

# INFLUÊNCIA DO CARVÃO ATIVADO E BAP NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE DUAS FRUTÍFERAS DE CLIMA TEMPERADO

Fabiola Villa<sup>1</sup>  
Moacir Pasqual<sup>1</sup>  
Leila Aparecida Salles Pio<sup>1</sup>  
Franscinely Aparecida Assis<sup>1</sup>  
Grazielle Sales Teodoro<sup>1</sup>

## RESUMO

A micropropagação de frutíferas de clima temperado pode gerar plantas livres de vírus num curto espaço de tempo (seis meses). Com o objetivo de aprimorar técnicas de propagação *in vitro* de amoreira-preta e videira, foram testadas concentrações de carvão ativado e BAP adicionadas ao meio. Este foi constituído de sais MS e ½ MS, respectivamente, acrescido de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar, e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C e 1 atm por 20 minutos. Os tratamentos consistiram de concentrações de carvão ativado (0; 1,0; 2,0; 3,0; e 4,0 g L<sup>-1</sup>) e de BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0; e 4,0 mg L<sup>-1</sup>) em todas as combinações possíveis, da amoreira-preta cv. Ébano e do porta-enxerto de videira 'P1103'. Segmentos nodais de plântulas preestabelecidas *in vitro* foram excisados e introduzidos em tubo de ensaio contendo 15 mL do meio de cultura. Posteriormente, os tubos foram transferidos para sala de crescimento a 27 ± 1 °C, com irradiância de 35 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas. Após 70 dias de cultivo das plantas *in vitro*, verificou-se que a adição de carvão ativado inibe a multiplicação das brotações das duas frutíferas de clima temperado. Maiores número e comprimento de raízes de plantas de amoreira-preta cv. Ébano e crescimento da parte aérea do porta-enxerto 'P1103' foram proporcionados com 3,0 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. Maior peso da matéria fresca da parte aérea das duas frutíferas estudadas foi obtido na ausência de carvão ativado e com a adição de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Maior número de folhas e de raízes de amoreira-preta cv. Ébano foi encontrado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Melhor meio de cultura utilizado na multiplicação *in vitro* das duas frutíferas de clima temperado é o adicionado de BAP na ausência de carvão ativado.

**Palavras-chave:** frutífera de clima temperado, BAP, carvão ativado.

## ABSTRACT

### INFLUENCE OF ACTIVATED CHARCOAL AND BAP *IN VITRO* MULTIPLICATION OF TWO TEMPERATE CLIMATE FRUIT

Rootstock grapevine micropropagation can generate virus-free plants in a short period of time (six months). Aiming at improving grapevine *in vitro* propagation techniques, activated charcoal and BAP concentrations were added to the culture medium. The culture medium consisted of ½ MS salts, added of 30 g L<sup>-1</sup> sucrose and 6 g.L<sup>-1</sup> agar, and pH adjusted to 5.8 before sterilization at 121°C and 1 atm for 20 minutes. The treatments consisted of activated charcoal concentrations (0; 1.0; 2.0; 3.0 and 4.0 g.L<sup>-1</sup>) and BAP (0; 0.5; 1.0; 2.0 and 4.0 mg.L<sup>-1</sup>), in all the possible combinations, blackberry cv Ebano and grapevine rootstock 'P1103'. Nodal segments of *in vitro* plants were excised and placed in tubes containing 15 mL of culture medium. The tubes were then transferred to growth room at 27 ± 1°C, 35 mol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> irradiance and photoperiod of 16 hours. After 70 days of *in vitro* culture, it was verified that the addition of activated charcoal inhibited the multiplication of the two temperate climate fruits. Activated charcoal in the concentration of 3.0

<sup>1</sup> Departamento de Fitotecnia, DAG/UFLA. Lavras, MG. E-mail: fvilla2003@libero.it, mpasqual@ufla.br

g L<sup>-1</sup> gave longer root length and larger root number for blackberry plants cv. Ebano and larger growth of aerial part for grapevine rootstock ‘P1103’. Larger fresh matter weight of aerial part of the two temperate climate fruits was obtained without activated charcoal but with addition of 2.0 mg L<sup>-1</sup> of BAP. BAP in the concentration of 0.5 mg L<sup>-1</sup> gave larger leaf number and larger root number for blackberry cv. Ebano. Addition of BAP without activated charcoal was the best culture medium used for the *in vitro* multiplication of the two temperate climate fruits.

**Keywords:** rootstock, BAP, activated charcoal.

## INTRODUÇÃO

A fruticultura de clima temperado tem grande importância no contexto da produção mundial. Algumas das frutas produzidas em maior volume em todo o mundo, como a macieira e a videira, são de espécies pertencentes a esta classe. Além disso, estas espécies são cultivadas com intensidade nas regiões de maior consumo de frutas, como os países desenvolvidos do Hemisfério Norte (Chalfun *et al.*, 1998).

No Brasil, a amoreira-preta vem sendo cultivada por pequenos produtores do Rio Grande do Sul (principal produtor brasileiro), Santa Catarina e Paraná, objetivando a exportação dos frutos (Antunes & Raseira, 2004). O sul de Minas Gerais tem apresentado elevado potencial para esta fruta e aumento da área plantada, destacando-se o município de Caldas. A cultura da videira (*Vitis* spp. L.), pela sua extensa área cultivada no Brasil e pelo seu potencial de utilização, constitui importante fruteira de clima temperado, ocupando o terceiro lugar em produção.

A propagação da amoreira-preta se faz por meio de estacas de raízes, ou ainda por brotos (rebentos) originados de plantas cultivadas e estacas herbáceas (Raseira, 2004). Além destes, com a micropropagação é possível obter plantas livres de vírus, geneticamente uniformes, e em curto espaço de tempo (seis meses), sendo assim uma alternativa viável (Grattapaglia & Machado, 1990).

Dentre os problemas fitossanitários da videira, a ocorrência de doenças causadas por vírus é um dos mais graves, pois uma vez instalados eles não são mais eliminados por métodos fitossanitários convencionais de controle. A recuperação da produtividade e eliminação das principais doenças viróticas da videira podem ser obtidas com a utilização da cultura de tecidos, associada ou não à termoterapia (Schuck e Silva & Crestain, 1988).

Um dos objetivos da micropropagação é a maximização da multiplicação de gemas. Muita atenção para sua obtenção tem sido dada com a manipulação de substâncias de crescimento no meio de cultura (Bhojwani, 1984).

O crescimento e a morfogênese *in vitro* são fatores regulados pela interação e pelo balanço dos reguladores de crescimento existentes no meio de cultura, principalmente auxinas e citocininas (George & Sherrington, 1984).

As citocininas são utilizadas para quebrar a dormência apical dos brotos, e aumentar a taxa de multiplicação. Dentre os reguladores de crescimento comumente usados no cultivo *in vitro* da videira estão as citocininas BAP, com concentrações que variam de 0,5 mg L<sup>-1</sup> a 2,0 mg L<sup>-1</sup> (Jona & Webb, 1978). A adição de auxinas aos meios de cultura não é recomendada, pois estes provocam a formação indesejável de raízes e calos, além de reduzirem o número de brotações produzidas por explante (Gray & Fisher, 1986).

Peixoto & Pasqual (1992) obtiveram maiores taxas de multiplicação e crescimento dos segmentos nodais de ‘P1103’ com o emprego de 0,5 e 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e na ausência de ANA. Para a amoreira-preta, os reguladores de crescimento comumente usados no cultivo *in vitro* são a 6-benzilaminopurina (BAP) e o ácido indolbutírico (AIB) (Donnelly *et al.*, 1986).

Entre os efeitos proporcionados pela adição do carvão ativado ao meio de cultura estão: promoção de ambiente escuro, favorecendo o enraizamento; adsorção de substâncias inibitórias produzidas pelo próprio meio ou explante; adsorção de reguladores de crescimento e de outros compostos orgânicos; e liberação de substâncias naturalmente presentes no carvão que beneficiam o crescimento *in vitro* das culturas (George & Sherrington, 1984).

O carvão ativado normalmente é adicionado ao meio de cultura em concentrações que variam de 0,2 a 3% (Beyl, 2000), porém sua presença pode promover ou inibir o crescimento *in vitro*, dependendo da espécie e do tecido utilizados (George & Sherrington, 1984). Vários são os trabalhos que citam o emprego de carvão ativado na micropropagação de espécies frutíferas como videi-

ra, ameixeira, framboeseira, morangueiro, macieira, abacaxizeiro e banana (Roy, 1995).

O presente trabalho objetivou avaliar o efeito de concentrações de carvão ativado e do BAP na multiplicação *in vitro* de plântulas de amoreira-preta cv. Ébano e do porta-enxerto de videira 'P1103'.

## MATERIAL E MÉTODOS

Segmentos nodais de plantas de amoreira-preta (*Rubus* spp.) cv. Ébano e do porta-enxerto de videira (*Vitis* spp. L.) 'P1103' com 2 cm, de plantas preestabelecidas *in vitro*, foram excisados e introduzidos em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio constituído dos sais minerais do meio MS e de metade dos sais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), respectivamente, combinados com cinco concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup>) e cinco de carvão ativado (0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 g L<sup>-1</sup>). O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem e solidificado com 6 g L<sup>-1</sup> de ágar (Merck®).

Posteriormente, foram transferidos para sala de crescimento a 27 ± 1 °C, irradiância de 35 μ mol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> fornecida por tubos fluorescentes de 20W (Osram), luz do dia especial e fotoperíodo de 16 horas, permanecendo nestas condições por 70 dias.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições constituídas de três explantes. As variáveis analisadas para o porta-enxerto de videira foram número de folhas, comprimento da parte aérea e peso das matérias fresca e seca da parte aérea, e para a amoreira-preta cv. Ébano foram avaliados o nú-

mero de folhas, número de raízes, comprimento da maior raiz, comprimento da parte aérea e o peso das matérias fresca e seca da parte aérea.

Os resultados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o software Sisvar (Ferreira, 2000), empregando-se regressão polinomial para concentrações de carvão ativado e de BAP e nível de significância de 0,05% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificaram-se com a adição de carvão ativado ao meio de cultura, nas concentrações utilizadas, a inibição da multiplicação dos brotos e o crescimento da parte aérea e do sistema radicular do segmento nodal inicialmente inoculado das duas frutíferas de clima temperado estudadas. Não houve a formação de calos em nenhum tratamento, diferindo assim dos resultados observados em figueira cv. Roxo de Valinhos micropropagada, onde se constatou essa formação apenas na presença de 0,5 a 4,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (Fráguas, 2003).

Para o comprimento da parte aérea, comprimento da maior raiz, número de folhas e raízes das plantas de amoreira-preta cv. Ébano e peso da matéria fresca da parte aérea houve interação significativa entre BAP e carvão ativado, constatando-se que os efeitos dos fatores são dependentes.

Com incrementos nas concentrações de carvão ativado, verificou-se decréscimo de forma quadrática no número de folhas das duas frutíferas estudadas até atingir um ponto de mínimo (Figuras 1A e 1B). O inverso foi observado em porta-enxerto de *Prunus pérsica* x

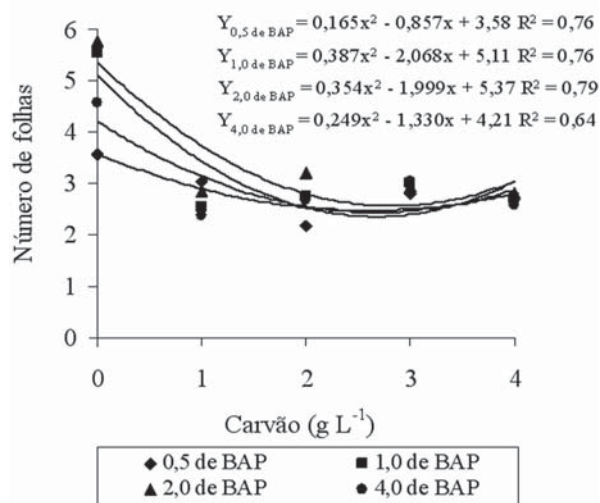


Figura 1A - Número de folhas em plantas de porta-enxerto de videira 'P1103' em diferentes concentrações de BAP e de carvão ativado.

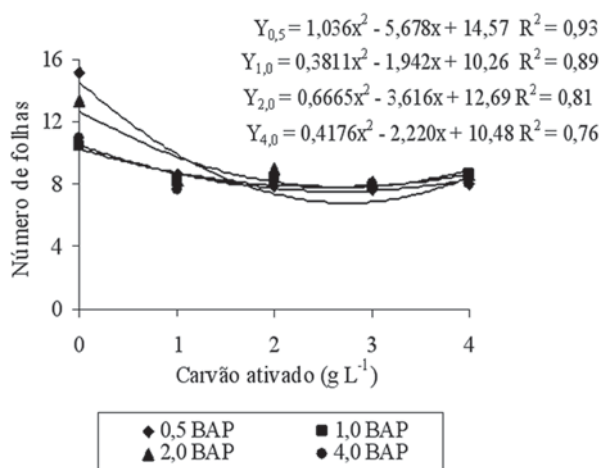


Figura 1B - Número de folhas em plantas de amoreira-preta cv. Ébano em diferentes concentrações de BAP e de carvão ativado.

*P. amygdalus*, onde maior número de folhas ocorreu com a adição de carvão ativado no meio de cultura (Sotiropoulos & Fotopoulos, 2005).

Mesmo na ausência de carvão ativado foi verificada a presença de folhas em plantas de amoreira-preta e no porta-enxerto de videira, obtendo-se maior número (15,17 e 5,76) com 0,5 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, respectivamente. Isto pode ser atribuído ao fato de o carvão ativado, associado ao BAP, favorecer a formação de maior número de brotos, porém de tamanho reduzido, apresentando menor número de segmentos nodais e folhas.

A análise de variância para comprimento da parte aérea das plântulas do porta-enxerto de videira, não indica interação entre os fatores BAP e o carvão ativado (Figuras 2A e 2B). Incremento nas concentrações de carvão e de BAP acarretou em aumento de forma quadrática no comprimento da parte aérea.

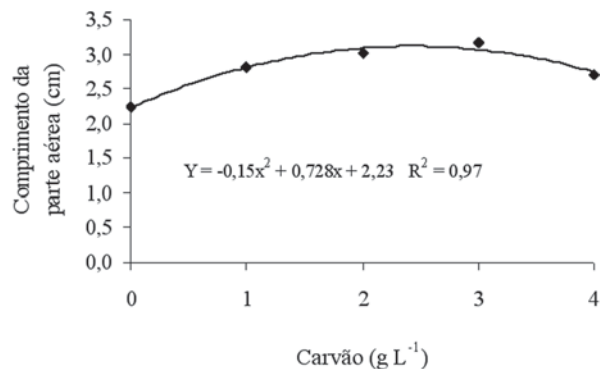
O comprimento da parte aérea atingiu o valor máximo (3,02 g) com a utilização de 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e com 3,0 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado (3,16 g), e a partir deste ponto o regulador de crescimento BAP e/ou o carvão ativado passaram a inibir o desenvolvimento das plântulas, apresentando decréscimo no comprimento.

Em plantas de amoreira-preta verificou-se interação significativa entre os fatores estudados (Figura 2C). Por meio do teste F, constatou-se resultado significativo em relação às concentrações de carvão ativado, exceto na ausência de BAP. O maior comprimento da parte aérea (6,188 cm) foi observado com 4,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP associado a 1,0 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado, porém a diferença verificada nos outros níveis de carvão é muito pequena. Rápida proliferação de gemas axilares de amoreira-preta cultivares Thornless Boysenberry e T. Youngberry foi obtida em meio MS acrescido de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de ANA (Skirvin et al., 1981).

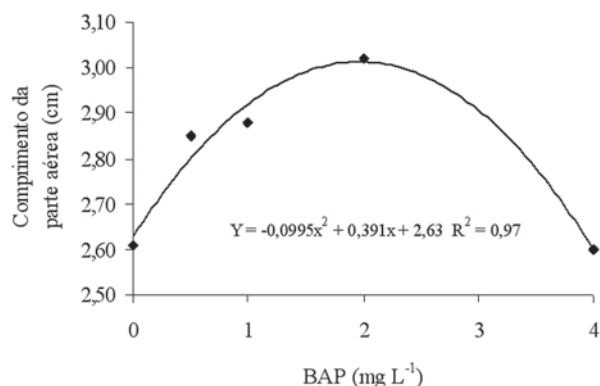
Vários autores relatam o efeito do carvão ativado no alongamento das brotações em diversas espécies. Kowalski e Staden (2001) citam que a utilização de 2,0 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado no meio de cultura WPM proporcionou melhor crescimento das brotações de *Podocarpus henkelii*. De forma semelhante, Mohamed-Yasseen (2001) verificou aumento no comprimento de plântulas de milho com a adição de carvão ativado ao meio. Com a adição de 2,0 g L<sup>-1</sup> de carvão em 3/4 do meio MS, Quoirin et al. (2001) também observaram um acréscimo no comprimento de plantas de *Acacia mearnsii*.

Concentrações elevadas do regulador de crescimento podem ter dificultado o desenvolvimento da parte aérea,

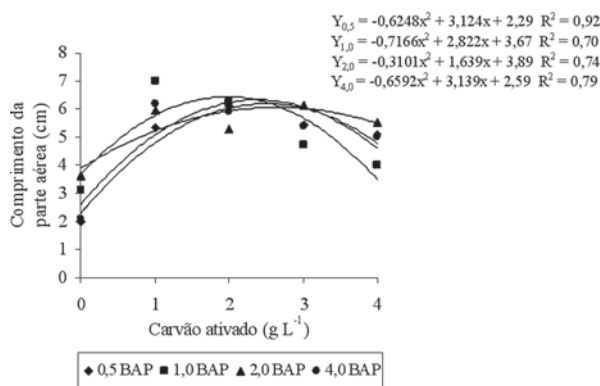
mesmo utilizando-se a maior concentração de carvão ativado, resultando em menor comprimento da parte aérea. Pasqual (2001) cita que altas taxas de citocininas podem reduzir o tamanho das brotações e estimular a ocorrência de hiperidricidade e formação de folhas anormais.



**Figura 2A** - Comprimento da parte aérea de plantas de porta-enxerto de 'P1103' cultivadas em diferentes concentrações de carvão ativado.



**Figura 2B** - Comprimento da parte aérea de plantas de porta-enxerto de 'P1103', cultivadas em diferentes concentrações de BAP.



**Figura 2C** - Comprimento da parte aérea de plantas de amoreira-preta cv. Êbano cultivadas em diferentes concentrações de carvão ativado e de BAP

Comprimento da maior raiz de amoreira-preta foi observado mesmo na ausência de carvão ativado em todas as concentrações do regulador de crescimento. Maior comprimento (1,713 cm) foi verificado com 4,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP associado a 3,0 g L<sup>-1</sup> de carvão (Figura 3).

Com o aumento das concentrações de carvão, houve acréscimo seguindo o modelo quadrático tanto para comprimento da maior raiz quanto para seu número (Figuras 3 e 4). Porém, para raízes, verificou-se maior número (1,92) com a mesma concentração de carvão que forneceu melhores resultados para comprimento de raiz (3,0 g L<sup>-1</sup>), mas com baixa dose do regulador (0,5 mg L<sup>-1</sup>) (Figura 4).

Esses resultados corroboram com Barbosa *et al.* (1992) que verificaram um aumento de qualidade e quantidade de raízes formadas de figueira 'Roxo de Valinhos' com a adição de 3,0 g L<sup>-1</sup> de carvão em meio de cultura MS. Porém, divergem de Fráguas (2003) quando cita que a adição de 1,0 g L<sup>-1</sup> de carvão aumentou o número de raízes em plantas de figueira da mesma cultivar multiplicadas em meio WPM.

Reddy *et al.* (2001) verificaram que plantas de *Decalepis hamiltonii* tiveram um enraizamento de 100% em meio MS adicionado de 4,4 m de IBA + 0,25% de carvão ativado. Nirmal Babu *et al.* (2003) também observaram melhores resultados no enraizamento *in vitro* de *Cinnamomum camphora* em meio WPM com a adição de IBA associado ao carvão ativado. Gubbuk & Pekmezci (2004) afirmaram que, para se obterem novas variedades de *Musa* spp. enraizadas, não é necessária a adição de IBA ou ANA ao meio MS quando esse contém carvão ativado.

Não se verificou interação significativa entre os fatores BAP e carvão ativado em peso de matéria fresca

da parte aérea de plantas de amoreira-preta. Incremento nas concentrações de carvão ativado acarretaram diminuição no peso de matéria fresca das plântulas de amoreira-preta. O inverso foi observado concentrações de BAP (Figuras 5A e 5B).

O peso da matéria fresca da parte aérea atingiu o valor máximo (0,797 g) com a utilização de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e na ausência de carvão ativado (0,812 g) e a partir desse ponto o BAP passou a inibir o desenvolvimento das plantas *in vitro*, apresentando um decréscimo no seu peso.

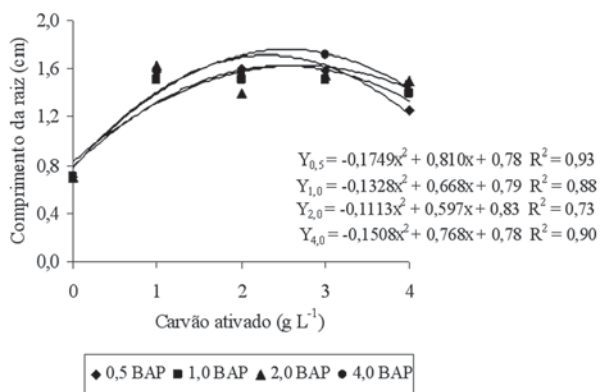
Por meio do teste F, verificou-se resultado significativo em relação às concentrações de carvão ativado e às de BAP para o peso da matéria fresca da parte aérea do porta-enxerto. A diferença observada nos níveis de carvão no peso de matéria fresca da parte aérea foi muito pequena (Figura 5C).

Na análise de variância, verifica-se que, nos pesos de matéria fresca e seca da parte aérea do porta-enxerto de videira, apenas a interação entre carvão e os níveis 1,0; 2,0 e 4,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP foram significativos (Figuras 5C e 6A).

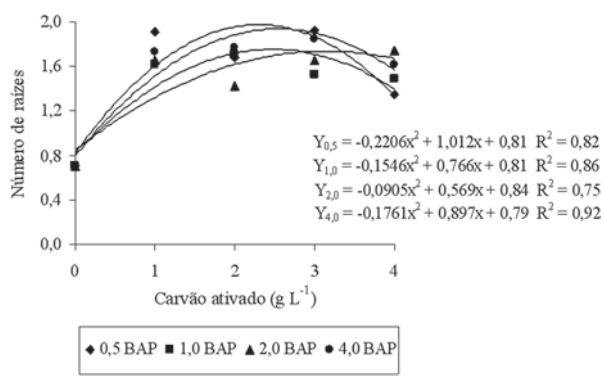
Constata-se nas Figuras 5C e 6A que maior peso da matérias frescas (1,52 g) e seca (0,787g) da parte aérea ocorreu com 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP na ausência de carvão ativado.

Com o incremento das concentrações de carvão ativado houve diminuição nos pesos fresco e seco da parte aérea de forma quadrática, combinado com 1,0; 2,0; e 4,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

Kadota, *et al.* (2001) citam que a adição de carvão ativado reduziu a biomassa de pereira micropropagada. O efeito não-seletivo desse carvão ativado pode proporcionar resultados negativos na micropropagação (Pan & Staden, 1998).

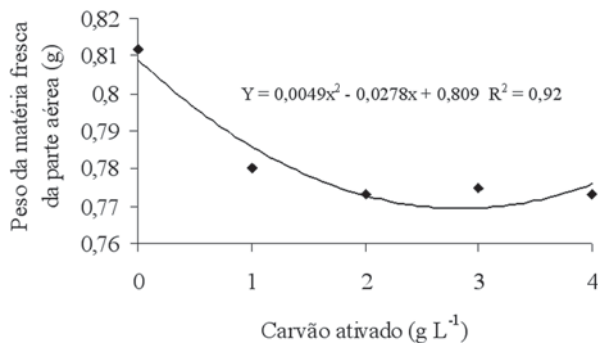


**Figura 3** - Comprimento da maior raiz de plantas de amoreira-preta cv. Ébano cultivadas em diferentes concentrações de carvão ativado e de BAP.

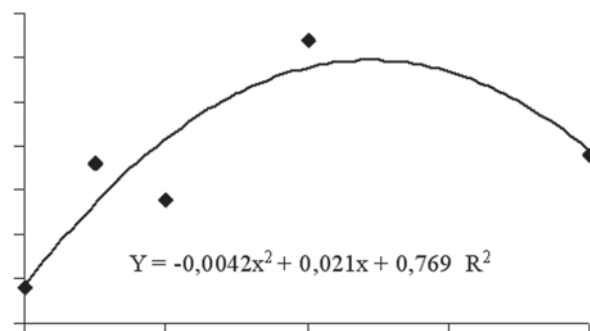


**Figura 4** - Número de raízes de plantas de amoreira-preta cv. Ébano, cultivadas em diferentes concentrações de carvão ativado e de BAP.

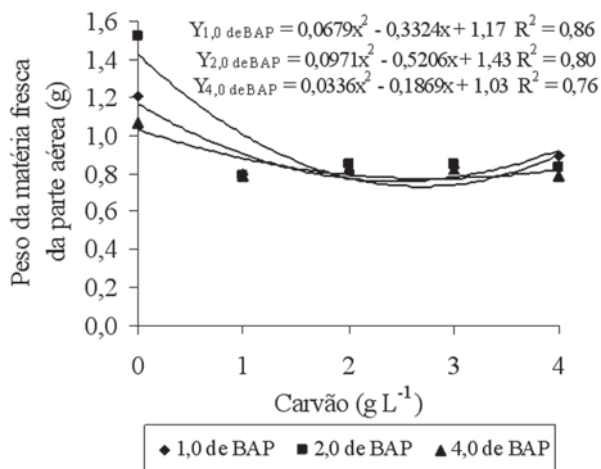
A análise de variância indica que apenas a interação entre o carvão e o nível 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP da amoreira-preta foi significativa (Figura 6B). Com o incremento das concentrações de carvão ativado houve diminuição no peso da matéria seca da parte aérea de forma quadrática.



**Figura 5A** - Peso da matéria fresca da parte aérea de plantas de amoreira-preta cv. Ébano, cultivadas em diferentes concentrações de carvão ativado.



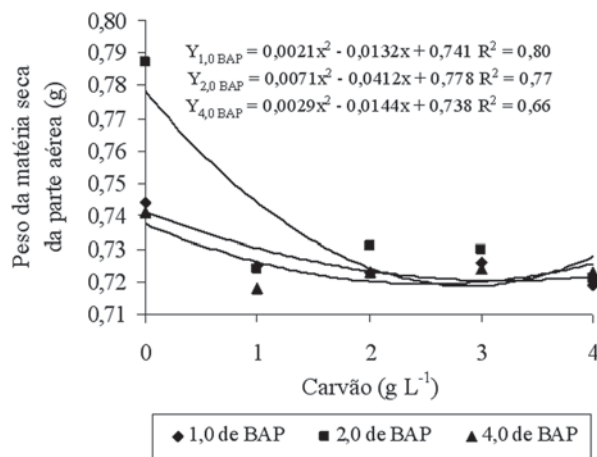
**Figura 5B** - Peso da matéria fresca da parte aérea de plantas de amoreira-preta cv. Ébano, cultivadas em diferentes concentrações de BAP.



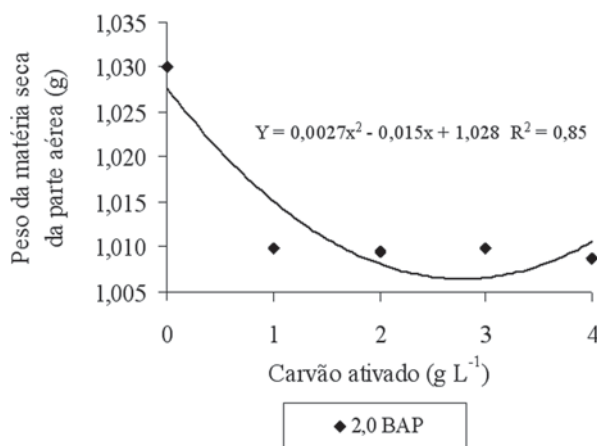
**Figura 5C** - Peso da matéria fresca da parte aérea de plantas de porta-enxerto 'P1103', cultivadas em diferentes concentrações de carvão ativado e de BAP.

Constata-se-se na Figura 6B que o maior peso da matéria seca da parte aérea de amoreira-preta (1,03 g) ocorre na ausência de carvão ativado associado a 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

As concentrações mais elevadas do regulador de crescimento podem ter dificultado o desenvolvimento da parte aérea, mesmo utilizando-se a maior concentração do carvão ativado, que resulta em menor peso das matérias fresca e seca da parte aérea. Apesar de a utilização de citocinina ser essencial à multiplicação da parte aérea, o seu excesso é tóxico e pode resultar, entre outros efeitos, na redução do tamanho das folhas e encurtamento dos entrenós (Leshen *et al.*, 1988).



**Figura 6A** - Peso da matéria seca da parte aérea de plantas de porta-enxerto 'P1103' cultivadas em diferentes concentrações de BAP e de carvão ativado.



**Figura 6B** - Peso da matéria seca da parte aérea de plantas de amoreira-preta cv. Ébano cultivadas em diferentes concentrações de carvão ativado e BAP.

## CONCLUSÕES

A adição de carvão ativado inibe a multiplicação das brotações das duas frutíferas de clima temperado. Maior peso da matéria fresca da parte aérea das duas frutíferas estudadas foi obtido na ausência de carvão ativado e com a adição de 2,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

Maior número e comprimento de raízes de amoreira-preta cv. Ébano e melhor crescimento da parte aérea do porta-enxerto 'P1103' foram proporcionados com 3,0 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado.

Maior número de folhas e de raízes de amoreira-preta foi obtido com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

A adição de BAP na ausência de carvão ativado resultou em melhor meio de cultura para a multiplicação de amoreira preta cv. Ébano e do porta-enxerto de videira 'P1103'.

## REFERÊNCIAS

- Antunes LEC, Raseira MCB (2004) Aspectos Técnicos da Cultura da Amora-Preta. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p.13. Embrapa Clima Temperado (Documentos, 122).
- Barbosa W, Campo-Dall'Orto FA, Ojima M, Martins FP, Bovi V, Castro JL. de. (1992.) Produção de mudas da figueira 'Roxo de Valinhos' através da cultura *in vitro*. O Agrônomo, 44:6-18.
- Beyl CA (2000) Getting started with tissue culture - media preparation, sterile technique, and laboratory equipment. In: Trigiano RN, Gray DJ (Ed.). Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. London: CRC Press, 21-38.
- Bhojwani SS, Mullins K, Cohen D (1984) *In vitro* propagation of *Pyrus pyrifolia*. Scientia Horticulturae, 23:247-54.
- Chalfun NNJ, Pasqual M., Hoffmann A (1998) Fruticultura comercial: frutíferas de clima temperado. Lavras: UFLA-FAEPE, 7:304p.
- Donnelly DJ, Stace-Smith R, Mellor FC (1986) *In vitro* culture of three *Rubus* species. Acta Horticulturae, 112:69-75.
- Ferreira DF (2000) Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 45, 2000, São Carlos. Anais... São Carlos: UFSCar:255-8.
- Fráguas CB (2003) Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira 'Roxo de Valinhos' em diferentes ambientes. Dissertação de Mestrado. Lavras, Universidade Federal de Lavras. 110 p.
- George EF, Sherrington PD (1984) Plant propagation by tissue culture. Eversley; Exegetics, 709p.
- Grattapaglia D, Machado MA (1990) Micropropagação. In: Torres AC, Caldas LS. Técnicas e aplicações de cultura de tecidos de plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPq, p.99-169.
- Gray DJ, Fisher LC (1986) *In vitro* shoot propagation of grape species, hybrids and cultivars. In: Annual Meeting of the Florida State Horticultural Society, 98, Proceedings ... Gainesville: Florida State Horticultural Society, 1986:172-4.
- Gubbuk H, Pekmezci M (2004) *In vitro* propagation of some new banana types (*Musa* spp.). Turkey Journal Agricultural, 28:355-61.
- Jona R, Webb J (1978) Callus and axillary-bud culture of *Vitis vinifera* 'Sylvaner Riesling'. Scientia Horticulturae, 9:55-60.
- Kadota M, Imizu K, Hirano T (2001) Double-phase *in vitro* culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. Scientia Horticulturae, 89: 207-15.
- Kowalski B, Staden J (2001) van. Micropropagation of *Podocarpus henkelii* and *P. elongates*. South African Journal of Botany, Pretoria, 67:362-6.
- Leshen B, Werker E, Shalev DP (1988) The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. Annals of Botany, 62:271-6.
- Mohamed-Yasseen Y (2001) Influence of agar and activated charcoal on uptake of gibberellin and plant morphogenesis *in vitro*. Cellular and Developmental Biology Plant, 37:204-5.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15:473-97.
- Nirmal Babu K, Sajina A, Minoo D, John CZ, Mini PM, Tushar KV, Rema J, Ravindran PN (2003) Micropropagation of camphor tree (*Cinnamomum camphora*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 74: 179-83.
- Pan MJ, Staden J (1998) van. The use of charcoal *in vitro* culture - A review. Plant Growth Regulation, 26:155-63.
- Pasqual M(2001) Meios de cultura. Lavras: UFLA/FAEPE, 74 p.
- Peixoto PHP, Pasqual M (1992) Multiplicação *in vitro* de brotações do porta-enxerto de videira. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 27:617-22.
- Qoierin M, Silva MC, Martins KG, Oliveira De (2001) Multiplication of juvenile black wattle by microcuttings. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 66:199-205.
- Raseira MCB (2004) A pesquisa com amora-preta no Brasil. In: Simpósio Nacional do Morango, 2; Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas, 1., Pelotas, Palestras ... Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p. 219-3. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 124).
- Reddy BO, Giridhar P, Ravishankar GA (2001) *In vitro* rooting of *Decalepis hamiltonii* Wight & Arn., an endangered shrub, by auxins and root-promoting agents. Current Science, 81:1479-1482.
- Roy GM (1995) Agriculture. In: Activated carbon applications in the food and pharmaceutical industries. Lancaster; Technomic Publishing Company, cap. 3:19-42.
- Schuck e Silva AL, Crestani DA (1988) Seleção e controle sanitário da videira em Santa Catarina para virose e anomalias similares. Florianópolis; EMPASC, 23 p. (Boletim Técnico, 42).
- Skirvin RM, Chu MC, Gomez E (1981) *In vitro* propagation of Thornless trailing blackberries. HortScience, 16:310-2.
- Sotiropoulos TE, Fotopoulos S (2005) *In vitro* propagation of the PR 204/84 peach rootstock (*Prunus persica* x *P. amygdalus*): the effect of BAP, GA(3), and activated charcoal on shoot elongation European Journal of Horticultural Science, 70:253-5.