

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**MICROPROPAGAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO DE
PLÂNTULAS DE MORANGUEIRO DO CLONE IVAHÉ**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carlos Evandro Leite Ritter

**Santa Maria, RS, Brasil
2009**

MICROPROPAGAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS DE MORANGUEIRO DO CLONE IVAHÉ

por

Carlos Evandro Leite Ritter

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agronomia.**

Orientador: Prof. Jerônimo Luiz Andriolo

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**MICROPROPAGAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS
DE MORANGUEIRO DO CLONE IVAHÉ**

elaborada por
Carlos Evandro Leite Ritter

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Agronomia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Jerônimo Luiz Andriolo, Dr.
(Presidente/Orientador)

Dilson Antônio Bisognin, Ph.D. (UFSM)

Gustavo Gimenez Franquez, Dr. (INIA, Uruguai)

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2009

Aos meus pais Carlos Roberto Camargo
Ritter (*In Memoriam*) e Suzete Maria Leite
Ritter, ao meu irmão Eduardo Leite Ritter,

Dedico...

AGRADECIMENTOS

Ao professor Jerônimo Luiz Andriolo, pela orientação, amizade e pela colaboração fundamental no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dilson Antônio Bisognin, pela orientação durante a graduação, confiança e amizade, além da essencial contribuição para minha dissertação pela orientação nos trabalhos de laboratório e aclimatização.

Ao professor Nereu Augusto Streck, pela co-orientação, amizade e incentivo na iniciação científica.

Aos demais professores do Departamento de Fitotecnia, pela atenção e amizade.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade da realização do curso de mestrado.

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

A todos os colegas e amigos do Departamento de Fitotecnia, em especial aos bolsistas dos setores de Genética e Melhoramento de Batata, pelo apoio, convívio e amizade.

Obrigado !

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

MICROPROPAGAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO DE PLÂNTULAS DE MORANGUEIRO DO CLONE IVAHÉ

AUTOR: Carlos Evandro Leite Ritter
ORIENTADOR: Jerônimo Luiz Andriolo

Local e data da Defesa: Santa Maria, 27 de fevereiro de 2009

Este trabalho teve como objetivos testar diferentes concentrações de sais e de sacarose no meio de cultura e sistemas de aclimatização para a produção de mudas matrizes de morangueiro. Foi conduzido um experimento no Laboratório de Melhoramento e Propagação Vegetativa de Plantas e dois em abrigo telado, no Departamento de Fitotecnia da UFSM, entre fevereiro e novembro de 2008. No primeiro experimento, foram comparadas as concentrações de sacarose de 15, 30, 45 e 60g/L e de sais de $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$ e 1 MS, em esquema fatorial 3x4 no delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições de cinco plântulas. Foram realizadas duas avaliações, uma na saída das plântulas do laboratório e outra após a aclimatização. Na primeira avaliação foi determinada a sobrevivência de plântulas, altura da parte aérea, número de raízes, comprimento da maior raiz e número de folhas. Na segunda avaliação essas determinações foram repetidas e foi também determinada a matéria seca de planta. No segundo experimento, foi determinado o efeito das concentrações de sais e sacarose no crescimento inicial das plantas matrizes. Foram utilizadas seis plântulas de cada concentração de meio empregadas no experimento anterior. Foi determinado o número de dias do transplante ao início do estolonamento, o número de folhas, número de estolões, diâmetro da coroa e matéria seca de plantas 30 dias após a aclimatização. No terceiro experimento, foram comparados os sistemas de aclimatização constituídos por bandejas alveoladas de poliestireno de 128 células com substrato orgânico, bandejas não alveoladas de polietileno com areia e bandejas não alveoladas com uma placa de poliestireno flutuante na solução nutritiva. O delineamento inteiramente casualizado foi empregado, com quatro repetições de 10 plântulas. Foi determinada a sobrevivência de plântulas, altura da parte aérea, número de raízes, comprimento da maior raiz, número de folhas e matéria seca de parte aérea e de raízes. No primeiro experimento, na primeira avaliação somente o número de folhas mostrou diferença significativa, sendo mais elevado na concentração 1 MS. Na segunda avaliação, a altura da parte aérea foi maior na concentração 1 MS, sem diferença de $\frac{3}{4}$ MS. No segundo experimento, o comprimento da maior raiz foi superior no tratamento $\frac{3}{4}$ MS, que não diferiu de $\frac{1}{2}$ MS. A matéria seca e o número de folhas das plantas matrizes foram superiores quando as plântulas foram enraizadas na concentração de sacarose de 45g/L e 1 MS de sais. Com relação aos sistemas de aclimatização, a altura da parte aérea e o número de folhas foram mais elevados no sistema de aclimatização em bandejas alveoladas com substrato, enquanto a matéria seca da parte aérea e das raízes foram superiores no sistema de bandejas não alveoladas com areia. Concluiu-se que para o clone Ivahé, a concentração de sais pode ser reduzida de 1 MS para $\frac{3}{4}$ MS e que a concentração de sacarose pode ser aumentada de 30 g/L para 45 g/L. Quanto aos sistemas de aclimatização, as bandejas alveoladas de poliestireno com substrato orgânico e as bandejas não alveoladas de polietileno com areia podem ser empregadas para aclimatizar plântulas do clone Ivahé.

Palavras-chave: Viveiros, propagação, cultivo sem solo, *Fragaria x ananassa*, meio de cultura *in vitro*, substrato.

ABSTRACT

Master's Thesis
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

MICROPROPAGATION AND ACCLIMATIZING OF STRAWBERRY PLANTLETS, CLONE IVAHÉ

AUTHOR: Carlos Evandro Leite Ritter

ADVISOR: Jerônimo Luiz Andriolo

Location and date of presentation: Santa Maria, February 27, 2009

The objectives of this work were to test different salt and sucrose concentrations in the *in vitro* medium and acclimatizing systems for production of strawberry stock plants. One experiment was conducted at the Breeding and Plant Propagation Laboratory and two experiments inside a screen house at the Department of Fitotecnia – UFSM, from February to October, 2008. In the first experiment, sucrose 15; 30; 45 and 60g/L and salt $\frac{1}{2}$; $\frac{3}{4}$ and 1 MS concentrations were compared, in a 3x4 factorial randomized experimental design, with five replications of five plantlets. Two evaluations were made, the first after plantlets were extracted from the *in vitro* medium and the second at the end of the acclimatizing period. In the first evaluation, the rate of survival, shoot height, number of roots, length of the bigger root and number of leaves of plantlets were determined. In the second evaluation, the same evaluations were done and also dry matter. In the second experiment, the effect of sucrose and salt concentrations on initial growth of stock plants was determined. Six plantlets of each *in vitro* medium of the previous experiment were used. The number of days from planting to the beginning of the stolon emission period, number of leaves and stolons, crown diameter and dry matter were determined 30 days after the acclimatizing period. In the third experiment, the acclimatizing systems made up by 128 cells polystyrene trays using organic substrate, polyethylene trays filled with sand and polyethylene trays filled with nutrient solution upon that plantlets floated were compared. The entirely randomized experimental design was used, with four replications of 10 plantlets. The rate of survival, shoot height, number of roots, length of the bigger root, number of leaves and shoot and root dry mass were determined. At the first evaluation of the first experiment, only number of leaves differed significantly, being higher in the 1 MS concentration. At the second evaluation, shoot height was higher in 1 MS, without difference from $\frac{3}{4}$ MS concentration. At the second experiment, the length of the bigger root was higher in $\frac{3}{4}$ MS, which did not differ from $\frac{1}{2}$ MS. Dry matter and number of leaves of stock plants were higher by rooting plantlets in the 45 g/L sucrose and 1 MS salt concentrations. About acclimatizing systems, shoot height and number of leaves were higher in the 128 cells polystyrene trays using organic substrate while shoot and root dry matter were higher in the polyethylene trays filled with sand. It was concluded that for the clone Ivahé, the salt concentration may be reduced from 1 MS to $\frac{3}{4}$ MS and sucrose may be increased from 30 g/L to 45 g/L. About acclimatizing systems, the 128 cells polystyrene trays using organic substrate and the polyethylene trays filled with sand may be either used for acclimatizing plantlets of the Ivahé strawberry clone.

Key words: Nurseries, propagation, soilless cultivation, *Fragaria x ananassa*, *in vitro* growing media, substrate.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Sistema de aclimatização de plântulas de morangueiro em bandejas não alveoladas de polietileno com areia. Santa Maria, UFSM, 2008.....	21
FIGURA 2 - Sistema de aclimatização de plântulas de morangueiro em bandejas não alveoladas com uma placa de poliestireno flutuante na solução nutritiva. Santa Maria, UFSM, 2008.....	21

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Efeito dos sais do meio de enraizamento antes da aclimatização (I) e no final da aclimatização (F) no número de folhas (NF), altura da parte aérea (AP) e no comprimento da maior raiz (CR) das plântulas. Santa Maria, UFSM, 2008.	24
TABELA 2 – Efeito dos sais do meio de enraizamento 30 dias após aclimatização na matéria seca de plantas (MS) matrizes de morangueiro do clone Ivahé. Santa Maria, UFSM, 2008.....	26
TABELA 3 – Efeito da sacarose do meio de enraizamento 30 dias após aclimatização no número de folhas e matéria seca de plantas (MS) em plantas de morangueiro do clone Ivahé. Santa Maria, UFSM, 2008.....	26
TABELA 4 - Matéria seca da parte aérea e matéria seca das raízes de plântulas de morangueiro para aclimatização em dois substratos no mês de fevereiro de 2008. Santa Maria, UFSM, 2008.....	27
TABELA 5 - Número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR), matéria seca da parte aérea (MSPA) e matéria seca das raízes (MSR) de plântulas de morangueiro do clone Ivahé para a aclimatização em dois substratos no mês de junho de 2008. Santa Maria, UFSM, 2008.....	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Cultura do morangueiro.....	12
2.2 Micropropagação.....	12
2.3 Adaptações das plantas às condições <i>in vitro</i>	15
2.4 Aclimatização.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Micropropagação e aclimatização de plântulas de morangueiro sob diferentes concentrações de sais e de sacarose do meio MS.....	18
3.2 Crescimento inicial das plantas matrizes.....	19
3.3 Sistemas de aclimatização e seu efeito na taxa de sobrevivência e crescimento.....	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 Micropropagação e aclimatização de plântulas de morangueiro sob diferentes concentrações de sais e de sacarose do meio MS.....	23
4.2 Crescimento inicial das plantas matrizes.....	25
4.3 Sistemas de aclimatização e seu efeito na taxa de sobrevivência e crescimento.....	27
5. CONCLUSÕES	30
6. REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

No mundo, a produção de morangos é de 3,1 milhões de toneladas por ano, sendo que Estados Unidos (740800t; 41t ha⁻¹), Espanha (306000t; 38t ha⁻¹), Japão (200000t; 25t ha⁻¹) são os maiores produtores em volume de produção e produtividade respectivamente. No Brasil, a produção está em torno de 40 mil toneladas anuais sendo os estados de Minas Gerais (32,3%), São Paulo (31,4%), e Rio Grande do Sul (16,5%) os principais produtores com uma produtividade média de 25t ha⁻¹(SANTOS; MEDEIROS, 2003). As propriedades que se dedicam ao cultivo desta fruta são em sua grande maioria propriedades familiares, com área cultivada de 0,5 a 1,0ha, devido a alta exigência em mão-de-obra para a condução da cultura (BRAHM; OLIVEIRA, 2004; REICHERT; MADAIL, 2003). No Rio Grande do Sul, destaca-se como principal região de produção o Vale do Rio Caí, seguido da região serrana com uma produtividade média de 35t ha⁻¹ (ANTUNES; DUARTE FILHO, 2003). O maior atrativo que a cultura do morangueiro vem despertando está relacionado a sua maior rentabilidade (224%) em relação a outras culturas como o milho (72%) e a soja (2%) (RONQUE, 1998).

A muda é um dos principais insumos da lavoura do morangueiro, estando diretamente relacionada com a produtividade e a qualidade, sendo um ponto fundamental para a obtenção de uma melhor resposta às tecnologias empregadas (OLIVEIRA; SCIVITTARO 2006). Um dos principais entraves para o aumento da produtividade das lavouras de morangueiro no Brasil é o preço das mudas. Em sua maioria são importadas do Chile e da Argentina. As mudas locais são de baixa qualidade fisiológica e fitossanitária e não atingem o padrão de certificação. Além disso, muitos produtores consideram o potencial de produção das mudas importadas maior, havendo controvérsias a esse respeito (OLIVEIRA et al., 2005).

Em plantas de propagação vegetativa a produção de mudas comerciais com comprovada origem genética e com elevada qualidade fisiológica e fitossanitária deve ser feita partir da produção de mudas matrizes pela cultura de tecidos (BISOGNIN, 2007). Apesar da grande importância das mudas na implantação de um cultivo de morangueiro, pouca importância tem sido dada a pesquisas nessa fase (TESSARIOLI, 2003). Este trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento de

tecnologias para a micropropagação e a aclimatização de plântulas para a produção de mudas matrizes de morangueiro de alta qualidade fisiológica. Os objetivos específicos foram:

- Determinar o efeito de diferentes concentrações no meio de enraizamento na taxa de sobrevivência, na aclimatização e no crescimento inicial das plantas matrizes;
- Comparar substratos e sistemas de aclimatização das plântulas e seu efeito na taxa de sobrevivência e crescimento das mudas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultura do morangueiro

O morangueiro *Fragaria x ananassa Duch* pertence à família Rosaceae, sendo a única hortaliça cultivada desta família. O morangueiro hoje cultivado originou-se do cruzamento das espécies *Fragaria virginiana* e *Fragaria chiloensis*, oriundas respectivamente, da América do Norte e do Chile (MEZZALIRA, 1986).

A planta é propagada comercialmente pelo plantio de estolões, emitidos pela planta matriz, em condições de temperaturas elevadas e dias longos. Muitos produtores utilizam os estolões das plantas que produziram frutos no ano anterior. No entanto essas mudas serão menos produtivas, devido à ocorrência de viroses e doenças radiculares. Por isso, é necessária a substituição anual das lavouras por mudas compradas junto à viveiristas especializados (FILGUEIRA, 2000).

As mudas representam um dos itens que mais onera o custo de produção da lavoura do morangueiro. No Rio Grande do Sul, esse custo é estimado em 9 até 30% do custo total dependendo do nível tecnológico adotado (EMBRAPA, 2003). Para se obter elevadas produtividades e alta qualidade de frutos é indispensável à produção de mudas com origem genética conhecida e alta qualidade fisiológica e fitossanitária (BISOGNIN, 2007). Essa produção passa por várias etapas: propagação das plantas básicas mantidas em jardim clonal, coleta dos explantes, estabelecimento e multiplicação dos explantes *in vitro*, enraizamento e aclimatização das mudas matrizes e propagação das mudas matrizes (BISOGNIN, 2007).

2.2 Micropropagação

A técnica da cultura de tecidos baseia-se na totipotência que é o princípio em que os seres têm a capacidade de regenerar organismos inteiros, idênticos à célula doadora, a partir de células únicas (ALVES et al., 2008). Uma das principais aplicações da cultura de tecidos é a propagação fiel de um genótipo. A propagação *in vitro* é também denominada de micropropagação devido ao tamanho dos

propágulos utilizados, sendo a aplicação mais prática da cultura de tecidos e também aquela de maior impacto (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

As principais etapas no processo de propagação *in vitro* são as seguintes (MURASHIGE, 1977):

Estágio I – seleção de explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas;

Estágio II – multiplicação dos propágulos mediante sucessivas sub-culturas em meio próprio para a multiplicação;

Estágio III – transferência das partes aéreas multiplicadas para meio de enraizamento e subsequente transplante das plântulas obtidas para substrato ou solo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O primeiro passo da micropropagação é a extração dos meristemas das plantas básicas mantidas em jardim clonal. Meristemas apicais são tecidos que têm a capacidade de permanecer em estado embrionário. Após alterações morfogénéticas, esses tecidos têm a capacidade de se diferenciar em outros tecidos especializados como raízes, caules e folhas (CUTTER, 1978; CLARK, 1997).

O protocolo que vem sendo adotado pelos laboratórios que fazem a micropropagação do morangueiro é aquele indicado pela EMBRAPA (2007). Para a extração dos meristemas são selecionadas as melhores plantas com base no vigor e na sanidade. São retiradas as pontas dos estolões na base da coroa com o auxílio de um bisturi, as quais são acomodadas em uma caixa gerbox para evitar contaminações e desidratação. A extração deve ser feita no início da manhã ou no final da tarde, no máximo doze horas antes da desinfestação.

A primeira etapa a ser seguida logo após a chegada das pontas de estolões no laboratório é uma pré-desinfestação. Devem ser lavadas em água corrente e os primórdios foliares externos retirados. O próximo passo é a desinfestação, que consiste em mergulhá-las em uma solução de álcool 70%, por 15 s e em seguida em solução de hipoclorito de sódio 1%, por mais 10 min. Após esta desinfestação, são levadas para o interior de uma câmara de fluxo laminar, onde os estolões são lavados novamente com água destilada autoclavada, por três vezes, para remoção dos resíduos de cloro.

Após a remoção do excesso de cloro procede-se a extração dos meristemas no interior de câmara de fluxo laminar, com a utilização de pinça e bisturi e de uma lupa estereoscópica. O trabalho de extração dos meristemas deve ser feito sobre uma placa de Petri, para diminuir os riscos de contaminação. As placas de Petri, as pinças e os bisturis devem ser previamente esterilizadas em autoclave por 40 min, na pressão de 98 MPa e temperatura de 120⁰ C.

O tamanho dos explantes é um dos principais fatores determinantes do sucesso no estabelecimento. Quanto menor for o explante, maiores são as chances de se obter uma planta livre de patógenos, mas menores são as chances de estabelecimento. Recomenda-se empregar meristemas com tamanho próximo de 0,2 mm (MURASHIGE, 1977).

Após a extração, os explantes devem ser inoculados, o mais rápido possível, em tubos de ensaio contendo meio de cultura, para minimizar os riscos de contaminação. O meio utilizado geralmente é o MS acrescido de BAP (6-benzilaminopurina), GA3 (ácido giberélico) e ANA (ácido naftalenoacético). Os explantes são mantidos na obscuridade por 48 horas, para minimizar a oxidação. Em seguida permanecem por 28 a 30 dias sob luz artificial na câmara de crescimento.

A etapa seguinte é a multiplicação dos explantes que tem como objetivo obter um número de plantas suficiente para a propagação das mudas, quando os explantes estabelecidos na etapa anterior são repicados para um meio de multiplicação que contém os sais do meio MS suplementados com BAP. Os explantes devem apresentar tamanho entre 2 a 3 mm, contendo de 2 a 3 gemas. Recomenda-se que sejam feitas no máximo cinco subculturas de 20 a 30 dias devido ao risco de indução de variação somaclonal.

A última etapa a ser realizada no laboratório é a transferência para o meio de enraizamento, com o objetivo de individualizar as plantas para que ocorra o alongamento e emissão das raízes. Nessa etapa formam-se raízes adventícias nas partes aéreas advindas da multiplicação o que vai permitir a transferência do material para condições *ex vitro* (CALVETE et al., 2002). O meio de cultura utilizado na etapa de enraizamento é o MS, sem adição de reguladores de crescimento. Após quatro semanas de cultivo nesse meio as plântulas devem atingir altura maior do que 30 mm (EMBRAPA, 2007).

Devido à baixa capacidade fotossintética das plantas *in vitro* é necessário adicionar ao meio de cultura uma fonte de carboidrato endógeno para suprir as necessidades metabólicas. Essa fonte é geralmente a sacarose (HAZARIKA, 2003). A concentração de sacarose e nutrientes no meio de cultura influencia os processos metabólicos do crescimento e da diferenciação das plântulas (MALDANER et al., 2007). Altas concentrações de sacarose aumentam as reservas de carboidratos nas folhas, causando um aumento na energia disponível na aclimatização, o que viria a aumentar a porcentagem de sobrevivência e a matéria seca, com maior desenvolvimento inicial das plântulas (SKREBSKI et al., 2004, CALVETE, 1998).

A concentração de sacarose no meio de enraizamento pode influenciar a aclimatização (DEBERGH, 1988). O efeito dessa concentração foi determinado no morangueiro por Calvete et al., (2002), indicando que a concentração de 45 g/L estimulou o desenvolvimento do sistema radicular. Quando essa concentração foi aumentada para 60 g/L ocorreu um aumento da matéria seca das plântulas. Em *Nepenthes biserrata*, ocorreu aumento no comprimento e diâmetro das folhas quando a concentração de sacarose foi aumentada de 15 g/L para 45 g/L, enquanto na ausência da sacarose houve inibição da regeneração de brotos e folhas (AMBROSIO; MELO, 2004). Cada espécie e cada clone de uma mesma espécie podem requerer uma concentração específica de meio de cultura (JONES, 1987; HAZARIKA, 2003).

2.3 Adaptações das plantas às condições *in vitro*

A plântula cultivada *in vitro* tem a morfogênese afetada, podendo levar a conseqüências negativas no crescimento e no desenvolvimento, tendo como resultado uma diminuição das taxas de estabelecimento e de multiplicação (CAMPOSTRINI; OTONI, 1996).

As plântulas oriundas da micropropagação apresentam variação em tamanho, forma e estágio de desenvolvimento (KOZAI; KITAYA, 1995). Essas plântulas apresentam pouca lignina, com células de paredes pouco espessadas, com abundância de espaços intercelulares, sistema vascular pouco desenvolvido e reduzida quantidade de esclerênquima e colênquima (DONNELLY et al., 1985).

As raízes adventícias desenvolvidas em meio de cultura apresentam sistema vascular pouco desenvolvido, tendo como consequência uma pequena porcentagem de sobrevivência dessas raízes durante a aclimatização (ZIV, 1995). As raízes formadas *in vitro* não se apresentam totalmente funcionais quando transferidas para o meio *in vivo*, sendo fracas e com poucos pêlos absorventes, geralmente morrendo logo após a transferência (PIERIK, 1990).

Além de não realizar a fotossíntese eficientemente, as plântulas *in vitro* possuem folhas com menor quantidade de cera epicuticular do que as plantas crescidas em condições naturais (BAKER, 1974; SUTTER; LANGHANS, 1979). Isso aumenta a perda de água pela transpiração a qual, aliada ao reduzido número de estômatos e à má estruturação do colênquima, pode levar a desidratação e morte da plântula (CAMPOSTRINI; OTONI, 1996).

2.4 Aclimatização

A etapa de aclimatização compreende a transferência das plântulas das condições assépticas da cultura de tecidos para um ambiente externo, normalmente uma casa de vegetação, para o crescimento e desenvolvimento. Essa transferência deve ser feita sob condições controladas para aumentar ao máximo a sobrevivência das plântulas (FORTES; PEREIRA, 2003).

O sucesso da aclimatização depende que as plântulas que cresceram em condições heterotróficas controladas em sala de cultivo passem a crescer em condições autotróficas no ambiente natural (ZIMMERMAN, 1988).

A fase de aclimatização é crítica, devido à mudança drástica no ambiente. No meio *in vitro* a transpiração é reduzida ou nula, o carbono tem origem heterotrófica, a disponibilidade de nutrientes é elevada e o meio é asséptico. Ao ser a plântula aclimatizada, ocorre uma mudança brusca para outra condição de demanda evaporativa mais elevada, carbono autotrófico, absorção de nutrientes dependente do crescimento e da atividade radicular e possibilidade de ataque de microorganismos, muitos destes patogênicos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). A transpiração é apontada como o processo determinante da sobrevivência nos

primeiros dias após a aclimatização, sendo que é necessário manter nessa fase temperaturas amenas e a umidade do ar elevada (SOUZA et al., 2006).

Existem algumas técnicas que interferem no crescimento das plântulas na fase de aclimatização. Dentre elas, o enraizamento *in vitro* (PASQUAL; LOPES 1991) e as características do substrato (NORMAH *et al.*, 1995). A perda de vigor e a subsequente morte devido à desidratação são os problemas mais graves que ocorrem durante a aclimatização de plântulas oriundas da cultura de tecidos (SUTTER; HUTZELL, 1984).

O substrato deve proporcionar à planta fixação mecânica do sistema radicular, estabilidade da parte aérea, suprimento de água e nutrientes (SILVEIRA et al., 2002). Os substratos utilizados na aclimatização podem facilitar ou dificultar a sobrevivência das plântulas e a emissão e crescimento de raízes (FACHINELLO *et al.*, 1995; CALVETE et al., 2000; SETUBAL; NETO, 2000). Substratos com elevado espaço de aeração e alta capacidade de retenção de água favorecem a aclimatização das plântulas (CALVETE, 1998).

Para a escolha de um determinado substrato, deve-se considerar também o custo e a disponibilidade. Para a aclimatização de plântulas de morangueiro da cv. Campinas, Calvete et al., (2000) testaram diferentes misturas de substratos e obtiveram plântulas mais desenvolvidas quando utilizaram casca de arroz queimada e turfa preta. Esses substratos apresentaram maior retenção de água e proporcionaram maior sobrevivência, crescimento e qualidade nas mudas.

A luminosidade é outro fator de extrema importância durante a aclimatização. Em bananeira foi observado 100% de sobrevivência das plântulas na condição de 50% de sombreamento, além de apresentar as maiores médias de comprimento, diâmetro e número de folhas (PEREIRA, 2005).

São escassos os resultados de pesquisas sobre aclimatização de plântulas oriundas de cultura de tecidos, especialmente em escala de produção comercial (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Micropropagação e aclimatização de plântulas de morangueiro sob diferentes concentrações de sais e de sacarose do meio MS

Esse experimento teve início em 15 de agosto de 2008 e foi concluído em 13 de outubro de 2008 no Laboratório de Melhoramento e Propagação Vegetativa de Plantas em um abrigo coberto com filme de polietileno de 150 μm , localizados no Departamento de Fitotecnia da UFSM. Foram utilizadas plântulas de morangueiro do clone Ivahé provenientes de cultivo *in vitro* sendo avaliadas as concentrações do meio MS de $\frac{1}{2}$ MS, $\frac{3}{4}$ MS e 1 MS e de sacarose de 15, 30, 45 e 60g/L combinadas entre si.

Foi empregado o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x4, com cinco repetições. Foram realizadas duas avaliações uma após o enraizamento *in vitro* e outra após aclimatização. Cada repetição *in vitro* foi de um frasco de 150mL com 30mL de meio de cultura, contendo cinco explantes no seu interior. As repetições *ex vitro* constaram de cinco plântulas em bandejas alveoladas de 128 células com substrato orgânico comercial.

Os frascos permaneceram por 30 dias em sala de cultivo. Ao final desse período foram avaliadas a altura da parte aérea, o número de folhas, o número de raízes e o comprimento da maior raiz. Após 30 dias do início da aclimatização foram avaliadas a altura da parte aérea, o número de folhas, o número de raízes, o comprimento da maior raiz, a taxa de sobrevivência e a matéria seca da parte aérea e das raízes. Os dados foram submetidos à análise da variância e as médias com diferenças significativas pelo teste F a 5% de probabilidade de erro foram analisadas por regressão polinomial sendo que as variáveis que não apresentaram grau de equação significativo foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

3.2 Crescimento inicial das plantas matrizes

O experimento foi realizado em um abrigo coberto com filme de polietileno de 150 μ m, localizado no Departamento de Fitotecnia da UFSM. Foram utilizadas bancadas constituídas por telhas de fibrocimento com 4m de comprimento, 1m de largura, canais de 0,06m de altura e 0,18m de distância, apoiadas sobre suportes a 0,80m de altura do solo, com declividade de 1%.

As telhas foram revestidas com filme transparente de polietileno de baixa densidade com espessura de 100 μ m. Os canais das telhas foram preenchidos com brita basáltica média, com tamanho de partículas entre 15mm e 20mm. Para armazenar a solução nutritiva foi instalado um reservatório de material anticorrosivo com capacidade para 500L próximo à extremidade inferior das telhas (ANDRIOLO et al., 2007).

Foram empregadas sacolas plásticas contendo 3,5dm³ do substrato orgânico comercial (Plantmax® PXT), fertirrigado com uma solução nutritiva completa por meio de tubos gotejadores distribuídos sobre as sacolas, com um gotejador para cada planta. A bancada foi coberta com filme opaco de polietileno de baixa densidade de coloração preta para diminuir as perdas de água por evaporação.

O plantio foi feito no dia 13 de outubro de 2008, com seis plantas por concentração do meio de enraizamento do experimento anterior, no delineamento inteiramente casualizado. Foram anotados o número de dias do transplante ao início do estolonamento, o número de estolões, o número de folhas e o diâmetro de coroa. O experimento foi encerrado 30 dias mais tarde, quando foi determinada a matéria seca das plantas matrizes. Os dados foram submetidos à análise da variância e as médias com diferenças significativas pelo teste F a 5% de probabilidade de erro foram analisadas por regressão polinomial sendo que as variáveis que não apresentarem grau de equação significativo foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

3.3 Sistemas de aclimatização e seu efeito na taxa de sobrevivência e crescimento

O experimento foi conduzido no período entre 4 de fevereiro e 6 de março de 2008 em um abrigo coberto com filme de polietileno de 150 μ m, localizado no Departamento de Fitotecnia da UFSM. Embora a época preferencial para a aclimatização de mudas matrizes de morangueiro ocorra no início da primavera, o experimento foi conduzido no verão porque nessa época as condições ambientais são menos favoráveis à sobrevivência das plântulas. No verão, a radiação solar, as temperaturas do ar e o déficit de saturação do ar são elevados. O sistema de aclimatização que for eficiente nessas condições também poderá sê-lo nas demais épocas do ano. Foram comparados nessa época três sistemas de aclimatização. Os dois que apresentaram resultados superiores foram testados novamente em um novo experimento realizado em junho de 2008.

O sistema de bandejas não alveoladas de polietileno com areia (Figura 1) foi constituído por bandejas de tamanho 55x34x15cm, contendo no fundo uma camada de 5cm de brita de tamanho de partículas entre 15 e 20mm. Sobre a brita foi colocada uma tela de polietileno e sobre esta uma segunda camada de 5cm composta por areia grossa. A densidade aparente da areia foi de 1.6086, a capacidade de retenção de água foi de 198,6mL dm⁻³ e a granulometria situou-se entre as classes de diâmetros de 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,106 $\times 10^{-3}$ m. As plântulas foram retiradas dos frascos empregados na fase *in vitro* e transplantadas na areia no espaçamento de 5 x 5cm.

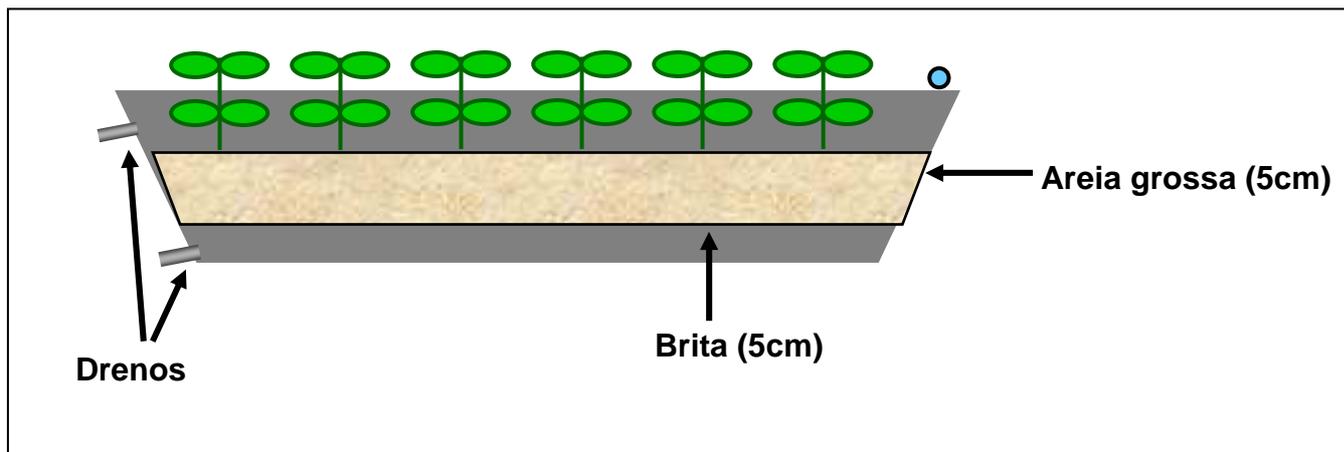


Figura 1: Sistema de aclimatização de plântulas de morangueiro em bandejas não alveoladas de polietileno com areia. Santa Maria, UFSM, 2008.

O sistema de aclimatização em bandejas alveoladas foi feito em bandejas de poliestireno expandido de 128 células, também empregadas na produção de mudas de hortaliças, com o substrato orgânico comercial Plantmax® PXT. Uma plântula foi transplantada em cada célula.

O sistema hidropônico em bandejas não alveoladas com uma placa de poliestireno flutuante na solução nutritiva (Figura 2) foi composto por bandejas de tamanho 55x34x15cm, contendo uma camada de solução nutritiva de 5cm de altura entre o fundo da bandeja e a lâmina líquida. O suporte das plantas foi constituído por uma placa de poliestireno expandido de 1,5cm de espessura com orifícios de 2,5cm de diâmetro, espaçados de 3cm. As plântulas foram retiradas dos frascos de cultivo *in vitro*, envolvidas individualmente em fitas de espuma de poliuretano de 3cm de largura e acomodadas nos orifícios da placa de poliestireno. Foram feitas adições de solução nutritiva sempre que necessárias para repor os volumes de solução nutritiva consumida e manter a altura da lâmina líquida.

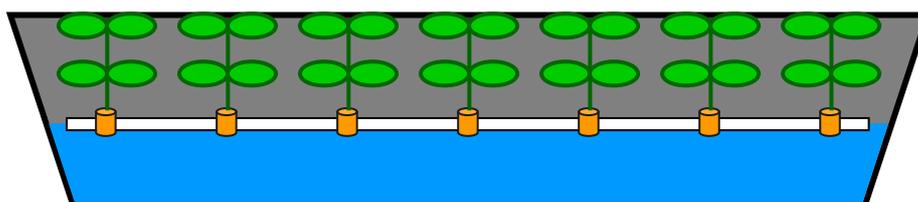


Figura 2: Sistema de aclimatização de plântulas de morangueiro em bandejas não alveoladas com uma placa de poliestireno flutuante na solução nutritiva.

Antes da retirada das plântulas da câmara de crescimento, as tampas dos frascos foram abertas por 48 horas. Em seguida, foram transferidas do meio de cultura *in vitro* para os sistemas de aclimatização. A aclimatização foi feita em abrigo coberto com filme de polietileno de 150µm, localizado no Departamento de Fitotecnia da UFSM. Nas duas aclimatizações, as plantas permaneceram por uma semana em câmara úmida instalada no interior do abrigo de polietileno. Essa câmara foi constituída por um túnel de 0,60m de altura coberto com tela de sombreamento de cor preta, com redução de 75% na radiação solar global incidente. Um sistema de nebulização foi instalado na parte superior interna do túnel, que foi acionado por cinco minutos durante o dia em intervalos de uma hora, através de um programador horário. Durante a noite o sistema permaneceu desligado. Ao final do período, as plântulas foram retiradas da câmara úmida e mantidas sobre bancadas a 0,80m, também sob redução de 75% na radiação solar global incidente por meio de tela de sombreamento, aí permanecendo por mais sete dias. Em seguida, a tela de sombreamento foi retirada e as plantas permaneceram por mais 14 dias até completar a fase de aclimatização. Nesses dois últimos períodos as mudas foram fertirrigadas durante o dia por microaspersão, em cinco períodos diários de 15min, controlados por um programador horário. Os volumes excedentes a capacidade máxima de retenção de água da areia foram drenados através de um orifício feita na parte inferior das bandejas. Foi empregada a solução nutritiva completa descrita por Andriolo, (2007).

Os sistemas de aclimatização por bandejas alveoladas de poliestireno de 128 células com substrato orgânico e por bandejas não alveoladas de polietileno com areia foram utilizados no experimento que foi realizado entre os dias 2 de junho e 2 de julho de 2008, sendo que foram utilizadas 4 repetições de 10 plantas no delineamento inteiramente casualizado.

Foi determinada a taxa de sobrevivência, número de folhas, altura da parte aérea, comprimento da maior raiz, número de raízes e matéria seca da parte aérea e das raízes. Os resultados foram submetidos à análise da variância e as médias com diferenças significativas comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Micropropagação e aclimatização de plântulas de morangueiro sob diferentes concentrações de sais e sacarose do meio MS

Neste experimento foram realizadas duas avaliações, uma após a saída das plântulas do laboratório e outra após a aclimatização. Na primeira avaliação somente o número de folhas mostrou diferença significativa, sendo que o melhor tratamento no que se refere à concentração de sais do meio MS foi 1 MS, o qual não diferiu de $\frac{1}{2}$ MS (Tabela 1). Não foram observadas diferenças significativas nas demais variáveis, cujos valores médios foram de 3,51 cm, 3,05 cm e 3,17 cm para altura da parte aérea, de 9,75, 8,50 e 8,98 raízes por planta para o número de raízes, 2,64 cm, 2,57 cm e 2,37 cm para comprimento da maior raiz, respectivamente para $\frac{1}{2}$ MS, $\frac{3}{4}$ MS e 1 MS. A taxa de sobrevivência foi de 100% em todos os tratamentos. Para as concentrações de sacarose não foram observadas diferenças significativas e não ocorreu interação com as concentrações de sais. Resultados semelhantes sobre a interação foram observados por Cuello et al., (1992).

De acordo com os resultados obtidos para o número de folhas, a concentração de sais do meio pode ser diminuída para $\frac{1}{2}$ MS. Segundo Moreira et al., (2006), a sobrevivência no campo após o plantio aumenta com número de folhas, pois as folhas são responsáveis pela captação da radiação solar e produção de matéria orgânica através da fotossíntese. Outro argumento para a diminuição de sais do meio de cultura é devido à sobrevivência que não diferiu entre os tratamentos. Obter elevadas taxas de sobrevivência é importante, pois os custos laboratoriais e de mão-de-obra na micropropagação são elevados (FIOR; KAMPF, 1999).

Os valores para o número e comprimento da maior raiz discordam parcialmente de Pereira et al., (1999), trabalhando com morangueiro, esses autores constataram que essas variáveis aumentaram com a diminuição da concentração de sais do meio MS. Essas diferenças podem ser atribuídas ao genótipo, pois a resposta *in vitro* não se deve somente ao meio empregado e às condições de crescimento, mas também às diferenças existentes entre os genótipos (CASTRO; ANDRADE 1995). Resultados semelhantes foram encontrados por Sobrosa e

Corder, (2003) em *Eucalyptus grandis* os quais obtiveram diferentes respostas dos genótipos para a formação de gemas e raízes *in vitro*.

Na segunda avaliação, feita ao final do período de aclimatização, as variáveis que apresentaram diferenças significativas foram a altura da parte aérea e o comprimento da maior raiz. Para a altura da parte aérea, o melhor tratamento foi 1 MS, que não diferiu de $\frac{3}{4}$ MS. Para comprimento da maior raiz, o melhor tratamento foi de $\frac{3}{4}$ MS, que não diferiu de $\frac{1}{2}$ MS (Tabela 1). Não foram observadas diferenças significativas para o número de folhas, número de raízes e matéria seca por planta, cujos valores médios foram de 7,81; 7,86 e 7,98 folhas/planta, de 20,56; 20,81 e 20,68 raízes/planta de 1,12, 1,05 e 1,18 g/planta, para $\frac{1}{2}$ MS, $\frac{3}{4}$ MS e 1 MS, respectivamente. A sobrevivência foi de 100% nas três concentrações. Para as concentrações de sacarose não foram observadas diferenças significativas e não ocorreu interação com as concentrações de sais. Na primeira avaliação o número de folhas se mostrou superior na concentração de 1 MS sendo que na segunda avaliação esta variável não mostrou diferenças entre as concentrações de sais. Um dos possíveis motivos pode ser devido a um maior crescimento do sistema radicular verificado nas concentrações de $\frac{1}{2}$ MS e $\frac{3}{4}$ MS que pode ter ocasionado um maior aporte de nutrientes as plantas.

Tabela 1: Efeito dos sais do meio de enraizamento antes da aclimatização (I) e no final da aclimatização (F) no número de folhas (NF), altura da parte aérea (AP) e no comprimento da maior raiz (CR) das plântulas. Santa Maria, UFSM, 2008.

Sais MS	NF		AP(cm)		CR(cm)	
	I	F	I	F	I	F
$\frac{1}{2}$ MS	5,97ab*	7,81a	3,51a	4,68b	2,64a	5,82ab
$\frac{3}{4}$ MS	5,89b	7,85a	3,05a	4,98a	2,57a	6,01a
1 MS	6,56a	7,98a	3,17a	5,07a	2,37a	5,45b
CV(%)	9,39	6,75	17,95	10,45	12,52	15,97

* Médias não seguidas de mesma letra diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância.

Os resultados encontrados concordam com Pereira et al., (1995) que trabalhando com diferentes concentrações de sais no enraizamento de plântulas de morangueiro obtiveram melhor desenvolvimento das raízes e da parte aérea quando utilizaram $\frac{1}{2}$ MS. Corroboram também os resultados de Fereira et al., (1996), que trabalhando com duas cultivares de morangueiro, em diferentes concentrações de sais do meio MS, concluíram que os meios contendo baixas concentrações de sais favoreceram o enraizamento.

4.2 Crescimento inicial das plantas matrizes

Neste experimento, em que foi avaliado o crescimento inicial da plantas matrizes, não ocorreu interação significativa entre a concentração de sais e de sacarose. O maior crescimento foi obtido com a concentração de sais de 1 MS (Tabela 2). Para o diâmetro de coroa e número de estolões por planta e número de dias do transplante ao início do estolonamento, não foram observadas diferenças significativas e os valores foram de 9,58 cm, 10,48 cm e 11,13 cm para diâmetro de coroa, de 4,95, 5,33 e 5,45 para o número de estolões e 17,58, 16 e 16,4 dias para o início de estolonamento, respectivamente para $\frac{1}{2}$ MS, $\frac{3}{4}$ MS e 1 MS. A sobrevivência foi de 100% nas três concentrações. Quanto à concentração de sacarose, o maior número de folhas e matéria seca da planta foi obtido nas concentrações de 45 e 60g/L, as quais não diferiram entre si (Tabela 3). Uma explicação para a obtenção de um maior número de folhas pode ser o aumento do teor de carboidratos das folhas. Os resultados encontrados para matéria seca confirmam aqueles de Calvete et al., (2002), que encontraram maiores valores de matéria seca quando a concentração de sacarose do meio de cultura foi aumentada. Um teor de matéria seca mais elevada vai acarretar um acúmulo maior de fotossintatos e favorecer a absorção de nutrientes (SALISBURY; ROSS 1994).

Tabela 2: Efeito dos sais do meio de enraizamento 30 dias após aclimatização na matéria seca de plantas (MS) matrizes de morangueiro do clone Ivahé. Santa Maria, UFSM, 2008.

Sais MS	MS (g/planta)
½ MS	2,04b*
¾ MS	2,54a
1 MS	2,79a
CV (%)	14,22

* Médias não seguidas de mesma letra diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância.

Tabela 3: Efeito da sacarose do meio de enraizamento 30 dias após aclimatização no número de folhas e matéria seca (MS) em plantas de morangueiro do clone Ivahé. Santa Maria, UFSM, 2008.

Sacarose (g/L)	N. de Folhas	MS (g/planta)
15	7,80b	2,22b
30	8,20b	2,15b
45	8,93ab	2,86a
60	10,07a	2,53ab
CV(%)	12,46	14,22

* Médias não seguidas de mesma letra diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de significância.

Estes resultados sugerem que a concentração de sacarose no meio de enraizamento pode ser aumentada de 30g/L para 45g/L, pois esta concentração apresentou um maior número de folhas no período inicial de crescimento das mudas matrizes o que pode vir a ter um reflexo na produção e na qualidade de mudas matrizes de morangueiro do clone Ivahé.

4.3 Sistemas de aclimatização das plântulas e seu efeito na taxa de sobrevivência e crescimento

No experimento realizado em fevereiro, o sistema com solução não circulante apresentou morte de todas as plântulas provavelmente esta mortalidade foi consequência da morte das raízes por excesso de água. O morangueiro é sensível ao déficit e ao excesso de água, ressaltando a importância do manejo da irrigação (MCNIESH et al., 1985). Nos dois outros sistemas dentre as variáveis determinadas somente a matéria seca da parte aérea e matéria seca de raízes apresentaram diferença significativa (Tabela 4). As demais variáveis não apresentaram diferenças significativas sendo que as médias foram de 8,06 e 7,83 para folhas por planta, 4,81 cm e 5,55 cm para altura da parte aérea, 4,28 cm e 4,04 cm para comprimento da maior raiz, 13,33 e 15,10 para número médio de raízes por planta respectivamente para os sistemas bandejas não alveoladas com areia e bandejas alveoladas com substrato orgânico. Em ambos os sistemas a sobrevivência foi de 65%.

Tabela 4: Matéria seca da parte aérea e matéria seca das raízes de plântulas de morangueiro para aclimatização em dois substratos no mês de fevereiro de 2008. Santa Maria, UFSM, 2008.

Sistema	MS P. Aérea	MS Raízes
Areia	0,86*	0,59*
Substrato	0,77	0,50
CV(%)	4,49	5,00

* Médias com diferença significativa pelo teste F a 5% de probabilidade de erro.

Na aclimatização feita em junho, as variáveis, comprimento da maior raiz e número de raízes foram mais elevadas no sistema bandejas alveoladas com substrato orgânico. Quanto a matéria seca de raízes e da parte aérea, foram superiores no sistema bandejas não alveoladas com areia (Tabela 5). As demais variáveis não apresentaram diferenças significativas, com médias de 6,89 e 7,28 para número médio de folhas por planta, 5,82 cm e 6,03 cm para altura da parte

aérea e sobrevivência de 87% e 97%, respectivamente para o sistema bandejas não alveoladas e de bandejas alveoladas.

Tabela 5: Número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR), Matéria seca da parte aérea (MSPA) e Matéria seca das raízes (MSR) de plântulas de morangueiro do clone Ivahé para a aclimatização em dois substratos no mês de junho de 2008. Santa Maria, UFSM, 2008.

Sistema	NR	CR (cm)	MSPA (g/planta)	MSR (g/planta)
Areia	10,88*	3,31*	0,89*	0,24*
Substrato	13,75	3,93	0,63	0,13
CV(%)	5,84	11,45	9,68	5,23

* Médias com diferença pelo teste F a 5% de probabilidade de erro.

Estes resultados concordam com Pio *et al.* (2005) os quais em mudas de jaboticabeira compararam os substratos Plantmax e areia e encontraram valores mais elevados para comprimento da parte aérea e de raízes quando utilizaram substrato Plantmax, enquanto o número de folhas não diferiu quando a areia foi empregada.

Com relação aos sistemas de aclimatização por bandejas não alveoladas com areia e bandejas alveoladas com substrato orgânico, ambos podem ser empregados a depender da situação de produção. Embora o sistema por bandejas não alveoladas com areia tenha obtido maior matéria seca, o número e comprimento das raízes foram superiores nas bandejas alveoladas. Além disso, o substrato orgânico apresenta elevada capacidade de retenção de água, a qual pode vir a ser um fator que contribui para a diminuição das perdas de água pela evapotranspiração durante o período inicial de desenvolvimento (SKREBSKY *et al.*, 2006). Outra característica favorável deste material é a relação entre macro e microporos, a qual mantém um adequado volume de aeração na capacidade máxima de retenção de água. Outra característica importante deste sistema é o emprego das bandejas alveoladas que permitem maior facilidade de manejo, porque estão individualizadas. Outro argumento a favor do sistema bandejas alveoladas se deve aos melhores

resultados apresentados para o sistema radicular, pois uma plântula com um sistema radicular bem desenvolvido tem a sobrevivência e crescimento favorecidos (PIO et al. 2002).

7. CONCLUSÕES

- A concentração de sais pode ser reduzida de 1 MS para $\frac{3}{4}$ MS e a de sacarose aumentada de 30 para 45 g/L para manter elevada a taxa de sobrevivência na aclimatização e obter maior crescimento inicial das plantas matrizes do clone Ivahé.
- Os sistemas de bandejas alveoladas empregando substrato orgânico e bandejas não alveoladas com areia permitem obter altas taxas de sobrevivência e elevado crescimento na aclimatização de plântulas de morangueiro do clone Ivahé.

7. REFERÊNCIAS

ALVES, C.; et al. A Cultura de Tecidos na Agricultura. In: I JORNADA CIENTÍFICA e VI FIPA do CEFET, 4., 2008, Bambuí. Capturado em http://www.cefetbambui.edu.br/str/artigos_aprovados/Meio%20Ambiente/21-CO-1.pdf. Acesso em 23 de dezembro de 2008. **Anais**: Bambuí, 2008.

AMBROSIO, S. T.; MELO, N. F. Interação da sacarose e níveis de pH durante o cultivo *in vitro* de *Nephrolepis biserrata* (Sw.) Schott (Pteridophyta). **Acta Botanica Brasílica**, São Paulo, v.18, n. 4, p. 809-813 out./dez., 2004.

ANDRIOLO, J. L.; BONINI, J. V. BOEMO, M. P. Acumulação de matéria seca e rendimento de frutos de morangueiro cultivado em substrato com diferentes soluções nutritivas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 24-27, mar., 2002.

ANDRIOLO, J. L. Preparo e manejo da solução nutritiva na produção de mudas e de frutas do morangueiro. In: SEMINÁRIO SOBRE O CULTIVO HIDRÔNICO DE MORANGUEIRO, 2007, Santa Maria, **Anais**.... Santa Maria: UFSM, 2007, p. 41-50.

ANTUNES, L. E. C.; DUARTE FILHO, J. Produção de mudas de morango. In: **Sistema de Produção de Morango**. Embrapa Clima Temperado, dez., 2003, (Sistemas de Produção 5).

AUGUSTO, C. S. S.; BIASI, L. A.; TELLES, C. A. Enraizamento e aclimatização de plantas micropropagadas de amoreira-preta cv. Brazos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 3, p. 473-476, dez., 2006.

BISOGNIN, D. A. Produção de plantas matrizes de morangueiro. In: SEMINÁRIO SOBRE O CULTIVO HIDRÔNICO DE MORANGUEIRO, 2007, Santa Maria **Anais**.... Santa Maria: UFSM, 2007, p. 9-17.

BAKER, E.A. The influence of environment on leaf wax development in *Brassica oleracea* var. gemmifera. **New Phytologist**, Oxford, n. 73 p.955-966, Feb., 1974.

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

CALVETE, E.O. **Concentração de sacarose in vitro e seleção de substratos para aclimatização ex vitro de morangueiro cv campinas (*Fragaria ananassa* Duch.)**. 1998. 108 f., Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CALVETE, E. O.; KÄMPF, A. N.; DAUDT, R. Efeito do substrato na aclimatização de *ex vitro* de morangueiro cv. Campinas, *Fragaria x ananassa* Duch. In: KÄMPF, A. N.; FERMINO, M. H. (Eds.). **Substrato para plantas**: a base da produção vegetal em recipientes. Porto Alegre: Gênese, 2000, p. 257-264.

CALVETE, E.O.; KÄMPF, A.N; SUZIN,M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p.186-191, jun., 2002.

CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W. C. **Aclimação de plantas**: abordagens recentes. ABCTP Notícias, Brasília, n. 25, p. 2-10, 1996.

CASTRO, O. F. A.; ANDRADE, A. G. Cultura *in vitro* de batata-doce (*Ipomea batatas* (L.) LAM.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 7, p. 917-922, jul., 1995.

CUTTER, E.G. **Plant Anatomy**. 2nd, ed. London Wesley, 1978., 315 p.

CLARK, S. E. Organ formation at the vegetative shoot meristem. **Plant Cell**, Waterbury, v. 9, p. 1067-1076, July, 1997.

CUELLO, J. L.; WALKER, P. N.; HEUSEUR, C. W. Controlled in vitro environment for stage II micropropagation of chrysanthemum. **Transactions of the ASAE**. St. Joseph, v. 3, n. 35, p. 1079-1083, 1992.

DEBERGH, P. C. Control of in vitro plant propagation. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS, 1., Piracicaba, **Anais...** Piracicaba: CEBTEC-FEALQ-USP, 1988.

DONNELLY, D.J.; VIDAVER, W.E.; LEE, K.Y. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, n. 4, p. 43-50, Aug., 1985.

EMBRAPA, **Produção de Matrizes de Morangueiro por meio de Cultura de Tecidos** Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/MatrizesMorangueiro/index.htm> Acesso em 20 de abril de 2007.

EMBRAPA, **Sistema de produção de morango**. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/SistemaProducaoMorango/cap15.htm>. Acesso em 29 de junho de 2008.

FACHINELLO, J. C.; et al. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2. ed. Pelotas: UFPel, 1995, 178 p.

FERREIRA, A. F., FARIAS, A. X., SILVA, E. S. B. da A. Enraizamento de duas cultivares de morangueiro (*Fragaria x ananassa Duch*) em diferentes concentrações de sais do meio MS. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 14, 1996, Curitiba, **Resumos**. Curitiba, p. 351.,1996.

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

FIOR, C. S.; KAMPF, A. N. Substrato e nutrição na aclimatização ex vitro de *Limonium platyphyllum* Kuntze. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. Campinas, v. 5, n. 1, p. 78-86, jan./jun., 1999.

FORTES, G. R. L.; PEREIRA, J. E. S. Batata-semente Pré-básica: Cultura de Tecidos. In: PEREIRA, A. S.; DANIELS, J. (Eds.). **O cultivo da batata na região sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003, p. 421-433.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1998, p. 183-260.

JONES, L. H. Clonal propagation of plantation crops. In: ABBOT, A.J. & ATKIN, R.K. **Improving vegetatively propagated crops**. London, Academic Press, 1987, p. 385-405.

HAZARIKA, B.N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, Stamford, v. 85, n. 12, p. 1704-1712, Dec., 2003.

KOZAI, T., KITAYA, Y. Environmental control for large scale production of *in vitro* plantlets. In: Terzi, M.; Cella, R.; Falavigna, A. (eds.) **Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology**. London: Kluwer Academic Publishers, 1995, p. 659-667.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Fisiologia Vegetal**. México: Iberoamérica, 1994, 759 p.

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

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

PEREIRA, A. V., *et al.* Efeitos de níveis de AIB e meio MS sobre o desenvolvimento de explantes de morangueiro "in vitro". In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, maio, 1995, Lavras. **Resumos**. Lavras, p. 186, 1995.

PEREIRA, J. E. S.; BIANCHI, V. J.; DUTRA, L. F. Enraizamento *in vitro* do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) em diferentes concentrações do meio MS. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 1, p.17-20, jan./abr., 1999.

PEREIRA, M.C.T., *et al.* Aclimatização de mudas micropropagadas de bananeira sob diferentes condições de luminosidade. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 238-240, ago., 2005.

PIO, R.; *et al.* Enraizamento *in vitro* de brotações do porta enxerto de citros *Tangerina sunki x Trifoliata* English 63-256 com o uso de sacarose e ácido indolbútrico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 1, p. 66-70, jan./mar., 2002.

PIO, R.; *et al.* Substratos na produção de mudas de jaboticaba **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 4, p. 425-427, out/dez., 2005.

MALDANER, J.; *et al.* Crescimento de plântulas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen cultivadas *in vitro* sob dois níveis de nitrogênio e sacarose, durante seis subculturas sucessivas e aclimatização. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n.1, p.133-140, jan/fev, 2007.

MCNIESH, C.M.; WELCH, N.C.; NELSON, R.D. Trickle irrigation requirements for strawberries in Coastal Califórnia. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.110, n.5, p.714-718, Set/Oct., 1985.

MEZZALIRA, H. Morango com dedicação boas perspectivas. **Balde Branco**. São Paulo. V. 21 p. 19 – 21, fev., 1986.

MOREIRA, M. A; et al. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência Agrotecnica**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 875-879, set./out., 2006.

MURASHIGE, T. Manipulation of organ initiation in plant tissue culture. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 18, P.1-24, 1977.

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

NORMAH, M. N.; NOR-AZZA, A. B.; ALLIUDIN, R. Factors affecting *in vitro* shoot proliferation and *ex vitro* establishment of mangosteen. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 43, n. 3, p. 291-294, Dec., 1995.

PASQUAL, M.; LOPES, P. A. Efeitos da concentração e tempo de incubação em ácido indolbutírico sobre o enraizamento e posterior desenvolvimento de brotos de *Pyrus calleryana* L. obtidos *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 7, p. 975-980, jul., 1991.

PIERIK, R. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 326p.

REICHERT, L. J.; MADAIL, J. C. M. Aspectos socioeconômicos. In: REICHERT, L. J.; MADAIL, J. C. M. (eds). **Morango**. Produção. Frutas do Brasil, Pelotas: EMBRAPA CLIMA TEMPERADO. 2003, p.12-15.

REIS, G.G., et al. Crescimento de *Eucalyptus camaldulensis*, *E. grandis* e *E. cloeziana* sob diferentes níveis de restrição radicular. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 13, n.1, p 1 – 18, jan/abr., 1989.

RONQUE, E. R. V. **Cultura do morangueiro**; revisão e prática. Curitiba: Emater, 1998. 206p.

SANTOS, A.M.; MEDEIROS, A.R.M. Produção de mudas comerciais de morango. In: SANTOS, A.M.; MEDEIROS, A.R.M. (eds). **Morango**. Produção. Frutas do Brasil, 40. Brasília: EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, 2003, p. 35-38.

SETUBAL, J. W.; AFONSO NETO, F. C. Efeito de substratos alternativos e tipos de bandejas na produção de mudas de pimentão. **Horticultura Brasileira**, v.18, p. 593-594, 2000. (Suplemento).

SILVEIRA, E. B.; et al. Pó de coco como substrato para produção de mudas de tomateiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 211-216, jun. 2002.

SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J. Substratos na aclimatização de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen produzida in vitro sob diferentes doses de sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 5, p.1416-1423, set/out., 2006.

SOBROSA, R. de C.; CORDER, M. P. M. Efeito do genótipo sobre o potencial para produção de gemas adventícias em *Eucalyptus grandis Hill in vitro*. **Floresta e Ambiente**, Seropedica, v. 10, n. 1, p. 58-68, jan./jul. 2003.

SOUZA, F. V. D. ; COSTA, M. A. P. C. ; SILVA NETO, PEREIRA, H. Aclimatização. In: SOUZA, A. da S.; JUNHANS, T. G.. (Org.). **Introdução a micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006, v. 1, p. 131-140.

SUTTER, E. G.; HUTZELL, M. Use of humidity tents and antitranspirants in the acclimatization to tissue-cultured plants to the greenhouse. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 23, n. 4, p. 303-312, 1984.

SUTTER, E. LANGHANS, R.W. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. **Journal of the American Society Horticultural Science**., Alexandria n.104, p.493-6, 1979.

TESSARIOLI NETO, J.; ORTIGOZA, L.E.R.; VERDIAL, M.F. Produção de mudas de cultivares de morangueiro em duas épocas de coleta. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 2, n.2, p.231-233, abr./jun. 2003.

ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation of woody plants: post tissue culture aspects. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 227, p. 489-499, 1988.

ZIV, M. *In vitro* acclimatization. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T. & SMITH, M.L.A. (eds.). **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995, p. 493-516.