COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO DO MORANGUEIRO
(*Fragaria x ananassa* Duch.) MICROPROPAGADO E
ACLIMATADO PRESENÇA DE FUNGOS ENDOMICORRÍZICOS

C A R L O S E D U A R D O C O R S A T O
Engenheiro Agrônomo

Orientador : Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para a obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área de
Concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro - 1993

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - FCLQ/USP

C826c Corsato, Carlos Eduardo
Comportamento fisiológico do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) micropropagado e aclimatado na presença de fungos endomicorrízicos. Piracicaba, 1993.
55 p.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia

1. Micorriza 2. Morango - Micorriza 3. Morango - Propagação "in vitro" - Comportamento I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CDD 634.75

COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO DO MORANGUEIRO
(*Fragaria x ananassa* Duch.) MICROPROPAGADO E
ACLIAMATADO NA PRESENÇA DE FUNGOS ENDOMICORRÍZICOS

Carlos Eduardo Corsato

Aprovado em: 10. 12. 1993

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo

ESALQ/USP

Prof. Dr. Keigo Minami

ESALQ/USP

Prof^a. D^{ra}. Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso

ESALQ/USP

Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo
Orientador

Aos meus irmãos Roberto, Perseo, Solange,
Claudio e à Clarice, ofereço

Aos meus pais Déa e Perseo
dedico

A G R A D E C I M E N T O S

Agradeço a todos que, de alguma forma, colaboraram na execução deste trabalho. Em especial:

- ao Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo pela orientação, e pelas excelentes condições de trabalho oferecidas

- à Pesquisadora D^{ra}. Vera L. M. Romani, pelas valiosas sugestões durante a execução da parte experimental e discussão, e pela indispensável solicitude e amizade

- à Pro^{fa}. D^{ra}. Elke J. B. N. Cardoso pela atenção e sugestões construtivas

- à Denise L. C. Mescolotti da Seção de Microbiologia do Solo e Isabel da Clínica Fitopatológica da ESALQ pelos diagnósticos de Laboratório

- ao Prof. Thomas Joseph Burke pelos apontamentos valiosos oferecidos na disciplina Metodologia da Pesquisa

- aos Profs. do Departamento de Estatística Experimental e ao monitor do CIAGRI, Marcelo (siri)

- à Kátia M. A. Ferraz, Eliana M. G. Sabino e demais funcionários da Biblioteca da ESALQ

- aos Profs. Dr. Murilo de Melo (pela redação do Summary), Luís A. Gallo, à estagiária Renata Kuerche, ao Amaral, Ênio, Chadadd, Romeu, Solizéte e demais funcionários do CEBTEC pelo apoio e amizade

- ao Regente do Coral "Luiz de Queiróz" Nelson
N. V. S. Sobrinho e seus integrantes pela acolhida e
momentos de descontração.

S U M Á R I O

página

RESUMO	ix
SUMMARY	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Aspectos gerais da cultura do morango	3
2.2. Micropropagação	4
2.3. Aclimação	7
2.4. Micorrizas	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Obtenção das plantas micropropagadas.	14
3.2. Obtenção do inoculante endomicorrízico.	15
3.3. Inoculação das plantas e aclimação	16
3.4. Delineamento experimental	17
3.5. Escolha das variáveis estudadas e modelo conceitual	18
3.6. Avaliação da colonização das raízes pelos fungos endomicorrízicos	21
3.6.1. Metodologia para a coloração das raízes	21
3.6.2. Avaliação da porcentagem de infecção das raízes	21
3.7. Escolha e definição operacional dos indicadores para as variáveis	22
3.7.1. Sobrevivência	23

3.7.2. Altura da planta, diâmetro do colo e número de folhas	23
3.7.3. Massa da matéria fresca e seca	24
3.7.3.1. Razão da massa da matéria fresca entre raiz e parte aérea	24
3.7.4. Colonização das raízes.	24
3.7.5. Número de estolões por planta	24
3.7.6. Teor de fósforo do tecido vegetal	25
3.8. Ensaio de campo.	25
3.9. Forma de análise dos resultados.	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.	27
4.1. Observações visuais durante a aclimação.	27
4.2. Sobrevivência.	28
4.3. Avaliação dos indicadores de crescimento aos 45 dias	34
4.4. Massa da matéria seca da parte aérea	35
4.5. Número de mudas por planta	40
4.6. Teor de fósforo da parte aérea aos 180 dias.	41
4.7. Ensaio de campo.	42
4.8. Arquitetura das raízes	44
4.9. Considerações finais	46
5. CONCLUSÕES.	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	49

COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO DO MORANGUEIRO
(*Fragaria x ananassa* Duch.) MICROPROPAGADO E
ACLIMATADO NA PRESENÇA DE FUNGOS ENDOMICORRÍZICOS

Autor : CARLOS EDUARDO CORSATO

Orientador : Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO

R E S U M O

Plantas dos cultivares Sequóia, Campinas e AGF-80 propagadas "in vitro" a partir de meristemas, foram aclimatadas em estufa com o objetivo de se avaliar o comportamento fisiológico de três tamanhos de plântulas na presença de fungos endomicorrízicos (MVA) dos gêneros *Acaulospora* sp e *Glomus* sp. Aos 45 dias da aclimação os cultivares Campinas e AGF-80 mostraram os maiores índices de sobrevivência (95%), e o cultivar Sequóia o menor (85%). Verificou-se um incremento na porcentagem de sobrevivência proporcional ao tamanho da planta aclimatada. Não houve diferença significativa na porcentagem de sobrevivência entre as plantas micorrizadas e as não micorrizadas. O crescimento das plantas avaliado pela medição da altura, diâmetro do colo e do número de folhas, foi estimulado nas plantas inoculadas com os fungos MVA, assim como a massa da matéria seca da parte aérea. A porcentagem de colonização pelos fungos endomicorrízicos mostrou-se, em média, superior a 40%. Pode-se concluir que o cultivar Sequóia foi o mais sensível às condições de aclimação, e que houve uma correlação entre o índice de sobrevivência e o tamanho da plântula aclimatada.

PHYSIOLOGICAL BEHAVIOR OF "IN VITRO MICROPROPAGATED
STRAWBERRY (*Fragaria x ananassa* Duch.) PLANTS
ACCLIMATED IN PRESENCE OF ENDOMYCORRHIZAL FUNGI

Author: CARLOS EDUARDO CORSATO

Adviser: Prof. Dr. OTTO JESU CROCOMO

S U M M A R Y

Plants of (*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivars Sequóia, Campinas and AGF - 80 propagated from meristems *in vitro* were acclimated in greenhouse in order to evaluate physiological behavior of plants of three different sizes in presence and absence of endomycorrhizal fungi (MVA) of the *Acaulospora* sp and *Glomus* sp genera. After 45 days of acclimation the cultivars Campinas and AGF - 80 showed the highest survival index (90%) and the cultivar Sequóia the lowest (85%). The survival rate showed to be proportional to the size of the tested plants, and did not show any relation to the presence or absence of mycorrhizal fungi. The mycorrhizal treatment, monitored by evaluating the growth of the plants with base on the plant height, number of leaves, shoot dry weight and diameter of the intersection region of the stem and root stimulated inoculated plants growth. The percentage of radicular colonization by MVA fungi was at average higher

than 40 %. It was possible to conclude that the Sequóia cultivar was the most sensitive to the acclimation conditions and there was a direct relationship between the size and the survival index of the acclimated plants.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) tem se expandido rapidamente no país, sobretudo nos estados da região Sul e nos municípios próximos a região de Campinas no estado de São Paulo.

Seu cultivo é altamente exigente com relação ao manejo fitossanitário, refletindo no aumento do custo de produção e em riscos de toxidez para os consumidores devido ao emprego de agroquímicos que visam o controle de inúmeras pragas e doenças. O emprego de cultivares resistentes seria a alternativa mais adequada; entretanto, os trabalhos de melhoramento genético nos cultivares atualmente utilizados concentraram-se em melhorar as características de mercado dos frutos.

A micropropagação tem se constituído numa das alternativas mais eficientes para a produção de matrizes livres de vírus, bactérias e de outros fitopatógenos. Uma vez estabelecida a metodologia para a multiplicação de matrizes sadias "in vitro", o próximo passo refere-se à aclimação dessas plantas em condições especiais para posteriormente serem encaminhadas para os produtores. Uma das etapas mais críticas no processo de obtenção de plantas matrizes de morangueiro e de muitas outras espécies por micropropagação, consiste no período de transição da fase "in vitro" (nutrição heterotrófica) para a fase "ex vitro" (nutrição autotrófica) DESJARDINS et alii, 1987).

As associações micorrízicas podem trazer grandes benefícios para amenizar os efeitos do estresse fisiológico das plantas sob condições adversas, podendo também refletir positivamente no custo de produção e no rendimento da cultura.

Nesse contexto, foi realizado o presente trabalho, cujo objetivo foi acompanhar o comportamento fisiológico de plantas de morangueiro na fase "ex vitro" da sua propagação, e verificar se os fungos endomicorrízicos poderiam auxiliar na sua sobrevivência e no crescimento, sobretudo daquelas plantas de menor tamanho, evitando-se que fossem descartadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais da cultura do morango

O morangueiro cultivado (*Fragaria x ananassa* Duch.) sob o ponto de vista econômico - social, tem significado para muitas regiões do país uma importante atividade agrícola, visto que o seu consumo tem aumentado e por tratar-se de uma exploração que agrega grande contingente de mão-de-obra familiar no meio rural.

No Brasil, a cultura do morangueiro tomou impulso a partir da Segunda Guerra Mundial (HASHIMOTO, 1962). São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul são os principais estados produtores, sendo que nos dois primeiros os frutos, em grande parte, são destinados para o consumo "in natura", havendo no Rio Grande do Sul predomínio à produção de morango destinado à indústria (FERNANDES, 1981). Atibaia, Cabreúva, Campinas, Louveira, Piedade e Vinhedo, entre outras, destacam-se entre as principais regiões paulistas produtoras de morangos. O morango amadurece numa época em que há falta de frutos no mercado; final de outono e inverno. Em função disso atingem cotações relativamente elevadas, o que estimula cada vez mais os produtores, mesmo sendo uma das culturas que exigem inúmeros cuidados desde a implantação até a comercialização dos frutos (CASTELLANE, 1986).

Por se tratar de uma cultura cujo ciclo produtivo é dos mais longos (até sete meses dependendo do cultivar, CAMARGO 1945), durante o ano o morangueiro exige

da parte do produtor um nível de tecnologia avançado no que diz respeito ao controle de doenças. A erradicação dessas doenças, nos campos de multiplicação, são dificultadas devido ao fato de que muitos dos seus sintomas característicos só se manifestam após a indução floral, o que leva à hipótese de que essa infecção se inicie na forma latente (BOXUS et alii, 1984).

As doenças viróticas no morangueiro, e sobretudo, aquelas provocadas por fungos vem adquirindo importância crescente no estado de São Paulo, não só pelo prejuízos causados nos viveiros de mudas, mas também nas culturas destinadas a produção de frutos (CARDOSO, 1980 e RAMOS, 1986).

O emprego de variedades resistentes é a indicação clássica; porém não se dispondo, no momento, de cultivares com resistência desejável e que tenham aceitação comercial, deve-se conciliar o controle químico às demais medidas empregadas para o controle de doenças (RAMOS, 1986). No caso do morangueiro, entre outras medidas, é recomendação obrigatória o uso de matrizes ou mudas comprovadamente sadias para multiplicação e/ou produção de frutos.

2.2. Micropropagação

As técnicas de cultura "in vitro" tem se tornado a única alternativa realmente efetiva para se obterem plantas livres de vírus, bactérias, micoplasmas e fungos (HU & WANG, 1983). Desse modo, a micropropagação a partir da cultura de meristemas tem sido amplamente utilizada visando a obtenção de plantas matrizes sadias.

A primeira experiência na obtenção de morangueiro, a partir de tecido meristemático, foi iniciado por BELKENGREN & MILLER (1962), onde estes conseguiram eliminar o vírus latente A de *Fragaria vesca* e

posteriormente em 1963, outro vírus de uma cultivar de morangueiro ornamental. A partir de então, tornou-se rotina em várias partes do mundo a produção de matrizes de morangueiro por cultura de meristemas (VILLALOBOS-ARÁMBULA & ORTEGA OBREGON, 1978; MAIA, 1984; BOXUS et alii 1984) destinadas a exploração comercial.

Desde o sucesso obtido por vários pesquisadores na regeneração de plantas saudáveis "in vitro" a partir de ápices meristemáticos (MOREL, 1965; MURASHIGE, 1977; HU & WANG, 1983), tem ocorrido nos últimos anos um grande interesse pela aplicação das técnicas de cultura de tecidos como alternativa para a propagação assexuada de plantas economicamente importantes. O tamanho do propágulo empregado nesse processo é bastante diminuto, razão pela qual essa técnica de propagação assexuada ficou conhecida como micropropagação .

HU & WANG (1983) destacaram como principais vantagens que tem levado a se preferir os métodos de cultura "in vitro" como: a) apenas uma pequena quantidade de tecido vegetal é necessária como explante inicial para se regenerar milhares de clones idênticos a planta doadora em apenas um ano, em comparação com os métodos convencionais que requerem vários anos para se obter o mesmo número de plantas, b) muitas espécies apresentam elevada resistência aos métodos convencionais de propagação; a propagação "in vitro" mostra-se como uma possível alternativa para a propagação dessas espécies, c) as técnicas "in vitro" consistem num método que dinamizam o intercâmbio de material estrangeiro; a condição estéril da cultura elimina o risco de serem introduzidas novas doenças, portanto o período de quarentena pode ser reduzido e até mesmo eliminado, d) as plantas "in vitro" podem ser multiplicadas ,armazenadas ou transportadas em qualquer época do ano.

As culturas "in vitro" podem ser armazenadas por longos períodos sem a perda de suas características vitais, desde que esta cultura seja mantida em condições mínimas de crescimento, isto é, diminuindo seu ritmo metabólico mantendo-as, por exemplo, sob baixas temperaturas, na ausência de luz e controlando-se as fontes nutricionais do meio de cultura. Essas técnicas tem sido empregada com sucesso no armazenamento de matrizes de morango livres de vírus obtidas a partir da cultura de meristemas (HU & WANG, 1983; GALLETA & BRINGHURST, 1990).

No Brasil, a produção de mudas de morangueiro testadas e livres de vírus iniciada em 1967 pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) no estado de São Paulo, promoveu um aumento da produtividade de 15 a 20 ton/ha em 1970 para 40 a 55 ton/ha poucos anos mais tarde. Os quatro vírus do morangueiro conhecidos em São Paulo disseminados através de afídeos ocorriam com alta incidência até o início da década de 70. O emprego de mudas obtidas a partir de matrizes básicas e livres de vírus produzidas por cultura de tecidos, cultivadas em locais afastados de outras plantações de morangueiro, permitiu praticamente erradicar esses vírus das regiões produtoras de morangos. Já foram obtidas mudas de morangueiro livre dos vírus que provocam os sintomas conhecidos como mosqueado, clorose marginal, encrespamento e faixa das nervuras, entre outros (BETTI, 1991).

MAIA (1984), relatou que a UEPAE - Cascata (RS), unidade da EMBRAPA, transformada em Centro Nacional de Pesquisa de Fruteiras de Clima Temperado, já dominando a técnica de cultura de tecidos em morangueiro, teve participação nesse mesmo ano pela produção de cerca de 20 milhões de mudas dessa espécie multiplicadas por viveiristas a partir de matrizes obtidas por cultura de meristemas. Essas mudas foram estimadas em 140 milhões de cruzeiros (valores da época) e responderam por 70% das

plantações comerciais de morango no Brasil durante este ano agrícola.

2.3. Aclimação

Uma vez multiplicadas "in vitro", o próximo passo refere-se à aclimação dessas plantas em condições especiais. A partir dessa fase tem início uma das etapas que exige um extremo controle dos fatores que interagem no processo.

O campo, as estufas, e até mesmo as casas de vegetação possuem umidade relativa mais baixa, elevada intensidade luminosa, e ambiente séptico que estressa as plantas micropropagadas quando comparadas com a condição "in vitro," onde são mantidas em ambientes monitorados (PREECE & SUTTER, 1991). Isto porque, durante a fase em que são cultivadas "in vitro", as plantas mostram pouca capacidade para sintetizar carboidratos a partir do aparelho fotossintético; nessa condição elas utilizam o carbono da sacarose contida no meio de cultura, havendo pouca demanda por compostos fotoassimilados. Assim, os cloroplastos apresentam-se achatados, com o grana desorganizado e com baixo acúmulo de grãos de amido (WETZSTEIN & SOMMER, 1982). Os estômatos permanecem constantemente abertos devido a elevada umidade relativa no recipiente de cultivo e seu mecanismo de fechamento funciona de modo precário quando essa umidade cai, fazendo com que a planta transpire ininterruptamente, colocando em risco sua sobrevivência (BRAINERD & FUCHIGAMI, 1982).

Tem sido proposto que a principal função das folhas produzidas "in vitro" relaciona-se a uma fonte transitória de nutrientes para auxiliar no período crítico da aclimação. A partir desse pressuposto, o sucesso da aclimação das plantas produzidas "in vitro" seria dependente da quantidade de material armazenado nos seus

tecidos, o qual serviria como fonte de carbono a ser consumida nos estágios iniciais do processo, até a emergência de novas folhas (GROUT & MILLAM, 1985; DESJARDINS et alii, 1987). O significado prático dessa hipótese implica no fato de que plantas "in vitro" de maior tamanho e, por conseguinte, contendo maior quantidade de material de reserva, seriam mais indicadas para a aclimação do que aquelas de menor tamanho e com menor quantidade de material armazenado. ZHANG & STOLTZ (1989), estudando o efeito de diferentes tamanhos de plantas micropropagadas de *Euphorbia fulgens* durante a aclimação estipularam um tamanho padrão mínimo, abaixo do qual as plantas aclimatadas teriam poucas chances de sobreviverem.

O sistema radicular "in vitro", quando presente é extremamente frágil, possui muitas pilosidades e seu sistema vascular é pouco desenvolvido. Por esse motivo, as raízes formadas na condição "in vitro" geralmente não sobrevivem quando as plantas são transferidas para a condição "ex vitro", o que, por sua vez, prejudica sua sobrevivência (DEBERG & MAENE, 1981). Além disso, o ambiente asséptico do cultivo "in vitro", geralmente, impede que essas plantas sofram qualquer dano provocado por fitopatógenos ou pragas de qualquer natureza, enquanto mantidas nessas condições.

O sucesso na fase de aclimação de plantas obtidas por cultura de tecidos, está intimamente relacionado com o seu enraizamento. CHRISTIE & BRASCAMP (1988) após estudarem o potencial de enraizamento de plantas micropropagadas de *Dafne adora*, durante o período de aclimação, observaram que todas as plantas aclimatadas apresentaram boa capacidade de enraizamento, independente do seu tamanho e peso iniciais.

A aclimação consiste em manter as plântulas, já na condição "ex vitro", em locais parcialmente controlados (geralmente estufas ou casas de vegetação)

fazendo com que as condições ambientais como a intensidade luminosa, assepsia, fonte nutricional e, sobretudo a umidade relativa do ar, se aproximem daquelas predominantes na condição "in vitro". Nos primeiros dias da aclimação essas condições ambientais devem ser rigorosamente controladas, mantendo-as o quanto possível parecidas com aquelas vigentes na condição "in vitro", pois, é nessa fase que as plântulas mais ressentem a mudança de ambiente e atingem o clímax do estresse fisiológico (PREECE & SUTTER, 1991).

As estufas de cobertura plástica ou de vidro são bastante recomendadas para esse processo, pois seu ambiente pode ser controlado mais facilmente do que o campo. A medida que as plântulas vão se acostumando às novas condições, as características do ambiente (luz, umidade,...) devem ir se modificando gradativamente, até que as plantas estejam bem adaptadas e com tamanho e vigor suficiente para serem transplantadas para o local definitivo. Esse processo pode demorar desde algumas semanas ou até meses, dependendo do grau de rusticidade da espécie vegetal e das condições vigentes no local da aclimação. Durante esse período novas folhas vão se desenvolvendo, já com plena capacidade de fotossintetizar (FABBRI et alii, 1986), brotam raízes adventícias com um sistema vascular melhor estruturado e em franco processo de absorção e transporte de água, nutrientes e fotoassimilados para a planta toda (MacCLELAND, 1989).

2.4. Micorrizas

Dentre os inúmeros tipos de interações (positivas ou não) que ocorrem entre plantas e microorganismos na natureza, as micorrizas tem despertado grande interesse na área biológica desde a publicação de Kamiensky (citado por SOUZA, 1986), no qual se referia às

vantagens do manto fúngico nas raízes absorventes durante o crescimento das plantas.

Micorrizas (do grego, mykes = fungo, rhiza = raiz) são associações simbióticas nas quais as raízes finas são invadidas por fungos específicos durante o período de crescimento ativo da raiz, de modo a formar um órgão morfológicamente distinto que é característico do hospedeiro e do endófito (HACSKAYLO, 1972). Numa definição mais ousada, há aqueles que a considerem como a parte mais metabolicamente ativa do órgão de absorção das plantas (COOKE & WHIPPS, 1980).

Do ponto de vista ecológico e interesse econômico, as micorrizas vesicular - arbusculares (MVA) e as ectomicorrizas são as mais importantes, e apresentam diferenças funcionais e ecológicas (SOUZA, 1986).

As MVA, objeto desse estudo, são formadas por fungos da família *Endogonaceae* (OLIVEIRA, 1986), e estão presentes em raízes de 90% das plantas vasculares. Distinguem-se pela ausência de alteração morfológica visual nas raízes, pela penetração inter e intracelular com formação de estruturas típicas (vesículas , arbúsculos e esporos) no interior das raízes e hifas (micélio) , células auxiliares e esporos na rizosfera.

Uma vez estabelecida a associação, o fungo absorve nutrientes da solução do solo, especialmente fósforo, translocando-os até os arbúsculos, onde são trocados com a planta por metabólitos originados da fotossíntese (CABALA - ROSAND & DIAS, 1985). Os processos de transferência e seus mecanismos de controle não são bem conhecidos, entretanto, acredita-se que a intensidade do fluxo desses dois processos é que controla a natureza da associação entre a planta e o fungo, podendo esta variar de mutualística a antagonica - parasítica (SIQUEIRA & COLLOZI - FILHO, 1986). Tanto o estabelecimento, como o funcionamento desta simbiose, são afetados por um grande

número de fatores inerentes aos três componentes do sistema, isto é, o fungo, a planta e o ambiente (solo e clima), e podem atuar sobre as diferentes fases de formação da simbiose bem como sobre seu funcionamento. Um fungo isolado de determinada espécie vegetal, pode colonizar qualquer outra capaz de formar micorriza; entretanto, podem ocorrer variações quanto a efetividade ou eficiência simbiótica, que se referem a diferentes combinações fungo - planta em condições definidas, em relação aos efeitos do fungo no crescimento, desenvolvimento e nutrição da planta (SOUZA, 1986). Em condições que favorecem o estabelecimento da simbiose, a inoculação com fungos MVA pode trazer grandes benefícios para a planta hospedeira; a saber: a) aumento na absorção e maior eficiência no uso de certos nutrientes do solo, sobretudo aqueles com pouca mobilidade no solo como fósforo, zinco, cobre (ZAMBOLIM & SIQUEIRA, 1985) e fertilizantes, b) aumento na nodulação, atividade da nitrogenase e fixação biológica do nitrogênio em leguminosas, c) favorável relação água - planta, d) aumento na produção de substâncias promotoras do crescimento, e) redução na severidade do ataque de pragas e doenças, f) mudanças fisiológicas e anatômicas na planta, g) aumento na agregação e estabilidade dos agregados do solo, h) benefícios no ajustamento e sobrevivência de plantas em ambientes adversos (SOUZA, 1986).

Sabe-se que o morangueiro (*Fragaria* spp) é um antigo hospedeiro de fungos MVA (NEMEC, 1974 e KIERNAN et alii, 1984). A influência positiva da inoculação de fungos MVA no crescimento e desenvolvimento dessa espécie tem sido relatada por vários pesquisadores ao constatarem benefícios na produção e vigor de estolões (HRSELOVÁ et alii, 1989), melhor aproveitamento do fósforo do solo (DUNNE & FITTER, 1989), aumento na produção de frutos (CHANG, 1986 e DUNNE & FITTER, 1989) dentre outros benefícios, quando comparados com testemunhas não micorrizadas.

A demanda por mudas de morangueiro, derivada de matrizes micropropagadas, tem aumentado a cada ano em todo mundo. MORANDI et alii (1979) e KIERNAN et alii (1984) destacaram a viabilidade de se inocularem fungos MVA às plantas micropropagadas em face dos inúmeros benefícios da simbiose nessa fase do seu desenvolvimento. CHANG (1986), obteve um acréscimo de trinta por cento na taxa de sobrevivência durante a aclimação de mudas de morangueiro obtidas por micropropagação e inoculadas com fungos MVA. ROBERTSON et alii (1988) sugeriram que essa inoculação seria mais prática e econômica durante a multiplicação das mudas, uma vez que no momento do seu transplante para o campo de produção já estariam colonizadas, além de servirem como fonte de inóculo para outras safras da cultura em anos subsequentes.

Nos sistemas industriais, o homem tende a otimizar cada vez mais as operações e materiais envolvidos na confecção de determinado bem de consumo , com o objetivo final de obter resultados que atendam cada vez mais as exigências de mercado e que encerrem uma favorável relação custo/benefício, tanto por parte do produtor como do consumidor. Tal fato também é realidade quando se trabalha com sistemas biológicos, como a agropecuária, com a diferença básica de que nesses sistemas a própria natureza já dispõe, em alguns casos, dos instrumentos necessários e prontamente disponíveis a atender determinado objetivo.

Nesse contexto, baseando-se nos conceitos anteriormente descritos a respeito da sua influência nos vegetais, podemos enquadrar o emprego dos fungos micorrízicos como uma "ferramenta biológica" bastante promissora a atender os propósitos requeridos nos processos de aclimação e no crescimento e desenvolvimento das plantas de modo geral.

Entretanto, a utilização prática dessas "ferramentas naturais", como é o caso dos fungos MVA, não

vem de graça, muito embora esses microorganismos estejam presentes , até o momento, em abundância na natureza. É necessário ainda muita pesquisa para que se possam colher os benefícios sócio - econômicos pelo seu emprego em larga escala nos sistemas agrícolas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção das plantas micropropagadas

Matrizes de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) provenientes da Seção de Virologia do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), propagadas "in vitro" a partir da cultura de meristemas, foram obtidas de três lotes referentes aos seguintes cultivares : Sequóia, Campinas e AGF - 80, de material já multiplicado nos laboratórios do CEBTEC.

O primeiro passo foi a retirada das mudas do recipiente de cultivo seguindo-se a remoção , em água corrente, do meio de cultura aderido às raízes. Prosseguiu-se, então, com a separação das plantas por tamanho. Três plântulas foram escolhidas como padrão visual para o agrupamento das demais nas categorias pequena, média e grande.

Ainda no recipiente de cultivo, muitas plântulas encontravam-se unidas numa mesma touceira de onde partiam raízes das mais variadas espessuras e comprimentos (Figura 1 - A). Por esse motivo foi necessário muito cuidado para individualizá-las durante o processo de lavagem, evitando-se o máximo possível danificar suas estruturas, cujo aspecto era bastante delicado.

Uma vez separadas por tamanho, as plântulas foram envolvidas em papel absorvente umedecido em água e

colocadas em caixas plásticas, ficando armazenadas em geladeira até o momento da aclimação.

Figura 1 - Fases da aclimação de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) obtidas por micropropagação

A - plântulas no ambiente "in vitro"

B - bandeja contendo os "vasos" mergulhados em solução nutritiva

C - bandejas cobertas com túneis plásticos no interior da estufa

D - plantas já aclimatadas e em fase de produção de estolões

3.2. Obtenção do inoculante endomicorrízico

O inoculante empregado pertencia a um banco de inoculantes mantido no CEBTEC, o qual já estava

multiplicado e cuja composição constava de esporos, segmentos de hifas e raízes colonizadas pelo fungo, e areia como veículo.

3.3. Inoculação das plantas e aclimação

Para o plantio das mudas foram utilizados copos de plástico descartável (180 ml de volume) perfurados no fundo para a drenagem da água. O substrato empregado no plantio foi areia de construção que, antes de ser utilizada foi lavada em água corrente para a remoção dos detritos e da matéria orgânica ou mineral que pudesse interferir no efeito dos tratamentos. Após a lavagem, a areia foi autoclavada por duas horas a 120 °C e sob pressão de 1 atm. Os copinhos foram etiquetados para a identificação dos tratamentos e do número da repetição e, então, preenchidos com a areia tratada, perfurando-se, em seguida, uma pequena cova, no interior da qual foi aplicado o inoculante que continha aproximadamente 50 esporos, em cada unidade experimental. Procedeu-se com o plantio das mudas, cujo sistema radicular foi colocado sobre a porção do inoculante aplicado, de forma a garantir o íntimo contato entre as estruturas infectivas do fungo e as raízes da planta, seguindo-se o preenchimento da cova com uma pequena porção da areia tratada, evitando-se enterrar o colo da planta.

O método de aclimação escolhido consistiu em manter os copos contendo as plântulas no interior de bandejas de plástico e imersos numa lâmina (de 1 a 2 cm de altura) de solução nutritiva completa de Hoagland & Arnon diluída 5 vezes em água (Figura 1 - B). Essas bandejas foram cobertas com túneis plásticos individuais e alocadas no interior de uma estufa, também de cobertura plástica, mantendo-se essa condição por 10 dias consecutivos (Figura 1 - C).

A diluição da solução nutritiva baseia-se no

fato de que elevadas concentrações de nutrientes minerais, sobretudo fósforo, podem vir a prejudicar tanto o estabelecimento da colonização como a eficiência da simbiose (CABALA - ROSAND & DIAS, 1985; ZAMBOLIM & SIQUEIRA, 1985).

A função da estufa foi de permitir um certo isolamento das plântulas das condições adversas do ambiente externo, e o túnel plástico contribuiu para manter um microclima adequado devido a fragilidade das plântulas nos primeiros dias do processo.

Lentamente, as plântulas foram sendo expostas a taxas de luminosidade maiores e a umidade relativa menor. Assim, os túneis plásticos foram removidos no décimo dia, mantendo-se, contudo, a lâmina d'água por mais algum tempo.

O controle das pragas surgidas (ácaros, pulgões e formigas) durante o experimento foi efetuado, quando necessário, utilizando-se dos métodos de controle químico convencionais.

3.4. Delineamento Experimental

Para atingir o objetivo geral visado pelo estudo, montou-se um experimento com delineamento inteiramente casualizado do tipo fatorial completo $3 \times 3 \times 3$, totalizando 27 tratamentos (ver esquema a seguir), repetidos 15 vezes cada um, somando 405 unidades experimentais.

O ensaio foi implantado no dia 10 de setembro de 1992, nas instalações do Centro de Biotecnologia de Plantas (CEBTEC), localizado no campus da Escola Superior de Agricultura "Luís de Queiróz"- ESALQ/USP, no município de Piracicaba, estado de São Paulo.

3.5. Escolha das variáveis estudadas e modelo conceitual

Dentre as inúmeras variáveis possíveis de serem testadas, a escolha por tamanho da planta, cultivar e

" Desenho Experimental "

sendo:

C = cultivares n° 1 - Sequóia
 2 - Campinas
 3 - AGF - 80

f = fungo número 1 - gênero *Acaulospora* sp
 2 - " *Glomus* sp
 3 - sem inoculante micorrízico

t = tamanho da planta: t1 - pequeno
 t2 - médio
 t3 - grande

tipo de fungo MVA se deu pelas seguintes razões:

a) durante a multiplicação de plantas "in vitro", é muito comum a ocorrência de plantas em diferentes fases de desenvolvimento num mesmo recipiente de cultivo (Figura - 1 A). No momento da aclimação, a discriminação das plântulas menores em detrimento das maiores pode resultar, em alguns casos, numa grande perda de material vegetal, refletindo negativamente na contabilidade do processo, uma vez que se trata de uma técnica que exige alto investimento em dinheiro e pessoal qualificado. Dessa forma, torna-se evidente a necessidade de se verificar a viabilidade em se padronizar o tamanho da planta a ser aclimatada.

b) os cultivares Sequóia, Campinas e AGF - 80 tem sido os mais explorados pelos produtores de morango no estado de São Paulo e, por esse motivo foram os escolhidos.

c) embora muitos resultados obtidos nas pesquisas sobre os efeitos da associação micorrízica no morangueiro tenham mostrado resultados satisfatórios na combinação de certos gêneros do fungo com cultivares específicos, não existe ainda nenhuma confirmação a respeito das condições ou de qualquer combinação comprovada sobre a afinidade de um ou outro gênero com os cultivares atualmente utilizadas no estado de São Paulo ou em qualquer outra região do Brasil. A preferência pelo gênero *Glomus* sp deveu-se ao fato de que a maioria dos pesquisadores revisados em literatura recomenda esse fungo para a inoculação em morangueiro micropropagado. O gênero *Acaulospora* sp foi escolhido pelo fato do inoculante também apresentar-se puro, e em volume suficiente para ser empregado no experimento, além de servir de comparação com o outro gênero estudado.

Foi montado um modelo conceitual para facilitar a visualização das hipóteses a serem testadas e de como elas podem estar influenciando nas variáveis dependentes Y_1 e Y_2 .

No modelo proposto, as variáveis % de sobrevivência e crescimento estão designadas pelos símbolos Y_1 e Y_2 respectivamente, e representam as variáveis dependentes, isto é, aquelas que poderão ou não ser influenciadas pelos tratamentos; ao mesmo tempo que as variáveis tamanho, cultivar e fungo estão respectivamente

indicadas pelos símbolos X_1 , X_2 e X_3 , representando as variáveis independentes (tratamentos), ou seja, aquelas que poderão ou não exercer alguma influência nas variáveis resposta Y_1 e Y_2 . A ocorrência de possíveis interações também fazem parte das hipóteses a serem testadas e poderão ser do tipo dupla ($X_{1,2}$, $X_{1,3}$ e $X_{2,3}$) ou tripla representada pelo símbolo

3.6. Avaliação da colonização das raízes pelos fungos endomicorrízicos

Essa informação, embora de natureza qualitativa, é extremamente importante em experimentos com micorriza, pois somente nos casos em que for verificada a sua presença no sistema radicular, é que se poderá atribuir qualquer alteração nos indicadores empregados como sendo produto da interação fungo - planta.

3.6.1. Metodologia para a coloração das raízes (PHILIPS & HAYMAN, 1970)

Segmentos de raízes fixados em formaldeído ácido-acético-etanol (FAA), foram lavados com água destilada e aquecidos em solução de KOH (10%) a 90° C por uma hora em banho-maria para a remoção do conteúdo citoplasmático, sendo então lavados com água destilada. A seguir as raízes foram lavadas em solução de HCL (5%) por 5 min. para a remoção dos resíduos de KOH e, em seguida, imersas na solução corante e aquecidas em banho-maria a 90° C por 20 min. Após esse tempo removeu-se a solução corante, mantendo-se as raízes em lactoglicerol claro até o momento da avaliação.

3.6.2. Avaliação da porcentagem de infecção das raízes (GIOVANNETTI & MOSSE, 1980)

Foram distribuídos 500 mg de raízes coradas numa placa de petri quadriculada (raio = 4,75 cm), separando-as uniformemente por toda a superfície. Observando-se à lupa estereoscópica, procedeu-se apenas a contagem das raízes que cruzavam as linhas verticais, calculando-se a porcentagem de infecção segundo a relação:

$$\frac{\text{número total de raízes colonizadas} \times 100 \%}{\text{número total de raízes observadas}} = \%$$

3.7. Escolha e definição operacional dos indicadores para as variáveis estudadas

De acordo com os diferentes níveis de organização dos vegetais e dos tipos de indicadores que poderiam ser empregados para se avaliar o crescimento e desenvolvimento das plantas (CAUSTON & VENUS, 1981), optou-se por aqueles que melhor poderiam expressar o efeito dos tratamentos impostos. Empregou-se tanto indicadores destrutivos como não destrutivos de acordo com a natureza da informação desejada nas variáveis dependentes, segundo a distribuição a seguir.

Cronograma de avaliação dos indicadores:

- indicador -	<u>dias após a implantação</u>		
	4 5	6 0	1 8 0
- % de Sobrevivência	X	X	
- Altura da planta	X		
- Diâmetro do colo	X		
- Número de folhas	X		
- MMFA e MMFR		X	X
- MMSA		X	X
- % de Colonização		X	X
- N ^o de estolões/planta			X
- % de P total na MMSA			X

* MMF - massa da matéria fresca : A - parte aérea

R - raiz

* MMSA - " " seca

3.7.1. Sobrevivência

Essa informação foi obtida a partir das anotações referentes às perdas de plântulas. Descartou-se toda planta cuja parte aérea tenha se degenerado e a região do colo apodrecido.

3.7.2. Altura da planta, diâmetro do colo e número de folhas

Esses indicadores foram avaliados com o objetivo de se verificar possíveis diferenças no crescimento das plântulas que poderiam ter sido provocados pela interação micorrízica, independente de se registrar o seu nível de colonização nas raízes.

3.7.2.1. Altura da planta

Mediu-se o comprimento do pecíolo em centímetros, a partir do ponto de sua inserção no colo até o limbo.

3.7.2.2. Diâmetro do colo

Empregando-se o paquímetro como instrumento de medição determinou-se o diâmetro do colo, que corresponde à região de interseção entre raiz e parte aérea.

3.7.2.3. Número de folhas

Foi determinado o número de folhas totalmente expandidas.

3.7.3. Massa da matéria fresca (MMF) e seca (MMS)

A MMF (em gramas) foi avaliada imediatamente após a remoção da planta do substrato de crescimento. A MMS foi obtida secando-se o material vegetal em estufa a 70°C por 48 horas.

3.7.3.1. Razão MMF parte aérea / MMF raiz

No caso específico de experimentos com micorriza, essa relação tem especial importância pelo fato de que quanto maior o seu valor, maior terá sido o investimento de fotoassimilados e de materiais absorvidos do sistema radicular na parte aérea. Deduz-se, a partir desse fato, que as hifas do fungo poderiam estar suprindo a demanda da planta por água e nutrientes em quantidades suficientes, dispensando assim o desenvolvimento de novas raízes.

3.7.4. Colonização das raízes

Considerou-se como colonizada todas aquelas raízes que, quando observadas à lupa, cruzavam as linhas verticais e apresentavam qualquer estrutura característica do fungo MVA, podendo ser vesículas, hifas, esporos ou arbúsculos.

3.7.5. Número de mudas por planta

Foi determinado o número aproximado de mudas por cada planta avaliada, considerando-se como muda todo broto produzido ao longo dos estolões emitidos pelas plantas.

3.7.6. Teor de fósforo do tecido vegetal

Foi determinado o teor de fósforo total da MMSA (em %) pelo método de colorimetria.

3.8. Ensaio de campo

Após a coleta referente aos 180 dias foi implantado um ensaio de campo com as plantas remanescentes empregando-se três repetições para cada um dos seguintes tratamentos:

C = cultivares n° 1 - Sequóia
 2 - Campinas
 3 - AGF - 80

f = fungo n° 1 - gênero *Acaulospora* sp
 2 - " *Glomus* sp
 3 - sem inoculante micorrízico

As mudas foram plantadas em pequenas covas mantendo-se o torrão de areia.

Aos 90 dias de sua permanência no campo efetuou-se uma avaliação visual para se verificar possíveis diferenças entre os tratamentos, prosseguindo-se no mesmo dia à colheita das plantas para a determinação da MMSA e da colonização das raízes pelos fungos MVA.

Para avaliação visual foram empregados os seguintes indicadores:

- altura das plantas: visto de cima
- enfolhamento: visto de cima
- largura dos folíolos: vistos de cima

Após a coloração das raízes e sua observação à lupa, avaliou-se o nível de colonização atribuindo-se um sistema de notas variando de um a três, sendo que as maiores notas correspondiam aos maiores níveis de infecção.

3.9. Forma de análise dos resultados

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística paramétrica com aplicação do teste F à análise da variância, seguindo-se ao teste de Tukey para os tratamentos cujo valor de F fosse significativo, e interpretados à margem de erro com 5% de significância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Observações visuais durante a aclimação

Verificou-se que, ao redor do quinto dia, as folhas produzidas "in vitro" das plantas aclimatadas foram sofrendo um leve encrespamento no limbo e um escurecimento gradativo da tonalidade verde. Essas alterações possivelmente refletem a reorganização do aparelho fotossintético proposta por FABBRI et alii (1986), o qual estaria operando mais ativamente devido à nova condição heterotrófica da planta (PREECE & SUTTER, 1991). Além disso, tornou-se evidente o desenvolvimento dos primeiros primórdios foliares produzidos pelas plântulas recém aclimatadas.

Por volta de 10 dias, as plantas pareciam bem adaptadas à condição heterotrófica, já requerendo maior intensidade de radiação luminosa para o seu crescimento. Foi então retirado o túnel plástico, verificando-se no dia seguinte a adaptação das plantas à maior intensidade de luz presente. Nesse mesmo período foram também registradas as primeiras perdas, que posteriormente se confirmariam como sendo causadas pela ocorrência de *Pythium*, devido a alta umidade em que as plantas se encontravam nesse período.

Findo o primeiro mês, verificou-se um atraso na emissão de novas folhas pelas plantas pertencentes ao cultivar Sequóia, quando comparado com as plantas dos outros cultivares.

Aos 45 dias efetuou-se o primeiro levantamento da porcentagem de sobrevivência das plantas entre os tratamentos, uma vez que o número de mortes aproximou-se praticamente de zero.

Por volta do segundo mês, as plantas foram transferidas para estufa antiafídica, cuja localização permitia maior captação da radiação luminosa (embora a temperatura interna atingisse valores mais elevados), pois, as mesmas necessitavam de mais luz.

Transcorridas duas semanas da mudança de local, notou-se uma sensível reação das plantas ao novo ambiente, onde os pecíolos tornaram-se mais eretos e os limbos mais expandidos para aumentar a superfície de captação da radiação luminosa.

Aos 100 dias foi registrada a emissão do primeiro estolão e da primeira flor para o cultivar Campinas. Para que as plantas melhor se desenvolvessem as mesmas foram transferidas para recipientes maiores (copos plásticos com 700 ml de volume), quando então constatou-se uma intensa emissão de estolões e florescimento.

4.2. Sobrevivência

O levantamento do índice de sobrevivência foi efetuado aos 45 e aos 60 dias da aclimação, podendo-se atribuir como causa das perdas, três fatores principais:

- a) Fisiológico
- b) Fitopatológico
- c) Interação micorrízica

As causas de natureza fisiológica e fitopatológica possivelmente tenham tido relação com a elevada umidade do substrato, o qual permaneceu saturado

com solução nutritiva nas primeiras semanas da fase da aclimatação, na tentativa de manter a umidade relativa elevada, de modo a amenizar o estresse fisiológico provocado pela acentuada queda da umidade no ambiente "ex vitro".

Após a análise de amostras de plantas anormais pela Clínica Fitopatológica da ESALQ, foi registrada a presença de *Pythium* no seu sistema radicular. Sanando-se este problema, observou-se um estímulo na emissão de novos primórdios foliares e no crescimento vegetativo como um todo. Esse estímulo pode estar relacionado com a drenagem do substrato, pois, além desse procedimento ter desfavorecido as condições para a disseminação e desenvolvimento do fitopatógeno nas plantas, permitiu uma melhor aeração do substrato, refletindo diretamente na taxa respiratória, e conseqüentemente na absorção e translocação de materiais entre a planta e o substrato.

A morte das plantas cessou por volta dos 45 dias, quando então efetuou-se o primeiro levantamento do índice de sobrevivência. A determinação da taxa de sobrevivência, efetuada aos 60 dias, teve a intenção de verificar uma possível influência da interação micorrízica nos diferentes tratamentos. Embora tenham ocorrido algumas perdas entre os 45 e os 60 dias, a análise estatística não revelou diferença significativa das plantas perdidas entre os tratamentos nesse intervalo de duas semanas. A atividade micorrízica mostrou, em base estatística, resultados significativos na taxa de sobrevivência acumulada referente as duas épocas avaliadas (Tabela 1).

A porcentagem de sobrevivência foi, de modo geral, bastante elevada para todos os tratamentos, variando numa amplitude entre 73.3 % (Sequóia - *Acaulospora* - pequeno) e 100% (vários tratamentos - Figura 2). Ocorreram diferenças

Tabela 1 - Médias de sobrevivência (%) aos 60 dias da aclimação de três cultivares de morangueiro micropropagado e inoculado em diferentes fases de crescimento com dois gêneros de fungos endomicorrízicos

	pequena	média	grande	$\bar{Y}$
Sequóia	76.7 Bb	88.0 Ba	92.2 Aa	85.0 B
Campinas	90.1 Ab	97.8 Aab	98.9 Aa	95.6 A
AGF-80	95.6 Aab	91.1 ABb	100 Aa	95.6 A
<i>Acaulospora</i> sp	90.1 Aa	91.1 Aa	97.8 Aa	92.9 AB
<i>Glomus</i> sp	84.4 Aa	88.8 Aa	94.4 Aa	89.2 B
testemunha	87.8 Aa	97.8 Aa	98.9 Aa	94.8 A
$\bar{Y}$	87.4 b	92.6 a	97.1 a	

letra maiúscula - coluna

CV - 28,37%

" minúscula - linha

* letras distintas indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância.

na porcentagem de sobrevivência das plantas dependendo do cultivar a que pertenciam. O menor índice de sobrevivência foi registrado para o cultivar Sequóia, cuja média diferiu estatisticamente dos cultivares Campinas e AGF-80, que por sua vez resultaram nos maiores níveis de sobrevivência, mostrando-se equivalentes entre si. Esse resultado não surpreende pois, dos três cultivares estudados, somente AGF-80 e Campinas foram especialmente desenvolvidos para as condições brasileiras, enquanto que o cultivar Sequóia foi introduzido dos Estados Unidos da América (TESSAROLI NETO, 1982).

Possivelmente, o maior número de perdas para as plantas do cultivar Sequóia seja um reflexo da interação genótipo-ambiente, que nesse caso estaria em desequilíbrio quando comparado com os cultivares Campinas e AGF-80. Esse fato pode ser confirmado pela observação citada anteriormente, onde foi registrado um atraso na emissão de novas folhas pelas plantas desse cultivar, quando comparado com os cultivares Campinas e AGF-80, após completarem trinta dias do período de aclimação.

O tamanho da planta aclimatada também influenciou na porcentagem de sobrevivência. O menor número de perdas foi registrado para as plantas de tamanho médio e grande. As plantas de tamanho pequeno apresentaram o menor índice de sobrevivência. Esse resultado vem a confirmar as observações de GROUT & MILLAN (1985) e DESJARDINS et alii (1987), de que plantas de maior tamanho e conseqüentemente com maior quantidade de material de reserva teriam maiores chances de sobrevivência.

Embora essa observação tenha predominado, ocorreram algumas diferenças entre os cultivares. Para os cultivares Sequóia e Campinas, prevaleceu a tendência de que quanto menor o tamanho da planta, menor foi sua chance de sobrevivência. Um resultado interessante foi observado para as plantas do cultivar AGF-80, cujas médias de sobrevivência para o tamanho médio, embora não tenha mostrado diferença significativa, quando comparada com o tamanho pequeno, mostrou o menor índice de sobrevivência, ao mesmo tempo que os tamanhos pequeno e grande apresentaram os maiores índices, não diferindo estatisticamente entre si.

Também foram observadas diferenças entre os cultivares dentro de cada tamanho testado (Tabela 1). De modo geral, esse efeito foi mais acentuado para as plantas de menor tamanho. Dentro do tamanho pequeno Sequóia foi

Figura 2 - Porcentagem de sobrevivência aos 45 da climatação de três cultivares de morangueiro micropropagado e inoculado em diferentes fases de crescimento com dois gêneros de fungos endomicorrízicos

sendo: T1 - plântulas de tamanho pequeno
 T2 - " " médio
 T3 - " " grande

quem apresentou o menor índice de sobrevivência, seguido por Campinas e AGF - 80. Dentro do tamanho médio, Sequóia novamente revelou o menor índice de sobrevivência, seguido por AGF - 80 e Campinas. As maiores perdas para o cultivar Sequóia poderiam ser explicadas pelas mesmas razões anteriormente expostas. Dentro do tamanho grande foram obtidos os maiores índices de sobrevivência para todos os cultivares, sendo que não houve diferença estatística entre as médias.

Ao contrário do resultado obtido por CHANG (1986), ao registrar um acréscimo de 30 % no índice de sobrevivência em morangueiro micropropagado e inoculado com fungos MVA (gên. *Glomus* sp), durante a fase de aclimação, o efeito dos fungos MVA frustraram a previsão de que a atividade micorrízica elevaria o índice de sobrevivência. Apesar da amplitude entre as médias da porcentagem de sobrevivência estar delimitada por valores relativamente próximos, as plantas não micorrizadas (testemunhas) alcançaram o maior índice de sobrevivência, quando comparadas com aquelas resultantes das plantas inoculadas com o gênero *Glomus* sp, que por sua vez mostrou o menor índice. A porcentagem de sobrevivência das plântulas inoculadas com *Acaulospora* sp permaneceram num nível intermediário daquelas inoculadas com *Glomus* sp e da testemunha. Uma possível explicação para esses resultados seria de que as condições vigentes no processo de aclimação, no presente experimento, teria retardado o estabelecimento da fase simbiótica.

A diminuição da intensidade luminosa provocada pelo túnel plástico e pela estufa, onde as plântulas foram aclimatadas, pode ter prejudicado sua atividade fotossintética, impedindo - as de produzir fotoassimilados num montante suficiente para sustentar a sua sobrevivência e a demanda requerida pelo fungo para o início do seu estabelecimento no sistema radicular. BETHLENFALVAY et alii (1982) explicam que em condições sub-ótimas de atividade fotossintética, os endófitos podem se tornar parasíticos, impedindo o desenvolvimento da planta, daí as plântulas não inoculadas terem rompido a barreira do estresse fisiológico com mais facilidade. Cabe aqui lembrarmos a nítida reação das plantas sempre que uma barreira à passagem da radiação luminosa era removida conforme relatado no item 4.1.

4.3. Avaliação dos indicadores de crescimento : altura da planta, diâmetro do colo e número de folhas aos 45 dias

De modo geral, aos 45 dias todas as plantas que foram inoculadas com fungos endomicorrízicos alcançaram as maiores médias de crescimento para os três indicadores avaliados (Tabela 2). As plantas inoculadas com o gênero *Glomus* sp superaram num nível estatisticamente significativo o crescimento verificado para as plantas testemunha, cujas medias foram as menores para todos os indicadores.

Tabela 2 - Médias de altura, n° de folhas e diâmetro do colo aos 45 dias da fase de aclimação de morangueiro micropropagado e inoculado com dois gêneros de fungos endomicorrízicos

	altura (cm)	n° folhas	Ø do colo (mm)
<i>Acaulospora</i> sp	5.38 A	4.72 AB	1.93 AB
<i>Glomus</i> sp	5.21 A	5.06 A	2.05 A
Testemunha	4.49 B	4.51 B	1.86 B
C V %	27.70	26.16	24.64

maiúscula - coluna

* letras distintas indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância

Esses resultados mostram que aos 45 dias as plantas possivelmente já estariam sendo beneficiadas pela simbiose micorrízica, sugerindo a existência de um fluxo positivo de materiais transferidos do substrato para a planta, via fungo. O crescimento superior verificado para

as plantas inoculadas com *Glomus* sp justificam a preferência desse gênero para o morangueiro, conforme os experimentos conduzidos por KIERNAM et alii (1984), CHANG (1986), HRSELOVÁ et alii (1989) e CHÁVEZ & FERRERA - CERRATO (1990) revisados em literatura.

4.4. Massa da matéria seca da parte aérea - (MMSA)

Para os indicadores número de folhas, diâmetro do colo e altura da planta avaliado aos 45 dias, as plantas inoculadas com *Glomus* sp apresentaram o maior crescimento. Por outro lado, com relação à produção de massa de matéria seca da parte aérea (MMSA) avaliado aos 60 dias (Tabela 3), as plantas inoculadas com o gênero *Acaulospora* sp superaram num nível estatisticamente significativo a testemunha.

Essa inversão na efetividade ou eficiência micorrízica (SOUZA,1986) verificada entre os fungos *Acaulospora* sp e *Glomus* sp, possivelmente tenha sido decorrência de modificações entre um ou mais fatores que regulam a natureza da simbiose , e que aos 60 dias estaria favorecendo as plantas inoculadas com *Acaulospora* sp.

De modo geral, as plantas micorrizadas resultaram num maior acúmulo na MMSA do que o mesmo incremento verificado para a testemunha aos 60 dias. Os valores obtidos para a relação massa de matéria fresca da parte aérea / massa de matéria fresca da raiz (MMFA/MMFR - Tabela 3), verificada entre as plantas micorrizadas e as não micorrizadas concordam com a ocorrência da simbiose em favor da planta, e com o elevado nível de colonização das raízes pelos fungos MVA (superior a 50% - Tabela 3) observado aos 60 dias nas plantas micorrizadas.

Tabela 3 - Médias da MMSA, MMFA/MMFR e da % de colonização aos 60 e 180 dias da inoculação com dois gêneros de fungos endomicorrízicos em morangueiro micropropagado

MMSA				MMFA/MMFR				% de colon.				
DIAS	60	-	180	60	-	180	60	-	180			

F1	0.13	A	2.82	B	0.92	A	1.00	AB	61.37	A	95.77	A
F2	0.12	AB	3.05	A	0.91	A	1.09	A	53.35	B	87.71	B
F3	0.11	B	3.02	AB	0.52	B	0.92	B	0.0	C	0.0	C

CV.%	23.8		10.70		18.90		23.70		18.10		13.8	

letra maiúscula - coluna

* letras distintas indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância

F1 = plantas inoculadas com *Acaulospora* sp

F2 = " " " *Glomus* sp

F3 = testemunha

MMSA = massa da matéria seca da parte aérea em gramas

MMFA/MMFR = razão massa da mat. fresca parte aérea e raiz

% de colonização das raízes pelos fungos MVA

Aos 180 dias verificou-se uma nova inversão na eficiência micorrízica (Tabela 3) com relação à produção de MMSA, desta vez colocando em desvantagem as plantas inoculadas com *Acaulospora* sp. Embora a porcentagem de colonização das plantas micorrizadas tenha se mantido num nível estatisticamente proporcional àquele verificado aos 60 dias, as plantas inoculadas com o gênero *Glomus* sp recuperaram aos 180 dias a efetividade simbiótica sobre *Acaulospora* sp na produção de MMSA, num montante acumulado

Tabela 4 - Médias da MMSA, MMFA/MMFR e da % de colonização aos 60 e 180 dias da inoculação com dois gêneros de fungos endomicorrízicos em três cultivares de morangueiro micropropagado

	MMSA		MMFA/MMFR		% de colon.	
	60	180	60	180	60	180
F1	0.10 A	2.63 A	1.00 A	1.06 A	80.83 A	98.57 A
C1 F2	0.10 A	2.67 A	0.98 A	1.05 A	79.80 A	91.34 A
F3	0.09 A	2.69 A	0.52 A	0.89 A	0.0 B	0.0 B
F1	0.17 A	3.09 AB	0.95 A	0.82 A	48.12 A	97.24 A
C2 F2	0.16 A	3.25 A	0.89 A	0.91 A	34.40 B	85.04 B
F3	0.13 A	2.82 B	0.58 A	0.79 A	0.0 C	0.0 C
F1	0.12 A	2.73 B	0.80 A	1.12 A	55.65 A	91.50 A
C3 F2	0.09 A	3.24 A	0.84 A	1.30 A	45.85 B	82.71 B
F3	0.10 A	3.26 A	0.45 A	1.09 A	0.0 C	0.0 C
C V %	23.80	10.73	18.90	23.76	18.10	13.38

letra maiúscula - coluna

* letras distintas indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância

C1 = cultivar Sequóia; C2 = Campinas e C3 = AGF - 80

F1 = plantas inoculadas com *Acaulospora* sp

F2 = " " " *Glomus* sp

F3 = testemunha

MMSA = massa da matéria seca da parte aérea em gramas

MMFA/MMFR = razão massa da mat. fresca parte aérea e raiz

% de colonização das raízes pelos fungos MVA

que foi equivalente ao da testemunha (Tabela 3). A relação MMFA / MMFR entre as plantas inoculadas com *Glomus* sp foi superior a da testemunha, revelando o maior direcionamento de fotoassimilados em direção a parte aérea, reiterando a preferência por espécies do gênero *Glomus* sp para o morangueiro conforme citado anteriormente.

Aos 60 dias, o acúmulo em MMSA entre as plantas micorrizadas e a testemunha não acusaram diferença estatística significativa para nenhum dos cultivares estudados (Tabela 4), embora a relação MMFA / MMFR se apresentassem mais elevadas para as plantas micorrizadas. Isto sugere que poderia estar ocorrendo uma equivalência entre a efetividade simbiótica das plantas micorrizadas e a eficiência metabólica da testemunha com relação ao acúmulo de MMSA. Somente aos 180 dias foram registradas diferenças significativas no acúmulo de MMSA provocadas pela presença dos fungos MVA, com exceção do cultivar Sequóia. Para o cultivar Campinas, as plantas inoculadas com *Glomus* sp superaram num nível significativo o montante de MMSA acumulado quando comparado com a testemunha. Para o cultivar AGF - 80, as plantas inoculadas com *Acaulospora* sp revelaram o menor acúmulo em MMSA. Para esse mesmo cultivar, tanto a testemunha como as plantas inoculadas com *Glomus* sp sofreram o maior acúmulo em MMSA aos 180 dias.

Ao contrário do resultado esperado dentro de cada tamanho de planta testado, a presença da micorriza aos 60 dias somente incrementou a MMSA nas plantas de tamanho grande (Tabela 5). O fungo *Acaulospora* sp contribuiu significativamente no incremento de MMSA das plantas de maior tamanho, superando tanto aquelas inoculadas com *Glomus* sp como a testemunha. Aos 180 dias não foi verificado influência significativa dos fungos MVA no incremento de MMSA, nem mesmo para as plantas inoculadas com *Acaulospora* sp.

Tabela 5 - Médias da MMSA, MMFA/MMFR e da % de colonização aos 60 e 180 dias em três tamanhos de morangueiro micropropagado e inoculado com dois gêneros de fungos endomicorrízicos

		MMSA		MMFA/MMFR		% de colon.	
		60	180	60	180	60	180
T1	F1	0.07 A	2.90 A	0.98 A	1.29 A	66.82 B	95.71 A
	F2	0.05 A	3.02 A	0.83 A	1.20 A	74.97 A	87.70 A
	F3	0.05 A	2.80 A	0.50 B	0.95 A	0.0 C	0.0 B
T2	F1	0.10 A	2.75 A	0.81 B	0.84 A	67.52 A	96.80 A
	F2	0.13 A	3.14 A	1.01 A	1.06 A	55.42 B	80.22 A
	F3	0.12 A	3.02 A	0.55 C	0.96 A	0.0 C	0.0 B
T3	F1	0.22 A	2.81 A	0.98 A	0.86 A	49.78 A	95.38 A
	F2	0.17 B	2.99 A	0.88 A	1.01 A	29.66 B	80.20 A
	F3	0.15 B	3.22 A	0.60 B	0.85 A	0.0 C	0.0 B
C V %		23.80	10.73	18.90	23.76	18.10	13.38

maiúscula - coluna

* letras distintas indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância

T1 = tamanho pequeno

T2 = tamanho médio

T3 = tamanho grande

F1 = plantas inoculadas com *Acaulospora* sp

F2 = " " " *Glomus* sp e F3 = testemunha

MMSA = massa da matéria seca da parte aérea em gramas

MMFA/MMFR = razão massa da mat. fresca parte aérea e raiz

% de colonização das raízes pelos fungos MVA

4.5. Número de estolões por planta

A influência dos fungos MVA na produção de mudas por planta (Figura 1 - D), revelou resultados diferentes entre os cultivares testados (Tabela - 6). As plantas dos cultivares Campinas e AGF - 80, quando inoculadas com *Glomus* sp produziram, em média, um número de mudas estatisticamente equivalente àquele verificado para a testemunha. Apenas no cultivar Sequóia a inoculação com *Glomus* sp suplantou o número de mudas produzido pela testemunha, confirmando os resultados obtidos por CHANG (1986) e HRSELOVÁ et alii (1989).

Tabela 6 - Produção de mudas de três cultivares de morangueiro aos 180 dias da inoculação com dois gêneros de fungos endomicorrízicos (#)

	Sequóia	Campinas	AGF-80	$\bar{Y}$
<i>Acaulospora</i> sp	0.51 AB	1.24 A	0.79 B	0.88 A
<i>Glomus</i> sp	0.85 A	1.08 A	1.23 A	1.06 A
testemunha	0.27 B	1.14 A	1.19 A	0.88 A
$\bar{Y}$	0.52 b	1.15 a	1.06 a	

valores transformados em raiz de x

maiúscula - coluna

minúscula - linha

* letras distintas indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância.

O gênero *Acaulospora* sp somente prejudicou a produção de mudas quando inoculado nas plantas do cultivar AGF-80 (Tabela 6), bem como nas plantas de tamanho médio (Tabela 7).

Tabela 7 - Produção de mudas de morangueiro aos 180 dias da inoculação de três tamanhos de plantas com dois gêneros de fungos endomicorrízicos (#)

	pequena	média	grande
<i>Acaulospora</i> sp	1.13 A	0.66 B	0.85 A
<i>Glomus</i> sp	1.19 A	1.26 A	0.80 A
testemunha	0.88 A	0.97 AB	0.79 A
$\bar{Y}$	1.06 a	0.97 ab	0.81 b

valores transformados em raiz de x

maiúscula - coluna

minúscula - linha

* letras distintas indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância.

4.6. Teor de fósforo da parte aérea aos 180 dias

Observando-se os teores de fósforo total contido na MMSA aos 180 dias (Tabela 8), verifica-se que as plantas micorrizadas apresentaram maior porcentagem de fósforo do que a testemunha. De modo geral, as plantas inoculadas com *Acaulospora* sp mostraram os maiores teores desse nutriente, quando comparada as aquelas inoculadas com *Glomus* sp . O tamanho da planta não mostrou influência no acúmulo de fósforo na parte aérea das plantas.

Os teores de fósforo encontrados em folhas novas de morangueiro dos cultivares Campinas e AGF-80 cultivadas com fornecimento deficiente de nutrientes (SCHIAVINATO, 1990), estão próximos daqueles registrados pelas plantas micorrizadas correspondentes aos mesmos cultivares. Segundo dados desse mesmo autor, os mesmos teores de fósforo obtidos em condições de fornecimento adequado de nutrientes correspondem ao dobro daqueles

encontrados na análise foliar das plantas micorrizadas.

Tabela 8 - Médias dos teores de fósforo total (%) na parte aérea de morangueiro inoculadas em diferentes fases de crescimento com dois gêneros de fungos endomicorrízicos aos 180 dias da inoculação

	Sequóia			Campinas			AGF-80		
	t1	t2	t3	t1	t2	t3	t1	t2	t3
f1	0.15	0.16	0.12	0.10	0.11	0.08	0.12	0.14	0.12
f2	0.15	0.13	0.12	0.08	0.08	0.08	0.09	0.10	0.09
f3	0.10	0.09	0.07	0.04	0.06	0.07	0.06	0.06	0.07

T1 = tamanho pequeno; T2 = médio e T3 = grande

F1 = plantas inoculadas com *Acaulospora* sp

F2 = " " " *Glomus* sp

F3 = testemunha

4.7. Ensaio de campo

Aos 90 dias de sua permanência no campo teve-se a impressão de que as plantas micorrizadas, independente do tipo de fungo e do cultivar, mostravam-se mais vigorosas e enfolhadas do que a testemunha.

Após a coleta das plantas para análise, verificou-se que o sistema radicular das plantas testemunha mostrava-se muito mais fasciculado quando comparado com aqueles provenientes das que haviam sido previamente inoculadas.

Observou-se também, que várias plantas haviam morrido entre os diferentes tratamentos, provocando o

desbalanceamento do número de repetições. Por esse motivo, os resultados foram discutidos apenas em relação às plantas micorrizadas e não micorrizadas.

Os dados referentes a MMSA (Tabela - 9), mostram que as plantas inoculadas com o fungo *Acaulospora* sp produziram, em média, a maior quantidade de MMSA (8,07g), seguido daquelas inoculadas com *lomus* sp (5,40 g) e por último a testemunha (2,42 g). Esses valores concordam com a observação visual feita a campo, de que as plantas micorrizadas se mostravam mais vigorosas e enfolhadas do que as não micorrizadas.

O nível de colonização do sistema radicular pelos fungos MVA mostrou-se, em média, duas vezes superior ao da testemunha (que possivelmente foi colonizada por fungos nativos do solo). As plantas inoculadas com o gênero *Acaulospora* sp (Tabela - 9) tiveram um nível de colonização 20% superior ao daquelas inoculadas com *Glomus* sp.

Tabela 9 - Médias da MMSA e da nota de colonização de morangueiro aos 90 dias do seu plantio no campo após inoculação com dois gêneros de fungos endomicorrízicos

	Nota	MMSA(g.)
<i>Acaulospora</i> sp	2.2	8.07
<i>Glomus</i> sp	1.8	5.40
testemunha	1.0	2.49

* notas maiores indicam maiores níveis de colonização pelos fungos MVA nas raízes

- MMSA = massa da matéria seca da parte aérea

Esses resultados indicam que houve uma relação direta entre o aumento da colonização e o incremento em MMSA das plantas mantidas nas condições de campo.

4.8. Arquitetura das raízes

Ao se efetuar a coleta das plantas aos 180 dias para a análise da MMSA e da porcentagem de colonização das raízes, verificou-se uma nítida diferença na arquitetura das raízes micorrizadas quando comparada com a testemunha. O sistema radicular das plantas testemunha mostrou-se muito mais fasciculado, isto é, com um grande volume de raízes finas, concentradas principalmente na região do terço superior da raiz. Também foi observado que o sistema radicular se mostrava, como um todo, com coloração bem mais clara, e aparentemente mais sadio e vigoroso. Por outro lado, nas plantas micorrizadas o sistema radicular se mostrava menos vigoroso, com poucas raízes, porém bem mais alongadas e espessas, de onde partiam poucas raízes secundárias. A coloração das raízes micorrizadas mostrou-se bastante escurecida e necrosada; com aspecto de envelhecida. A análise de algumas plantas pela Clínica Fitopatológica da ESALQ não revelou a presença de nenhum fitopatógeno que pudesse ter provocado esses sintomas nas raízes micorrizadas. Essas diferenças também foram observadas para as plantas provenientes do ensaio de campo, porém, eram muito menos evidentes do que nas plantas coletadas aos 180 dias; possivelmente porque na estufa as condições eram bem mais controladas do que no campo.

A única alternativa a se questionar como sendo a responsável por essas diferenças, seria de que o sistema radicular estaria sofrendo alguma anomalia de natureza fisiológica. Uma possível explicação seria de que nas plantas micorrizadas, os fungos MVA teriam aumentado o

volume de substrato explorado, e conseqüentemente a quantidade de materiais absorvidos e enviados para a planta num montante suficiente dispensando, assim, o seu emprego, bem como o de fotoassimilados para a síntese de novas raízes. Ao se observar o sistema radicular das plantas micorrizadas após alguns dias de estresse hídrico forçado,

Figura 3 - Raízes de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) colonizadas por fungos endomicorrízicos.

A - raiz colonizada envolvida por hifas extraradiculares

B - aspecto geral de raiz colonizada #

C - detalhe de um segmento de raiz colonizada mostrando veículas e hifas intraradiculares #

D - detalhe de um segmento de raiz colonizada mostrando uma sequência de arbúsculos #

- após coloração

foi possível distinguir, a olho nú, inúmeros aglomerados filamentosos espalhados pelas raízes, e que observados à lupa estereoscópica se confirmaram como sendo hifas extraradiculares do fungo endomicorrízico (Figura 3 - A).

A menor quantidade de raízes produzidas pelas plantas micorrizadas pode ser confirmado pelos valores da relação MMFA / MMFR, que se mostraram inferiores para a testemunha (Tabelas 3,4 e 5).

FUSCONI et alii (1986) verificaram uma sensível queda na taxa mitótica em raízes de *Allium porrum* quando colonizadas por fungos MVA. BERTA et alii (1984) trabalhando com *Allium porrum* infectado por *Glomus* sp observaram um decréscimo no comprimento das suas raízes, e um grande número de raízes parenquimatizadas com ápices necróticos, o que confirma os sintomas observados nas raízes das plantas de morangueiro micorrizadas. Segundo GALLETA & BRINGHURST (1990), as raízes mais jovens do morangueiro são de coloração branca, e respondem por uma maior atividade na absorção de água e nutrientes minerais do solo, enquanto as mais escuras são mais suberizadas e geralmente mais velhas e, embora absorvam certo volume de água, tem baixa condutibilidade. Essas observações quando em confronto com os sintomas verificados nas raízes de morangueiro micorrizadas, sugerem que as raízes das plantas micorrizadas eram mais velhas, além de ser um indicativo de que o sistema radicular das plantas não micorrizadas deve se renovar muito mais intensamente do que em plantas micorrizadas.

4.9. Considerações finais

A porcentagem de sobrevivência foi, independente dos fatores relativos aos tratamentos, bastante elevada, confirmando a eficiência do método de

aclimatação escolhido. Em função das primeiras plantas mortas terem sido descartadas, não foi possível confirmar a natureza da sua morte antes da chegada do diagnóstico feito pela Clínica Fitopatológica, muito embora os sintomas das plantas perdidas tenham sido registrados desde o início. Esse imprevisto prejudicou uma avaliação mais precisa a respeito da influência dos diferentes tratamentos na taxa de sobrevivência.

Possivelmente, o maior número de perdas verificado entre as plantas do cultivar Sequóia seja, conforme mencionado anteriormente, um reflexo do desequilíbrio genótipo x ambiente, que no caso presente, estaria relacionado à elevada umidade relativa presente nos túneis plásticos durante os primeiros dias de aclimatação; uma vez que esse cultivar provém de uma região de clima temperado, na costa da Califórnia (EUA).

Fazendo-se um balanço a respeito da influência dos fungos endomicorrízicos no crescimento e desenvolvimento das plantas, podemos admitir que para a maioria dos indicadores avaliados houve uma tendência de as plantas micorrizadas alcançarem os melhores resultados.

A frequente indiferença das plantas à presença dos fungos endomicorrízicos, observada tanto para certos indicadores como entre as duas épocas avaliadas, deixa uma dúvida com relação à natureza da(s) causa(s) que poderia ter provocado essa alternância nas respostas. Uma das hipóteses levantadas, conforme sugerido anteriormente, seria de que os fatores ambientais estariam interagindo de forma diferente com a simbiose entre os diferentes cultivares, fungos e tamanhos testados.

5. Conclusões

Os resultados obtidos nas condições deste trabalho permitiram concluir que:

a) O comportamento fisiológico durante a fase de aclimação de morangueiro micropropagado diferiu, dependendo dos cultivares testados. Os cultivares AGF-80 e Campinas alcançaram os maiores índices de sobrevivência, enquanto Sequóia foi o que se mostrou mais sensível, resultando no maior número de perdas durante essa fase.

b) Quanto menor o tamanho da planta aclimatada mais comprometida ficou sua chance de sobrevivência, sobretudo para o cultivar Sequóia.

c) Os fungos endomicorrízicos influenciaram no índice de sobrevivência e no crescimento das plantas :

- a sobrevivência das plantas que receberam o inoculante MVA não foi beneficiada pela presença da associação endomicorrízica.

- o estabelecimento da associação micorrízica estimulou o crescimento das plantas em diferentes níveis, em função do cultivar de morangueiro e da época de avaliação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELKELGREN, R. O. & MILLER, P. W. Cultural of apical meristem of *Fragaria vesca* strawberry plants as a method of excluding latent A virus. Plant Disease Report, St. Paul, 46: 119-21, 1962.
- BERTA, G.; FUSCONI, A.; TROTTA, A. Crescita dell'apparato radicale in una VA micorriza. Giorn. Bot. Ital., 118: 19 - 21, 1984.
- BETHLENFALVAY, G. J.; BROWN, M. S.; PACOVSKY, R. S. Parasit and mutualistic associations between a mycorrhizal fungus and soyben: development of the host plant. Phitopatology, Lancaster, 72: 889 - 93, 1982.
- BETTI, J. A. Obtenção de material propagativo vegetal livre de vírus. In: CROCOMO, O. T.; SHARP, W.R.; MELLO, M., ed. Biotechnologia para produção vegetal. Piracicaba, FEALQ, 1991. p.145-72.
- BOXUS, Ph.; DAMIANO, C.; BRASSEUR, E. Strawberry. In: EVANS, D. A.; SHARP, W. R. ; AMIRATO, P. V.; YAMADA, Y., ed. Handbook of plant cell tissue and organ culture. New York, MacMillan, 1984. v.3, cap.17, p. 453-86.

- BRAINERD, K. E. & FUCHIGAMI, L. H. Stomatal functioning of "in vitro" and greenhouse apple leaves in darkness, manitol, ABA, and CO₂. Journal of Experimental Botany, Oxon, 33: 338-92, 1982.
- CABALA - ROSAND, P. & DIAS, R. Associações micorrízicas e a nutrição mineral das plantas. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 1., Lavras, 1985. Anais. Lavras, FAEPE, 1986 p.33-59.
- CAMARGO, L.S. Cultura do morangueiro, Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1945. 38 p.
- CARDOSO, C.O.N. Doenças do morangueiro - *Fragaria vesca*. In: GALLI, F. Manual de fitopatologia. 2. ed. São Paulo, Agnômica Ceres, 1980. v.2, cap. 28, p. 392-403.
- CASTELLANE, P.D. Nutrição mineral e adubação da cultura do morango. In: SIMPÓSIO SOBRE A CULTURA DO MORANGUEIRO, 1., Cabreúva, 1986. Cabreúva, Casa da Agricultura, 1986. p.22-42.
- CAUSTON, D. R. & VENUS, J. C. The biometry of plant growth. London, Edward Arnold, 1981. 397 p.
- CHANG, D.C.N. Responses of micropropagated (cultivar) Harunoka strawberry (*Fragaria ananassa*) to *Glomus* Endomicorrhizal fungi. HortScience, Alexandria, 21(3): 885 , 1986.
- CHAVES, M. C. & FERRERA-CERRATO, R. Effect of vesicular-arbuscular mycorrizae on tissue culture-derived plantlets of strawberry. HortsScience, Saint Joseph, 25 (8):903-5, 1990.

CHRISTIE, C.B. & BRASCAMP, W. Exflasking high health Daphne plantlets. Combined Proceedings of the International Plant Propagators Society, 38: 394 - 8, 1988. Apud Horticultural Abstracts, Farnham Royal, 60(): - , 1990. (Resumo)

COOKE, R.C. & WHIPPS, The evolution of modes of nutrition in fungi parasitic on terrestrial plants. Biological Reviews, Prague, 55: 341-61, 1980.

DEBERG, P. C. & MAENE, L. J. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. Scientia Horticulturae, Amsterdam, 14: 335-45, 1981.

DESJARDINS, Y.; GOSSELIN, A.; YELLE, S. Acclimatization of "ex vitro" strawberry plantlets in CO₂ - enriched environments and supplementary lighting. Journal of the American Society for Horticultural Science, Alexandria, 112:(5): 846-51, 1987.

DUNNE, M.J. & FITTER, A.H. The phosphorus budget of a field-grown strawberry (*Fragaria ananassa* cv. Hapil) Crop: evidence for a mycorrhizal contribution. Annals of Applied Biology, Wellesbourne, 114: (1): 185-93, 1989.

FABBRI, A.; SUTTER, E.; DUNSTON, S.K. Anatomical changes in persistent leaves of tissue-cultured strawberry plants after removal from culture. Scientia Horticulturae, Amsterdam, 28: 331-7, 1986.

FERNANDES, E. A. Apresentação. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Morango; resumos informativos. Brasília, 1981. p.5.

- FUSCONI, A.; BERTA, G.; SCANNERINI, S.; TROTTA, A.
Meritematic activity in mycorrhizal and uninfected roots of *Allium porrum* L. In: GIANNINAZI - PEARSON, V. & GIANNINAZI S., ed. *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae*, Paris, INRA Press, 1986. p.667-71.
- GALLETA, G.J. & BRINGHURST, R.S. Strawberry management. In: GALLETA, G. J. & HIMERLICK, D.G., ed. Smaal fruit crop management. New Jersey, Prentice Hall, 1990. cap. 3, p. 83 - 156.
- GIOVANNETTI, M. & MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring V.A. mycorrhizal infection in roots. New Phytologist, Cambridge, 84: 489-500, 1980.
- GROUT, W. W. & MILLAN, S. Photosyntetic development of propagated plantlets following transplanting. Annals of Botany, London, 55: 129-31, 1985.
- HACSKAYLO, E. Micorrhiza: the ultimate in receptional parasitisms ?. BioScience, Washignton, 22: 577-83, 1972.
- HASHIMOTO, S. Morango compensa o que dá. Coopercotia, São Paulo, 152: 11-5, 1962.
- HRSELOVÁ, H.; VEJSADOVÁ, H.; PRIKRYL, Z.; VACHOVÁ, J.; VANCURA, V.; VIT, A. Effect of inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on growth of strawberries. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INTERRELATIONSHIPS BETWEEN MICROORGANISMS AND PLANTS IN SOIL, Liblice, 1987. Proceedings, edited by V. Vancura and F. Kunk. Amsterdam, Elsevier Science, 1989. p. 109-14. (Developments in soil science, 18).

- HU, C.Y. & WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud cultures. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y., ed., Handbook of plant cell tissue and organ culture. New York, MacMillan, 1983. v.1, cap. 5, p. 177-227.
- KIERNAN, J.M.; HENDRIX, J. W.; STOLTZ, L.P.; MARONEK, D.M. Characterization of strawberry plants specific mycorrhizal fungi. HortScience, Alexandria, 19: 883-5, 1984.
- MacCLELAND, M.T. Effects on proliferation and rooting microenvironments on micropropagated woody plants. Urbana, 1989. 235 p. (M.S. - University of Illinois).
- MAIA, J. S. As biotecnologias aplicadas à agricultura no Brasil. In: ALMEIDA, A. L. O. Biotecnologia e Agricultura. Rio de Janeiro, Ed. Vozes, 1984. cap. 5, p. 87-100.
- MORANDI, D.S.; GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI - PERSON, V. Intérêt de l'endomycorhization dans la reprise et la croissance du franboisier issue de multiplication végétative "in vitro". Annales de l'Amélioration des Plantes, Paris, 29: 623-30, 1979.
- MOREL, G. M. Clonal propagation of orchids by meristem culture. Cymbidium Society News, Leucadia, 20: 3-11, 1965.
- MURASHIGE, T. Current status of plant cell and organ cultures. HortScience, Alexandria, 12: 127-30, 1977.

- NEMEC, S. Populations of *Endogone* in strawberry fields in relation to root infection. Transactions of the British Mycological Society, Cambridge, 62: 45-9, 1974
- OLIVEIRA, E. Taxonomia da *Endogonaceae*. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 1., Lavras, 1985. Anais. Lavras, FAEPE, 1986. p. 100-19.
- PHILIPS, J. M. & HAYMAN, Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular - arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society, Cambridge, 55 (1): 158-61, 1970.
- PREECE, J. E. & SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERG, P.C. & ZIMMERMAN, R. H., ed. Micropropagation Technology and Application. Dordrecht, Kluwer Academic, 1991. cap. 4., p.71-93.
- RAMOS, R. S. Antracnose do morangueiro. In: SIMPÓSIO SOBRE A CULTURA DO MORANGUEIRO, 1., Cabreúva, 1986. Cabreúva, Casa da Agricultura, 1986. p.15-21.
- ROBERTSON, W.J.; BOYLE, C.D.; BROWN, H.L. Endomycorrhizal status of certified strawberry nursery stock. Journal of the American Society for Horticultural Science, Alexandria, 113 (4): 525-9, 1988.
- SCHIAVINATO, R. J. Diagnose visual de algumas deficiências minerais e suas codificações na cultura do morangueiro (*Fragaria* sp) Jaboticabal, 1990. 61 p. (Graduação - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária/UNESP).

SIQUEIRA, J.O. & COLOZZI-FILHO, A. Micorrizas vesículo-arbusculares em mudas de cafeeiro. II. Efeito do fósforo no estabelecimento e funcionamento da simbiose. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, 10 (3): 207-11, 1986.

SOUZA, P. de. Micorrizas: histórico, perspectivas e potencial para a agricultura tropical. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 1., Lavras, 1985. Anais. Lavras, FAEPE, 1986. p. 1-4.

TESSAROLI NETO, J. Avaliação do potencial produtivo e de seus componentes em diferentes clones de morangueiro (*Fragaria ananassa* Duch.). Piracicaba, 1982. 82 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz" / USP).

VILLALOBOS-ARAMBULA, V. M. & ORTEGA-OBREGON, C.A. Cultivo meristemático de *Fragaria* spp "in vitro". Chapingo, México, 10: 21-5, mar./abr. 1978.

WETZSTEIN, H. Y. & SOMMER, H. E. Leaf anatomy on tissue-cultured *Liquidambar styraciflua* (*Hammamelidaceae*) during acclimatization. American Journal of Botany, Columbus, 69: 1579-86, 1982.

ZAMBOLIM, L. & SIQUEIRA, J.C. Importância e potencial das associações micorrízicas para a agricultura. Belo Horizonte, EPAMIG, 1985. 36p. (EPAMIG. Documentos, 26)

ZHANG, B. & STOLTZ, L.P. Acclimatization systems for *Euphorbia fulgens* microcuttings. Hortscience, Saint Joseph, 24: 6, 1025 - 2, 1989.