

Aclimatização de videiras micropropagadas em frascos com e sem vedação e diferentes concentrações de sacarose

Acclimatization of micropropagated grapevine plants in vessels with or without closed and different sucrose concentrations

Guilherme Nakao Tanno^[a], Luiz Antonio Biasi^[b]

^[a] Acadêmico do Curso de Agronomia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), bolsista de Iniciação Científica do CNPq, Curitiba, PR - Brasil, e-mail: guinata@hotmail.com

^[b] Engenheiro agrônomo, doutor, professor associado do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR - Brasil, e-mail: biasi@ufpr.br

Resumo

Diversos fatores influenciam o processo de aclimatização de plantas micropropagadas, como a concentração de sacarose no meio de cultura e a umidade do ambiente *in vitro*, que é dependente da técnica utilizada de vedação dos frascos. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da concentração de sacarose no meio de cultura e a influência causada pela ausência e presença de filme de PVC na vedação dos frascos na micropropagação e aclimatização de videiras cv. Bordô. Os explantes utilizados foram segmentos nodais com uma gema e uma folha, medindo cerca de 10 mm de comprimento, inoculados em meio de cultura MS contendo a metade da concentração de sais e isento de reguladores de crescimento. Os tratamentos resultaram da combinação de diferentes concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L⁻¹), com e sem vedação com filme de PVC. O delineamento foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial (3 x 2) com 5 repetições. Após 48 dias de cultivo *in vitro*, o experimento foi avaliado. Após a avaliação, as videiras foram aclimatizadas e avaliadas novamente após 35 dias. As concentrações de 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose proporcionaram 100% de plantas enraizadas e com maior altura, maior número de folhas e maior comprimento médio das raízes, em relação à ausência de sacarose. A vedação com filme de PVC foi prejudicial ao crescimento das plantas na ausência de sacarose, resultando em baixa sobrevivência na aclimatização. Concluiu-se que para a aclimatização da videira cv. Bordô, deve-se utilizar 30 g L⁻¹ de sacarose e frascos com ou sem vedação com filme de PVC.

Palavras-chave: Cultura de tecidos. *Vitis labrusca*. Meio de cultura. Filme de PVC.

Abstract

Many factors affect the acclimatization of micropropagated plants, like that sucrose concentration in culture medium and humidity of in vitro environmental, which is dependent of the form used to close the vessels.



The objective of this work was to evaluate the effect of the sucrose concentration in culture medium and the influence of PVC film to close the vessels in micropropagation and acclimatization of 'Bordô' grapevine. Nodal segments with one bud and one leaf, with 10 mm of length, were used like explants, and cultivated in half strength MS culture medium without growth regulators. The treatments were different sucrose concentration (0, 15 and 30 g L⁻¹) combined with or without vessels closed with PVC film. A completely randomized design, using 3 x 2 factorial treatments and 5 replications was used. After 48 days of in vitro culture, the experiment was evaluated. After this evaluation, the grapevines were acclimatized and evaluated again after 35 days. The sucrose concentrations of 15 and 30 g L⁻¹ showed 100% of plant rooting, higher length, higher number of leaves and higher root length than without sucrose. Vessels closed with PVC film were prejudicial to plant growth without sucrose, resulting little survival in acclimatization. In conclusion, to acclimatization of 'Bordô' grapevine must to be used 30 g L⁻¹ of sucrose and vessels closed with or without PVC film.

Keywords: Tissue culture. *Vitis labrusca*. Culture medium. PVC Film.

Introdução

Dentre as cultivares de videiras americanas, destaca-se a 'Bordô', pertencente à espécie *Vitis labrusca*. É uma cultivar utilizada para a produção de vinho tinto comum e suco intensamente coloridos, normalmente usados em cortes no suco e vinho elaborados de 'Isabel' e 'Concord'. Possui alta resistência a doenças fúngicas e produtividade entre 10 a 25 t ha⁻¹, normalmente cultivada de pé-franco, sem a utilização de porta-enxertos, principalmente nos Estados do Sul do Brasil (CAMARGO; MAIA, 2008).

Para assegurar um bom potencial de produção, é importante a obtenção de mudas a partir de plantas matrizes livres de vírus, que podem ser obtidas pela micropropagação, garantindo a eliminação de patógenos, como viroides, fitoplasmas e bactérias (BIASI, 2003). Durante a micropropagação, há fatores internos dos frascos de cultivo que afetam a aclimatização dos explantes, como: baixa intensidade luminosa; baixa concentração de CO₂ durante o período de luz; alta pressão osmótica no meio de cultura, graças à concentração de íons inorgânicos e sacarose; baixa troca gasosa com o ambiente externo; elevada umidade do ambiente *in vitro* (AFREEN, 2004).

As folhas das plantas *in vitro* caracterizam-se por serem delgadas, fotossinteticamente inativas, possuem estômatos não funcionais em baixa densidade, geralmente grandes e com alta condutância estomática, pelos menores e camada de cera epicuticular

fina (AFREEN, 2004) e células epidérmicas com parede celular não lignificada, não estando adaptadas para enfrentar as condições climáticas *ex vitro*, o que causa perda de água e estresse hídrico nas primeiras horas de aclimatização (BELLINTANI et al., 2007). Desta forma, um número expressivo de espécies vegetais micropropagadas não sobrevive quando transferidas das condições *in vitro* para ambiente de casa-de-vegetação ou campo (HAZARIKA, 2003). Então, uma das fases mais críticas na micropropagação, para a maioria das espécies vegetais, é a transição de um meio heterotrófico *in vitro* para o autotrófico *ex vitro* (DESJARDINS; GROSSELIN; YELLE, 1987).

Na micropropagação, quando o crescimento das plantas depende do açúcar presente no meio de cultura, tem-se um crescimento fotomixotrófico ou heterotrófico. Já quando o crescimento ocorre pela inclusão de CO₂ no microclima de cultivo, como fonte de carbono para a fotossíntese gerar novos carboidratos, tem-se o crescimento fotoautotrófico (KOZAI; ZOBAYED, 2000). Assim, na micropropagação convencional, por causa da presença de sacarose no meio de cultura, baixa intensidade luminosa, reduzida troca gasosa, elevada umidade interna dos frascos, alta concentração de etileno e baixa concentração de CO₂, as plantas *in vitro* podem ser caracterizadas como heterotróficas, pois não produzem açúcares suficientes para seu crescimento. Uma das formas de promover o comportamento fotoautotrófico é a utilização da luz natural (ERIG; SCHUCH, 2005).

Na micropropagação heterotrófica, a presença de sacarose torna-se fundamental como fonte de carboidratos para o crescimento das plantas, conforme verificado em plantas de morangueiro, batata, menta, videira e ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) (RIQUELME; GUIÑAZU; TIZIO, 1991; SKREBSKY; NICOLOSO; MALDANER, 2006; VILLA et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da concentração de sacarose no meio de cultura e a influência causada pela ausência e presença de filme de PVC na vedação dos frascos na micropropagação e aclimatização de videiras cv. Bordô.

Materiais e métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Micropropagação de Plantas e na casa-de-vegetação da Universidade Federal do Paraná no período de maio a agosto de 2007.

O meio de cultura utilizado foi o MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com a metade da concentração de sais, isento de reguladores de crescimento e solidificado com 6 gL⁻¹ de ágar (Vetec®). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da adição do ágar. Cada frasco de 250 mL recebeu 25 mL do meio de cultura e foram fechados com tampa de polipropileno rígido e transparente com rosca. Os frascos foram esterilizados a 120 °C e 1,5 atm de pressão por 20min.

A fonte dos explantes foram videiras cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS com 30 gL⁻¹ de sacarose e isento de reguladores de crescimento. Os explantes consistiram de segmentos nodais com 10 mm de comprimento cada, com uma gema axilar e uma folha.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial (3 x 2) e os tratamentos resultaram da combinação de diferentes concentrações de sacarose (0, 15 e 30 gL⁻¹) com e sem vedação de filme de PVC (polivinilcloreto) com espessura de 9 µm na tampa com cinco repetições. A parcela foi composta por três frascos contendo quatro explantes por frasco. Os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 40 a 45 µmol m⁻² s⁻¹.

Após 48 dias de cultivo *in vitro*, o experimento foi avaliado pelas seguintes variáveis: altura de plantas,

número de folhas por planta, porcentagem de plantas vivas, porcentagem de enraizamento e o comprimento médio das três maiores raízes por planta.

Após a primeira avaliação, as videiras foram plantadas em tubetes de polipropileno com 53 cm³ de volume, utilizando Plantmax HT® como substrato e foram colocadas em casa-de-vegetação com irrigação intermitente de 15s de rega a cada 15min, das 8 às 17h; a cada hora, das 17 às 23h e a cada 3h., das 23 às 8h. Após 19 dias nesse ambiente, as videiras foram mantidas na mesma casa-de-vegetação apenas com rega uma vez ao dia. Após 16 dias, o experimento foi novamente avaliado pelas seguintes variáveis: porcentagem de sobrevivência e número médio de folhas novas. O processo completo de aclimatização totalizou 35 dias, sendo realizado durante o inverno.

As médias obtidas foram estudadas pela análise de variância e pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Resultados

Na primeira avaliação, realizada após 48 dias de cultivo *in vitro*, verificou-se que houve interação significativa em todas as variáveis analisadas. O meio de cultura sem sacarose e com filme de PVC apresentou resultados inferiores em comparação aos outros tratamentos, com a menor sobrevivência, menor porcentagem de enraizamento, menor altura de plantas, menor número de folhas e menor comprimento de raízes (Tabela 1). Na ausência de sacarose, os frascos sem filme de PVC apresentaram melhores resultados que com filme de PVC, mas ambos foram inferiores aos outros tratamentos em relação à altura, número de folhas e comprimento das raízes. Desta forma, na ausência de sacarose, a vedação plástica foi prejudicial para as plantas. Provavelmente, esse comportamento ocorreu pela redução das trocas gasosas entre o ambiente externo e o interno dos frascos, ocasionando a elevação na umidade relativa, o acúmulo de etileno e a redução do CO₂ no interior do frasco durante o período de luz, prejudicando o crescimento das plantas *in vitro*. O acúmulo de etileno tem sido relatado em diversos cultivos *in vitro*, ocorrendo de forma gradual com o tempo de cultivo (FUJIWARA; KOZAI, 1995).

Nos frascos hermeticamente fechados, o nível de CO₂ aumenta durante o período de escuro e reduz durante o período de luz, em resposta da baixa taxa fotossintética e alta taxa respiratória noturna (KOZAI et al., 1992). Isso também foi verificado na micropropagação de tomilho (*Thymus vulgaris*), em que a altura das plantas, o número de gemas por planta e o número de folhas por planta foi maior naquelas cultivadas em frascos fechados com algodão do que naqueles fechados com alumínio ou filme de PVC (BANDEIRA et al., 2007). Apesar de o tomilho ser uma planta herbácea, diferente da videira, que é uma planta lenhosa, o comportamento *in vitro* é semelhante entre as espécies, pois, durante o processo de micropropagação, o crescimento das plantas é acelerado e os subcultivos são frequentes. A redução da massa fresca em plantas da bromélia *Orthophytum mucugense*, após a retirada dos frascos de cultivo e exposição ao ambiente, foi muito menor naquelas cultivadas em frascos vedados com algodão, apresentando média de 10,9%, em relação aos frascos vedados com filme de PVC, em que a perda de massa foi em média 20,2%. Isso comprovou que a vedação com filme de PVC dificulta as trocas gasosas entre o microambiente *in vitro* e o ambiente externo, impedindo o desenvolvimento de adaptações contra a perda de água por transpiração (BELLINTANI et al., 2007).

O número de folhas e o comprimento das raízes foram maiores nos tratamentos com sacarose (Tabela 1). Isto prova que a fonte de sacarose no meio foi essencial para o crescimento das plantas, já que houve grande diferença com relação à ausência de sacarose. Villa et al. (2006) também obtiveram para o porta-enxerto de videira VR043-43, um maior número de folhas com 30 g L⁻¹ de sacarose, apesar de que não houve diferença significativa entre 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose com filme de PVC, da mesma forma como observado nesse experimento. Para o porta-enxerto de macieira M9, a presença de 30 g L⁻¹ de sacarose favoreceu o enraizamento em relação à ausência de sacarose, bem como a vedação dos frascos com algodão em relação ao papel alumínio (SOUZA et al., 2007). Na micropropagação de tomilho, o aumento da concentração de sacarose para 40 e 50 g L⁻¹ resultou numa redução da altura e do número de folhas por planta, sendo considerada adequada à concentração de 30 g L⁻¹ (BANDEIRA et al., 2007). O mesmo comportamento foi verificado para a *Melissa officinalis*, uma espécie herbácea, com

redução da altura e área foliar das plantas cultivadas em meios com concentrações acima de 30 g L⁻¹ de sacarose (RIBEIRO et al., 2007). Para o mamoeiro 'Tainung 01', foi observado um comportamento quadrático das variáveis *crescimento dos segmentos nodais, comprimento da maior folha e porcentagem de enraizamento*, com o aumento da concentração de sacarose até concentrações próximas de 30 g L⁻¹ (SCHMILDT; AMARAL; SCHMILDT, 2007). Já para o morangueiro, foi demonstrado que o aumento da concentração de sacarose até 60 g L⁻¹ favoreceu de forma linear o incremento da massa seca da parte aérea e da raiz e, na sua ausência, não houve desenvolvimento da raiz. Dessa forma, confirmou-se que o morangueiro apresentou um típico comportamento heterotrófico, sendo dependente da sacarose como fonte de carbono para o desenvolvimento das plantas *in vitro* (CALVETE; KÄMPF; SUZIN, 2002). Para o porta-enxerto de pereira OH x F97 também foi verificado maior desenvolvimento das raízes nos meios contendo concentrações superiores de sacarose (LEITE; FINARDI; FORTES, 2000). Geralmente as condições utilizadas para o cultivo *in vitro* não permitem que as plantas realizem a fotossíntese de forma adequada para serem consideradas autotróficas, sendo necessário o fornecimento de carboidratos no meio de cultura. Para promover a fotossíntese e o cultivo em meio sem sacarose é necessária a utilização de outros sistemas de cultivo que permitam o fornecimento de elevada intensidade luminosa e aumento na taxa de CO₂ com ventilação forçada (ERIG; SHUCH, 2005; KOZAI et al., 2005). Nesse caso, o cultivo em condições realmente autotróficas em meios sem sacarose pode reduzir o custo de produção das mudas micropropagadas, elevar a taxa de sobrevivência após a aclimatização e aumentar a sua qualidade (XIAO; KOZAI, 2004).

Na segunda avaliação, realizada após 35 dias de aclimatização, a sobrevivência das plantas provenientes do meio de cultura com 30 g L⁻¹ de sacarose foi superior às plantas cultivadas na ausência de sacarose e não diferiu significativamente das provenientes do meio de cultura com 15 g L⁻¹ de sacarose (Tabela 2). A sobrevivência de plantas aclimatizadas de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*) também foi favorecida pela presença de sacarose no meio de cultura, sendo os melhores resultados obtidos nas concentrações de 45 e 60 g L⁻¹, que promoveram o maior crescimento das plantas (SKREBSKY; NICOLOSO; FERRÃO, 2004).

Tabela 1 - Porcentagem de plantas vivas, porcentagem de enraizamento, altura das plantas, número de folhas e comprimento médio das três maiores raízes da videira cv. Bordô em meio de cultura com diferentes concentrações de sacarose e frascos com e sem vedação com filme de PVC (polivinilcloroeto)

Sacarose (g L ⁻¹)	Plantas vivas (%)		Enraizamento (%)		Altura (cm)		Número de Folhas		Comprimento das três maiores raízes (cm)	
	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com
0	100 aA	86,6 bB	100 aA	58,3 bB	2,92 bA	1,16 bB	4,53 bA	1,79 bB	8,35 cA	0,85 cB
15	100 aA	100 aA	100 aA	100 aA	4,10 aA	4,40 aA	5,15 aB	6,48 aA	15,49 bA	13,13 bB
30	100 aA	100 aA	100 aA	100 aA	4,23 aA	4,60 aA	5,80 aA	6,48 aA	17,37 aA	16,04 aA
C.V. (%)	3,9		2,6		8,0		8,8		9,5	
F	9,83**		249,156***		44,42***		52,85***		21,57***	

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Tabela 2 - Sobrevivência e número médio de folhas novas em plantas da videira cv. Bordô, provenientes do cultivo *in vitro* em meio de cultura com diferentes concentrações de sacarose e frascos com e sem vedação com filme de PVC (polivinilcloroeto), após aclimatização

Sacarose (g L ⁻¹)	Sobrevivência (%)		Número médio de folhas novas por planta	
	Sem	Com	Sem	Com
0	66,7 bA	23,3 bB	0,62 aA	0,00 bB
15	84,9 aA	84,9 aA	0,67 aA	0,76 aA
30	94,9 aA	94,9 aA	0,58 aA	0,73 aA
C.V. (%)	13,4		25,1	
F	15,54***		23,17***	

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Na ausência de sacarose, a sobrevivência foi menor nas plantas originadas de frascos com vedação de filme de PVC, em que apenas 23,3% das plantas sobreviveram (Tabela 2). O crescimento das plantas, analisado com base na formação de folhas novas, foi pequeno nesse período, mas novamente ficou evidente que o tratamento sem sacarose e com filme de PVC apresentou o pior comportamento, e as plantas não conseguiram emitir nenhuma folha nova. Comportamento semelhante foi observado na aclimatização de *Orthophytum mucugense*: as plantas provenientes do cultivo em frascos vedados com filme de PVC e meio de cultura contendo 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose apresentaram maior sobrevivência do que as plantas cultivadas na ausência de sacarose. As plantas provenientes de frascos com vedação de

algodão também apresentaram sobrevivência superior àquelas oriundas de frascos com vedação de filme de PVC. Esse comportamento foi explicado pela melhor adaptação das plantas cultivadas em frascos com maior troca gasosa, pois a avaliação da espessura da parede lignificada de células da epiderme foliar mostrou que, no momento da retirada dos frascos, as plantas procedentes de tubos vedados com filme PVC não apresentaram presença de lignina nem espessamento nas paredes das células da epiderme foliar abaxial ou adaxial, enquanto as plantas procedentes de tubos vedados com algodão apresentaram paredes lignificadas em desenvolvimento nos tratamentos com presença de sacarose no meio de cultura (BELLINTANI et al., 2007).

Conclusões

Para o melhor desenvolvimento da videira cv. Bordô na fase de enraizamento e aclimatização recomenda-se o uso de 30 g L⁻¹ de sacarose, em frascos com ou sem filme de PVC.

Referências

- AFREEN, F. Physiological and anatomical characteristics of *in vitro* photoautotrophic plants. In: KOZAI, T. et al. (Ed.). **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system**. Dordrecht: Springer, 2004. p. 59-87.
- BANDEIRA, J. M. et al. Diferentes tipos de vedações dos frascos e concentrações de sacarose na micropropagação de *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 472-474, 2007.
- BELLINTANI, M. C. et al. Efeito da ventilação *in vitro* na aclimatização de plantas micropropagadas de *Orthophytum mucugense* Wand e Conceição. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 1098-1100, 2007.
- BIASI, L. A. Micropropagação de videiras. In: POMMER, C. V. (Ed.). **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003. p. 320-350.
- CALVETE, E. O.; KÄMPF, A. N.; SUZIN, M. Concentração de sacarose no enraizamento *in vitro* de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 186-191, 2002. doi:10.1590/S0102-05362002000200014.
- CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G. Cultivares de uvas rústicas para regiões tropicais e subtropicais. In: BOLIANI, A. C. et al. (Ed.). **Uvas rústicas: cultivo e processamento em regiões tropicais**. Jales: [s.n.], 2008. p. 63-90.
- DESJARDINS, Y.; GROSSELIN, A.; YELLE, S. Acclimatization of *ex vitro* strawberry plantlets in CO₂ - enriched environments and supplementary lighting. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v. 112, n. 5, p. 846-851, 1987.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005. doi:10.1590/S0103-84782005000400039.
- FUJIWARA, K.; KOZAI, T. Physical microenvironment and its effects. In: AITKEN-CHRISTIE, J. et al. (Ed.). **Automation and environment control in plant tissue culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 319-369.
- HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. **Current Science**, v. 85, n. 12, p. 1704-1712, 2003.
- KOZAI, T.; ZOBAYED, S. M. A. Acclimatization. In: SPIER, R. E. (Ed.). **Encyclopedia of cell technology**. New York: John Wiley & Sons, 2000. v. 1. p. 1-12.
- KOZAI, T. et al. Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation systems for large-scale commercialization. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 5, n. 1, p. 23-34, 2005.
- KOZAI, T. et al. The *in vitro* environment and its control in micropropagation. In: KURATA, K.; KOZAI, T. (Ed.). **Transplant production systems**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1992. p. 247-282.
- LEITE, G. B.; FINARDI, N.; FORTES, G. R. L. Efeitos de concentrações de sacarose no meio de cultura e da intensidade luminosa no enraizamento "*in vitro*" do porta-enxerto de pereira OH x F97. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 2, p. 353-357, 2000.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-479, 1962. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- RIBEIRO, M. V. et al. Concentrações de sacarose e tipos de vedação no cultivo *in vitro* de *Melissa officinalis* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 843-845, 2007.
- RIQUELME, C.; GUIÑAZU, M. E.; TIZIO, R. Pre-acondicionamiento y aclimatación em condiciones de invernáculo de plântulas micropropagadas de frutilla, menta, papa y vid. **Phyton**, v. 52, n. 1, p. 73-82, 1991.
- SCHMILDT, E. R.; AMARAL, J. A. T.; SCHMILDT, O. Sacarose na fase de enraizamento *in vitro* de mamoeiro 'Tainung 01'. **Scientia Agraria**, v. 8, n. 1, p. 25-31, 2007.
- SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; FERRÃO, G. E. Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimatização *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pffafia glomerata* Spreng. Pedersen), **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1471-1477, 2004. doi:10.1590/S0103-84782004000500022.
- SKREBSKY, E. C.; NICOLOSO, F. T.; MALDANER, J. Substratos na aclimatização de *Pffafia glomerata* (Spreng) Pedersen produzida *in vitro* sobre diferentes doses de sacarose. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p. 1416-1423, 2006. doi:10.1590/S0103-84782006000500011.

SOUZA, J. A. et al. Enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira – M9 em função da vedação, sacarose e material de suporte no meio de cultura. **Scientia Agraria**, v. 8, n. 2, p. 161-164, 2007.

VILLA, F. et al. Multiplicação *in vitro* de porta-enxerto de videira em variações do meio MS. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 28, n. 3, p. 345-349, 2006.

XIAO, Y.; KOZAI, T. Commercial application of a photoautotrophic micropropagation system using large vessels with forced ventilation: plantlet growth and production cost. **HortScience**, v. 39, n. 6, p. 1387-1391, 2004.

Recebido: 19/05/2010

Received: 05/19/2010

Aprovado: 15/02/2011

Approved: 02/15/2011