

## NÍVEIS DE VERMICULITA® EM MISTURA DE SUBSTRATO NA ACLIMATIZAÇÃO DE PLANTAS DE AMOREIRA-PRETA 'TUPY'

### LEVELS OF VERMICULITE® SUBSTRATE MIXTURE IN THE ACCLIMATIZATION OF TUPY BLACKBERRY PLANTS

Américo Wagner Júnior<sup>1</sup>; Rodrigo Cezar Franzon<sup>2</sup>; Marcelo Couto<sup>3</sup>; Paulo Cesar Conceição<sup>1</sup>; Gerson Renan de Luces Fortes<sup>4</sup>

#### RESUMO

A aclimatização é considerada uma das fases primordiais no processo de propagação *in vitro*, pois está diretamente ligada ao desenvolvimento e sobrevivência das plantas. O objetivo deste trabalho foi verificar a influência de níveis de vermiculita® misturados com terra de mato:esterco bovino na aclimatização de plantas de amoreira-preta (*Rubus* sp.), cultivar Tupy. O trabalho foi realizado em casa de vegetação, da Embrapa Clima Temperado, em Pelotas (RS/Brasil). Os tratamentos consistiram de seis níveis de vermiculita® 0; 20; 40; 60; 80; 100% (v/v), misturados com terra de mato:esterco bovino (1:1, v/v). Foi utilizado o delineamento experimental em blocos casualizados, com quatro repetições, considerando-se como parcela cada doze células de bandeja alveolada. Na aclimatização das plantas de amoreira-preta Tupy recomenda-se utilizar os menores níveis de vermiculita® (20 e 40%) quando misturados com terra de mato:esterco bovino.

**Palavras chave:** *Rubus* sp., substrato, cultura de tecidos.

#### ABSTRACT

The acclimatization is considered one of the primordial phases in the process of *in vitro* propagation, because it is directly related

with the development and survival of the plantlets. The aim of this work was to verify the influence of different levels of vermiculite® mixed with forest soil and manure in the acclimatization of 'Tupy' blackberry (*Rubus* sp.) plants. The work was accomplished in a greenhouse at Embrapa Temperate Climate, in Pelotas (RS/Brazil). The treatments consisted of six vermiculite® levels, 0; 20; 40; 60; 80 and 100% (v/v), mixed with forest soil:manure (1:1, v/v). It was used a completely randomized blocks design, with four replications and twelve cells from trays per plot. In the acclimatization of Tupy blackberry plants, it recommended to use the lower vermiculite® levels (20% e 40%) with forest soil:manure mixture.

**Keywords:** *Rubus* sp., substrate, tissue culture.

#### INTRODUÇÃO

A amoreira-preta propaga-se através de estacas de raiz, estacas de ramos com 4 ou 5 gemas, ou por rebentos que surgem ao redor das plantas adultas (ANTUNES et al., 2004). Além destes métodos, a multiplicação via micropropagação, pode ser utilizada, permitindo a obtenção de plantas isentas de

<sup>1</sup>Eng. Agr., Dr., Professor do Departamento de Horticultura. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Dois Vizinhos. e-mail: americowagner@utfpr.edu.br

<sup>2</sup>Eng. Agr. Dr., Embrapa Clima Temperado. Pelotas e-mail: rcfranzon@hotmail.com

<sup>3</sup>Eng. Agr. Dr., Pesquisador Epagri. Caçador –SC. e-mail mcouto@gmail.com

<sup>4</sup>Eng. Agr., Dr. Pesquisador Aposentado. e-mail: gerson@cenargen.embrapa.br

viroses e geneticamente uniformes em curto espaço de tempo (FACHINELLO et al. 2005).

Na micropropagação, as fases de enraizamento e aclimatização podem comprometer todo processo, pois envolve a formação de um novo sistema radicular durante a passagem para condições *ex vitro* (ZIV, 1995). Para muitas espécies esta mudança das condições *in vitro* para *ex vitro* é crítica e representa, em alguns casos, um fator limitante do processo de micropropagação (HOFFMANN, 2002). A transição do heterotrofismo para o autotrofismo, durante a fase de aclimatização de mudas provenientes da cultura de tecidos, depende das condições que garantam a manutenção mecânica do sistema radicular, a estabilidade da planta, o suprimento de água e nutrientes, e as trocas gasosas entre as raízes e o ar atmosférico (TIMBÓ et al., 2004). Desta forma, a seleção do substrato tem fundamental importância no crescimento e no desenvolvimento das plantas micropropagadas, influenciando diretamente no sucesso desta etapa (WAGNER JÚNIOR et al., 2003).

Segundo KÄMPF (1992), a porosidade, a permeabilidade, a retenção de água e a capacidade de troca de cátions são algumas características importantes que definem a qualidade de um material a ser usado como substrato. O substrato pode ser formado de matéria-prima de origem mineral, orgânica ou sintética, de um só material ou de diversos materiais em conjunto, sendo que alguns não possuem as características desejáveis de qualidade (KANASHIRO, 1999).

Tendo em vista a diversidade dos substratos e de suas características, torna-se difícil escolher a melhor mistura que atenda as condições para o ótimo desenvolvimento e sobrevivência das plantas durante a aclimatização.

DUTRA et al. (2010) desenvolveram protocolo para micropropagação da amoreira preta, descrevendo as técnicas adotadas na Embrapa Clima Temperado. Neste documento, as plantas são transplantadas

para bandejas de isopropileno com 72 células, tubetes ou sacos plásticos e mantidos em casa de vegetação, mantendo-se nestas condições por 30 dias, com percentual de sobrevivência superior a 95%.

Todavia, não existem informações de qual o melhor substrato utilizar nesta etapa. Dos substratos já utilizados durante a aclimatização de várias espécies vegetais pode-se citar o Plantmax® em amoreira preta e bananeira (VILLA et al., 2006; PEREIRA et al., 2005, respectivamente), Vermiculita® em amoreira preta (VILLA et al., 2006), casca de arroz carbonizada em morangueiro, gipsofila, amoreira preta e helicônia (CALVETE et al., 2000; BOSA et al., 2003; VILLA et al., 2006; SANTOS et al., 2004, respectivamente), Turfa Preta (mineralizada) em morangueiro (CALVETE et al., 2000), pó de casca de coco seco e verde em helicônia (SANTOS et al., 2004). Entretanto, a maioria destas são adquiridos comercialmente, aumentando-se os custos para produção da muda.

Neste sentido, seria importante testar um tipo de mistura de substrato, que envolve-se um dos já testados como a Vermiculita®, que apresentou bons resultados, com outros de fácil aquisição e sem custo, visando a manutenção da sobrevivência e qualidade das mudas produzidas com custo reduzido.

A mistura Vermiculita®:terra de mato:esterco bovino (1:1:1 v/v), já foi utilizada com sucesso na aclimatização de plantas propagadas *in vitro* de macieira (*Malus domestica* Borrk.) (PEREIRA et al., 2000; PEREIRA et al., 2001). Com isso, pode-se testá-la para amoreira preta.

O objetivo deste trabalho foi verificar a influência de diferentes níveis de Vermiculita® misturados com terra de mato: esterco bovino na aclimatização de plantas de amoreira-preta, cultivar 'Tupy'.

O trabalho foi realizado em casa de vegetação da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro de Pesquisa Agropecuária Clima Temperado, em Pelotas (RS/Brasil).

Brotações apicais do cultivar de amoreira-preta Tupy, obtidas após 3 subcultivos *in vitro*, com dois a três pares de folhas e com 1,0 a 1,5 cm de comprimento. Essas foram enraizadas em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com 50% da sua concentração plena, adicionado de 0,1 mg·L<sup>-1</sup> de ácido naftaleno-acético, 1 mg·L<sup>-1</sup> de piridoxina, 10 mg·L<sup>-1</sup> de tiamina, 10 mg·L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 1 mg·L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 500 mg·L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 6 g·L<sup>-1</sup> de ágar (Merck®) e 30 g·L<sup>-1</sup> de sacarose, sendo o pH ajustado para 5,8. Foram utilizados nesta fase frascos de vidro com capacidade de 250 mL, contendo 40 mL de meio, vedados com tampas de papel alumínio. As condições na sala de crescimento eram de 25±2°C, densidade de fluxo luminoso de 31,41 W m<sup>-2</sup>, fornecido por lâmpadas fluorescentes (40w) brancas frias, 16 horas de fotoperíodo, com umidade relativa do ar entre 70 e 80%.

Quatro semanas após a inoculação, as brotações enraizadas foram retiradas de frascos, lavadas em água corrente para remover resíduos do meio de cultura aderido às raízes, e colocadas em bandejas plásticas

com papéis-toalha umedecidos em água, para evitar a desidratação das mesmas. Posteriormente, estas foram transferidas para bandejas alveoladas de isopropileno, com 128 células, contendo diferentes níveis de Vermiculita® misturada com terra de mato:esterco bovino (1:1, v/v) (PEREIRA et al., 2001), e levadas para aclimatização em casa de vegetação. Nas duas primeiras semanas foi necessário o uso de túnel baixo com filme plástico (150 µ) e sombrite (50%), sob as bandejas, procurando aproximar ao máximo as condições de umidade das plantas *in vitro*. As plantas foram irrigadas diariamente, com maior frequência nos primeiros vinte dias (5 vezes ao dia), mantendo as folhas e os substratos sempre úmidos.

Os tratamentos consistiram de seis níveis de Vermiculita® 0; 20; 40; 60; 80 e 100%, misturados com terra de mato:esterco bovino (1:1, v/v) (PEREIRA et al., 2001). Na Tabela 1 estão descritas as principais características químicas dos substratos utilizados no presente trabalho.

**Tabela 1** – Atributos químicos das misturas utilizadas na aclimatização de plantas de amoreira-preta (*Rubus* sp.), cv. Tupy propagadas *in vitro*

Níveis de Vermiculita®	pH água	Índice SMP	M. O. <sup>1</sup> (%) (m/v)	K <sup>2</sup> mg dm <sup>-3</sup>	P <sup>2</sup> mg dm <sup>-3</sup>	Al <sup>2</sup> cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	Ca <sup>2</sup> cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	Mg <sup>2</sup> cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>
0%	5,6	6,0	2,7	132	190,0	0,1	4,1	3,1
20%	5,8	6,0	2,9	162	160,9	0,1	5,4	4,9
40%	5,7	6,2	2,3	239	170,1	0,2	4,6	6,1
60%	6,0	6,6	1,2	280	167,1	0,1	6,0	9,4
80%	6,3	6,6	0,9	269	136,0	0,1	6,1	9,8
100%	6,7	7,3	0,0	264	108,9	0,1	6,0	9,6

<sup>1</sup> M. O. – Matéria orgânica

<sup>2</sup>P, K – Extrator Mehlich 1; Ca, Mg, Al – Extrator: KCl 1molL<sup>-1</sup>.

Após 56 dias de aclimatização foram avaliadas, porcentagem de sobrevivência; comprimentos da parte aérea, da raiz e total (cm); número de folhas; área foliar (cm<sup>2</sup>); massa da matéria seca da parte aérea e da raiz (mg).

Para determinação da área foliar, primeiramente obteve-se a massa da matéria fresca foliar de uma área conhecida das folhas, sendo em seguida realizada pesagem total das mesmas, e posteriormente através do uso da regra de três obteve-se então a área foliar. Já para a variável número de

folhas foi realizado a contagem das mesmas em quatro plantas de cada parcela.

Foi utilizado o delineamento experimental em blocos casualizados, com quatro repetições, considerando-se como parcela cada doze células das bandejas alveoladas. Os dados analisados foram submetidos às análises, de variância e regressão polinomial, sendo que os dados em porcentagem de sobrevivência foram transformados previamente em *arco seno*  $\sqrt{x/100}$  e o número de folhas em  $\sqrt{x+1}$ . Enquanto que,

os demais dados não sofreram transformação. Foi utilizado o aplicativo computacional SANEST (ZONTA & MACHADO, 1984).

De acordo com os resultados obtidos na análise de variância, não houve diferenças significativas entre os níveis de Vermiculita® misturados com terra de mato:esterco bovino para porcentagem de sobrevivência, comprimentos da parte aérea, da raiz e total, número de folhas e massa da matéria seca da raiz (Tabela 2).

**Tabela 2** – Porcentagem de sobrevivência (PS); comprimentos da parte aérea (CPA), da raiz (CR) e total (CT); número de folhas (NF) e massa da matéria seca da raiz (MMSR) de plantas de amoreira-preta (*Rubus* sp.), cultivar Tupy, aclimatizadas nos níveis de Vermiculita® misturado com terra de mato:esterco bovino (1:1 v/v)

Níveis de Vermiculita® (%)	PS (%) <sup>1</sup>	CPA (cm)	CR (cm)	CT (cm)	NF <sup>2</sup>	MMSR (mg)
0	100 ns	3,24 ns	7,47 ns	10,71ns	9,39 ns	0,04 ns
20	100	3,46	7,74	11,2	11,59	0,03
40	100	3,19	7,70	10,89	10,41	0,03
60	100	3,17	7,28	10,45	10,12	0,03
80	100	3,0	7,94	10,94	11,22	0,03
100	100	2,45	7,39	9,84	10,50	0,02
CV (%)	0	16,55	7,25	5,67	6,16	22,12

ns – não significativo ao teste F.

<sup>1</sup>. Comparação feita com transformação em *arco seno*  $\sqrt{x/100}$ .

<sup>2</sup>. Comparação feita com transformação em  $\sqrt{x+1}$ .

Conforme a Tabela 2 verificou-se que em todos os níveis de Vermiculita® foram obtidos 100% de sobrevivência das plantas, comprovando em parte que as misturas testadas proporcionaram condições adequadas para o bom pegamento das mesmas.

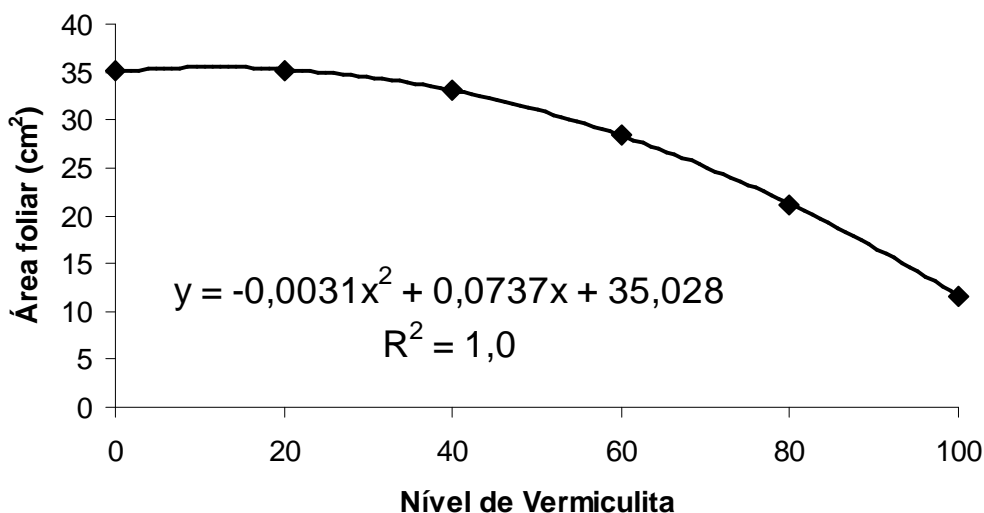
Além dos substratos, acredita-se que o uso de túnel baixo com filme plástico e sombrite (50%), sobre as bandejas, no início do experimento, também teve relação com estes resultados, principalmente, pela manutenção da alta umidade necessária durante a aclimatização, permitindo assim

maior controle sobre as perdas de água, o qual possibilitou a sobrevivência de todas as plantas até a entrada em funcionamento dos estômatos. A umidade relativa do ar no interior dos recipientes é próxima a 100% e, quando ocorre a transferência para o ambiente de aclimatização, a planta enfrenta redução drástica para níveis frequentemente próximos a 70% ou menos. Na aclimatização convencional, o principal meio de controle ambiental é conseguido com elevação da umidade relativa do ar (UR), através do uso de túnel baixo ou pela irrigação frequente do ambiente.

VILLA et al. (2006), durante a aclimatização de plantas propagadas *in vitro* de amoreira-preta, 'Cherokee', em quatro substratos (Vermiculita®, casca de arroz carbonizada, Plantmax® e mistura Vermiculita® + Plantmax® + casca de arroz carbonizada), obtiveram 92% de sobrevivência. Estes autores destacaram que o fator que pode ter contribuído para esta elevada taxa de sobrevivência foi a pré-aclimatização, realizada através da abertura dos frascos contendo as plântulas *in vitro* três dias antes da aclimatização.

No presente trabalho, apesar de não ter sido realizado a pré-aclimatização com a abertura dos frascos obteve-se resultados superiores de sobrevivência, destacando-se assim, as misturas utilizadas e as condições em que as plantas foram aclimatizadas, bem como, o maior cuidado com a umidade do ambiente nos primeiros dias de aclimatização.

Em relação à área foliar e massa da matéria seca da parte aérea das plantas de amoreira preta observou-se efeito significativo dos diferentes níveis de Vermiculita® misturados com terra de mato:esterco bovino durante a aclimatização (Figuras 1 e 2).



**Figura 1** – Área foliar de plantas de amoreira-preta (*Rubus* sp.), cultivar Tupy, aclimatizadas em seis níveis de Vermiculita® misturado com terra de mato:esterco bovino (1:1 v/v)

Na Figura 1, observou-se resposta quadrática para área foliar das plantas de amoreira-preta 'Tupy', com as maiores médias obtidas com 0%, 20% e 40% de Vermiculita®. Enquanto que, na Figura 2, observou-se resposta linear decrescente com o maior valor de massa da matéria seca da parte aérea da plantas de amoreira-preta, cultivar Tupi, obtido com 0% de Vermiculita® misturada com terra de mato:esterco bovino.

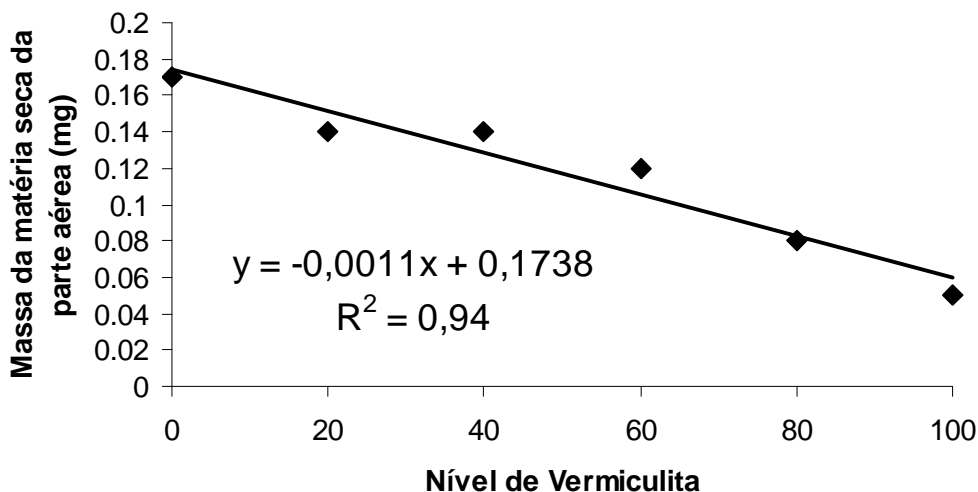
Vale ressaltar que ao comparar os resultados das Figuras 1 e 2, verificou-se que

os resultados da área foliar apresentou certa relação com o ganho de massa de matéria seca da parte aérea das plantas aclimatizadas de amoreira-preta entre os seis níveis de Vermiculita® utilizados e misturados com terra de mato:esterco bovino.

Supõe-se que os maiores valores de matéria orgânica e P (Tabela 1) presentes nas composições de substrato com 0%, 20% e 40% podem ter influenciado nestes resultados (área foliar e massa da matéria seca da parte aérea). De acordo com BLACK

(1967), o P é o elemento chave na fase inicial de crescimento devido ao maior acúmulo de

biomassa.



**Figura 2** – Massa da matéria seca da parte aérea de plantas de amoreira-preta (*Rubus* sp.), cultivar Tupy, aclimatizadas em seis níveis de Vermiculita® misturado com terra de mato:esterco bovino (1:1 v/v)

Além disso, os valores mais baixos de pH presentes nestas composições de substrato (Tabela 1), também podem ter favorecido a obtenção destas médias superiores. Segundo KÄMPF (2000), o pH é um fator que influencia tanto na disponibilidade de nutrientes como na biologia de microrganismos do substrato, sendo os melhores resultados obtidos numa faixa de pH entre 5,0 – 5,8.

Segundo LARCHER (2000), grande parte da matéria acumulada pelas plantas durante o crescimento é o resultado da atividade fotossintética, e o resto depende da absorção de nutrientes do meio. Assim, supõe-se que, além da matéria orgânica, do P e do pH, a maior área foliar pode ter interferido positivamente na atividade fotossintética, favorecendo o maior acúmulo de matéria seca da parte aérea nas mistura contendo 0%, 20% e 40% de Vermiculita®.

Nas Figuras 1 e 2 observou-se que quando foi utilizada somente Vermiculita® nas amoreiras preta Tupy foram obtidos os menores valores de aérea foliar e massa da

matéria seca da parte aérea. HOFFMANN et al. (1999), concluíram que a Vermiculita® foi o substrato menos eficiente para uso durante a aclimatização de plantas de macieira micropropagadas em comparação a areia e Plantmax®. Isso demonstra que a Vermiculita® por apresentar alta retenção de água demonstra-se importante para aclimatização das plantas, mesmo utilizada em misturas com outros substratos.

Assim, na aclimatização das plantas de amoreira-preta, cultivar Tupy recomenda-se utilizar os menores níveis de Vermiculita® (20 e 40%), misturados com terra de mato:esterco bovino.

## REFERÊNCIAS

ANTUNES, L.E.C.; TREVISAN, R.; GONÇALVES, E.D. Propagação, plantio e tratos culturais. In: ANTUNES, L.E.C.; RASEIRA, M.C.B. **Aspectos técnicos da cultura da amora-preta**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. p.37-42. 2004.

BLACK, C.A. **Soil plant relationships**. 2nd ed. New York, J. Wiley. 1967. 792 p.

BOSA, N.; CALVETE, E.O.; KLEIN, V.A.; SUZIN, M. Crescimento de mudas de gipsofila em diferentes substratos. **Horticultura Brasileira**, Brasília. v.21, n.3, p.514-519, 2003.

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.). **Substratos para plantas – a base da produção vegetal em recipientes**. Porto Alegre: Gênese. 2000. p.257-264.

DUTRA, L.F.; DA SILVA, N.D.G.; MAYER, K.C.A.; NINO, A.F.P.; DA SILVA, F.O.; VIEIRA, F.C.B. Protocolos de micropropagação de plantas II: amoreira-preta. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. **Documentos**, 326. 21 p.

FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C. **Propagação de Plantas Frutíferas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 221 p.

HOFFMANN, A. Aclimatização de mudas produzidas *in vitro* e *in vivo*. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte. v.23, n.216, p.7-11, 2002.

HOFFMANN, A.; CHALFUN, N.N.J.; PASQUAL, M.; VEIGA, R.D. Efeito do substrato no enraizamento e aclimatização de mudas micropropagadas do porta-enxerto de macieira Marubakaido. **Revista Agropecuária Clima Temperado**, Pelotas. v.2, n.2, p.189-197, 1999.

KÄMPF, A.N. Seleção de Materiais para uso como substrato. In: KÄMPF, A.N.; FERMINO, M.H. **Substratos para plantas: a base de produção vegetal em recipientes**. Porto Alegre, Editora Gênese. 2000. p. 139–145.

KÄMPF, A.N. Substratos para floricultura. In: Simpósio Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, Maringá, 1992. **Anais...**, Maringá: Universidade Estadual de Maringá. 1999. p.36-43.

KANASHIRO, S. **Efeito de diferentes substratos na produção da espécie *Aechmea fasciata* (Lindley) Baker em vasos**. Piracicaba, 1999. 79 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos, Rima. 2000. 531p.

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

PEREIRA, J.E.S.; FORTES, G.R.L. Desfolhamento e baixa temperatura em plantas micropropagadas de macieira como forma de superar a parada do crescimento durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v.12, n.22, p.135-145, 2000.

PEREIRA, J.E.S.; FORTES, G.R.L.; SILVA, J.B. Efeito da aplicação de baixa temperatura em plantas de macieira sobre o crescimento durante a aclimatização. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília. v.36, n.1, p.89-95, 2001.

PEREIRA, M.C.T.; NIETSCHE, S.; FRANÇA, A.C.; NUNES, C.F.; LIMA, C.; GONÇALVES, V.D.; SALLES, B.P.; MORAIS, D.L.B.; KOBAYASHI, M.K. Aclimatização de mudas micropropagadas de bananeira sob diferentes condições de luminosidade. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal. v.27, n.2, p.238-240, 2005.

RADMANN, E.B.; GONÇALVES, E.D.; FORTES, G.R.L. Concentração de ácido indolbutírico e períodos de escuro, no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta (*Rubus* sp.), cv. Ébano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal. v.25, n.1, p.124-126, 2003.

SANTOS, M.R.A.; TIMBÓ, A.L.O.; CARVALHO, A.C.P.P.; MORAIS, J.P.S. Avaliação de substratos e adubos orgânicos na aclimatização de plântulas de *Heliconia psittacorum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília. v.39, n.10, p.1049-1051, 2004.

SHALUPAEV, M.P.; YATSYNA, A.A. Vestsi Natsyyanal'nai Akademii Navuk Belarusi Seryya Biyalagichnykh Navuk, **Russian**, n. 3, p.109-111, 2002.

TIMBÓ, A.L.O.; SANTOS, M.R.A.; CARVALHO, A.C.P.P., MORAIS, J.P.S. Aclimatização de *Heliconia bihai* L. em diferentes combinações de substratos e adubos orgânicos. In: BARBOSA, J.G.; MARTINEZ, H.E.P.; PEDROSA, M.W.; SEDIYAMA, M.A.N. **Nutrição e adubação de plantas cultivadas em substrato**. Viçosa.. 2004. p. 334.

VILLA, F.; PASQUAL, M; ARAUJO, A.G.; PIO, L.A.S. Micropropagação da amoreira-preta (*Rubus* spp.) e efeito dos substratos durante na aclimatização de plântulas. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá. v.28, n.1, p.47-53, 2006.

WAGNER JÚNIOR, A.; COUTO, M.; FRANZON, R.C.; QUEZADA, A.C. Efeito de substratos na aclimatização de plantas micropropagadas do porta-enxerto de ameixeira Marianna 2624. **Revista Ceres**, Viçosa. v.51, n.295, p.317-323, 2003.

ZIV, M. **In vitro acclimatization**. In: Automation and environmental control in plant tissue culture. Dordresh, Kluwer Academic Publishers, 1995. 535 p.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. **SANEST – Sistema de análise Estatística para Microcomputadores**. Pelotas. UFPel, 1984. 75 p.