em culturas comerciais como em cultivares de bananas, morango, espécies ornamentais, entre outras. Essas variações podem causar problemas na uniformidade e no rendimento da cultura afetando a aplicação prática da técnica na propagação de plantas.

Com a finalidade de ampliar a disponibilidade de mudas sadias de morangueiro e com garantia de identidade genética, verificou-se a necessidade de aperfeiçoar a metodologia em micropropagação, no sentido de otimizar o processo de multiplicação eficiente para genótipos de morango.

Com base nisso, formulam-se as seguintes hipóteses científicas: através da propagação *in vitro* é possível se obter o maior número possível de plantas, por meio de um maior número de subcultivos sucessivos; o acréscimo no número de subcultivos pode induzir a um aumento no número de mutações, alterações cromossômicas e epigenéticas, que em conjunto configuram a variação somaclonal e, que é dependente de vários fatores, entre eles a espécie e o genótipo dos clones utilizados.

Este trabalho teve como objetivo geral analisar, a partir do uso de marcadores morfológicos, o número de subcultivos que permita a multiplicação do morangueiro em larga escala, sem que ocorra a perda da identidade genética dos clones submetidos a este processo.

Os objetivos específicos foram: verificar o efeito de genótipo em relação ao número de subcultivos e verificar se existe diferenças entre as cultivares quanto à taxa de variação em relação ao número de subcultivos possíveis que possam manter a identidade genética.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cultura do morangueiro

O morangueiro atualmente cultivado em diferentes regiões do mundo, pertence à família *Rosaceae*, subfamília *Rosoideae* e à tribo *Potentilleae*. O gênero *Fragaria* L. compreende 19 ou mais espécies silvestres, possui quatro grupos classificados quanto ao seu nível de ploidia: diplóide, tetraplóide, hexaplóide e octoplóide. Estima-se que as espécies cultivadas de *Fragaria x ananassa* (Duch.) tenham se originado na França no século XVIII a partir de um provável cruzamento envolvendo duas espécies nativas da América, a norte-americana ou morango silvestre, *Fragaria virginiana* (L.) Duch., com morangueiro originário do Chile, *Fragaria chiloensis* Duch. (GRAHAM, 2005).

É uma planta herbácea perene, porém cultivada como anual, que forma uma espessa roseta, podendo ser rasteira ou atingir de 15 a 30 cm de altura. Possui caule curto, denominado coroa. É uma planta típica de climas frios, sendo as altas temperaturas o principal fator limitante da cultura. É sensível à variação fotoperiódica. Plantas de dias curtos têm o desenvolvimento vegetativo favorecido, estímulo da emissão de estolões e inibição do florescimento durante o verão (FILGUEIRA, 2007). Quando as condições climáticas são adequadas, a planta emite estolões, que são caules finos e prostrados, com entrenós longos, que facilmente enraízam dando origem a plantas autônomas (MIRANDA & FERNANDES, 2001). As folhas são do tipo compostas, que podem ser constituídas de três, quatro ou cinco folíolos (SILVA *et al.*, 2007), onde cada folíolo possui pecíolo que se une a um pecíolo principal mais ou menos longo inserido na coroa (VIDAL *et al.*, 2007). O sistema radicular é fasciculado, constituído por numerosas raízes superficiais. Possui flores com um número variável agrupadas em inflorescências do tipo cimeira, que podem ser brancas ou róseas. Nas atuais cultivares de morangueiro as flores são hermafroditas. Os pequenos pontos pretos e duros, conhecidos popularmente como sementes, são na verdade os frutos do morangueiro, denominados aquênios. Após a fecundação dos óvulos, ocorre o engrossamento do receptáculo da flor resultando na porção carnosa comestível (pseudofruto), devido à presença de auxinas produzida pelos embriões contidos em cada aquênio (SILVA *et al.*, 2007).

Entre as muitas cultivares de morangueiro, algumas se destacam no cultivo para atender a preferência do mercado consumidor, tanto para o consumo *in natura*, como para mesa e para industrialização. As cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real apresentam bom potencial produtivo comprovado em estudos anteriores e possuem adaptação às condições climáticas do Rio Grande do Sul (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

A cultivar Camino Real se destaca principalmente por gerar frutos mais resistentes a pragas e ter vida útil maior do que a maioria das variedades brasileiras, consideradas mais frágeis. A ‘Camarosa’ é uma cultivar de dias curtos, caracterizada por ser uma planta vigorosa, com folhas grandes de coloração verde-escura. Possui frutos grandes de epiderme vermelha, firme e de bom sabor doce e um pouco ácido, coloração interna vermelho intenso. O ciclo de produção é precoce, com alta capacidade de produção. Resistente ao transporte. A ‘Aromas’ é uma cultivar de dias neutros, precoce e muito produtiva, apresentando plantas com vigor médio. Possui frutos grandes, com coloração vermelho brilhante e bom sabor. É indicada para o cultivo de verão (plantio a partir de setembro), com excelente qualidade para consumo *in natura* e também para industrialização. Todas essas cultivares são originárias da Universidade da Califórnia, nos Estados Unidos.

2.2. 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 inoculação 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, através de vários subcultivos para meio de cultura fresco em intervalos de quatro a seis semanas (GRAHAM, 2005). Segundo Guerra e Nodari (2006), neste estágio deve-se determinar o número e intervalo de subcultivos, bem como determinar e otimizar a taxa de multiplicação. Grattapaglia e Machado (1998) afirmam que, 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. 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 através de sementes e estolões, a utilização de sementes como material propagativo não é adotada comercialmente, pois as mudas demoram mais tempo a frutificar do que as plantas propagadas através de 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 junto à viveiristas idôneos (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, através 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), atualmente 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 podem variar (GASPAR *et al.*, 2002 citado por SOUZA *et al.*, 2006b). 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). Segundo Jain (2001), o genótipo é um fator importante que determina o tipo e a frequência de variação genética em plantas micropropagadas. Além disso, o número de subcultivos e a idade da planta matriz são outros aspectos importantes que podem levar à ocorrência de variações entre plantas regeneradas.

Em relação ao tipo de explante utilizado, de acordo com Grattapaglia e Machado (1998), os explantes 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. Em sistemas como de cultura de protoplastos, a regeneração é alcançada através da formação de meristemas adventícios após uma fase de calo desordenado ou de crescimento de células em suspensão. Estes sistemas estão sujeitos à instabilidade, sugerindo que a organização celular é uma característica essencial e que a variação somaclonal está relacionada ao crescimento desorganizado. 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 através da alta concentração de reguladores de plantas, 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 & 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 mg.l⁻¹ para 0,5 ou 0,25 mg.l⁻¹. Dessa forma, um estoque de material de alta qualidade estará bem adaptado ao novo sistema de cultivo intensivo.

2.3. Variação Somaclonal

À cultura de tecidos estão associados alguns problemas como ausência ou perda do potencial organogênico, hiperhidricidade e variação somaclonal, que afetam a qualidade das plantas regeneradas. Estes problemas podem ser de ordem fisiológica, genética e epigenética (modificações químicas do DNA ou das proteínas que estão associadas a ele, as quais são transmitidas na divisão celular, mas que não constituem parte da sequência do DNA) (CASSELLS & CURRY, 2001).

Em plantas regeneradas por meio de cultura de tecidos, ocasionalmente podem surgir indivíduos que se distinguem da planta original em uma ou mais características e essas alterações podem ser estáveis e transmissíveis aos descendentes. A frequência de mutantes não pode ser prevista e, aparentemente, diversos fatores podem afetar a natureza e a frequência da variação somaclonal, entre eles, o genótipo doador do explante e as condições de cultivo (ILLG, 1990). A variação somaclonal pode ser fortemente expressa após a fase de estabelecimento da população de microplantas como variação interplantas em caracteres morfológicos. Algumas plantas podem apresentar características de quimeras setoriais (CASSELLS & CURRY, 2001).

Variação somaclonal parece ser um resultado de vários fatores, mas em geral, acredita-se que seja uma expressão de variação pré-existente, quer no tecido do explante ou induzida durante o processo de cultura de células *in vitro* e regeneração de plantas (EVANS & BRAVO, 1986; KARP, 1989). Outro fator que pode levar à ocorrência de variação somaclonal é o método de propagação *in vitro* utilizado. O processo de regeneração de plantas a partir de calos e protoplastos é frequentemente associado com mais variação somaclonal do que outros métodos de regeneração. Vários trabalhos sobre a ocorrência de variação somaclonal em plantas derivadas de cultura de tecidos têm sido descritos para muitas espécies. A maioria desses trabalhos relata que a variação em plantas regenerantes é devida ao tipo de explante utilizado como ocorre na cultura de tecidos a partir de calos. Entretanto, Harding (1996) relata que ainda existem preocupações sobre a estabilidade genética na cultura de brotos apicais durante prolongados períodos de tempo.

Nehra *et al.* (1994) estudaram o efeito dos métodos de propagação *in vitro* em duas cultivares de morango. Estes autores verificaram que anormalidades fenotípicas foram limitadas principalmente à ocorrência de variantes com folhas amarelas em plantas propagadas por cultura de meristema e por cultura de calos e a um aparecimento ocasional de plantas com florescimento e hábito de crescimento irregular entre plantas propagadas por cultura de calos.

Existem também indicações de que variação somaclonal é influenciada pelo nível de ploidia, regulador de crescimento vegetal, composição do meio de cultura e a duração do tempo em cultura (GOULD, 1986; VARGA *et al.*, 1988; KARP, 1989).

Miñano *et al.* (2009) avaliaram a estabilidade genética de plantas de crisântemo micropropagadas através do uso de marcadores moleculares RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA” – DNA polimórfico amplificado ao acaso), em diferentes aspectos da cultura como, a fonte de explante, composição do meio de cultura e tempo de subcultivo. Neste estudo, somente a cultivar Refocus mostrou um padrão de banda claramente diferente após o sétimo subcultivo, no entanto, nenhuma variação morfológica foi detectada em qualquer cultivar durante o período de multiplicação *in vitro* e as plantas aclimatizadas não apresentaram nenhum tipo de variação nas inflorescências produzidas.

Reguladores de crescimento vegetal afetam indiretamente a taxa de variação somaclonal pelo aumento na taxa de multiplicação e pela indução de brotos adventícios (DAMASCO *et al.*, 1998). Segundo Pierik (1987), se a formação de brotos adventícios ocorre devido ao uso de reguladores de crescimento a chance de ocorrer mutação aumenta. Ciclos sucessivos de multiplicação promovem a multiplicação adicional de variantes produzidos em ciclos anteriores. Bairu *et al.* (2006) estudaram o efeito do tipo e concentração de reguladores vegetais e ciclos de subcultivos em banana Cavendish. Estes autores verificaram que a variação tornou-se inicialmente visível no quarto ciclo de multiplicação e a taxa de variantes somaclonais aumentou com dez ciclos de subcultivos, o qual está além do número de ciclos utilizados em multiplicação comercial que é de cinco a seis subcultivos.

A variação somaclonal detectada pela primeira vez por Larkin e Scowcroft em 1981, é um termo que descreve as variações observadas entre os tecidos cultivados *in vitro*, como o aparecimento de plantas anormais, as quais não correspondem geneticamente à planta matriz (SOUZA *et al.*, 2006b). Sob o ponto de vista de propagação clonal *in vitro*, transformação genética e/ou preservação de germoplasma, a variação somaclonal não é desejável, sendo importante conhecer a frequência, a distribuição genômica, os mecanismos e os fatores que influenciam esse fenômeno, representando um desafio a ser considerado sob o ponto de vista teórico e prático (POLANCO & RUIZ, 2002).

A ocorrência de variação somaclonal está associada com mutações de ponto, recombinação e rearranjos cromossômicos, metilação do DNA, número de cópias de sequência alterada, elementos transponíveis (transposons) e parece ser influenciada pelo genótipo, tipo de explante, meio de cultura, idade da planta doadora (JAIN *et al.*, 1997; VEILLEUX & JOHNSON, 1998; JAIN *et al.*, 1998).

No trabalho de Sheidai *et al.* (2008), foram estudados variantes somaclonais de banana cv. Valery obtidos de cultura de tecidos utilizando como ferramenta marcadores RAPD e, foi observado que variações no número total de bandas RAPD bem como o número de bandas específicas entre plantas mãe e plantas regeneradas de diferentes subcultivos, revelaram diferenças genéticas dos genótipos devido à cultura de tecidos e variação somaclonal induzida. Segundo estes mesmos autores, os resultados deste estudo mostraram que a ocorrência de variação somaclonal identificada foi devida a diferentes subcultivos e que com o aumento do período de subcultivos, possivelmente maiores variações genéticas podem ocorrer. Além disso, o uso de marcador molecular RAPD pode ser uma ferramenta utilizada para a identificação genética de genótipos ou somaclones um dos outros, por ter revelado variação somaclonal em banana e a ocorrência de bandas específicas/loci nas plantas mãe bem como nas plantas regeneradas em diferentes subcultivos.

Segundo Tyrka *et al.* (2002), plantas de morango têm sido extensamente analisadas usando marcadores RAPD para identificação de clones, mapeamento e estudos de diversidade. No entanto, este método tem baixa reprodutibilidade

especialmente entre laboratórios. Outro sistema de marcador multilocus altamente reprodutível, o AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism” – polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados), tem várias vantagens sobre outros métodos e, tem sido extensivamente utilizado para uma vasta gama de espécies, incluindo morango (DEGANI *et al.*, 2001). Segundo estes mesmos autores, os vários níveis de similaridade detectados dependem do sistema de marcador aplicado e que estes valores são maiores para marcadores AFLP quando comparados a marcadores RAPD.

A escolha da técnica para obtenção de marcadores moleculares depende da questão a ser respondida, da resposta genética necessária, além das implicações financeiras e disponibilidade técnicas. Dentre os diversos marcadores utilizados, os marcadores de AFLP têm se mostrado bastante úteis na identificação de diferenças entre indivíduos e populações. A técnica de AFLP, descrita pela primeira vez por Vos *et al.* (1995), possibilitou a identificação de um grande número de polimorfismos do que análises com RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism” – polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição) ou RAPD e, é relativamente fácil de executar, é altamente reproduzível e utiliza poucas quantidades de DNA. Esta técnica está baseada na amplificação seletiva por PCR (“Polymerase Chain Reaction” – reações em cadeia de polimerase) de fragmentos de restrição obtidos da digestão total do DNA genômico, envolvendo três passos principais: digestão do DNA genômico total com enzimas de restrição, uma de corte raro (geralmente *EcoRI*) e outra de corte frequente (*MseI*), e ligação de adaptadores com sequência conhecida nas duas extremidades de cada fragmento; amplificação seletiva (em duas fases) de fragmentos de restrição com o uso de “primers” aleatórios que possuem em sua sequência um a três nucleotídeos que flanqueiam os adaptadores previamente ligados aos sítios de restrição; e a análise dos fragmentos amplificados em gel de poliacrilamida desnaturante que proporciona alto nível de resolução.

Os marcadores produzidos por AFLP apesar de serem dominantes, fator considerado sua grande desvantagem a marcadores como RFLP e microssatélites, oferecem seis vantagens, que em uma série de situações conseguem inclusive contornar esta desvantagem: i) podem ser aplicados em qualquer organismo que possua DNA; ii) por serem realizados em condições de alta seletividade apresentam uma alta taxa de repetibilidade; iii) podem ser realizados com quantidades muito pequenas de DNA (esporos de fungos micorrízicos por exemplo); iv) podem ser realizados com grande velocidade pois não necessitam a construção de iniciadores específicos, e apresentam uma alta taxa de polimorfismo; v) possuem herança mendeliana o que permite sua utilização em análises populacionais e de QTLs; e vi) por serem visualizados por géis de poliacrilamida que permitem alta resolução, detectam diferenças muito pequenas (poucos nucleotídeos) (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995; VOS *et al.*, 1995; MUELLER & WOLFENBARGER, 1999; GAUDEUL *et al.*, 2000; TERO *et al.*, 2003). KRAUSS (2000) demonstrou que resultados estatisticamente desviados em função do uso de marcadores dominantes, como o AFLP, são em grande parte corrigidos pelo uso de marcadores altamente polimórficos, além de uma amostra com um número grande de indivíduos por população (± 30).

Ferreira e Grattapaglia (1995) relataram que a tecnologia AFLP tem um grande poder de detecção de variabilidade genética, explorando simultaneamente o polimorfismo de presença e ausência de sítios de restrição e a ocorrência ou não de amplificação a partir de sequências arbitrárias. Com isso, consegue-se uma flexibilidade significativa na obtenção de marcadores polimórficos. Por ser a variação somaclonal um fenômeno que pode ocorrer a níveis de pares de bases (mutações de ponto), para sua

identificação é necessário o uso de marcadores moleculares bastante sensíveis como o AFLP.

Diversos estudos utilizando como marcador molecular o AFLP para verificação de instabilidade genética produzida através de regeneração de plantas *in vitro* têm sido realizados para várias espécies vegetais tais como: *Arabidopsis thaliana* (POLANCO & RUIZ, 2002), *Humulus lupulus* L. (PEREDO *et al.*, 2006) e *Actinidia deliciosa* (PRADO *et al.*, 2007).

Segundo Arruda *et al.* (2006), a maioria dos trabalhos aborda a variação encontrada nas plantas regeneradas de cultura de tecidos. Essa verificação pode ser constatada por meio do uso de marcadores morfológicos e moleculares. A decisão de qual método utilizar depende dos recursos disponíveis e do grau de confiabilidade do método (CONTI *et al.*, 2002b), no entanto, estudos mais detalhados sobre a natureza genética das características variantes são necessários. A detecção de tipos-fora entre plantas micropropagadas por meio de identificação fenotípica é trabalhosa e demorada e, é mais difícil em culturas perenes, onde muitas observações devem ser feitas até a maturidade. Além disso, todas as mudanças genéticas poderão não ser refletidas nas mudanças fenotípicas observadas. Williams e Collins (1976), observaram pouca ou nenhuma variação fenotípica entre plantas de aipo regeneradas, e concluíram que aipo foi altamente estável em cultura de tecidos. Entretanto, resultados subsequentes de Browsers e Orton (1982) e Orton (1985) mostraram sutil variação nas plantas regeneradas. Apesar dessas anomalias, marcadores morfológicos têm sido amplamente usados na identificação de variantes somaclonais (RANI & RAINA, 2000).

Ferreira & Grattapaglia (1995) comentam que até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudos de genética eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral, fenotípicos de fácil identificação visual, como a morfologia foliar. Além disso, os marcadores morfológicos são específicos para um determinado tecido, o que impede a sua determinação quando há apenas alguma parte vegetativa da planta disponível.

As cultivares de *Fragaria x ananassa* podem ser caracterizadas com base nas diferenças morfológicas da folha, da planta ou do fruto (CONTI *et al.*, 2002b). Essa caracterização fornece subsídios para trabalhos de estimativa de similaridade genética e identificação botânica (CONTI *et al.*, 2002a). No Brasil, atualmente, o registro institucional de cultivares de morangueiro baseia-se no trabalho de Passos *et al.* (1994), onde são descritas as características morfológicas que devem ser consideradas na caracterização de cultivares.

Deve-se ter um conhecimento prévio das condições de cultivo *in vitro* que irão variar de acordo com a espécie estudada. Em plantas do gênero *Fragaria*, com o aumento do número de subcultivos, podem ocorrer variações nas características fenotípicas como altura e vigor das plantas, tamanho e formato de frutos (RANCILLAC *et al.*, 1987; DEBERGH & READ, 1991).

Nehra *et al.* (1992) verificaram variações fenotípicas entre os regenerantes de morangueiro obtidos a partir de cultura de calos em diferentes concentrações de reguladores de crescimento vegetal e em diferentes durações de tempo de cultivo dos calos.

Em mudas micropropagadas de bananeira cv. Pacovan foram observadas variações nas características morfológicas das plantas em decorrência da variação somaclonal com o aumento do número de subcultivos (SANTOS & RODRIGUES, 2004).

Segundo Brunello (2002), cor de tubérculo, produção de frutos, alterações na altura da planta, dimensão do broto, número de ramos primários, cor de flores e

resistência à patógenos são características morfológicas de interesse que são afetadas pelas variações fenotípicas e têm sido pouco estudadas em plantas regenerantes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de plântulas de morangueiro

Esta fase do trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Fitotecnia do Instituto de Agronomia da UFRRJ e, foi dividida em duas etapas. Na primeira etapa, foram realizados 12 subcultivos e, na segunda, três subcultivos, com intervalos médios de 30 dias. Mensalmente foram realizadas avaliações do comportamento morfogênico de cada genótipo. Foram utilizados três genótipos de morango, as cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real, provenientes da Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS. Na primeira etapa, as cultivares foram recebidas apresentando três ciclos de subcultivos e, na segunda etapa, a cultivar Aromas encontrava-se no primeiro subcultivo e as cultivares Camarosa e Camino Real encontravam-se na fase de estabelecimento *in vitro* (sem subcultivos). Imediatamente após a chegada do material, as brotações foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio de cultura fresco para multiplicação, onde permaneceram por um período de 15 dias, sendo realizados posteriormente os subcultivos subsequentes.

Para a realização dos processos de multiplicação e enraizamento das plântulas foi adotado o mesmo protocolo para a produção de matrizes de morangueiro por meio de cultura de tecidos utilizado pela Embrapa Clima Temperado (OLIVEIRA *et al.*, 2005). O meio de cultura utilizado na fase de multiplicação foi o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), com concentração salina integral, na consistência sólida, com 7,0 g.l⁻¹ de ágar, 30 g.l⁻¹ de sacarose, acrescido de 0,5 mg.l⁻¹ de ácido nicotínico, 0,5 mg.l⁻¹ de cloridrato de piridoxina, 0,5 mg.l⁻¹ de cloridrato de tiamina, 2,0 mg.l⁻¹ de glicina e 100 mg.l⁻¹ de mio-inositol, e suplementado com 1 mg.l⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina). O pH foi ajustado para 5,8 antes do processo de autoclavagem a 121 °C durante 20 minutos.

Na capela de fluxo laminar, com auxílio de pinça e bisturi, foram retiradas as brotações do tubo de ensaio e, posteriormente, efetuou-se a separação dos brotos. Em cada frasco contendo 40 ml de meio MS para multiplicação, foram inoculados cinco explantes (brotos) com três a quatro folhas. Os frascos foram fechados com tampa e vedados com filme plástico PVC. Em seguida, levados à sala de crescimento com temperatura de 25±3°C e regime de fotoperíodo de 16 horas, com lâmpadas fluorescentes com luminosidade em torno de 45 µmol.m⁻².s⁻¹(Figura 1).



Figura 1. Separação dos brotos (a); Inoculação e número de brotos por frasco (b); Frascos vedados com filme plástico PVC (c) e; Frascos na sala de crescimento (d).

Para a realização das repicagens subsequentes, de cada um dos três genótipos foram tomados cinco frascos ao acaso. De cada frasco foram extraídos 10 brotos que, em seguida, foram inoculados em meio fresco para multiplicação, formando dois frascos seguintes com cinco brotos cada. Dessa forma, foram obtidos 30 frascos para cada dia de repicagem. Este procedimento foi repetido em quatro dias (considerado quatro blocos), totalizando 120 frascos em cada mês de subcultivo, formando um estande de 600 brotos.

O meio de cultura utilizado para o enraizamento das plântulas foi o MS, conforme descrito anteriormente, excluindo o regulador de crescimento. O pH foi ajustado para 5,8 antes do processo de autoclavagem a 121 °C durante 20 minutos.

Nesta fase, da mesma forma que nos subcultivos, dos três genótipos foram tomados cinco frascos ao acaso. De cada frasco foram extraídos 15 brotos com três a quatro folhas que, em seguida, foram inoculados cinco brotos em frascos contendo 40 ml de meio MS. Para cada cultivar, da primeira e segunda etapas, este procedimento foi repetido em quatro dias (considerado quatro blocos), totalizando 360 frascos, formando um estande de 1800 mudas. Os frascos foram fechados com tampa e vedados com filme plástico PVC. Em seguida, levados à sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ e regime de fotoperíodo de 16 horas, com lâmpadas fluorescentes com luminosidade em torno de $45 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, onde permaneceram por um período de 45 dias.

3.2. Aclimatização das mudas

As plântulas enraizadas *in vitro* foram retiradas do frasco e as raízes foram lavadas em água corrente para retirada do excesso de meio de cultura e, posteriormente foi feito o transplantio para bandejas de polipropileno de 165 células com substrato comercial Plantmax® na seguinte composição: composto orgânico, turfa, casca de Pinus compostada e vermiculita expandida (Figura 2). A aclimatização das mudas foi realizada em casa de vegetação sob túnel plástico transparente (Figura 3). O sistema de irrigação utilizado foi o de nebulização intermitente em forma de névoa durante 20 segundos em intervalos de 16 minutos, acionado por um timer automático. A nutrição das mudas foi feita semanalmente através de solução diluída em oito vezes a concentração integral de sais do meio de cultura MS com auxílio de um pissete.

Após 45 dias de aclimatização, com auxílio de régua milimetrada, foram feitas determinações da altura da parte aérea e do comprimento da raiz das mudas a serem utilizadas neste trabalho (Figura 4).



Figura 2. Retirada da plântula do frasco (a); Raízes lavadas em água corrente (b); Plântula enraizada *in vitro* (c); Transplântio em bandeja com substrato comercial Plantmax[®] (d) e; Bandeja de polipropileno com plântulas enraizadas *in vitro* (e).



Figura 3. Aclimatização das plântulas enraizadas *in vitro* em casa de vegetação sob túnel plástico transparente.



Figura 4. Mudas aclimatizadas após 45 dias. Cultivares Aromas (a), Camarosa (b) e Camino Real (c) submetidas a três ciclos de subcultivos.

3.3. Avaliação a campo de variação somaclonal com caracteres morfológicos de morango – características quantitativas

O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Setor de Horticultura do Departamento de Fitotecnia do Instituto de Agronomia da UFRRJ.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados em esquema fatorial 3x2, sendo um dos fatores, as cultivares (Aromas, Camarosa e Camino Real) e o outro, o número de subcultivos (três e doze) com quatro repetições e 16 plantas por parcela.

Uma semana antes do plantio os canteiros foram preparados com 1,20 m de largura e 9,00 m de comprimento, e foi aplicada uma mistura de vermicomposto e esterco bovino na proporção 1:2. Cada parcela de 1,20 x 1,50 m recebeu aproximadamente 15 kg da mistura, perfazendo um total de 83,33 toneladas por hectare. Após 45 dias de aclimatização, as mudas foram transplantadas para os canteiros onde foi utilizado espaçamento de 30 x 30 cm. A irrigação foi realizada através de mangueiras de gotejamento (Figura 5). Uma semana após o plantio foi feita a cobertura do solo (*mulching*) com plástico de polietileno preto (Figura 6). Em função da temperatura na ocasião do plantio, foi colocado telado com 50% de sombreamento a 1,50 m de altura.



Figura 5. Transplântio das mudas aclimatizadas para canteiros em casa de vegetação com irrigação através de mangueiras de gotejamento.



Figura 6. Cobertura do solo (*mulching*) com plástico de polietileno preto após uma semana do transplantio das mudas.

Para a análise morfológica foram feitas avaliações das características quantitativas como: medidas da altura da planta e do comprimento da raiz (cm), determinação das massas fresca e seca da parte aérea e da raiz (gramas) e, contagem do número de estolões.

Após a coleta das plantas, as raízes foram lavadas em água corrente para remover o excesso de terra e, em seguida, retirou-se o excesso de água com papel toalha. Logo após, foi feita a separação da parte aérea da raiz com auxílio de tesoura de poda e, procedeu-se a determinação a massa fresca da parte aérea e da raiz em balança analítica digital com três casas decimais. A altura da parte aérea e comprimento da raiz foram determinados com auxílio de régua milimetrada. A massa seca da parte aérea e raiz foi determinada após secagem do material, em estufa durante 48 horas a 60°C, em balança analítica digital com três casas decimais.

3.4. Avaliação a campo de variação somaclonal com marcadores morfológicos e agrônômicos de morango – características qualitativas

A avaliação das características qualitativas foi realizada de acordo com as instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade aplicada às cultivares de morangueiro do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2003). As avaliações foram efetuadas com base na observação visual das plantas e, para as avaliações das características foliares, utilizou-se a folha madura mais expandida. Para cada característica morfológica identificada foi registrado um código referente a esta. As características morfológicas e as suas respectivas variações dos tipos são descritas a seguir:

- Planta - Quanto à:

1. Forma. Para avaliação desta característica foi feita a observação visual e a comparação com a figura indicada pela tabela de descritores, sendo as plantas classificadas com as formas (1) globosa ou (2) globosa achatada.



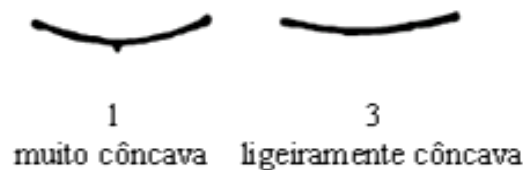
2. Densidade. Para avaliação desta característica as plantas foram caracterizadas de acordo com a densidade das folhas, sendo classificadas como fraca (3), média (5) ou forte (7) as plantas com folhagem muito densa.

3. Vigor. Para avaliação desta característica foi considerada a altura e a densidade das plantas, sendo considerado fraco (3) plantas com altura e densidade baixas, médio (5) plantas com altura e densidade intermediárias, ou forte (7) plantas com maior altura e densidade forte.

- Folha - Quanto à:

1. Cor da página superior. Para avaliação desta característica foi utilizada uma escala de cores para a comparação com a folha de cada planta avaliada. As cores variaram entre verde-médio (3) e verde-escuro (4).

2. Forma da secção transversal. Para avaliação desta característica foi feita a observação visual e a comparação com a figura indicada pela tabela de descritores, sendo a secção transversal das folhas classificadas com as formas, muito côncava (1) e ligeiramente côncava (3).



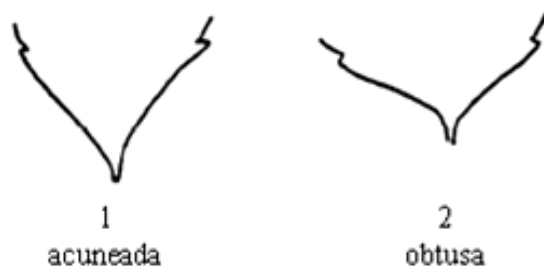
3. Ondulação. Para avaliação desta característica foi considerada a aparência visual da sinuosidade da lâmina foliar, sendo classificadas como nula ou muito fraca (1) a superfície da lâmina foliar lisa ou com muito pouca sinuosidade, fraca (3) com pouca sinuosidade ou média (5) a superfície da lâmina foliar com irregularidade média.

4. Brilho. A avaliação desta característica foi feita pela observação visual da intensidade do brilho da lâmina foliar, sendo classificadas como fraco (3) as folhas foscas, médio (5) as folhas com intensidade de brilho intermediária ou forte (7) as folhas que refletiam a luz com muita intensidade.

- Folíolo terminal - Quanto à:

1. Relação comprimento/largura. A avaliação desta característica foi realizada com auxílio de uma régua milimetrada, onde foram feitas medidas da largura e do comprimento e o folíolo terminal foi classificado como: (1) folíolo terminal mais largo que comprido, (2) folíolo terminal tão comprido como largo ou (3) folíolo terminal mais comprido do que largo.

2. Forma da base. Para avaliação desta característica foi feita a observação visual e a comparação com a figura indicada na tabela de descritores, sendo a forma da base do folíolo terminal classificados com as formas (1) acuneada ou (2) obtusa.



- Estípula - Quanto à pigmentação antocianica.

Para avaliação desta característica foi considerada uma escala de cores para a comparação com as estípulas de cada planta avaliada. Foram consideradas como: ausente ou muito fraca (1) as estípulas que apresentavam muito pouca ou nenhuma pigmentação ou fraca (3), as estípulas que apresentavam uma coloração vermelha fraca.

- Estolões - Quanto à pigmentação antociânica.

Para avaliação desta característica foi considerada uma escala de cores para a comparação com a estípula dos estolões de cada planta avaliada. Foram consideradas como: ausente ou muito fraca (1) para os estolões que apresentavam muito pouca ou nenhuma pigmentação e fraca (3) para coloração vermelha fraca.

Para a análise dos caracteres quantitativos como, massas fresca e seca da parte aérea e da raiz, altura da planta e comprimento da raiz após a fase de aclimatização e a campo e, número de estolões, foi feita análise de variância em cada combinação genótipo e subcultivo, considerando como efeito apenas o bloco, com o objetivo de determinar a variância média dentro dos blocos para cada combinação. Para cada genótipo, as variâncias dos subcultivos três e doze foram comparadas pelo teste F, dividindo a variância maior pela menor. Em seguida, foram calculadas as médias referentes a cada bloco para cada combinação genótipo e subcultivo. Esses valores foram submetidos à análise de variância considerando o modelo fatorial (genótipos e subcultivos), com quatro repetições em blocos casualizados. Foi realizada análise do fatorial seguindo-se a decomposição de subcultivos dentro de genótipo (STEEL & TORRIE, 1981).

A comparação das médias para subcultivos foi feita de acordo com o teste F (ANOVA), considerando significativas as diferenças quando o valor de F correspondente foi significativo. Para cultivares, quando o valor de F correspondente foi significativo, foi realizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade, dentro de cada subcultivo e para a média geral.

Para avaliação dos caracteres qualitativos como, forma, vigor e densidade das plantas, cor da página superior, forma da secção transversal, ondulação e brilho das folhas e pigmentação antociânica da estípula e dos estolões, foram computadas as frequências de cada característica e aplicado o teste χ^2 .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de plântulas de morangueiro

Durante a fase de multiplicação *in vitro*, na primeira etapa (plantas submetidas a doze subcultivos), não foram detectadas alterações no comportamento morfogênético até o sexto subcultivo, quando foi observada a ocorrência de calos na cultivar Camarosa e de alterações fisiológicas nos brotos como a hiperhidricidade na cultivar Camino Real. Em geral, os brotos com sintomas de hiperhidricidade apresentavam uma morfologia anormal, como a lâmina foliar enrolada, quebradiça e com aspecto vitrificado e pecíolo retorcido (Figura 7). Na cv. Camino Real foi observado um frasco com brotos hiperhídricos, aumentando para onze frascos no nono subcultivo e reduzindo para cinco frascos no 12º subcultivo. Nas cvs. Aromas e Camarosa, brotos hiperhídricos foram observados a partir do sétimo subcultivo e em menor frequência, em torno de um a dois frascos por subcultivo. Nesta etapa, somente na cv. Camarosa foi observada a formação de calo (Figura 8), sendo detectado um frasco no sexto subcultivo, atingindo o número de três frascos no oitavo e nono subcultivos e reduzindo para um frasco no décimo subcultivo (Tabela 1).



Figura 7. Brotos da cultivar Camino Real no 9º ciclo de subcultivo apresentando sintomas de hiperhidricidade.



Figura 8. Formação de calo na cultivar Camarosa no 6º ciclo de subcultivo.

Na segunda etapa (plantas submetidas a três subcultivos), foram observados três frascos com brotos hiperhídricos no primeiro subcultivo e um frasco no terceiro subcultivo da cultivar Camino Real. Na cultivar Aromas foi observado um frasco no terceiro subcultivo (Tabela 2).

Tabela 1. Número de frascos com brotos apresentando sintomas de hiperhidricidade (H) e formação de calo para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real a partir do 6º subcultivo da primeira etapa. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivos	Genótipos					
	Aromas		Camarosa		Camino Real	
	H	calo	H	calo	H	calo
6	-	-	-	1	1	-
7	1	-	2	1	5	-
8	1	-	2	3	8	-
9	-	-	1	3	11	-
10	1	-	-	1	9	-
11	-	-	1	-	4	-
12	-	-	3	1	5	-

Tabela 2. Número de frascos com brotos apresentando sintomas de hiperhidricidade (H) e formação de calo para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real na segunda etapa. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivos	Genótipos					
	Aromas		Camarosa		Camino Real	
	H	calo	H	calo	H	calo
1	-	-	-	-	3	-
2	-	-	-	-	-	-
3	1	-	-	7	1	1

Nehra *et al.* (1992) estudando variação somaclonal em morangueiro, obtiveram calogênese em meios com 1-10mM de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e com 1-10mM de BAP (6-benzilaminopurina), sendo que as melhores respostas para o crescimento dos calos foram registradas com 5mM de 2,4-D e de 5mM de BAP. No presente trabalho, foi acrescido ao meio de cultura para multiplicação dos explantes 1 mg.l⁻¹ de BAP, o que equivale a concentração de 4,4 mM, valor estabelecido em protocolo para produção de matrizes de morangueiro através de cultura de tecidos da Embrapa Clima Temperado (Oliveira *et al.*, 2005). Durante a fase de multiplicação não foi utilizada nenhuma fonte de auxina, talvez por esta razão, a formação de calos tenha sido observada em menor frequência. A ocorrência de calogênese variou entre as cultivares. No segundo subcultivo da segunda etapa, foi observada a formação de calo em sete frascos para a cv. Camarosa e um frasco para a cv. Camino Real (Tabela 2). Flores *et al.* (1998) verificaram diferenças significativas entre as cultivares de morangueiro estudadas quanto a intensidade de formação de calos. Vários trabalhos têm demonstrado que certos grupos de plantas respondem mais facilmente em culturas *in vitro* que outros. Estas diferenças mostram que as condições ideais para o cultivo *in vitro* variam com o genótipo em estudo (AMMIRATO, 1986).

De acordo com Hazarika (2006), as condições pelas quais a maioria dos laboratórios executam o cultivo *in vitro* podem contribuir para desordens morfo-fisiológicas favorecendo a formação de plantas morfológicamente anormais que podem não sobreviver na transição das condições *in vitro* para *ex vitro*.

Embora tenha ocorrido a formação de calos e brotos com sintomas de hiperhidricidade nas cultivares estudadas, as plântulas enraizadas *in vitro* não apresentaram anormalidades morfológicas (Figura 9). Não foi feita avaliação quanto à resposta ao enraizamento das plântulas com relação ao número de subcultivos. As plântulas transferidas para meio MS sem a adição de fitorreguladores apresentaram adequados enraizamento e alongamento da parte aérea, sendo obtidas plântulas com altura maior do que 3 cm, de acordo com o sugerido pelo protocolo da Embrapa Clima Temperado para produção de matrizes de morangueiro por meio de cultura de tecidos vegetais (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

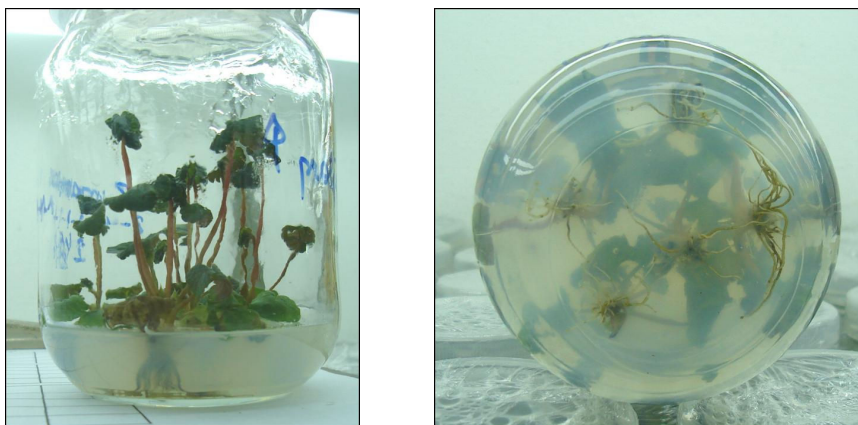


Figura 9. Plântulas da cultivar Camarosa submetidas a doze subcultivos apresentando enraizamento em meio MS sem a adição de fitorreguladores.

A cultivar Camino Real apresentou um maior número de frascos com plântulas manifestando sintomas de hiperhidricidade do que as demais cultivares. A hiperhidricidade é uma desordem morfológica e fisiológica de plantas propagadas *in vitro*. De acordo com Cassells e Curry (2001), os problemas ligados à aplicação da cultura de tecidos vegetais entre eles a hiperhidricidade, podem estar relacionados pelo menos em parte, a danos induzidos pelo estresse oxidativo. Segundo Hazarika (2006), muitos estudos sobre os fatores que influenciam a ocorrência de hiperhidricidade demonstram que esta é dependente da disponibilidade hídrica, conteúdo de micronutrientes e do balanço hormonal no meio de cultura e que, o microambiente e a composição de etilenono interior do frasco de cultivo têm sido relacionados exercer um efeito prolongado sobre a hiperhidricidade. De acordo com Harding (1996), subcultivos por prolongados períodos de tempo sob condições de estresse no microambiente *in vitro* têm sido mostrados serem a causa de mudanças físicas tais como a hiperhidricidade e redução do comprimento do pecíolo e tamanho da lâmina foliar em cultura de brotos.

No presente estudo, a ocorrência de hiperhidricidade foi mais intensa a partir do sétimo subcultivo em todas as cultivares avaliadas neste estudo. O que pode explicar as diferenças significativas observadas para as características analisadas com o aumento do número de subcultivos. De acordo com Jain (2001), dependendo da espécie vegetal, o número de subcultivos é um importante aspecto que pode levar à maiores variações. Vieitez *et al.* (1985) observaram no cultivo *in vitro* da castanha (*Castanea sativa* Mill) a produção de brotos hiperhídricos durante sucessivos subcultivos utilizando meio MS. Gomide (2004) verificou em plântulas de morango pequeno número de folhas hiperhídricas e que, com o aumento de subcultivos, foi diminuída a ocorrência de folhas com este sintoma. Em seu trabalho, não foram identificados variantes somaclonais *in vitro*, quanto às características morfológicas.

4.2. Aclimatização das mudas

Existem na literatura diversos protocolos bem estabelecidos para a aclimatização de mudas de morango obtidas a partir de cultura de tecidos vegetais. Neste trabalho, não foi feita avaliação das mudas quanto à taxa de sobrevivência durante esta etapa, uma vez que independente do número de subcultivos, foi possível obter o número necessário de mudas à implantação do experimento.

Ao final da fase de aclimatização, a avaliação da altura média da parte aérea das plântulas, demonstrou pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, que não houve diferença significativa entre as cultivares (Tabela 3). Levando em conta os dois níveis de subcultivos, a maior altura média da parte aérea de 6,83 cm foi observada no 12º subcultivo. Gomide(2004) observou que as mudas de morangueiro submetidas a nove ciclos de subcultivos *in vitro* apresentaram maior altura que as demais mudas subcultivadas por menor tempo.

Não houve interação significativa entre subcultivos e genótipos, no entanto, a decomposição de subcultivo dentro de genótipo mostrou que houve diferença significativa entre os subcultivos para a cv. Camarosa e para a cv. Camino Real, que apresentaram maiores valores médios de altura da parte aérea de 7,07 e 6,95 cm com 12 subcultivos, respectivamente.

Tabela 3. Valores médios da altura da parte aérea de plântulas após a fase de aclimatização das cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real submetidas a três e doze subcultivos. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivos	Cultivares			
	Aromas	Camarosa	Camino Real	Média
3	5,82 Aa	5,70 Ab	6,20 Ab	5,90 b
12	6,48 Aa	7,07 Aa	6,95 Aa	6,83 a
Média	6,15A	6,38 A	6,57 A	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula, nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey (5%) e letras minúsculas, nas colunas, não diferem significativamente entre si, com base no teste F (5%).

Não foi observada diferença significativa entre as médias do comprimento da raiz das plântulas de morangueiro submetidas a três e 12 subcultivos após a fase de aclimatização. Em relação à média das cultivares, o teste de Tukey ao nível de significância de 5% mostrou que não houve diferença significativa entre as cultivares Camarosa e Camino Real, no entanto, as plântulas destas cultivares apresentaram comprimento médio de raiz superior ao da cultivar Aromas (Tabela 4). Não houve interação significativa entre subcultivos e cultivares, entretanto, a decomposição de subcultivo dentro de genótipo mostrou que houve diferença significativa entre os subcultivos para a cv. Camino Real, que apresentou o maior valor médio de comprimento da raiz de 11,99 cm com 12 subcultivos.

Tabela 4. Valores médios do comprimento da raiz de plântulas após a fase aclimatização das cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real submetidas a três e doze subcultivos. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivos	Cultivares			
	Aromas	Camarosa	Camino Real	Média
3	9,87 Aa	9,93 Aa	10,19 Ab	9,99 a
12	9,37 Ba	11,01 Aa	11,99 Aa	10,79 a
Média	9,62 B	10,47 A	11,09 A	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula, nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey (5%) e letras minúsculas, nas colunas, não diferem significativamente entre si, com base no teste F (5%).

Em termos de variação entre os dois níveis de subcultivos para as cultivares Camarosa e Camino Real não foi observada diferença significativa na altura da parte aérea das plântulas após a fase de aclimatização. Por outro lado, a cultivar Aromas apresentou diferença significativa nos valores de variância entre os dois níveis de subcultivos. Para a característica comprimento da raiz após a fase de aclimatização, foi verificado que não houve diferença significativa em termos variação entre os dois níveis de subcultivos para as cultivares Aromas e Camino Real, contudo, a cultivar Camarosa apresentou variação no comprimento da raiz entre os dois níveis de subcultivos. As maiores variações foram observadas nas plantas submetidas a 12 subcultivos, conforme mostra o teste F (Tabela 5). Estes resultados indicam que o número de subcultivos somente exerce influência em determinada característica e cultivar e que a variação no comportamento das cultivares em relação às características estudadas pode ser devida à resposta do genótipo ao número de subcultivos em que foi submetido.

Tabela 5. Valores das variâncias dentro das cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real e dos subcultivos três e doze e teste F para as características altura da parte aérea (APA) e comprimento da raiz (CR) das plântulas após a fase de aclimatização. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Característica	Cultivar								
	Aromas			Camarosa			Camino Real		
	Subcultivo			Subcultivo			Subcultivo		
	3	12	F	3	12	F	3	12	F
APA	2,21	4,05	1,83 *	4,77	4,62	1,03 ñs	3,53	2,90	1,22 ñs
CR	15,68	12,38	1,27 ñs	21,78	13,08	1,66 *	14,59	10,29	1,42 ñs

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade (Teste F)

ñs - não significativo

4.3. Avaliação a campo de variação somaclonal com caracteres morfológicos de morango – características quantitativas

A cultivar Camarosa apresentou maior valor médio de massa fresca da parte aérea diferindo das demais cultivares (Tabela 6), no entanto, não houve diferença significativa entre as cultivares quanto à média da característica massa seca da parte aérea (Tabela 7). Nos dois níveis de subcultivos (três e doze), as médias das características massas fresca e seca da parte aérea, não apresentaram diferença significativa entre si (Tabelas 6 e 7). Houve interação significativa entre subcultivos e genótipos, sendo na cv. Camarosa observados os maiores valores médios de massa fresca (23,72 g) e de massa seca (4,44 g) nas plantas submetidas a doze subcultivos (Tabela 6 e 7), não havendo diferenças significativas entre os subcultivos nas demais cultivares.

As maiores médias de massa fresca e seca da parte aérea foram verificadas nas plantas da cultivar Camarosa submetidas a doze subcultivos. O maior número de ciclos de subcultivos pode ter influenciado uma maior capacidade para acúmulo de biomassa para essa cultivar. Gomide (2004) avaliou a influência do número de subcultivos na aclimatização e verificou nas mudas de morangueiro cvs. Oso Grande e Vila Nova, uma tendência de diminuir a biomassa da parte aérea até o oitavo subcultivo *in vitro* e um aumento da biomassa nas plântulas subcultivadas por dez vezes. Segundo a autora, as brotações de ambas as cultivares quando subcultivadas por três vezes apresentaram alta taxa de multiplicação e, por isso, as mudas podem ter utilizado grande parte da energia na emissão de novos brotos em detrimento do crescimento.

Tabela 6. Valores médios de massa fresca da parte aérea de plantas das cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real em avaliação a campo após serem submetidas a três e doze subcultivos. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivos	Cultivares			
	Aromas	Camarosa	Camino Real	Média
3	11,41 Ba	17,33 Ab	13,61 Aa	14,12 a
12	10,40 Ba	23,72 Aa	11,54 Ba	15,22 a
Média	10,91 B	20,52 A	12,58 B	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula, nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey (5%) e letras minúsculas, nas colunas, não diferem significativamente entre si, com base no teste F (5%).

Tabela 7. Valores médios de massa seca da parte aérea de plantas das cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real em avaliação a campo após serem submetidas a três e doze subcultivos. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivos	Cultivares			
	Aromas	Camarosa	Camino Real	Média
3	2,17 Ba	3,53 Ab	2,83 Aa	2,84 a
12	2,16 Ba	4,44 Aa	2,37 Ba	2,99 a
Média	2,16 A	3,99 A	2,59 A	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula, nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey (5%) e letras minúsculas, nas colunas, não diferem significativamente entre si, com base no teste F (5%).

Para as características massas fresca e seca da raiz não houve diferenças significativas entre os dois níveis de subcultivos. Não houve interação significativa entre subcultivos e genótipos. O teste de Tukey ao nível de significância de 5% mostrou que houve diferença significativa entre as cultivares em relação às médias das duas características, sendo a cv. Camarosa a que apresentou maiores valores médios de massas fresca e seca da raiz (Tabelas 8 e 9). Segundo Gomide (2004), durante a aclimatização a massa fresca e seca das raízes das mudas das cultivares de morangueiro Oso Grande e Vila Nova, produzidas nos diferentes subcultivos *in vitro*, variou segundo um comportamento quadrático. Foi verificada a menor biomassa da raiz em mudas subcultivadas por seis vezes e a maior biomassa da raiz em mudas subcultivadas por dez vezes.

Tabela 8. Valores médios de massa fresca da raiz de plantas das cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real em avaliação a campo após serem submetidas a três e doze subcultivos. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivos	Cultivares			
	Aromas	Camarosa	Camino Real	Média
3	2,57 Ba	4,41 Aa	2,41 Ba	3,13 a
12	2,47 Ba	4,79 Aa	2,33 Ba	3,20 a
Média	2,52 B	4,59 A	2,37 B	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula, nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey (5%) e letras minúsculas, nas colunas, não diferem significativamente entre si, com base no teste F (5%).

Tabela 9. Valores médios de massa seca da raiz de plantas das cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real em avaliação a campo após serem submetidas a três e doze subcultivos. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivos	Cultivares			
	Aromas	Camarosa	Camino Real	Média
3	0,40 Ba	0,68 Aa	0,42 Ba	0,50 a
12	0,42 Ba	0,77 Aa	0,40 Ba	0,53 a
Média	0,41 B	0,73 A	0,41 B	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula, nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey (5%) e letras minúsculas, nas colunas, não diferem significativamente entre si, com base no teste F (5%).

Para a variável altura da parte aérea ao teste de Tukey ao nível de significância de 5% mostrou a existência de superioridade da cultivar Camarosa (15,76 cm), não havendo diferença significativa entre as cultivares Camarosa e Camino Real (Tabela 10). Não houve diferença significativa entre os dois níveis de subcultivos. Este resultado foi diferente ao observado na análise da variável altura da parte aérea após o período de aclimatização.

Não houve interação significativa entre subcultivos e genótipos. No entanto, a decomposição de subcultivo dentro de genótipo mostrou que houve diferença significativa entre os subcultivos para a cv. Camarosa, apresentando maior valor médio de altura da parte aérea de 16,91 cm com 12 subcultivos. Vidal *et al.* (2007) realizaram a caracterização morfológica de cultivares de morangueiro. Estes autores verificaram que as plantas das cultivares Aromas e Camarosa apresentaram maior altura de 16,1 e

15,6 cm, respectivamente e a cv. Camino Real apresentou menor altura das plantas de 12,9 cm.

Tabela10. Valores médios da altura da parte aérea de plantas das cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real em avaliação a campo após serem submetidas a três e doze subcultivos. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivos	Cultivares			
	Aromas	Camarosa	Camino Real	Média
3	13,32 Aa	14,62 Ab	13,70 Aa	13,88 a
12	12,91 Ba	16,91 Aa	14,46 Aa	14,76 a
Média	13,11 B	15,76 A	14,08 A	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula, nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey (5%) e letras minúsculas, nas colunas, não diferem significativamente entre si, com base no teste F (5%).

Para a característica comprimento da raiz, não houve diferença significativa nem entre as médias das três cultivares nem entre os dois níveis de subcultivos, não havendo tampouco interação significativa entre subcultivos e genótipos. O teste de Tukey, ao nível de significância de 5% mostrou que não houve diferença significativa entre as cultivares (Tabela 11).

Tabela 11. Valores médios do comprimento da raiz de plantas das cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real em avaliação a campo após serem submetidas a três e doze subcultivos. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivos	Cultivares			
	Aromas	Camarosa	Camino Real	Média
3	19,27 Aa	18,46 Aa	18,49 Aa	18,74 a
12	19,77 Aa	19,74 Aa	18,27 Aa	19,26 a
Média	19,52 A	19,10 A	18,38 A	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula, nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey (5%) e letras minúsculas, nas colunas, não diferem significativamente entre si, com base no teste F (5%).

Em relação à média das cultivares para o número de estolões, o teste de Tukey ao nível de significância de 5% mostrou que houve diferença significativa entre as cultivares, sendo a cv. Camarosa a que apresentou maior número de estolões (Tabela 12). Não houve diferença significativa entre os dois níveis de subcultivos. Não houve interação significativa entre subcultivos e genótipos.

Neste trabalho, os estolões não foram eliminados para que fossem realizadas avaliações do número de estolões por planta. De acordo com Miranda & Fernandes (2001), a produção de estolões intensifica-se quando a temperatura sobe e os dias ultrapassam 12 horas de luz. Segundo esses autores, é necessário proceder-se à eliminação destes estolões à medida que vão surgindo, porque limitam o desenvolvimento da parte aérea, reduzindo a formação de coroas secundárias e debilitam as plantas, que acabam por ter uma produção mais reduzida e frutos de menor tamanho.

No campo, uma das principais características de plantas de morangueiro micropropagadas é o grande número de emissões de estolões. No início do verão, os estolões emitidos são mais curtos e mais finos que os formados em plantas normais. Ao final da fase vegetativa, as mudas obtidas a partir de plantas micropropagadas são idênticas as convencionais, apenas o número de estolões por planta-mãe pode ser diferente. Essa capacidade de produzir maiores quantidades de estolões desaparece durante o segundo ano de produção. Este aumento do número de estolões no primeiro ano de produção é muito importante para cultivares de safra permanente, que são geralmente pobres produtores de estolões (BOXUS, 1999).

Tabela 12. Valores médios do número de estolões das cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real em avaliação a campo após serem submetidas a três e doze subcultivos. UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivos	Cultivares			
	Aromas	Camarosa	Camino Real	Média
3	4,26 Ba	5,83 Aa	4,81 Aa	4,97 a
12	3,94 Ba	5,98 Aa	5,09 Aa	5,00 a
Média	4,10 B	5,91 A	4,95 B	

Médias seguidas de mesma letra maiúscula, nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey (5%) e letras minúsculas, nas colunas, não diferem significativamente entre si, com base no teste F (5%).

Na análise das variáveis massas fresca e seca da parte aérea, foi verificado que não houve diferença em termos de variação entre os subcultivos três e doze para as cultivares Aromas e Camarosa. Para a cultivar Camino Real houve diferença significativa em termos de variação entre os dois níveis de subcultivos. De acordo com o teste F, as maiores variações foram observadas nas plantas submetidas a três subcultivos (Tabela 13).

Em relação às massas fresca e seca da raiz não houve diferença significativa em termos de variação entre os dois níveis de subcultivos para a cultivar Aromas. Para a cultivar Camarosa, houve diferença significativa na variação da massa fresca da raiz entre os dois níveis de subcultivos, entretanto, não ocorreu variação na massa seca da raiz. Foi observado que a variação nas massas fresca e seca da raiz foram maiores nas plantas com três subcultivos do que doze para estas cultivares. Para a cv. Camino Real houve diferença significativa na variação das massas fresca e seca da raiz entre os dois níveis de subcultivos. As maiores variações foram observadas nas plantas submetidas a três subcultivos (Tabela 13).

De acordo com o teste F (Tabela 13), não houve diferença significativa em termos de variação na altura das plantas entre os subcultivos para as cultivares Aromas e Camino Real. Para a cv. Camarosa houve variação em termos de altura da parte da aérea entre os dois níveis de subcultivos, sendo a maior variação observada nas plantas submetidas a três subcultivos.

Uma explicação poderia ser devido a uma provável seleção dos explantes mais vigorosos durante os três ciclos de subcultivos ou que o menor número de subcultivos não foi suficiente para garantir a estabilidade genética dos explantes para estas características na cultivar Camino Real. Jain (1997) estudou a variação somaclonal em plantas ornamentais de *Begonia* e *Saintpaulia* micropropagadas em apenas três ciclos de subcultivos e verificou que é difícil prever o número de ciclos de micropropagação quando a estabilidade genética da característica número de flores por planta poderá ser perdida.

Um aspecto que não pode deixar de ser considerado é que as plantas submetidas a três e doze subcultivos apesar de serem originárias do mesmo local e dos mesmos genótipos foram produzidas em épocas diferentes.

Para a variável comprimento da raiz o teste F indica que houve diferença significativa em termos da variação entre os dois níveis de subcultivos para a cultivar Aromas, sendo a maior variação observada nas plantas submetidas a 12 subcultivos. As cvs. Camarosa e Camino Real não apresentaram diferenças significativas na variação do comprimento da raiz entre os dois níveis de subcultivos (Tabela 13).

Quanto ao número de estolões por planta, somente a cultivar Camarosa apresentou diferença significativa em termos de variação no número de estolões entre os dois níveis de subcultivos, sendo a maior variação observada nas plantas subcultivadas por três vezes (Tabela 13).

Tabela 13. Valores das variâncias dentro das cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real e dos subcultivos três e doze e teste F para as características massa fresca da parte aérea (MFPA); massa seca da parte aérea (MSPA); massa fresca da raiz (MFR); massa seca da raiz (MSR); altura da parte aérea (APA), comprimento da raiz (CR); número de estolões (NE). UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Característica	Cultivar								
	Aromas			Camarosa			Camino Real		
	Subcultivo			Subcultivo			Subcultivo		
	3	12	F	3	12	F	3	12	F
MFPA	14,60	11,92	1,23 ñs	60,97	78,98	1,3 ñs	49,82	20,66	2,41 **
MSPA	0,57	0,56	1,02 ñs	2,57	2,29	1,12 ñs	2,22	0,80	2,76 **
MFR	0,98	1,03	1,06 ñs	3,96	2,28	1,74 *	1,63	0,84	1,94 **
MSR	0,02	0,04	1,54 ñs	0,15	0,12	1,31 ñs	0,06	0,03	2,19 **
APA	3,68	4,93	1,34 ñs	6,95	3,90	1,78 *	6,05	5,04	1,2 ñs
CR	12,79	23,91	1,87 *	13,11	8,61	1,52 ñs	11,59	7,93	1,46 ñs
NE	1,42	1,85	1,31 ñs	5,78	2,01	2,88 **	3,81	2,84	1,34 ñs

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade (Teste F).

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade (Teste F).

ñs – não significativo

Foi verificada maior estabilidade em termos de variação para a cultivar Aromas em comparação com as outras cultivares, pois apresentou menor número de características morfológicas com variação dentro dos subcultivos.

Segundo Gaafar & Saker (2006), às vezes é difícil diferenciar a variabilidade somaclonal permanente das mudanças epigenéticas transientes. Estas mudanças epigenéticas podem incluir expressões transientes ou modificações de uma característica vegetal. De acordo com Jain (1997), a estabilidade das características nos somaclones é muito dependente se a característica surge como um resultado de alterações genéticas ao invés de mudanças epigenéticas. Entretanto, é bastante difícil descobrir estas alterações nas gerações micropropagadas.

Lópes-Aranda *et al.* (1994) transplantaram para o campo plantas de morangueiro das cultivares Chandler e Douglas, oriundas de oito subcultivos *in vitro* e não foram observadas plantas anormais. Este estudo indicou que provavelmente ambas as cultivares são bastante estáveis e que não há nenhum risco em usar plantas, de material micropropagado.

Neste trabalho, somente a característica altura da parte aérea após a fase de aclimatização apresentou diferença estatística entre os subcultivos. Estes resultados estão de acordo com os observados por Gomide (2004). Esta autora sugere que a falta de diferenças significativas nas características fenotípicas das cultivares estudadas nos diferentes ciclos de subcultivos pode ter sido devido ao pequeno número de ciclos de subcultivos estudados (dois a dez). Segundo Rancillac & Nourisseau (1989), não foram observadas diferenças no comportamento de campo em plantas de morango regeneradas com quatro e dezenove subcultivos.

4.4. Avaliação a campo de variação somaclonal com marcadores morfológicos e agrônômicos de morango – características qualitativas

Embora caracteres morfológicos de morango não sejam substanciais para o estudo da variabilidade inter-cultivares, foi identificado um grupo de características que podem ser utilizadas para identificar uma determinada cultivar entre outras estudadas. Esses caracteres incluem: características da fase vegetativa como: ondulação da folha, comprimento, largura e forma da base e forma do recorte do folíolo terminal, além de características da fase reprodutiva (NIELSEN & LOVELL, 2000).

A tabela 14 mostra a frequência da característica forma da planta dos tipos globosa (G) ou globosa achatada (GA) para as diferentes combinações entre as cultivares e o número de subcultivos das quais estas plantas resultaram. Observou-se uma acentuada predominância da forma da planta do tipo globosa achatada em todas as combinações (Figura 10a). Na combinação ‘Camarosa’ submetida a doze subcultivos, foi observado um predomínio do tipo globosa achatada e também um grande número de plantas com a forma globosa (Figura 10b). O valor do χ^2 de 48,19 para esta análise de frequências foi altamente significativo indicando que a forma da planta é influenciada pelas classes apresentadas, contudo, a tabela apresenta alguns valores zero para frequência observada, o que torna o resultado do χ^2 tendencioso. Nestes casos, aconselha-se unir as classes com frequências muito baixas, o que foi feito unindo os subcultivos em cada genótipo (Tabela 16) ou as cultivares em cada subcultivo (Tabela 17).

Tabela 14. Frequência da característica forma da planta, tipo globosa (G) ou globosa achatada (GA), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos, e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Genótipo	Subcultivo	Forma da planta		Soma
		G	GA	
Aromas	3	3	60	63
	12	0	54	54
Camarosa	3	4	55	59
	12	16	44	60
Camino Real	3	1	56	57
	12	0	59	59
Soma		24	328	352

$\chi^2 = 48,19^{**}$

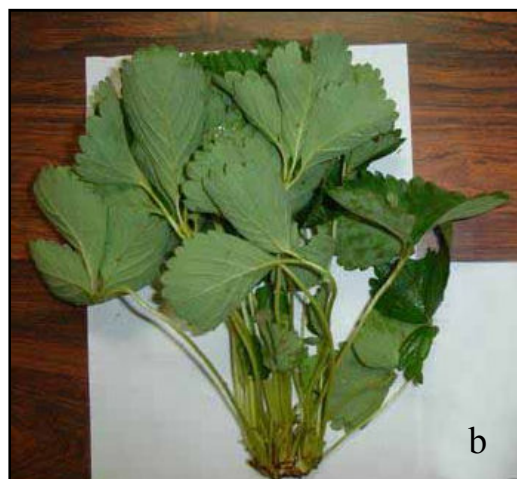
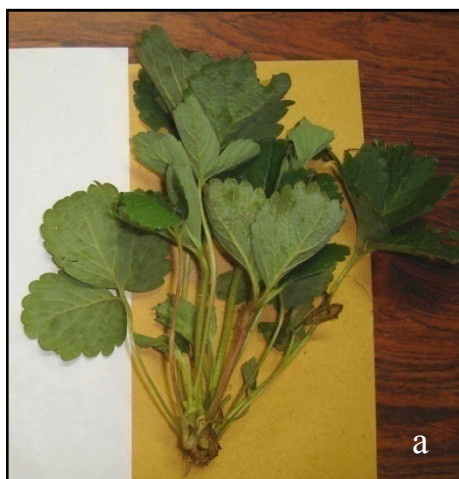


Figura 10. Planta da cultivar Aromas submetida a três subcultivos apresentando a forma da planta do tipo globosa achatada (a) e; Planta da cultivar Camarosa submetida a doze subcultivos apresentando a forma da planta do tipo globosa (b).

A tabela 15 mostra as frequências da forma da planta para as três cultivares. Neste caso, existem frequências observadas baixas o que pode gerar uma tendenciosidade. Nota-se que a cv. Camarosa apresenta uma distribuição diferente das cultivares Aromas e Camino Real o que foi corroborado com o valor de χ^2 de 28,50, altamente significativo.

Tabela 15. Frequência da característica forma da planta, tipo globosa (G) ou globosa achatada (GA), para as cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Genótipo	Forma da planta		Soma
	G	GA	
Aromas	3	114	117
Camarosa	20	99	119
Camino Real	1	115	116
Soma	23	328	352

$\chi^2 = 28,50$ **

A tabela 16 mostra a frequência da forma da planta para os dois níveis de subcultivos. O valor de χ^2 não foi significativo (3,16), o que permite afirmar que a distribuição das frequências da forma da planta não variou entre o 3º e o 12º subcultivo.

Tabela 16. Frequência da característica forma da planta, tipo globosa (G) ou globosa achatada (GA), para os subcultivos três e doze e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivo	Forma da planta		Soma
	G	GA	
3	8	171	179
12	16	157	173
Soma	24	328	352

$\chi^2 = 3,16$ ñs

Para melhor entendimento sobre o comportamento das frequências em relação a cultivares e subcultivos foi feita a divisão das frequências para subcultivos dentro de cada cultivar (Tabela 17). Embora as cultivares Aromas e Camino Real tenham apresentado valor zero na frequência observada, tornando os resultados tendenciosos (não confiáveis), estes não foram significativos. O teste χ^2 para subcultivo dentro da cv. Camarosa apresentou valor altamente significativo de 8,41 (teste confiável), indicando que para esta cultivar houve uma variação significativa na frequência da forma da planta globosa e globosa achatada entre os subcultivos três e doze.

Tabela 17. Frequência da característica forma da planta, tipo globosa (G) ou globosa achatada (GA), dentro dos genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos e os valores correspondentes de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivo	Genótipo								
	Aromas			Camarosa			Camino Real		
	G	GA	Soma	G	GA	Soma	G	GA	Soma
3	3	60	63	4	55	59	1	56	57
12	0	54	54	16	44	60	0	59	59
Soma	2	114	117	20	99	119	1	115	116
	$\chi^2 = 2,64$ ñs			$\chi^2 = 8,41$ **			$\chi^2 = 1,04$ ñs		

A tabela 18 mostra a frequência da característica densidade da planta, fraca (3), média (5) ou forte (7), para as diferentes combinações entre os genótipos e o número de subcultivos. Nas combinações entre as cultivares Aromas e Camino Real e os dois níveis de subcultivos observa-se um predomínio de plantas apresentando densidade fraca; no entanto, foi observado um grande número de plantas apresentando densidade média. Ao contrário, na combinação ‘Camarosa’ nos dois níveis de subcultivos, houve um predomínio de plantas apresentando densidade forte; contudo, apresentou 16 plantas com densidade média. Nota-se uma distribuição de frequências diferenciada entre as cultivares confirmado pelo teste de χ^2 de 89,29, altamente significativo, indicando que a densidade da planta é influenciada pelas classes apresentadas.

Tabela 18. Frequência da característica densidade da planta, fraca (3), média (5) ou forte (7), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos, e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Genótipo	Subcultivo	Densidade da planta			Soma
		3	5	7	
Aromas	3	32	24	7	63
	12	34	17	3	54
Camarosa	3	14	19	26	59
	12	7	25	28	60
Camino Real	3	24	27	6	57
	12	33	25	1	59
	Soma	144	137	71	352

$\chi^2 = 89,29$ **

A tabela 19 mostra a frequência da característica densidade da planta para as três cultivares. A cultivar Camarosa apresentou maior número de plantas com densidade forte. Este resultado corrobora o trabalho de Vidal *et al.* (2007), que caracterizaram morfológicamente cultivares de morango e verificaram que a cultivar Camarosa apresentou uma forma mais volumosa em relação às cvs. Aromas e Camino Real.

A cv. Camino Real apresentou distribuição semelhante nas frequências observadas para densidade média e fraca. Para a cv. Aromas foi observado maior número de plantas com densidade fraca. O valor do teste χ^2 para esta tabela foi de 82,96, altamente significativo, indicando que densidade da planta variou entre as cultivares.

Tabela 19. Frequência da característica densidade da planta, fraca (3), média (5) ou forte (7), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Genótipo	Densidade da planta			Soma
	3	5	7	
Aromas	66	41	10	117
Camarosa	21	44	54	119
Camino Real	57	52	7	116
Soma	144	137	71	352

$\chi^2 = 82,96$ **

A tabela 20 mostra a frequência da característica densidade da planta para os dois níveis de subcultivos. O valor de χ^2 não foi significativo (0,76), o que permite afirmar que a distribuição das frequências da forma da planta não variou entre o 3º e o 12º subcultivo.

Tabela 20. Frequência da característica densidade da planta, fraca (3), média (5) ou forte (7), para os subcultivos três e doze e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivo	Densidade da planta			Soma
	3	5	7	
3	70	70	39	179
12	74	67	32	173
Soma	144	137	71	352

$\chi^2 = 0,76$ ñs

Para melhor entendimento sobre o comportamento das frequências em relação a cultivares e subcultivos foi feita a divisão das frequências para subcultivos dentro de cada cultivar. O teste χ^2 para subcultivo dentro das cvs. Aromas, Camarosa e Camino Real apresentaram valores não significativos de 2,18, 3,22e 5,04, respectivamente, indicando que não houve uma variação significativa na frequência da densidade da planta, fraca, média e forte, entre os subcultivos três e doze (Tabela 21).

Tabela 21. Frequência da característica densidade da planta, fraca (3), média (5) ou forte (7), dentro dos genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos e os valores correspondentes de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivo	Genótipo											
	Aromas				Camarosa				Camino Real			
	3	5	7	Soma	3	5	7	Soma	3	5	7	Soma
3	32	24	7	63	14	19	26	59	24	27	6	57
12	34	17	3	54	7	25	28	60	33	25	1	59
Soma	66	41	10	117	21	44	54	119	57	52	7	116
	$\chi^2 = 2,18$ ñs				$\chi^2 = 3,22$ ñs				$\chi^2 = 5,04$ ñs			

A tabela 22 mostra a frequência da característica vigor da planta, fraco (3), médio (5) ou forte (7), para as diferentes combinações entre os genótipos e o número de subcultivos. Nota-se uma distribuição das frequências diferenciada entre as cultivares confirmado pelo teste de χ^2 de 74,83, altamente significativo, indicando que o vigor da planta é influenciado pelas classes apresentadas.

Tabela 22. Frequência da característica vigor da planta, fraco (3), médio (5) ou forte (7), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos, e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Genótipo	Subcultivo	Vigor da planta			Soma
		3	5	7	
Aromas	3	16	34	13	63
	12	11	30	13	54
Camarosa	3	8	11	40	59
	12	2	12	46	60
Camino Real	3	14	14	29	57
	12	7	32	20	59
	Soma	58	133	161	352

$\chi^2 = 74,83$ **

A tabela 23 mostra as frequências da característica vigor da planta para as três cultivares. A cultivar Camarosa apresentou maior número de plantas com vigor forte. A cv. Camino Real apresentou distribuição semelhante nas frequências observadas para vigor médio e forte. Para a cv. Aromas foi observado maior número de plantas com vigor médio. O valor do teste χ^2 para esta tabela foi de 60,45, altamente significativo, indicando que a distribuição de frequências da característica vigor da planta variou entre as cultivares.

Tabela 23. Frequência da característica vigor da planta, fraco (3), médio (5) ou forte (7), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Genótipo	Vigor da planta			Soma
	3	5	7	
Aromas	27	64	26	117
Camarosa	10	23	86	119
Camino Real	21	46	49	116
Soma	58	133	161	352

$$\chi^2 = 60,45 **$$

A tabela 24 mostra a frequência da característica vigor da planta para os dois níveis de subcultivos. O valor de χ^2 foi significativo (7,23), o que permite afirmar que a distribuição das frequências do vigor da planta variou entre o 3º e o 12º subcultivo.

Tabela 24. Frequência da característica vigor da planta, fraco (3), médio (5) ou forte (7), para os subcultivos três e doze e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivo	Vigor da planta			Soma
	3	5	7	
3	38	59	82	179
12	20	74	79	173
Soma	58	133	161	352

$$\chi^2 = 7,23 *$$

Para melhor entendimento sobre o comportamento das frequências em relação a cultivares e subcultivos foi feita a divisão das frequências para subcultivos dentro de cada cultivar. O teste χ^2 para subcultivo dentro das cvs. Aromas e Camarosa apresentaram valores não significativos de 0,49 e 4,05, respectivamente, indicando que não houve uma variação significativa na frequência do vigor da planta, fraco, médio e forte, entre os subcultivos três e doze. Para a ‘Camino Real’ o teste χ^2 apresentou valor significativo de 10,99, altamente significativo. Este resultado indica que para esta cultivar houve uma variação significativa na frequência de plantas com diferentes níveis de vigor entre os subcultivos três e doze (Tabela 25).

Tabela 25. Frequência da característica vigor da planta, fraco (3), médio (5) ou forte (7), dentro dos genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos e os valores correspondentes de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivo	Genótipo											
	Aromas				Camarosa				Camino Real			
	3	5	7	Soma	3	5	7	Soma	3	5	7	Soma
3	16	34	13	63	8	11	40	59	14	14	29	57
12	11	30	13	54	2	12	46	60	7	32	20	59
Soma	27	64	26	117	10	23	86	119	21	46	49	116
	$\chi^2 = 0,49$ ñs				$\chi^2 = 4,05$ ñs				$\chi^2 = 10,99$ **			

A tabela 26 mostra a frequência da característica cor da página superior da folha, verde-médio (3) e verde-escuro (4), para as diferentes combinações entre os genótipos e o número de subcultivos. Observa-se uma acentuada predominância da cor verde-escuro em todas as combinações. O valor do χ^2 para esta tabela de frequências foi de 19,36, que é significativo, indicando que a cor da página superior da folha é influenciada pelas classes apresentadas.

Tabela 26. Frequência da característica cor da página superior da folha, verde-médio (3) e verde-escuro (4), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos, e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Genótipo	Subcultivo	Forma da planta		Soma
		3	4	
Aromas	3	11	52	63
	12	11	43	54
Camarosa	3	26	33	59
	12	17	43	60
Camino Real	3	10	47	57
	12	9	50	59
	Soma	84	268	352
$\chi^2 = 19,36$ *				

A tabela 27 mostra as frequências da característica cor da página superior da folha para as três cultivares. Nota-se que as cultivares Aromas e Camino Real apresentam uma distribuição diferente da cultivar Camarosa o que foi corroborado com o valor de χ^2 de 16,83, altamente significativo, indicando que a cor da página superior da folha variou entre as cultivares.

Tabela 27. Frequência da característica cor da página superior da folha, verde-médio (3) e verde-escuro (4), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Genótipo	Cor da página superior da folha		Soma
	3	4	
Aromas	22	95	117
Camarosa	43	76	119
Camino Real	19	97	116
Soma	84	268	352

$$\chi^2 = 15,09^{**}$$

A tabela 28 mostra a frequência da característica cor da página superior da folha para os dois níveis de subcultivos. O valor de χ^2 não foi significativo (1,15), o que permite afirmar que a distribuição das frequências cor da página superior da folha não variou entre o 3º e o 12º subcultivo.

Tabela 28. Frequência da característica cor da página superior da folha, verde-médio (3) e verde-escuro (4), para os subcultivos três e doze e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivo	Cor da página superior da folha		Soma
	3	4	
3	47	132	179
12	37	136	173
Soma	84	268	352

$$\chi^2 = 1,15 \text{ ñs}$$

A divisão das frequências para subcultivos dentro de cada cultivar e seus respectivos testes χ^2 apresentados na tabela 29 indicaram que não houve uma variação significativa na frequência dos tipos de cor da página superior da folha entre os subcultivos três e doze em nenhuma das cultivares avaliadas.

Tabela 29. Frequência da característica cor da página superior da folha, verde-médio (3) e verde-escuro (4), dentro dos genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos e os valores correspondentes de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivo	Genótipo								
	Aromas			Camarosa			Camino Real		
	3	4	Soma	3	4	Soma	3	4	Soma
3	11	52	63	26	33	59	10	47	57
12	11	43	54	17	43	60	9	50	59
Soma	22	95	117	43	76	119	19	97	116

$$\chi^2 = 0,16 \text{ ñs}$$

$$\chi^2 = 3,19 \text{ ñs}$$

$$\chi^2 = 0,11 \text{ ñs}$$

A tabela 30 mostra a frequência da forma da secção transversal da folha dos tipos muito côncava (1) e ligeiramente côncava (3) para as diferentes combinações entre os genótipos e o número de subcultivos. Observa-se uma acentuada predominância da forma muito côncava em todas as combinações. O valor do χ^2 para esta tabela de frequências foi de 14,49, não significativo, indicando que a forma da secção transversal da folha não é influenciada pelas classes apresentadas.

Tabela 30. Frequência da característica forma da secção transversal da folha, muito côncava (1) ou ligeiramente côncava (3), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos, e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Genótipo	Subcultivo	Forma da secção transversal da folha		Soma
		1	3	
Aromas	3	51	12	63
	12	51	3	54
Camarosa	3	53	6	59
	12	51	9	60
Camino Real	3	57	0	57
	12	51	8	59
Soma		314	38	352

$\chi^2 = 14,49$ ñs

A tabela 31 mostra as frequências da característica forma da secção transversal da folha para as três cultivares. Neste caso, as frequências observadas para esta característica foram mais altas na forma muito côncava. O valor do teste χ^2 não foi significativo (2,73), indicando que a forma da secção transversal da folha não variou entre as cultivares.

Tabela 31. Frequência da característica forma da secção transversal da folha, muito côncava (1) ou ligeiramente côncava (3), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Genótipo	Forma da secção transversal da folha		Soma
	1	3	
Aromas	102	15	117
Camarosa	104	15	119
Camino Real	108	8	116
Soma	314	38	352

$\chi^2 = 2,73$ ñs

A tabela 32 mostra a frequência da característica forma da secção transversal da folha para os dois níveis de subcultivos. Neste caso, o valor de χ^2 de 0,21 não foi significativo, indicando que a distribuição das frequências da característica forma da secção transversal da folha não variou entre os dois níveis de subcultivos.

Tabela 32. Frequência da característica forma da secção transversal da folha, muito côncava (1) ou ligeiramente côncava (3), para os subcultivos três e doze e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivo	Forma da secção transversal da folha		Soma
	1	3	
3	161	18	179
12	153	20	173
Soma	314	38	352

$\chi^2 = 0,21$ ñs

Na tabela 33 foi feita a divisão das frequências para subcultivos dentro de cada cultivar. O teste χ^2 para subcultivo dentro das cvs. Aromas e Camarosa apresentou valores não significativos de 4,73 e 0,63, respectivamente, indicando que não houve uma variação significativa na frequência da forma da secção transversal da folha, muito côncava, ou ligeiramente côncava, entre os subcultivos três e doze. Embora a cv. Camino Real tenha apresentado teste χ^2 de 8,30, que foi significativo, apresentou valor zero na frequência observada, tornando este resultado tendencioso.

Tabela 33. Frequência da característica forma da secção transversal da folha, muito côncava (1) ou ligeiramente côncava (3), dentro dos genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos e os valores correspondentes de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivo	Genótipo								
	Aromas			Camarosa			Camino Real		
	1	3	Soma	1	3	Soma	1	3	Soma
3	51	12	63	53	6	59	57	0	57
12	51	3	54	51	9	60	51	8	59
Soma	102	15	117	104	15	119	108	8	116
$\chi^2 = 4,73$ ñs			$\chi^2 = 0,63$ ñs			$\chi^2 = 8,30$ *			

A tabela 34 mostra a frequência da característica ondulação da folha, nula ou muito fraca (1) e fraca (3) para as diferentes combinações entre os genótipos e o número de subcultivos. Na combinação ‘Camarosa’ submetida a doze subcultivos, predominou o tipo de ondulação fraca. O valor do χ^2 para esta tabela de frequências foi de 80,01 que é altamente significativo indicando que a característica ondulação da folha é influenciada pelas classes apresentadas.

Tabela 34. Frequência da característica ondulação da folha, nula ou muito fraca (1) e fraca (3), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Genótipo	Subcultivo	Ondulação da folha		Soma
		1	3	
Aromas	3	48	15	63
	12	41	13	54
Camarosa	3	17	42	59
	12	7	53	60
Camino Real	3	28	29	57
	12	22	37	59
Soma		163	189	352

$$\chi^2 = 80,01^{**}$$

A tabela 35 mostra as frequências da característica ondulação da folha para as três cultivares. Neste caso, as maiores frequências observadas foram para a característica ondulação nula ou muito fraca. O valor de χ^2 de 74,86, foi altamente significativo, indicando que a ondulação da folha variou entre as cultivares.

Tabela 35. Frequência da característica ondulação da folha, nula ou muito fraca (1) e fraca (3), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Genótipo	Ondulação da folha		Soma
	1	3	
Aromas	89	28	117
Camarosa	24	95	119
Camino Real	50	66	116
Soma	163	189	352

$$\chi^2 = 74,86^{**}$$

A tabela 36 mostra a frequência da característica ondulação da folha para os dois níveis de subcultivos. O valor de χ^2 foi significativo (4,67), o que permite afirmar que a distribuição das frequências da característica ondulação da folha variou entre o 3º e o 12º subcultivo.

Tabela 36. Frequência da característica ondulação da folha, nula ou muito fraca (1), fraca (3), para os subcultivos três e doze e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivo	Ondulação da folha		Soma
	1	3	
3	93	86	179
12	70	103	173
Soma	163	189	352

$\chi^2 = 4,67 *$

A divisão das frequências para subcultivos dentro de cada cultivar e seus respectivos testes χ^2 apresentados na tabela 37, indicaram que não houve uma variação significativa na frequência da característica ondulação da folha, entre os subcultivos três e doze para as cultivares Aromas e Camino Real. Para a cv. Camarosa o teste χ^2 apresentou valor de 5,43, significativo, indicando que para esta cultivar houve uma variação significativa na frequência da característica ondulação da folha entre os subcultivos três e doze.

Tabela 37. Frequência da característica ondulação da folha, nula ou muito fraca (1), fraca (3) ou média (5), dentro dos genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos e os valores correspondentes de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivo	Genótipo								
	Aromas			Camarosa			Camino Real		
	1	3	Soma	1	3	Soma	1	3	Soma
3	48	15	63	17	42	59	28	29	57
12	41	13	54	7	53	60	22	37	59
Soma	89	28	117	24	95	119	50	66	116
	$\chi^2 = 0,001$ ñs			$\chi^2 = 5,43 *$			$\chi^2 = 1,66$ ñs		

A tabela 38 mostra a frequência da característica brilho da folha, fraco (3) e médio (5), para as diferentes combinações entre os genótipos e o número de subcultivos. Observa-se uma acentuada predominância da característica brilho da folha médio em todas as combinações. O valor do χ^2 para esta tabela de frequências foi de 21,38 que é altamente significativo, indicando que a característica brilho da folha é influenciada pelas classes apresentadas.

Tabela 38. Frequência da característica brilho da folha, fraco (3) e médio (5), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos, e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Genótipo	Subcultivo	Brilho da folha		Soma
		3	5	
Aromas	3	12	51	63
	12	17	37	54
Camarosa	3	14	45	59
	12	12	48	60
Camino Real	3	13	44	57
	12	30	29	59
Soma		98	254	352

$\chi^2 = 21,38$ **

A tabela 39 mostra as frequências da característica brilho da folha para as três cultivares. Observa-se um predomínio de plantas com brilho médio na folha para as três cultivares, no entanto, o valor do χ^2 para esta tabela de frequências foi de 7,58, significativo, indicando que a característica brilho da folha é influenciada pelas classes apresentadas.

Tabela 39. Frequência da característica brilho da folha, fraco (3) e médio (5), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Genótipo	Brilho da folha		Soma
	3	5	
Aromas	29	88	117
Camarosa	26	93	119
Camino Real	43	73	116
Soma	98	254	352

$\chi^2 = 7,58$ *

A tabela 40 mostra a frequência da característica brilho da folha para os dois níveis de subcultivos. O valor de χ^2 foi significativo (6,64), o que permite afirmar que a distribuição das frequências do brilho da folha variou entre o 3º e o 12º subcultivo.

Tabela 40. Frequência da característica brilho da folha, fraco (3) e médio (5), para os subcultivos 3 e 12 e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivo	Brilho da folha		Soma
	3	5	
3	39	140	179
12	59	114	173
Soma	98	254	352

$$\chi^2 = 6,64 *$$

A divisão das frequências para subcultivos dentro de cultivares e seus respectivos testes χ^2 apresentados na tabela 41 indicaram que não houve uma variação significativa na frequência da característica brilho da folha entre os subcultivos três e doze para as cvs. Aromas e Camarosa. Para a cultivar Camino Real o teste χ^2 apresentou valor de 9,77, altamente significativo, indicando que para esta cultivar houve uma variação significativa na frequência da característica brilho da folha entre os subcultivos três e doze.

Tabela 41. Frequência da característica brilho da folha, fraco (3) e médio (5), dentro dos genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos e os valores correspondentes de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivo	Genótipo								
	Aromas			Camarosa			Camino Real		
	3	5	Soma	3	5	Soma	3	5	Soma
3	12	51	63	14	45	59	13	44	57
12	17	37	54	12	48	60	30	29	59
Soma	29	88	117	26	93	119	43	73	116

$$\chi^2 = 2,41 \text{ ãs}$$

$$\chi^2 = 0,24 \text{ ãs}$$

$$\chi^2 = 9,77 **$$

A tabela 42 mostra a frequência da característica relação comprimento/largura do folíolo terminal, tão comprida como larga (2) ou mais comprida do que larga (3), para as diferentes combinações entre os genótipos e o número de subcultivos. Observa-se uma diferenciada distribuição das frequências entre as cultivares. Na combinação ‘Camarosa’ nos dois níveis de subcultivos, predominou o tipo, mais comprida do que larga, apresentando também plantas com o tipo, tão comprida como larga na combinação com três subcultivos, no entanto, para as cvs. Aromas e Camino Real verificou-se um predomínio do tipo tão comprida como larga e, também apresentaram plantas com o tipo, mais comprida do que larga. O valor do χ^2 para esta tabela de frequências foi de 92,09 que é altamente significativo indicando que a característica relação comprimento/largura do folíolo terminal é influenciada pelas classes apresentadas. No entanto, a tabela apresentou valor zero para frequência observada, o que torna o resultado do χ^2 tendencioso (não confiável). Nestes casos, aconselha-se unir as classes com frequências muito baixas, o que foi feito unindo os subcultivos em cada genótipo (Tabela 44) ou os genótipos em cada subcultivo (Tabela 45).

Tabela 42. Frequência da característica relação comprimento/largura do folíolo terminal, tão comprida como larga (2) ou mais comprida do que larga (3), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos, e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Genótipo	Subcultivo	Relação comprimento/largura		Soma
		2	3	
Aromas	3	45	18	63
	12	30	24	54
Camarosa	3	14	45	59
	12	0	60	60
Camino Real	3	30	27	57
	12	39	20	59
Soma		158	194	352

$$\chi^2 = 92,09$$

A tabela 43 mostra as frequências da relação comprimento/largura do folíolo terminal para as três cultivares. As frequências mais altas observadas para esta característica foram no tipo, mais comprida do que larga para a cv. Camarosa e no tipo tão comprida do que larga para as cvs. Aromas e Camino Real. Nielsen & Lovell (2000), estudando caracteres morfológicos para identificação de cultivares de morango, verificou a mesma característica do folíolo terminal, mais comprido do que largo para a cultivar Camarosa. Vidal *et al.* (2007) observaram que as cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real apresentaram a largura e o comprimento do folíolo terminal semelhantes, caracterizando o folíolo destas cultivares como do tipo tão comprido quanto largo.

Em termos de variação, Nehra *et al.* (1992) não verificou diferença significativa na característica relação comprimento/largura do folíolo terminal entre plantas regeneradas de morango cv. Redcoat a partir de calos em diferentes tempos de cultivo *in vitro*.

Nota-se que as três cultivares apresentam uma distribuição diferenciada na frequência observada corroborado pelo valor de χ^2 de 80,22, altamente significativo.

Tabela 43. Frequência da característica relação comprimento/largura do folíolo terminal, tão comprida como larga (2) ou mais comprida do que larga (3), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Genótipo	Relação comprimento/largura		Soma
	2	3	
Aromas	75	42	117
Camarosa	14	105	119
Camino Real	69	47	116
Soma	158	194	352

$$\chi^2 = 80,22^{**}$$

A tabela 44 mostra a frequência relação comprimento/largura do folíolo terminal para os dois níveis de subcultivos. Apresenta o valor de χ^2 de 3,44, não significativo, o que permite afirmar que a distribuição das frequências da relação comprimento/largura do folíolo terminal não variou entre o 3º e o 12º subcultivos.

Tabela 44. Frequência da característica relação comprimento/largura do folíolo terminal, tão comprida como larga (2) ou mais comprida do que larga (3), para os subcultivos três e doze e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivo	Relação comprimento/largura		Soma
	2	3	
3	89	90	179
12	69	104	173
Soma	158	194	352

$\chi^2 = 3,44$ ñs

Para melhor entendimento sobre o comportamento das frequências em relação a cultivares e subcultivos foi feita a divisão das frequências para subcultivos dentro de cada cultivar. As cultivares Aromas e Camino Real apresentaram valor do χ^2 não significativos de 3,18 e de 2,18, respectivamente. A ‘Camarosa’ apresentou valor de χ^2 de 16,14, altamente significativo, no entanto, apresentou valor zero na frequência observada, tornando este resultado tendencioso (Tabela 45).

Tabela 45. Frequência da característica relação comprimento/largura do folíolo terminal, tão comprida como larga (2) ou mais comprida do que larga (3), dentro dos genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos três e doze subcultivos e os valores correspondentes de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivo	Genótipo								
	Aromas			Camarosa			Camino Real		
	2	3	Soma	2	3	Soma	2	3	Soma
3	45	18	63	14	45	59	30	27	57
12	30	24	54	0	60	60	39	20	59
Soma	75	42	117	14	105	119	69	47	116
	$\chi^2 = 3,18$ ñs			$\chi^2 = 16,14$ **			$\chi^2 = 2,18$ ñs		

A tabela 46 mostra a frequência da característica forma da base do folíolo terminal tipos acuneada (1) ou obtusa (2), para as diferentes combinações entre as cultivares e o número de subcultivos. Observa-se uma acentuada predominância da forma acuneada na combinação cv. Camarosa nos dois níveis de subcultivos e da forma obtusa na combinação ‘Camino Real’ nos dois níveis de subcultivos. Na combinação cv. Aromas nos dois níveis de subcultivos observa-se uma predominância da forma acuneada. No entanto, observa-se também que um número razoável de plantas apresentou a forma obtusa nos dois níveis de subcultivos. O valor do χ^2 para esta tabela de frequências foi de 129,32 que é altamente significativo indicando que a forma da base do folíolo terminal é influenciada pelas classes apresentadas.

Tabela 46. Frequência da característica forma da base do folíolo terminal, tipos acuneada (1) ou obtusa (2), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos, e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Genótipo	Subcultivo	Forma da base do folíolo terminal		Soma
		1	2	
Aromas	3	34	29	63
	12	32	22	54
Camarosa	3	50	9	59
	12	53	7	60
Camino Real	3	7	50	57
	12	8	51	59
Soma		184	168	352

$$\chi^2 = 129,32 **$$

A tabela 47 mostra a frequência da característica forma da base do folíolo terminal para as três cultivares. Para as cultivares Aromas e Camarosa foram verificadas que as frequências observadas para a característica forma da base do folíolo terminal do tipo acuneada foram mais altas. Este resultado é contrário ao observado por Nielsen & Lovell (2000), que na identificação de cultivares de morango utilizando caracteres morfológicos caracterizaram as plantas da cultivar Camarosa com a forma da base do folíolo terminal do tipo obtusa.

Para a cv. Camino Real verificou-se uma distribuição de frequências diferente das cvs. Aromas e Camarosa, pois apresentou uma predominância acentuada da forma da base do folíolo terminal do tipo obtusa. O valor do teste de χ^2 de 128,83, altamente significativo, indicou que a forma da base do folíolo terminal variou entre as cultivares.

Tabela 47. Frequência da característica forma da base do folíolo terminal, tipos acuneada (1) ou obtusa (2), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Genótipo	Forma da base do folíolo terminal		Soma
	1	2	
Aromas	66	51	117
Camarosa	103	16	119
Camino Real	15	101	116
Soma	184	168	352

$$\chi^2 = 128,83 **$$

A tabela 48 mostra a frequência da característica forma da base do folíolo terminal para os dois níveis de subcultivos. O valor de χ^2 não foi significativo (0,30), o que permite afirmar que a distribuição das frequências da característica forma da base do folíolo terminal não variou entre o 3º e o 12º subcultivo.

Tabela 48. Frequência da característica forma da base do folíolo terminal, tipos acuneada (1) ou obtusa (2), para os subcultivos três e doze e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivo	Forma da base do folíolo terminal		Soma
	1	2	
3	91	88	179
12	93	80	173
Soma	184	168	352

$\chi^2 = 0,30$ ñs

Para melhor entendimento sobre o comportamento das frequências em relação a cultivares e subcultivos foi feita a divisão das frequências para subcultivos dentro de cada cultivar. O teste χ^2 para subcultivo dentro das cvs. Aromas, Camarosa e Camino Real apresentou valores de 0,33, 0,33 e 0,04, respectivamente. Estes resultados não foram significativos, indicando que não houve uma variação significativa na frequência da forma da base do folíolo terminal acuneada e obtusa entre os subcultivos três e doze para estas cultivares (Tabela 49).

Tabela 49. Frequência da característica forma da base do folíolo terminal, tipos acuneada (1) ou obtusa (2), dentro dos genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos, e os valores correspondentes de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivo	Genótipo								
	Aromas			Camarosa			Camino Real		
	1	2	Soma	1	2	Soma	1	2	Soma
3	34	29	63	50	9	59	7	50	57
12	32	22	54	53	7	60	8	51	59
Soma	66	51	117	103	16	119	15	101	116
	$\chi^2 = 0,33$ ñs			$\chi^2 = 0,33$ ñs			$\chi^2 = 0,04$ ñs		

A tabela 50 mostra a frequência da pigmentação antociânica da estípula tipo ausente ou muito fraca (1) ou fraca (3), para as diferentes combinações entre os genótipos e o número de subcultivos. Observa-se uma acentuada predominância da forma do tipo ausente ou muito fraca em todas as combinações. O valor do χ^2 para esta tabela de frequências foi de 16,29 que é altamente significativo indicando que a pigmentação antociânica da estípula é influenciada pelas classes apresentadas.

Tabela 50. Frequência da característica pigmentação antociânica da estípula, ausente ou muito fraca (1) ou fraca (3), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos, e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Genótipo	Subcultivo	Pigmentação antociânica da estípula		Soma
		1	3	
Aromas	3	51	12	63
	12	48	6	54
Camarosa	3	50	9	59
	12	40	20	60
Camino Real	3	41	16	57
	12	53	6	59
Soma		283	69	352

$\chi^2 = 16,29$ **

A tabela 51 mostra as frequências da característica pigmentação antociânica da estípula para as três cultivares. Neste caso, as frequências observadas para esta característica foram altas no tipo ausente ou muito fraca. Nota-se que as três cultivares apresentam uma distribuição semelhante o que foi confirmado pelo valor de χ^2 de 3,07, não significativo.

Tabela 51. Frequência da característica pigmentação antociânica da estípula, ausente ou muito fraca (1) ou fraca (3), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Genótipo	Pigmentação antociânica da estípula		Soma
	1	3	
Aromas	99	18	117
Camarosa	90	29	119
Camino Real	94	22	116
Soma	283	69	352

$\chi^2 = 3,07$ ñs

A tabela 52 mostra a frequência da pigmentação antociânica da estípula para os dois níveis de subcultivos. O valor de χ^2 não foi significativo (0,26), o que permite afirmar que a distribuição das frequências da pigmentação antociânica da estípula não variou entre o 3º e o 12º subcultivo.

Tabela 52. Frequência da característica pigmentação antociânica da estípula, ausente ou muito fraca (1) ou fraca (3), para os subcultivos três e doze e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivo	Pigmentação antociânica da estípula		Soma
	1	3	
3	142	37	179
12	141	32	173
Soma	283	69	352

$\chi^2 = 0,26$ ñs

Para melhor entendimento sobre o comportamento das frequências em relação a cultivares e subcultivos foi feita a divisão das frequências para subcultivos dentro de cada cultivar. O teste χ^2 para subcultivo dentro da cv. Aromas apresentou valor não significativo de 1,41, indicando que não houve uma variação significativa na frequência da característica pigmentação antociânica da estípula nos tipos, ausente ou muito fraca e fraca, entre os dois níveis de subcultivos. Para as cvs. Camarosa e Camino Real os testes χ^2 apresentaram valores significativos de 5,27 e 6,04, respectivamente. Estes resultados indicaram que para estas cultivares houve uma variação significativa nas frequências dos tipos de pigmentação antociânica da estípula entre os subcultivos três e doze (Tabela 53).

Tabela 53. Frequência da característica pigmentação antociânica da estípula, ausente ou muito fraca (1) ou fraca (3), dentro dos genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos e os valores correspondentes de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivo	Genótipo								
	Aromas			Camarosa			Camino Real		
	1	3	Soma	1	3	Soma	1	3	Soma
3	51	12	63	50	9	59	41	16	57
12	48	6	54	40	20	60	53	6	59
Soma	99	18	117	90	29	119	94	22	116
	$\chi^2 = 1,41$ ñs			$\chi^2 = 5,27$ *			$\chi^2 = 6,04$ *		

A tabela 54 mostra a frequência da característica pigmentação antociânica dos estolões, média (5) ou forte (7), para as diferentes combinações entre os genótipos e o número de subcultivos. As três cultivares apresentaram maiores frequências observadas no tipo forte, sendo as maiores frequências encontradas nas combinações ‘Camarosa’ e ‘Camino Real’ ambas submetidas a três subcultivos, e para a cv. Aromas na combinação com doze subcultivos. O valor do χ^2 para esta tabela de frequências foi de 42,99, altamente significativo, indicando que a pigmentação antociânica dos estolões é influenciada pelas classes apresentadas.

Tabela 54. Frequência da característica pigmentação antociânica dos estolões, média (5) ou forte (7), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos, e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Genótipo	Subcultivo	Pigmentação antociânica dos estolões		Soma
		5	7	
Aromas	3	36	27	63
	12	14	40	54
Camarosa	3	12	47	59
	12	25	35	60
Camino Real	3	27	30	57
	12	42	17	59
Soma		156	196	352

$$\chi^2 = 42,99^{**}$$

A tabela 55 mostra as frequências da característica pigmentação antociânica dos estolões para as três cultivares. Nota-se que a cv. Camarosa apresenta uma distribuição diferente das cultivares Aromas e Camino Real o que foi corroborado com o valor de χ^2 de 19,36, altamente significativo, indicando que a pigmentação antociânica dos estolões variou entre as cultivares.

Tabela 55. Frequência da característica pigmentação antociânica dos estolões, média (5) ou forte (7), para os genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Genótipo	Pigmentação antociânica dos estolões		Soma
	5	7	
Aromas	50	67	117
Camarosa	37	82	119
Camino Real	69	47	116
Soma	156	196	352

$$\chi^2 = 19,36^{**}$$

A tabela 56 mostra a frequência da característica pigmentação antociânica dos estolões para os dois níveis de subcultivos. O valor de χ^2 não foi significativo (0,86), o que permite afirmar que a distribuição das frequências da característica pigmentação antociânica dos estolões não variou entre o 3º e o 12º subcultivo.

Tabela 56. Frequência da característica pigmentação antociânica dos estolões, média (5) ou forte (7), para os subcultivos três e doze e o valor correspondente de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivo	Pigmentação antociânica dos estolões		Soma
	5	7	
3	75	104	179
12	81	92	173
Soma	156	196	352

$\chi^2 = 0,86$ ñs

A divisão das frequências para subcultivos dentro de cada cultivar e seus respectivos testes χ^2 apresentados na tabela 57 indicaram que houve uma variação significativa na frequência da pigmentação dos estolões entre os subcultivos três e doze para todas as cultivares avaliadas.

Tabela 57. Frequência da característica pigmentação antociânica dos estolões, média (5) ou forte (7), dentro dos genótipos Aromas, Camarosa e Camino Real, submetidos a três e doze subcultivos e os valores correspondentes de χ^2 . UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

Subcultivo	Genótipo								
	Aromas			Camarosa			Camino Real		
	5	7	Soma	5	7	Soma	5	7	Soma
3	36	27	63	12	47	59	27	30	57
12	14	40	54	25	35	60	42	17	59
Soma	50	67	117	37	82	119	69	47	116
	$\chi^2 = 11,58$ **			$\chi^2 = 6,32$ *			$\chi^2 = 6,82$ *		

Neste estudo, na avaliação a campo as três cultivares apresentaram diferentes repostas quanto às características quantitativas e qualitativas em relação ao número de subcultivos em que os clones foram submetidos, entretanto, não foram observadas plantas aberrantes ou anormais.

Embora as cultivares Camarosa e Camino Real tenham apresentado o maior número de características quantitativas com variação dentro de subcultivos, esta foi observada em plantas submetidas a três ciclos de subcultivos. Isso indica que é possível aumentar para doze ciclos de subcultivos o que possibilitaria a obtenção de um maior número de mudas micropropagadas apresentando menor variação. O mesmo resultado não foi observado para a cultivar Aromas que, embora tenha sido mais estável, apresentando um menor número de características quantitativas com variação dentro de subcultivos, as maiores variações foram observadas em plantas submetidas a doze ciclos de subcultivos.

Para algumas das características qualitativas avaliadas observou-se grande número de variações significativas na distribuição de frequências nas classes apresentadas. Algumas características apresentaram alta variabilidade dentro da cultivar, no entanto, entre os dois níveis de subcultivos, não foi observada variação na distribuição de frequências. Isso indica que não houve influência do número de subcultivos para essas classes.

De acordo com Nielsen & Lovell (2000), a variabilidade observada a nível morfológico pode ser causada pelo hábito de crescimento clonal do morango. Além disso, os clones de muitas espécies têm um alto nível de plasticidade morfológica em resposta às condições ambientais (DE KROONS & HUTCHINGS, 1995). De acordo com Preece (2008), sabe-se que diferentes genótipos muitas vezes não respondem da mesma forma, mesmo quando cultivados no mesmo meio.

Larkin (1987) relatou uma grande variabilidade entre plantas regeneradas de uma mesma espécie. Diferenças dentro de uma mesma espécie foram descritas entre variedades de trigo de inverno e de primavera (GALIBA *et al.*, 1985).

Segundo Nielsen & Lovell (2000), a natureza octoplóide de plantas de morango fornece uma enorme fonte de possíveis variações. No trabalho de Ramuluet *al.* (1983), foi verificada uma ampla gama de variação fenotípica entre plantas tetraplóides de batata cultivar Bintje derivadas de protoplastos. As plantas variantes apresentaram alterações no crescimento e vigor, nas folhas e nas características da haste. Segundo estes mesmos autores, a ocorrência de mixoploidia indica que, pelo menos parte da variação observada surgiu durante o estágio da cultura.

Gaafar & Saker (2006), estudaram plantas de morangueiro derivadas de cultura de tecidos e observaram pequenas variações na morfologia foliar de alguns clones regenerados, embora os perfis de RAPD desenvolvidos dos diferentes clones micropropagados foram semelhantes ao da planta mãe, indicando alta estabilidade genética dentro de cada cultivar submetida à cultura de tecidos.

Segundo Margherita *et al.* (1996), os desvios do fenótipo original (morfologia da folha, hábito da planta e demora na floração) poderiam persistir por diferentes ciclos de cultivo ou serem observados apenas no primeiro ciclo de cultura (no vigor da planta e alta porcentagem de folhas aberrantes). Mesmo em casos onde variação somaclonal tem ocorrido a altas frequências e mudanças têm sido observadas em uma ampla gama de caracteres, alguns caracteres não variam. Isto significa que não há garantia de que quaisquer caracteres de interesse específico irão variar entre os soma clones (KARP, 1994).

5. CONCLUSÕES

- Com doze ciclos de subcultivos *in vitro* de plantas de morangueiro, das cultivares Aromas, Camarosa e Camino Real, é possível obter mudas em larga escala, sem que ocorra a perda da identidade genética dos clones submetidos a este processo;
- A cultivar Camarosa apresentou valores médios superiores para altura da parte aérea após a fase de aclimatização e a campo e, massas fresca e seca da parte aérea, quando submetida a doze ciclos de subcultivos;
- As cultivares Camarosa e Camino Real apresentaram maior número de características quantitativas com variação, sendo as maiores variações observadas em plantas submetidas a três ciclos de subcultivos;
- A cultivar Camino Real seguida da ‘Camarosa’ apresentaram um maior número de características qualitativas com variação na distribuição das frequências entre os dois níveis de subcultivos;
- A cultivar Aromas apresentou uma maior estabilidade genética em relação às características quantitativas e qualitativas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMMIRATO, P. V. Control and expression of morphogenesis in culture. In: WITHERS, L. A.; ALDERSON, P. G. Plant tissue culture and its agricultural applications. London: Butterwoths, Cap. 2. p. 23-45, 1986.
- ARRUDA, A. S.; FIGUEIRA, E. R.; SILVA, A. S.; LONDE, L. N.; SOUZA, G. F. M. V.; SPINI, V. B. M. G.; SOUSA, C. S.; KERR, W. E.; GOULART, L. R. Variação genômica intraclonal de explantes de morango em ambiente protegido. Bioscience, v. 22, n. 1, p. 119-124, 2006.
- BAIRU, M. W.; FENNELL, C. W.; STADEN, J. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (Musa AAA cv. 'Zelig'). Scientia Horticulturae, 108, 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).
- BHATT, I. D.; DHAR, U. Micropropagation of Indian wild strawberry. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 60: 83–88, 2000.
- BOXUS, P. Micropropagation of strawberry via axillary shoot proliferation. In: Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology, Vol. 111. Ed. HALL, R. D., 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.
- BRAHM, R. U.; UENO B.; OLIVEIRA R. P. Reação de cultivares de morangueiro ao oídio sob condições de casa de vegetação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 219-221, 2005.
- BROWERS, M. A.; ORTON, T. J. A factorial study of chromosomal variability of callus cultures of celery (*Apium graveolens*). Plant Sci. Lett., 26: 65-69, 1982.
- BRUNELLO, A. E. M. Clonagem - Variação Somaclonal em frutíferas perenes. 2002. Disponível em: <http://www.ufv.br/dbg/BIO240/C017.htm>. Acesso em: 12 fev. 2010.
- CALVETE, E. O.; KÄMPF, A. N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. Horticultura Brasileira, v. 20, n. 2, 2002.
- 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 64, p. 145–157, 2001.
- CENCI, S. A. Para reduzir perdas com o morango. Revista Frutas e Derivados, Ano 3, Edição 11. 2008. Disponível em:

http://www.todafruta.com.br/todafruta/mostra_conteudo.asp?conteudo=18262.

Acesso em: 27 nov. 2009.

CONTI, J. H.; MINAMI, K.; GOMES, L. H.; TAVARES, F. C. A. Estimativa da similaridade genética e identificação de cultivares de morangueiro por análise de RAPD. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 2, p. 145-152, 2002a.

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

D' AMATO, F. Cytogenetics of differentiation in tissue and cell cultures. In REINERT, J., AND BAJAJ, Y. P. S. (eds.) *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cells, Tissue and Organ Culture*, Springer-Verlag, Berlin, p. 343-356. 1977.

D' AMATO, F. Spontaneous mutations and somaclonal variation; in: *Nuclear techniques and in vitro culture for plant improvement*, International Atomic Energy Commision, Vienna, Austria, IAEA282/65 publication, p. 3-10.1986.

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.* 461, p. 157-164. 1998

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

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 xananassa* Duch.) based on AFLPs, RAPDs, and pedigree data. *Euphytica*, 117:1-12, 2001.

DE KROONS, H.; HUTCHINGS, M. J. Morphological plasticity in clonal plants: the foraging concept reconsidered. *J. Ecol.*, 83: 143-152. 1995.

DIAS, M. S. C.; COSTA, H.; CANUTO, R. S. Manejo de doenças do morangueiro. **Informe Agropecuário**. Morango: conquistando novas fronteiras, Belo Horizonte, v.28, n.236, p.64-77, jan./fev. 2007.

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

EVANS, D. A.; BRAVO, J. E. Phenotypic and genotypic stability of tissue culture plants. In: ZIMMERMAN, R.H.; GRIESBACH, I. L.; HAMMERSCHLAG, F.A.; LAWSON, R.H. (Eds) *Tissue Culture as a Plant Production System for Horticultural Crops*. pp 73-94. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 1986.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. [FAOSTAT-Agriculture](http://faostat.fao.org). Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>.

Acesso em: 04 jan. 2010.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores RAPD e RFLP em Análise Genética**. EMBRAPA – CENARGEM. 220 pp. 1995.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura**. Viçosa: UFV, 402 p. 2000.

FILGUEIRA, F. A. R. Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças – 3ª ed. rev. e ampl. – ed. Viçosa, Viçosa, MG. 421 p. Rosáceas: Morango, um frutinho rasteiro, 387-393. 2007.

FLORES, R.; GOMES, P. R.; FARIA, J. T. C.; CENTELLAS, A. Q.; FORTES G. R. de L.; PETERS, J. A. Calogênese *in vitro* de duas cultivares de morangueiro (*Fragaria x ananassa*) a partir de discos foliares. Rev. Bras. de Agrociência, v.4, no 1, p. 09-14, 1998.

GAAFAR, R. M.; SAKER, M. M. Monitoring of Cultivars Identity and Genetic Stability in Strawberry Varieties Grown in Egypt. World Journal of Agricultural Sciences 2 (1): 29-36, 2006.

GALIBA, G.; KERTESZ, Z.; SULKA, J.; SAGI, L. Differences in somaclonal variation in three winter wheat *Triticum aestivum* varieties. Cereals Research Communications, V. 13, p. 342-350, 1985.

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**, 9, p.1625 – 1637. 2000.

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: SPL, v.1, p.183-260, 1998.

GOMIDE, D. G. Influência do número de subcultivos na multiplicação *in vitro* e na aclimatização de plantas micropropagadas de morangueiro. 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, Vol 3, 549-567, 1986.

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

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

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.), Proceedings of the International Workshop on *in vitro* Conservation of Plant Genetic

Resources. Plant Biotechnology Laboratory University Kebangsaan, Kuala Lumpur Malaysia, p. 135–168. 1996.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, 108: 105–120, 2006.

IBGE Censo. Disponível em:

<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=818&z=p&o=2&i=P>. Acesso em: 6 jan. 2010.

ILLG, R. D. Variação somaclonal. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (eds). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCTP / Embrapa – CNPH, p. 287– 295, 1990.

JAIN, S. M. Micropropagation of selected somaclones of *Begonia* and *Saintpaulia*. *J. Biosci*, v. 22, n. 5, p. 585-592, 1997.

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*, p. 218–232, CCSHAU, Hissar & MMB, New Delhi, India. 1998.

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

KARP, A. Can genetic instability be controlled in plant tissue cultures? *IAPTC Newsletter*, 58: 2-11, 1989.

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.139-151, 1994.

KRAUSS, S. K. Accurate genetic diversity estimates from amplified fragment length polymorphism. **Molecular Ecology**, 9, pp. 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*, 35, p. 254-258, 1999.

LARKIN, P. J.; SCOWCROFT, W. R. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60, p.197-214, 1981.

LARKIN, P. J. Somaclonal variation, history, method and meaning. *Iowa State Journal of Research*, v. 61, p. 122-128, 1987.

LÓPEZ-ARANDA, J. M.; PLIEGO-ALFARO, F.; LÓPEZ-NAVIDAD, I.; BRACELÓ-MUÑOZ, M. Micropropagation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). Effect of minerlas salts, benzyladenine levels and number of subcultures on the *in vitro* and field behaviour of the obtained microplants and the fruiting capacity of their progeny. *Journal of Horticultural Science*, n. 69, v. 4, p. 625-637, 1994.

MADAIL, J. C. M.; ANTUNES, L. E.; BELARMINO, L. C.; SILVA, B.A.; GARDIN, J. A. Avaliação Econômica dos Sistemas de Produção de Morango: Convencional, Integrado e Orgânico. Pelotas, RS. Comunicado Técnico, 181, dezembro, 2007.

MARGHERITA, B.; GIAMPIERO, C; PIERRE, D. Field performance of tissue-cultured plants of *Ranunculus asiaticus* L. Scientia Horticulturae, v. 66, Issues 3-4, October, p. 229-239, 1996.

MERCADO, J. A.; MANSOURI, I. El; JIMÉNEZ-BERMÚDEZ, S.; PLIEGO-ALFARO, F.; QUESADA, M. A. A convenient protocol for extraction and purification of DNA from *Fragaria*. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant, 35, p. 152-153, 1999.

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

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade aplicada às cultivares de morangueiro Diário Oficial da União de 14 de fevereiro de 2003, seção 1, páginas 5 e 6.

MIRANDA, F.; FERNANDES, T. D. Manual de boas práticas: Morango. Escola Superior de Biotecnologia, Porto - U.C.P. 31 p. 2001.
Disponível em: http://www.esb.ucp.pt/twt/disqual/pdfs/disqual_morango.pdf

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. 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*, 29: 257-268, 1992.

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*, 76, p. 107-115, 1994.

NIELSEN, J. A.; LOVELL, P. H. Value of morphological characters for cultivar identification in strawberry (*Fragaria x ananassa*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, Vol. 28: 89-96, 2000.

NUNES T. H. L. e produtores. Jornal do Comércio. “Produzir morangos é viável para pequenos”. Data Inclusão: 11/01/2007. [On line] Disponível na Internet via: http://www.sebrae-sc.com.br/novos_destaque/opportunidade/default.asp?materia=13320
Arquivo consultado em 12 de julho de 2008.

OLIVEIRA, R. P.; NINO, A. F. P.; SILVA, F. O. X.; BRAHM R. U. Produção de Matrizes de Morangueiro por meio de Cultura de Tecidos. Pelotas: [Embrapa Clima Temperado](#), 2005. 34 p. (Sistemas de Produção, 7).

OLIVEIRA R. P.; SCIVITTARO, W. B. Desempenho produtivo de mudas nacionais e importadas de morangueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 28, n. 3, p. 520-522, 2006.

OLIVEIRA R. P.; SCIVITTARO, W. B.; CASTRO L. A. S. Novas Cultivares de Morangueiro para a Região de Pelotas. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. 22 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 55).

ORTON, T. J. Genetic instability during embryogenic cloning of celery. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 4: 159-169, 1985.

PAGOT, E.; HOFFMANN, A. Produção de pequenas frutas no Brasil: origem e difusão. Pág. 7-15. SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS (1.: 2003 : Vacaria, RS). Anais.../ Editado por Alexandre Hoffmann, Sandra de Souza Sebben. – Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 64p. - (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 37). 2003.

PASSOS, F. A.; GRIDI-PAPP, I. L.; CAMARGO, C. E. O.; CHIAVEGATO, E. J.; DALL'ORTO, F. A. C.; NAGAI, H.; de GODOY, I. J.; FAZUOLI, L. C.; VEIGA, R. F. A. Descritores mínimos para o registro institucional de cultivares: MORANGO. Campinas: IAC, 1994. 8 p. (IAC Documentos, 40).

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**, 163: 1071-1079, 2006.

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

POLANCO, C.; RUIZ, M. L. AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants. **Plant Science**, 162: 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**, 88: 1-10, 2007.

PREECE, J. Stock Plant Physiological Factors Affecting Growth and Morphogenesis. E. F. GEORGE *et al.* (eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture* 3rd Edition, 403–422. 2008.

RAMULU, K. S.; DIJKHUIS, P.; ROEST, S. Phenotypic variation and ploidy level of plants regenerated from protoplasts of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L. cv. 'Bintje'). *Theor Appl Genet*, 65, p. 329-338, 1983.

RANCILLAC, M.; NOURRISEAU, J. G.; NAVATEL, J. C.; ROUDEILLAC, P. Incidence de la multiplication *in vitro* sur le comportement du plant de fraisier en

France. In: BOXUS, P. and LARVOR, 83 p. Eds. *In vitro* culture of strawberry plants. Cesena: Commission of the European Communities, p. 55-73. 1987.

RANCILLAC, N. J.; NOURRISSEAU, J. G. Micropropagation and strawberry plant quality; *Acta Horticulturae*.265: 123-128. 1989.

RANI, V.; RAINA, S. N. Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: A critical reappraisal. *In Vitro Cell. Dev. Biol.–Plant*, 36: 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.

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.

SHEIDAI, M.; AMINPOOR, H.; NOORMOHAMMADI, Z.; FARAHANI, F. RAPD analysis of somaclonal variation in banana (*Musaacuminata* L.) cultivar Valery. *Acta Biologica Szegediensis*, v. 52, n. 2, p.307-311. 2008.

SILVA, A. F.; DIAS, M. S. C.; MARO, L. A. C. Botânica e fisiologia do morangueiro. **Informe Agropecuário**. Morango: conquistando novas fronteiras, Belo Horizonte, v.28, n.236, p.7-13, jan./fev. 2007.

SOUSA, C. M. Otimização de protocolos para a propagação *in vitro* de gérbera (*Gerbera jamesonii*). 75 p. Dissertação (Mestrado Fitotecnia/Produção Vegetal) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2005

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. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, p. 11-35, 2006a.

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. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, p. 38-50, 2006b.

SPECHT, S.; BLUME, R. Competitividade e segmento de mercado à cadeia do Morango: Algumas evidências sobre o panorama Mundial e Brasileiro. In: 47º CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL. Anais eletrônicos...Porto Alegre, 2009. Disponível em: <http://www.sober.org.br/palestra/13/1245.pdf>. Acesso em: 27 nov. 2009.

SREEDHAR, R. V.; VENKATACHALAM, L.; NEELWARNE, B. Hyperhydricity-Related Morphologic and Biochemical Changes in Vanilla (*Vanilla planifolia*). *Journal Plant Growth Regulator*, 28: 46–57, 2009.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. New York: Mc-Graw Hill, 633 p., 1981.

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

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

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

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

VIDAL, H. R.; CORSO, F.; OLIVEIRA, A. E.; NIESING, P.; OTTO, R. F. Caracterização morfológica de quatro cultivares de morangueiro para a região de Ponta Grossa, PR. In: Resumos / III Simpósio Nacional do Morango e II Encontro Sobre Pequenas Frutas e Frutas Nativas do MERCOSUL / Eds. ANTUNES, L. E. C.; RASEIRA, M. C. B.; PEREIRA, J. F. M. - Pelotas: Embrapa Clima Temperado. 291 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 203). 2007.

VIEITEZ, A. M.; BALLESTER, A.; SAN-JOSE, M. C.; VIEITEZ, E. Anatomical and chemical studies of vitrified shoots of chestnut regenerated *in vitro*. **Physiol. Plant.** 65, 177-184. 1985.

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. (Lond.)**, 40: 333-338, 1976.