

Micropropagação da amoreira-preta (*Rubus* spp.) e efeito de substratos na aclimatização de plântulas

Fabiola Villa*, Moacir Pasqual, Aparecida Gomes de Araújo e Leila Aparecida Salles Pio

¹Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras (Ufla), 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: fvilla2003@libero.it

RESUMO. O objetivo do presente estudo foi aprimorar técnicas de propagação *in vitro* e determinar um melhor substrato para a amoreira-preta. O primeiro experimento consistiu de gemas axilares com cerca de 2 cm, oriundas de plântulas preestabelecidas *in vitro* da cv. Ébano, excisadas e inoculadas em meio MS, suplementado com 5 concentrações de carvão ativado e 5 de BAP. Ambos os experimentos foram inteiramente casualizados, utilizando-se *in vitro* 3 explantes por repetição e 4 repetições por tratamento e em casa-de-vegetação um fatorial 4x4. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da adição de 6 g L⁻¹ de ágar e da autoclavagem a 121°C e 1 atm por 20 minutos. Após 70 dias, foram avaliados diversos parâmetros nos explantes. Maior número de folhas e maior número de raízes foram obtidos com 0,5 mg L⁻¹ de BAP. Na presença de 3 g L⁻¹ de carvão ativado, o número e comprimento de raízes foi maior. Maior biomassa fresca foi obtido na ausência de carvão ativado. O segundo experimento consistiu de plântulas da cv. Cherokee mantidas em condições *in vitro* e transplantadas para bandejas plásticas, contendo os substratos e mantidas em casa-de-vegetação. Foram testados 4 tipos de substratos. Após 100 dias de aclimatização, foram avaliados números de folhas, comprimento das raízes e da parte aérea, peso fresco e seco das raízes e peso fresco e seco da parte aérea. Foi possível concluir que a aclimatização pode ser realizada com sucesso, utilizando-se Plantmax[®] seguido da mistura de Plantmax[®] + vermiculita + casca de arroz carbonizada e vermiculita. Houve 92% de sobrevivência de plantas em todos os substratos.

Palavras-chave: aclimatização, *Rubus* spp., substratos, regulador de crescimento.

ABSTRACT. Blackberry micropropagation (*Rubus* spp.) and effects of substrates in plants acclimatization. The objective of the present study was to achieve the improved techniques in *in vitro* propagation and to determine a better substrate for the blackberry. The first experiment consisted of nodal segments of plants with ± 2 cm of length obtained from *in vitro* culture cv. Ebano, excised and inoculated in MS culture medium, supplemented with five activated charcoal concentrations and five BAP concentrations. Both experiments were entirely performed in a design randomized complete block, using *in vitro* 3 explants by repetition and 4 replications for treatment and in greenhouse, a factorial 4x4. The pH of the culture medium was adjusted to 5.8 before the addition of 6 g L⁻¹ of agar and the sterilization to 121°C and 1 atm for 20 minutes. After 70 days, several parameters in the explants were evaluated. A greater number of leaves and roots were obtained with 0.5 mg L⁻¹ of BAP. The number of roots and their length were larger in the presence of 3 g L⁻¹ of activated charcoal. A larger weight of the fresh matter was obtained in the absence of activated charcoal. The second experiment consisted of plants cv. Cherokee maintained in *in vitro* conditions and transplanted to plastic trays, containing the substrates and kept in greenhouse. Four types of substrates were tested. After 100 days of acclimatization, the leaf number, root length and aerial part, cool and dry root weight and cool and dry aerial part weight had been evaluated. It was concluded that the acclimatization can be successfully performed using Plantmax[®] followed by the Plantmax[®] + vermiculita + rind rice carbonized mixture. There was a 92% rate of the plants' survival in all substrates.

Key words: acclimatization, *Rubus* spp., substrates, growth regulator.

Introdução

Os maiores produtores de amora-preta na América do Sul são a Argentina e o Chile (Jennings e McNicol, 1991). No Brasil, o estado que se destaca é o Rio Grande do Sul, seguido de Santa Catarina, Paraná e pelo Sul de Minas Gerais; sendo que, neste

último, o plantio restringe-se apenas ao plantio na Epamig/FECD, em Caldas.

Atualmente, além da propagação tradicional, a micropropagação da amoreira-preta é considerada uma outra alternativa viável, com o intuito de se obter plantas livres de vírus, geneticamente uniformes e em curto espaço de tempo (Antunes, 1999). Muita

atenção para sua obtenção tem sido dada à adição de substâncias de crescimento no meio de cultura (Brojwani *et al.*, 1984). Dentre os reguladores de crescimento comumente usados no cultivo *in vitro* da amoreira-preta, estão, a 6-benzilaminopurina (BAP) e o ácido indol butírico (AIB) (Donnelly *et al.*, 1980).

Vários são os trabalhos que citam a utilização de carvão ativado na micropropagação de espécies frutíferas tais como ameixeira, framboeseira, morangueiro, macieira, videira, abacaxizeiro e bananeira (Roy, 1995). 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 utilizado (Pan e Staden, 1998).

Uma etapa da micropropagação que inspira cuidado é a aclimatização, devido à dificuldade de transferir com sucesso plântulas da condição *in vitro* para a casa-de-vegetação e posteriormente para o campo (Fráguas, 2003). Outro fator de importância na aclimatização de mudas é o substrato (Calvete *et al.*, 2000), devendo apresentar boa coesão entre as partículas e adequada aderência junto às raízes (Toledo, 1992). Especialmente para a cultura da amoreira, que desenvolve grande número de raízes finas e compridas, é necessário que o substrato tenha uma boa agregação em torno delas (Couto *et al.*, 2002).

O presente trabalho teve como objetivos avaliar o efeito de concentrações de carvão ativado e de 6-Benzilaminopurina (BAP) na micropropagação de amoreira-preta cv. Ébano e determinar o melhor substrato na aclimatização da cv. 'Cherokee' oriundas do cultivo *in vitro*.

Material e métodos

O experimento foi instalado e conduzido na Universidade Federal de Lavras, Departamento de Agricultura, Lavras, Estado de Minas Gerais, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e em casa-de-vegetação com aproximadamente 90% de umidade do ar, temperatura controlada e nebulização intermitente.

O primeiro experimento consistiu de segmentos nodais de amoreira-preta, cv. Ébano, com cerca de 2 cm, excisados de plântulas preestabelecidas *in vitro*, após 4 subcultivos. Os explantes foram inoculados em tubo de ensaio contendo 15 mL de meio constituído dos sais minerais do meio MS (Murashige e Skoog, 1962), combinados com 5 concentrações de BAP (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹) e 5 de carvão ativado (0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 g L⁻¹). O pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem e geleificado com 6 g L⁻¹ de ágar. Posteriormente foram transferidos para sala de crescimento a 27±1°C, irradiância de 35 µ mol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas, permanecendo nessas condições por 70 dias.

O delineamento experimental dos dois experimentos foi inteiramente casualizado com 4 repetições constituídas de 3 explantes, perfazendo assim um fatorial 5x5x4. As variáveis analisadas foram número de folhas, número de raízes, comprimento da maior raiz, comprimento da parte aérea, biomassa fresca e seca. Os resultados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o software Sisvar (Ferreira, 2000), sendo utilizado regressão polinomial para concentrações de carvão ativado e de BAP e teste de Tuckey para os substratos, em nível de significância de 0,05% de probabilidade.

O segundo experimento consistiu de plântulas de Amoreira Preta da cv. 'Cherokee' mantidas em condições *in vitro*, em tubos de ensaio, contendo meio de cultura MS acrescido de 1,0 mg L⁻¹ de BAP e mantidas em sala de crescimento com 27±1°C, irradiância de 35 µ mol m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo de 16 horas diárias durante 60 dias.

Para a aclimatização das plântulas, os tubos de ensaio ficaram destampados durante três dias, as plântulas retiradas, lavadas em água corrente para remover resíduos do meio de cultura aderido às raízes e secas em papel de filtro. A seguir, foram transferidas para bandejas plásticas com 24 células de 150 cm³ cada, contendo os substratos vermiculita, casca de arroz carbonizada, Plantmax[®] e uma mistura de vermiculita + casca de arroz carbonizada + Plantmax[®].

Foram utilizadas 4 repetições de 4 plantas cada. Após 100 dias de aclimatização, foram avaliados os parâmetros número de folhas, comprimento das raízes e da parte aérea, peso fresco e seco das raízes e peso fresco e seco da parte aérea.

Resultados e discussão

Verificou-se com a adição de carvão ativado ao meio de cultura, nas concentrações utilizadas, o crescimento da parte aérea e do sistema radicular do segmento nodal inicialmente inoculado. Não houve a formação de calos em nenhum tratamento, diferindo assim dos resultados observados em figueira cv. Roxo de Valinhos micropropagado, no qual se verificou essa formação apenas na presença de 0,5 a 4,0 mg L⁻¹ de BAP (Fráguas, 2003). Para as variáveis comprimento da parte aérea, comprimento da maior raiz, número de folhas e raízes das plântulas, 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 no número de folhas da cultivar Ébano de forma quadrática até certo ponto (Figura 1).

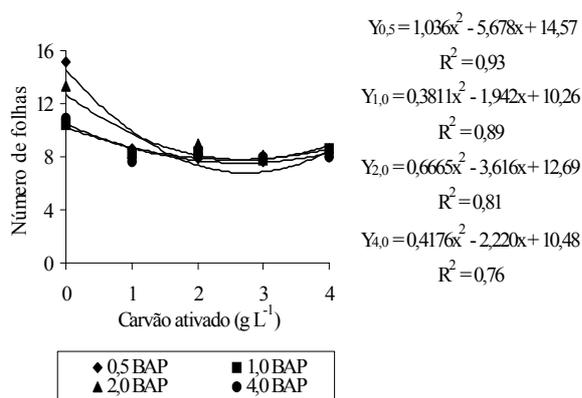


Figura 1. Número de folhas em plântulas de amoreira-preta, cultivar Ébano, cultivadas *in vitro*, em meio de cultura MS, com diferentes concentrações de BAP e de carvão ativado. Ufla, Lavras, Estado de Minas Gerais, Brasil, 2004.

Mesmo na ausência de carvão ativado, foi verificada a presença de folhas, cujo maior número (15,168) se deu com 0,5 mg L⁻¹ de BAP. Isso pode ser atribuído ao fato de o carvão ativado associado ao BAP favorecer a formação de maior número brotos, porém de tamanho reduzido, apresentando menor número de segmentos nodais e de folhas.

Por meio do teste F, verificou-se resultado significativo em relação às concentrações de carvão ativado, exceto na ausência de BAP (Figura 2). O maior comprimento da parte aérea (6,188 cm) foi observado com 4 mg L⁻¹ de BAP associado a 1,0 g L⁻¹ de carvão ativado, porém a diferença observada nos outros níveis de carvão é muito pequena.

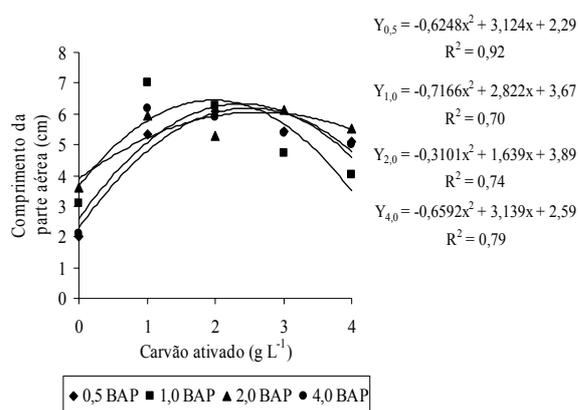


Figura 2. Comprimento da parte aérea de plântulas de amoreira-preta, cultivar Ébano, cultivadas *in vitro*, em meio de cultura MS, com diferentes concentrações de BAP e de carvão ativado. Ufla, Lavras, Estado de Minas Gerais, Brasil, 2004.

De forma semelhante, Mohamed-Yasseen, (2001) verificou aumento no comprimento de plântulas de milho com a adição de carvão ativado ao meio utilizado.

Rápida proliferação de gemas axilares de amoreira-preta cultivares Thornless Boysenberry e Thornless

Youngberry foi obtida em meio MS acrescido de 2,0 mg L⁻¹ de BAP e 0,1 mg L⁻¹ de ANA (Skirvin *et al.*, 1981).

Comprimento da maior raiz 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 mg L⁻¹ de BAP associado a 3 g L⁻¹ de carvão (Figura 3).

Com o aumento das concentrações de carvão, houve decréscimo de forma quadrática tanto para comprimento da maior raiz quanto para seu número. No entanto, para número de raízes, verificou-se maior número (1,925) com a mesma concentração de carvão para comprimento de raiz (3 g L⁻¹), porém com baixa dosagem do regulador (0,5 mg L⁻¹) (Figura 4).

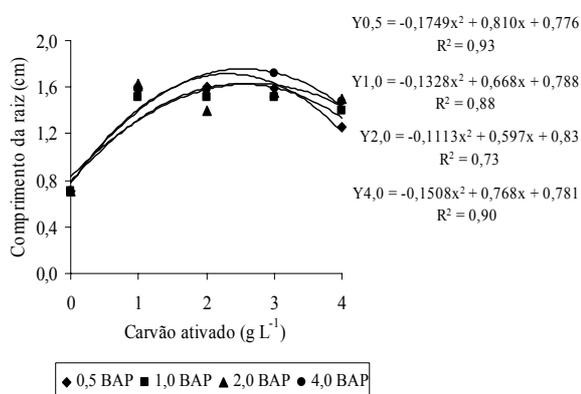


Figura 3. Comprimento da maior raiz de plântulas de amoreira-preta, cultivar Ébano, cultivadas *in vitro*, em meio de cultura MS, com diferentes concentrações de BAP e de carvão ativado. Ufla, Lavras, Estado de Minas Gerais, Brasil, 2004.

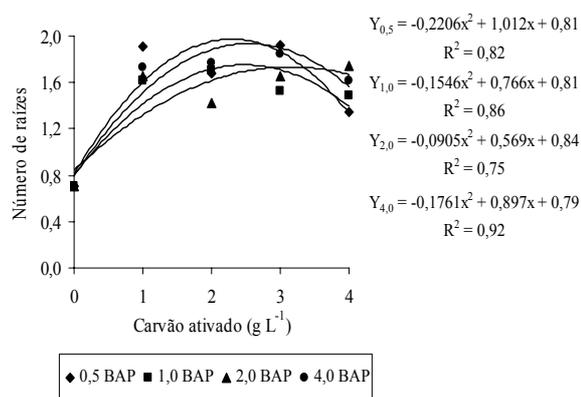


Figura 4. Número de raízes de plântulas de amoreira-preta, cultivar Ébano, cultivadas *in vitro*, em meio de cultura MS, com diferentes concentrações de BAP e de carvão ativado. Ufla, Lavras, Estado de Minas Gerais, Brasil, 2004.

Esses resultados corroboram com Barbosa *et al.* (1992), que verificou um aumento de qualidade e quantidade de raízes formadas de figueira cv. Roxo de Valinhos com a adição de 3 g L⁻¹ de carvão em meio de cultura MS. Entretanto divergem de Fráguas (2003)

quando cita que a adição de 1 g L^{-1} de carvão aumentou o número de raízes em plântulas de figueira da mesma cultivar multiplicadas em meio WPM.

Não se verificou interação significativa entre os fatores BAP e carvão ativado para peso fresco da parte aérea. Incremento nas concentrações de carvão ativado acarretaram em uma diminuição no peso fresco das plântulas de amoreira-preta. O inverso foi observado para concentrações de BAP (Figuras 5A e 5B).

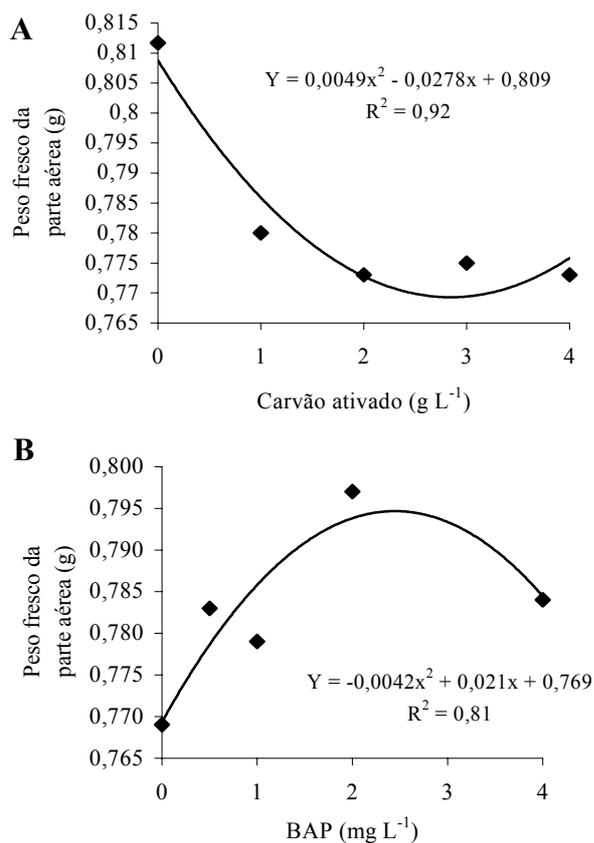


Figura 5A-B. Peso fresco da parte aérea de plântulas de amoreira-preta, cultivar Ébano, cultivadas *in vitro*, em meio de cultura MS, com diferentes concentrações de carvão ativado (A) e BAP (B). Ufla, Lavras, Estado de Minas Gerais, Brasil, 2004.

O peso da matéria fresca da parte aérea atingiu o valor máximo ($0,797 \text{ g}$) com a utilização de 2 mg L^{-1} de BAP e na ausência de carvão ativado ($0,812 \text{ g}$) e, a partir desse ponto, o regulador de crescimento BAP passou a inibir o desenvolvimento das plantas *in vitro* apresentando um decréscimo no peso.

O excesso do regulador de crescimento pode ter dificultado o desenvolvimento da parte aérea, mesmo utilizando-se a maior concentração de carvão ativado, resultando em menor peso da matéria fresca 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 no encurtamento dos entrenós (Leshem *et al.*

1988).

Na análise de variância, verifica-se que apenas a interação entre carvão e 2 mg L^{-1} de BAP foi significativa. Com o incremento das concentrações de carvão ativado, houve diminuição no peso seco da parte aérea de forma quadrática (Figura 6).

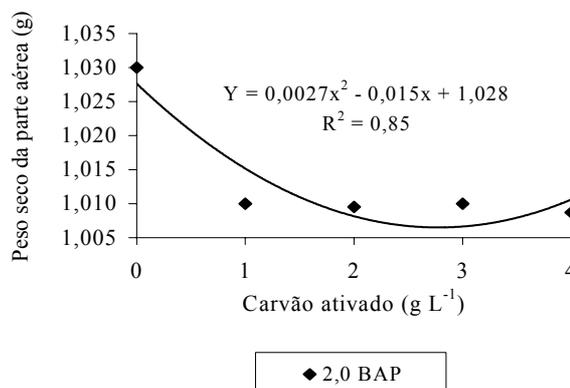


Figura 6. Peso seco da parte aérea de plântulas de amoreira-preta, cultivar Ébano, cultivadas *in vitro*, em meio de cultura MS, com diferentes concentrações de BAP e de carvão ativado. Ufla, Lavras, Estado de Minas Gerais, Brasil, 2004.

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

Maior comprimento, peso fresco e seco da parte aérea, peso fresco e seco das raízes foram obtidos com o substrato Plantmax[®], devido, provavelmente, ao fato de esse substrato possuir nutrientes na quantidade adequada para o período inicial de desenvolvimento das mudas, conferindo uma maior taxa de sobrevivência.

Na variável número de folhas, não houve diferença entre Plantmax[®] e a mistura dos três substratos. O número de folhas é característica importante e possivelmente mudas com maior número de folhas têm maiores índices de pegamento no campo, pois as folhas são as estruturas responsáveis pela captação de energia solar e pela produção de matéria orgânica através da fotossíntese (Sousa, 1994). Para o número de folhas da cultivar Cherokee, todos os substratos estudados tiveram um comportamento semelhante estatisticamente (Tabela 1).

Em estudos com substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de morangueiro, Calvete *et al.* (2000) identificaram as misturas contendo casca de arroz carbonizada e turfa preta, as que proporcionaram maior crescimento da parte aérea e da raiz. Os resultados de Rodrigues e Fior (2000) também mostraram que plântulas micropropagadas de

Persea venosa apresentaram índice de sobrevivência significativamente maior quando aclimatizadas em substrato contendo maiores proporções de casca de arroz carbonizada esterilizada. Neste trabalho, a casca de arroz carbonizada não se mostrou eficiente como substrato na aclimatização de amoreira-preta cv. Cherokee.

Tabela 1. Diferentes substratos na aclimatização de amoreira-preta Cherokee, Ufla, Lavras, Estado de Minas Gerais, 2004.

Substrato	NF	CPA (cm)	CR (cm)	PFPA (g)	PS PA (g)	PFR (g)	PSR (g)
Plantmax [®]	8,16 a	7,51 a	46,80 a	0,65 a	0,21 a	2,01 a	0,48 a
Mistura ¹	7,57 a b	6,28 b	44,20 a	0,39 b	0,10 b	1,10 b	0,27 b
Vermiculita	6,58 b c	5,69 b	40,63 a b	0,29 c	0,08 b	0,73 c	0,17 c
CAC ²	6,31 c	4,39 c	33,38 b	0,17 d	0,05 c	0,46 c	0,10 d

¹Plantmax[®] + Vermiculita + Casca de arroz carbonizada. ²Casca de arroz carbonizada. NF = número de folhas; CPA = comprimento da parte aérea; CR = comprimento de raízes; PFPA = peso fresco da parte aérea; PS PA = peso seco da parte aérea; PFR = peso fresco de raízes; PSR = peso seco de raízes.

Para a variável comprimento da parte aérea, o substrato que mais se destacou foi o Plantmax[®]. O substrato Plantmax[®], a mistura (Plantmax[®] + vermiculita + casca de arroz carbonizada) e a vermiculita não se diferenciaram entre si para comprimento das raízes. Na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola, Moreira (2001) concluiu que, para as variáveis, altura da planta e número de folhas, o Plantmax[®] foi o segundo melhor substrato, acrescido ainda de 40% de terra + 30% de esterco bovino.

Plantmax[®] também se destacou nas variáveis peso fresco e seco da parte aérea e peso fresco, seco e comprimento das raízes (Figura 7), concordando com Moreira (2001), que obteve melhores resultados com o mesmo substrato para mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola e Fráguas (2003) ao estudar a cv. de figueira Roxo de Valinhos.

Devido às boas características químicas e físicas do Plantmax[®], as plantas se desenvolveram adequadamente, resultando em maior matéria fresca e seca da parte aérea. Segundo Hoffmann (1999), o Plantmax[®] apresenta características que favorecem o crescimento das mudas após emissão das raízes adventícias: as propriedades físicas (porosidade, textura, drenagem e baixa compactação) e químicas (presença de nutrientes e pH adequado ao desenvolvimento da muda).

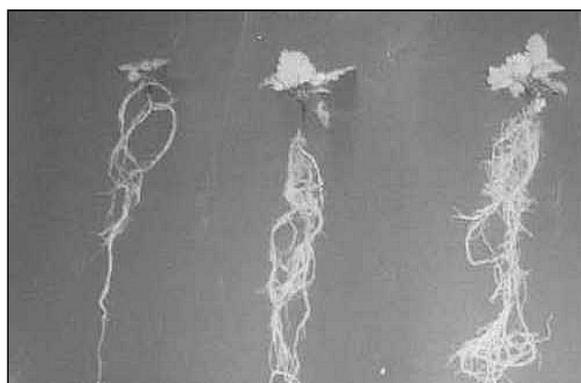


Figura 7. Comprimento das raízes utilizando-se substrato Plantmax[®] na aclimatização de amoreira-preta cv. Cherokee, Ufla, Lavras, Estado de Minas Gerais, 2004.

Júnior *et al.* (2002) obtiveram melhores substratos para a aclimatização de plântulas micropropagadas de amoreira-preta cv. Tupy com as misturas 0, 20, 40% do substrato vermiculita + solo. Couto *et al.* (2002), estudando a mesma cultivar, concluíram que o pó de serragem nas proporções 0, 20, 40, 60, 80 e 100% é inadequado para utilização como substrato na aclimatização de plantas micropropagadas.

Para a aclimatização de mudas micropropagadas de porta-enxerto de macieira ‘Marubakaido’ e ‘M-26’, Hoffmann (1999) identificou, como melhor substrato, o Plantmax[®], seguido da mistura de solo + areia. Hutchinson (1984), trabalhando com macieira ‘Northern Spy’, testou dois substratos compostos para aclimatização (vermiculita + perlita 1:1 v/v e turfa + areia grossa 1:3 v/v), obtendo mais de 90% de sobrevivência com eles.

Fráguas (2003) verificou que o maior percentual de sobrevivência (95%) de plântulas de figueira cv. Roxo-de-Valinhos ocorreu com 45 e 90 dias de aclimatização com a utilização do Plantmax[®], sendo que a mistura Plantmax[®] + vermiculita também proporcionou bons resultados.

No presente trabalho, durante a aclimatização, as mudas de amoreira-preta micropropagadas obtiveram uma sobrevivência de 92%, sendo que a maior sobrevivência foi em Plantmax[®]. Em plantas de *Rubus arcticus*, Shalupaev e Yatsyna (2002) obtiveram uma sobrevivência maior que 90% em substrato de perlita + turfa (1:1). Costa e Lovato (2000), utilizando a mistura terra roxa estruturada + vermiculita + composto termofílico (1:1:1, v/v), comparados com o substrato comercial Plantmax[®], obtiveram 100% de sobrevivência na aclimatização de plântulas de videira.

Além do substrato, outro fator que pode ter contribuído para a elevada taxa de sobrevivência foi a pré-aclimatização, realizada através da abertura dos tubos de ensaio por três dias antes da aclimatização. Apesar de pouco, o tempo foi suficiente para que as

plântulas não murchassem durante e após o transplantio.

Conclusão

Maior número de folhas e de raízes foram obtidos com 0,5 mg L⁻¹ de BAP.

Na presença de 3 g L⁻¹ de carvão ativado, o número e o comprimento de raízes apresentaram melhor desenvolvimento, sem a formação de calos.

Maior peso da matéria fresca foi obtido na ausência de carvão ativado.

A aclimatização pode ser realizada com sucesso, utilizando-se o substrato comercial Plantmax[®] seguido da mistura de Plantmax[®] + vermiculita + casca de arroz carbonizada e vermiculita, resultando maior acúmulo de peso da matéria fresca e maior desenvolvimento das raízes das plantas.

Referências

- ANTUNES, L.E.C. *Aspectos fenológicos, propagação e conservação pós-colheita de frutas de amoreira-preta (Rubus spp) no sul de Minas Gerais*. 1999. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.
- BARBOSA, W. *et al.* Produção de mudas da figueira 'Roxo de Valinhos' através da cultura *in vitro*. *O Agrônomo*, Campinas, v. 44, n. 1, 2, 3, p. 6-18, jan./dez. 1992.
- BEYL, C.A. Getting started with tissue culture - media preparation, sterile technique, and laboratory equipment. In: TRIGIANO, R.N.; GRAY, D.J. (Ed.). *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. London: CRC Press, 2000, p. 21-38.
- BHOJWANI, S.S. *et al.* *In vitro* propagation of *Pyrus pyrifolia*. *Sci. Hortic.*, Amsterdam, v. 23, p. 247-254, 1984.
- CALVETE, E.O. *et al.* Efeito do substrato na aclimatização *ex vitro* de morangueiro cv. Campinas, *Fragaria x ananassa* Duch. In: KÄMPF, A.N.; FERMINO, M.H. (Ed.). *Substrato para plantas - a base da produção vegetal em recipientes*. Porto Alegre: Genesis, 2000, p. 257-264.
- COSTA, M.D.; LOVATO, P.E. Aclimatização de um porta-enxerto micropropagado de videira em dois substratos com e sem inoculação micorrízica. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE SUBSTRATOS PARA PLANTAS, 2., 2000, Florianópolis. *Anais...* Florianópolis, 2000, p. 66-67.
- COUTO, M. *et al.* Avaliação do pó-de-serra como substrato para a aclimatização da amoreira-preta (*Rubus spp*) cultivar Tupy em casa de vegetação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém, 2002. 1 CD-ROM.
- DONNELLY, D.J.; *et al.* *In vitro* culture of three *Rubus* species. *Acta Hortic.*, Wageningen, n. 112, p. 69-75, 1980.
- FERREIRA, D.F. 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, 2000. p. 225-258.
- FRÁGUAS, C.B. *Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira 'Roxo-de-Valinhos' em diferentes ambientes*. 2003. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- HOFFMANN, A. *Enraizamento e aclimatização de mudas micropropagadas dos porta-enxertos de macieira 'Marubakaido' e 'M-26'*. 1999. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.
- HUTCHINSON, J.F. Factors affecting shoot proliferation and root initiation in organ cultures of the apple 'Northern Spy'. *Sci. Hortic.*, Amsterdam, v. 22, n. 4, p. 347-358, 1984.
- JENNINGS, D. L.; McNICOL, R. J. *Rubus* breeding - recent progress and problems. *Plant Breeding Abstracts*, v. 61, p. 753-758, 1991.
- JÚNIOR, A. W. *et al.* Avaliação de diferentes níveis de vermiculita na aclimatização de plântulas micropropagadas de amoreira-preta (*Rubus spp*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17., 2002, Belém, 2002. 1 CD-ROM.
- KADOTA, M.; *et al.* Double-phase *in vitro* culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. *Sci. Hortic.*, Amsterdam, v. 89, n. 3, p. 207-215, July, 2001.
- LESHEN, B. *et al.* The effect of cytokinins on vitrification in melon and carnation. *Ann. Bot.*, London, v. 62, n. 3, p. 271-276, Sept. 1988.
- MOHAMED-YASSEEN, Y. Influence of agar and activated charcoal on uptake of gibberellin and plant morphogenesis *in vitro*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, Largo, v. 37, n. 2, p. 204-205, Mar./Apr. 2001.
- MOREIRA, M.A. Produção e aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro *Ananas comosus* (L.) Merrill cv. Pérola. 2001. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- PAN, M.J.; STADEN, J.V. The use of charcoal *in vitro* culture - A review. *Plant Growth Regul.*, Dordrecht, v. 26, n. 3, p. 155-163, 1998.
- RODRIGUES, L.R.; FIOR, C.S. Substrato para aclimatização *ex vitro* de canela-sebo, *Persea venosa* Nees et Martius ex Nees. In: KÄMPF, A.; FERMINO, M.H. (Ed.). *Substrato para plantas - a base da produção vegetal em recipientes*. Porto Alegre: Genesis, 2000.
- ROY, G.M. Agriculture. In: ROY, G.M. (Ed.). *Activated carbon applications in the food and pharmaceutical industries*. Lancaster: Technomic Publishing Company, 1995, cap. 3, p. 19-42.
- SHALUPAEV, M.P.; YATSYNA, A.A. Vestsi Natsyyanal'nai Akademii Navuk Belarusi Seryya Biyalagichnykh Navuk, Russian, n. 3, p.109-111, 2002.
- SKIRVIN, R.M. *et al.* *In vitro* propagation of Thornless trailing blackberries. *Hortscience*, Alexandria, v. 16, n. 3, p. 310-312, 1981.
- SOUSA, H.U. de. *Efeito da composição e doses de superfosfato simples no crescimento e nutrição de mudas de bananeira (Musa sp) cv. Mysore obtidas por cultura de meristemas*. 1994. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1994.
- TOLEDO, A.R.M. de. *Efeitos de substratos na formação de*

mudas de laranjeira (Citrus sinensis (L.) Osbeck cv. Pera Rio) em vaso. 1992. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1992.

Received on June 20, 2005.

Accepted on December 16, 2005.