

Cultivo *in vitro* do cultivar italiano de morangueiro Pircinque

In vitro cultivation of the Italian strawberry cultivar Pircinque

Samila Silva **CAMARGO**^{1,2}; Aline **MENEGUZZI**¹ & Leo **RUFATO**¹

RESUMO

Estudos sobre a multiplicação de cultivares de morangueiro recentemente introduzidos no Brasil são necessários para verificar o potencial de produção das mudas. Verificaram-se dois meios de cultura (KNOP e MS) e componentes, no estabelecimento e multiplicação *in vitro* de Pircinque, a fim de otimizar o protocolo de micropropagação para o cultivar. Pesquisaram-se concentrações de PPM[®] durante o estabelecimento e na multiplicação, níveis de sacarose, ágar, carvão ativado, Fe EDDHa, BAP e GA₃. Além disso, foi avaliada a influência da “dupla fase”, com combinações do meio de cultivo, carvão ativado e BAP. Concluiu-se que, no estabelecimento, KNOP + 2 mL L⁻¹ PPM possibilita maior sobrevivência dos explantes, enquanto o meio de cultura MS favorece a multiplicação deles. A adição dos seguintes componentes é indicada para a maior eficiência da técnica: 30 g L⁻¹ sacarose; 6 g L⁻¹ ágar; 4 g L⁻¹ carvão ativado; 0,1 g L⁻¹ Fe EDDHA; 1 mg L⁻¹ BAP; e 0,250 mg L⁻¹ GA₃. Após cultivo em meio MS sólido, indica-se o uso da técnica de “dupla fase”, com adição de MS líquido com a combinação de 0,5 mg L⁻¹ de BAP e de 4 g L⁻¹ de carvão ativado.

Palavras-chave: *Fragaria x ananassa*; meio de cultura; micropropagação.

ABSTRACT

Studies on the multiplication of strawberry cultivars recently introduced in Brazil are necessary to verify the seedlings production potential. Two culture media (KNOP and MS) and components were verified in the establishment and *in vitro* multiplication of Pircinque, in order to optimize the micropropagation protocol for the cultivar. Concentrations of PPM[®] during *in vitro* establishment and in multiplication, levels of sucrose, agar, activated carbon, Fe EDDHa, BAP and GA₃ were studied. In addition, the influence of the “double-phase” was evaluated, with combinations of culture medium, activated carbon and BAP. It was concluded that in the establishment, KNOP + 2 mL L⁻¹ PPM allows greater survival of the explants, while the medium of MS culture favors the multiplication of the explants. Addition of the following components is indicated for the greater efficiency technique: 30 g L⁻¹ sucrose; 6 g L⁻¹ agar; 4 g L⁻¹ activated carbon; 0.1 g L⁻¹ EDDHAFe; 1 mg L⁻¹ BAP and 0.250 mg L⁻¹ GA₃. After culturing in solid MS medium, the use of the “double-phase” technique with the addition of liquid MS with the combination of 0.5 mg L⁻¹ of BAP and 4 g L⁻¹ of activated carbon is indicated.

Keywords: culture medium; *Fragaria x ananassa*; micropropagation.

Recebido em: 7 nov. 2018
Aceito em: 4 mar. 2020

INTRODUÇÃO

Os métodos mais empregados para a produção de mudas de morangueiro são o sistema de estolões e o de micropropagação. A técnica por estolões é muito utilizada por viveiristas, por conta

¹ Universidade do Estado de Santa Catarina (Udesc), Avenida Luís de Camões, n.º 2.090, Conta Dinheiro – CEP 88520-000, Lages, SC, Brasil.

² Autor para correspondência: samilasc@yahoo.com.br.

da facilidade de execução, entretanto Biswas *et al.* (2010) enfatizam as limitações de tal método, por causa da presença de patógenos nos diferentes ciclos de cultivo. Já a micropropagação se mostra uma alternativa viável para a produção massal de plantas, sendo o morangueiro uma das principais espécies trabalhadas com essa técnica no Brasil e no exterior (OLIVEIRA & SCIVITTARO, 2009).

A composição do meio de cultura tem importante função nas respostas de crescimento das células, já que explantes cultivados *in vitro* têm exigências nutricionais específicas e requerem meios nutritivos compostos por minerais, vitaminas e fontes de energia (BRAGA *et al.*, 2009). No Brasil, o protocolo adotado pelos laboratórios para o morangueiro é o uso do meio de cultivo MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), indicado por Dutra *et al.* (2012), entretanto, para cultivares oriundos da Itália, o crescimento dos explantes ocorre em KNOP (KNOP, 1865). Nesse sentido, estudos de protocolos quanto à composição mineral básica do meio de cultura e à concentração de reguladores de crescimento são necessários, já que influenciam o crescimento dos explantes *in vitro*.

O cultivar de morangueiro Pircinque, já introduzido no Brasil, está sendo estudado nas condições do país. Fagherazzi *et al.* (2017) compararam-no com outros cinco cultivares no Planalto Sul Catarinense e concluíram que o morango italiano Pircinque é um cultivar promissor para os produtores brasileiros da espécie.

Tendo em vista tais aspectos e o fato de este ser o primeiro relato no Brasil, incluindo múltiplos fatores para o estabelecimento e a multiplicação do cultivar italiano de morangueiro Pircinque, o objetivo do presente trabalho foi verificar distintos meios de cultura no cultivo *in vitro*, aliados a outros componentes, a fim de otimizar o seu protocolo de micropropagação.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos compreenderam o estabelecimento e a multiplicação *in vitro* do morangueiro italiano Pircinque e foram conduzidos no Laboratório de Micropropagação Vegetal (Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina – CAV-Udesc), onde os frascos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e intensidade luminosa de $27\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

No estabelecimento, realizaram-se três experimentos: comparação de meios de cultivo KNOP e MS, uso do biocida PPM[®] (Plant Preservative Mixture[®] - 5-cloro-2-metil-3-2H-isotiazolona e 2-metil-3-2H-isotiazolona) e uso de cloreto de ferro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) componente do protocolo italiano com KNOP.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com seis repetições de 20 tubos de ensaio. A assepsia dos estolões foi feita em câmara de fluxo laminar, com imersão em álcool 70% (um minuto), seguido de hipoclorito de sódio (2,5%) e duas gotas de Tween 20[®] (15 minutos). Realizou-se tríplex lavagem em água destilada e autoclavada, e os meristemas foram extraídos, inoculados ao meio e permaneceram sob a ausência de luz por sete dias.

No primeiro experimento, avaliou-se o meio de cultura (KNOP e MS). Além dos sais e vitaminas, adicionaram-se $0,1\ \text{mg L}^{-1}$ BAP, $0,01\ \text{mg L}^{-1}$ AIB, $0,1\ \text{mg L}^{-1}$ GA_3 , $0,1\ \text{g L}^{-1}$ mio-inositol, $30\ \text{g L}^{-1}$ sacarose e $5,0\ \text{g L}^{-1}$ ágar, com pH ajustado em $5,8\pm 0,1$.

Estudou-se, em um segundo momento, a influência do biocida PPM[®] (0 e $2\ \text{mL L}^{-1}$). Em função dos melhores resultados apresentados, como sequência do estudo anterior, o meio de cultivo utilizado foi o KNOP.

No terceiro experimento, os tratamentos diferiram quanto à presença de cloreto de ferro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - $125\ \text{mg L}^{-1}$) no meio KNOP.

As variáveis analisadas foram: número de explantes com contaminações fúngica e bacteriana, oxidação e sobreviventes.

Na multiplicação dos explantes, realizaram-se nove experimentos comparando os meios de cultura KNOP e MS. Em ambos, além dos sais e das vitaminas característicos, adicionaram-se $0,1\ \text{g L}^{-1}$ mio-inositol, $30\ \text{g L}^{-1}$ sacarose e $6,0\ \text{g L}^{-1}$ ágar.

Efetuar-se-ão diferentes estudos: 1 – concentrações de sacarose (0; 15; 30 e $45\ \text{g L}^{-1}$); 2 – combinações de sacarose e/ou sorbitol: $30\ \text{g L}^{-1}$ sacarose; $20\ \text{g L}^{-1}$ sacarose + $10\ \text{g L}^{-1}$ sorbitol;

10 g L⁻¹ sacarose + 20 g L⁻¹ sorbitol e 30 g L⁻¹ sorbitol; 3 – concentrações de ágar (5; 6 e 7 g L⁻¹); 4 – concentrações de carvão ativado (0; 2 e 4 g L⁻¹); 5 – fonte de ferro: Fe EDDHA e Fe EDTA (0,1 g L⁻¹); 6 – ausência e presença de folhas (0; 2 e 4 folhas); 7 – concentrações de BAP: 0; 1; 2 e 3 mg L⁻¹; 8 – concentrações de ácido giberélico (GA₃ – 0; 0,125; 0,250 e 0,375 mg L⁻¹); 9 – combinações de meio de cultivo, carvão ativado e citocinina BAP, a partir do sistema dupla fase. Neste último experimento, os explantes foram cultivados durante 10 dias em meio de cultivo MS sólido e, após esse período, foi adicionado meio líquido, com 11 combinações: sem adição de meio líquido; MS sem regulador de crescimento; MS + 0,5 mg⁻¹ BAP; MS + 0,5 mg BAP + 4 g L⁻¹ carvão ativado; MS + 1 mg⁻¹ BAP; MS + 1 mg BAP + 4 g L⁻¹ carvão ativado; KNOP sem regulador de crescimento; KNOP + 0,5 mg L⁻¹ BAP; KNOP + 0,5 mg L⁻¹ BAP + 4 g L⁻¹ carvão ativado; KNOP + 1 mg L⁻¹ BAP; e KNOP + 1 mg L⁻¹ BAP + 4 g L⁻¹ carvão ativado.

As variáveis analisadas após 45 dias foram: comprimento do explante, brotações e raízes, número de brotações, folhas e raízes e intensidade de calos (escala – 0: sem calos; 1: < 1 cm; 2: 1-1,5 cm; e 3: > 1,5 cm). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com seis repetições de seis explantes cada, com 1,5±0,2 cm e quatro folhas iniciais.

Os dados qualitativos foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro; para os fatores quantitativos, realizou-se análise de regressão polinomial. Os valores provenientes de contagem foram transformados em $[\sqrt{(x+0,5)}]$, os de porcentagem em $[\arcseno\sqrt{(x/100)}]$ e a escala de intensidade de calos em $\log(x+1)$, em que x é a média obtida de cada variável.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verifica-se na tabela 1 que, para o estabelecimento de meristemas de Pircinque, os meios de cultura, a presença do biocida PPM® e do cloreto de ferro influenciaram a sobrevivência, a oxidação e as contaminações fúngica e bacteriana dos explantes.

Tabela 1 – Sobrevivência, oxidação e contaminações fúngica e bacteriana (%) de meristemas de Pircinque nos meios de cultivo KNOP e MS, presença de PPM® e cloreto de ferro. Legenda: ns – não significativo.

Fatores	Sobrevivência		Oxidação Fungo	Contaminação				
				Fungo		Bactéria		
Meio KNOP	50,0	a*	32,0	B	12,0	ns	16,0	ns
Meio MS	26,0	b	70,0	A	10,0		10,0	
0 mL L ⁻¹ PPM®	18,4	b	11,0	ns	11,0	ns	24,0	a
2 mL L ⁻¹ PPM®	26,0	a	10,0		11,0		19,0	b
Sem FeCl ₃ .H ₂ O	44,0	a	19,6	B	16,0	ns	19,0	ns
Com FeCl ₃ .H ₂ O	26,3	b	28,6	A	15,0		18,2	

* Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Tanto para a variável sobrevivência quanto para a oxidação dos explantes, o melhor meio de cultivo para o estabelecimento dos meristemas foi o KNOP. A maior oxidação dos explantes e, conseqüentemente, a menor sobrevivência deles podem ser justificadas pela concentração de sais presentes em ambos os meios de cultivo, em que o MS se caracteriza por altas concentrações iônicas, quando comparado ao KNOP.

Em relação ao uso do PPM®, ele propiciou maior sobrevivência dos meristemas estabelecidos em KNOP e menor ocorrência de contaminações bacterianas. Em contrapartida, para as variáveis oxidação e presença de fungos, não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos. A menor

taxa contaminante e, por conseguinte, a maior sobrevivência dos explantes são decorrentes dos ingredientes ativos presentes no composto PPM®. Diferentemente, Lima (2012) verificou, para *Protium heptaphyllum*, que o PPM® a 1 e 2% não foi eficaz para o controle de microrganismos, pois a taxa de contaminação ficou em torno de 85%.

Constatou-se que a presença do nutriente $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ proporcionou maior ocorrência de explantes oxidados e menor índice de sobrevivência, sem influenciar o desenvolvimento de agentes contaminantes, bactéria e fungo. De acordo com Assis *et al.* (2018), os micronutrientes ferro, cobre e zinco influenciam na oxidação de explantes, e os dois primeiros são constituintes de enzimas que são liberadas quando os tecidos são lesados.

Na figura 1, verificam-se a análise de regressão polinomial, o comprimento do explante, o comprimento médio de brotações, o número de folhas e a intensidade de calos, em função dos diferentes meios de cultura e concentrações de sacarose neles.

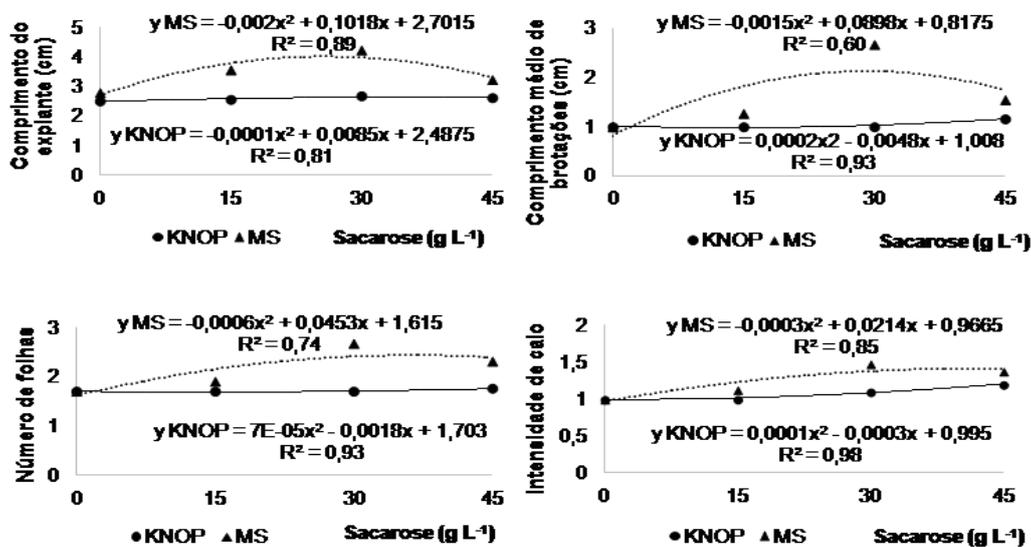


Figura 1 – Comprimento do explante e de brotações (cm), número de folhas e intensidade de calos de Pircinque, em função do meio de cultivo e concentração de sacarose.

Para as variáveis da figura 1, observou-se um comportamento de curva de regressão similar em que o MS com 30 g L⁻¹ de sacarose foi favorável para o crescimento do explante e de brotações e gerou maior intensidade de calos na base dos explantes, entretanto não atuou negativamente no desenvolvimento deles. A melhor concentração (30 g L⁻¹) do MS reafirma o indicado por Dutra *et al.* (2012) no protocolo de micropropagação de morangueiro utilizado pela Embrapa, diferentemente da metodologia adotada na Itália com KNOP, em que se recomenda a adição de 25 g L⁻¹ da fonte de açúcar.

Na figura 2 são demonstradas as regressões para as variáveis do sistema radicular dos explantes de Pircinque: comprimento médio de raízes, comprimento da maior raiz e número de raízes. Assim como na parte aérea, os melhores resultados obtidos foram em meio de cultivo MS, com o uso de 30 g L⁻¹ de sacarose, sendo o MS, mais uma vez, superior ao meio KNOP.

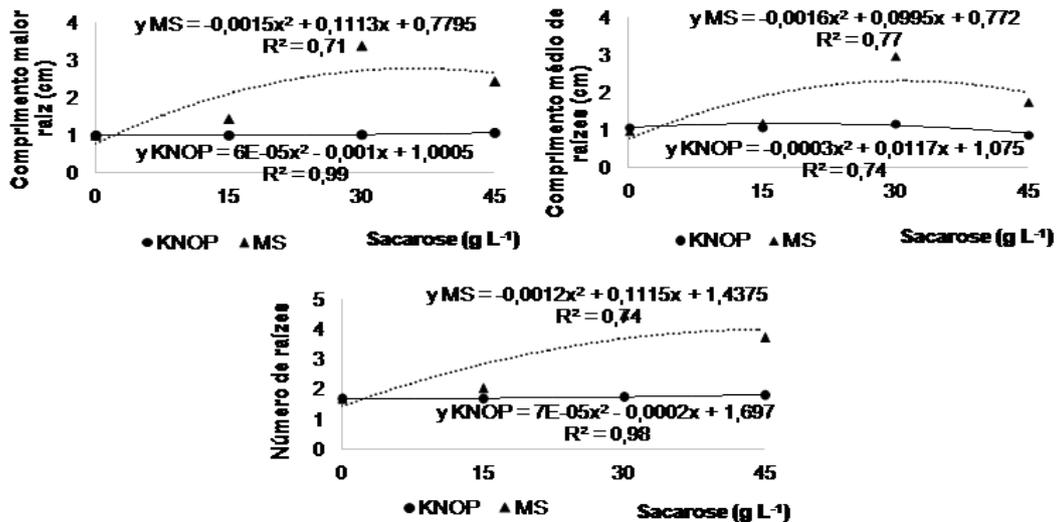


Figura 2 – Comprimento da maior raiz, comprimento médio de raízes (cm) e número de raízes de morangueiro Pircinque *in vitro*, em função do meio de cultivo e concentração de sacarose.

Calvete *et al.* (2009) concluíram que a sacarose influenciou também a aclimatização de explantes de morangueiro e, diferentemente do obtido no presente estudo, indicaram que a concentração de 45 g L⁻¹ foi mais eficiente no desenvolvimento do sistema radicular. Na figura 2, constata-se o contrário, pois em concentração maior que 30 g L⁻¹ houve uma tendência de queda da curva, acarretando menor desenvolvimento radicular, tanto em comprimento quanto em número de raízes. Nesse sentido, Besson *et al.* (2010) afirmam que a concentração interfere na formação das raízes e no crescimento da planta, uma vez que o aumento de açúcares ocasiona a diminuição da absorção de sais e água.

A utilização dos diferentes meios de cultivo combinados com a adição de sacarose e/ou sorbitol resultou em uma interação estatística para esses fatores para todas as variáveis estudadas (figuras 3 e 4). Em relação ao uso de diferentes fontes de carboidrato, Flores *et al.* (2013) também verificaram que concentrações distintas de sacarose e sorbitol influenciaram significativamente o crescimento das plantas *in vitro*.

Para os dados referentes à parte aérea, verifica-se, na figura 3, que tanto para comprimento do explante quanto para comprimento e número médio de brotações o meio MS se destacou em relação ao protocolo italiano (KNOP), sendo influenciado, ainda, pela combinação entre sacarose e/ou sorbitol. O comprimento principal dos explantes foi superior em MS + 30 g sacarose, porém não diferindo de MS + 20 g sacarose + 10 g sorbitol. Mais uma vez, para o comprimento médio e o número de brotações, a adição isolada de sacarose (30 g) possibilitou resultados mais satisfatórios, contudo sem diferir significativamente dos tratamentos KNOP + 10 g sacarose + 20 g sorbitol ou somente de 30 g de sorbitol.

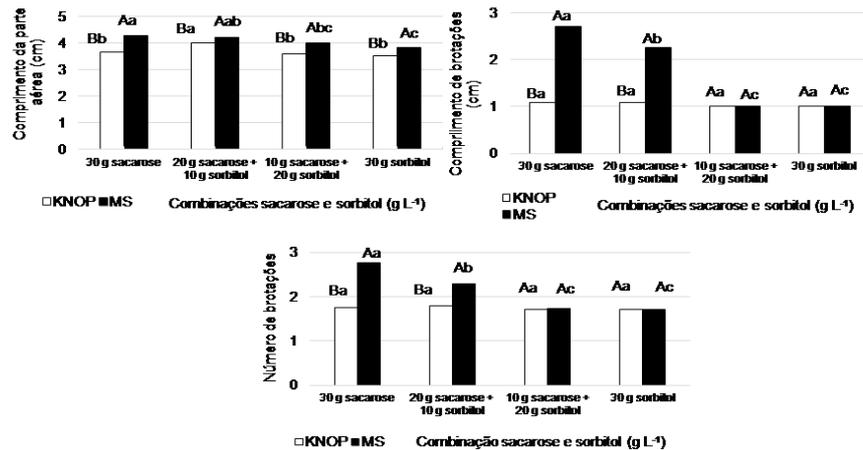


Figura 3 – Comprimento do explante e de brotações (cm) e número de brotações de morangueiro Pircinque *in vitro*, em função do meio de cultivo e combinação de sacarose e sorbitol. *Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro; letras maiúsculas comparam meios de cultura, e minúsculas, combinações entre sacarose e sorbitol.

No mesmo sentido, Flores *et al.* (2013) concluíram que os explantes cultivados em meio contendo somente sorbitol como fonte de carboidrato apresentaram menores taxas de crescimento. Isso ocorre em virtude da redução do potencial osmótico e, conseqüentemente, da dificuldade de absorção de água e de nutrientes por parte dos explantes. Alam *et al.* (2010) explicam que, por causa das condições herméticas dos frascos, há impedimento de trocas gasosas entre o ambiente interno e o externo, o que não favorece a atividade fotossintética das plantas *in vitro*, e, nesse caso, faz-se necessário adicionar ao meio uma fonte de carbono, sendo a sacarose o açúcar mais utilizado na micropropagação.

Da mesma forma, o sistema radicular dos explantes de Pircinque, em condições *in vitro*, foi influenciado pela interação dos fatores de meio de cultivo e combinações de sacarose e sorbitol (figura 4). O número de raízes e o comprimento da maior raiz (cm) foram superiores nos tratamentos MS (30 g sacarose) e KNOP (20 g sacarose + 10 g sorbitol; 10 g sacarose + 20 g sorbitol; ou somente 30 g sorbitol). Já o comprimento médio de raízes foi superior em meio de cultivo MS com a presença apenas de sacarose, porém sem diferir estatisticamente do meio de cultura KNOP, com o sorbitol isoladamente, ou de 10 g de sacarose + 20 g de sorbitol. Em consequência disso, a intensidade de calos foi maior nesse tratamento, em que a presença e o tamanho dos calos foram favorecidos em detrimento do maior crescimento radicular e, também, do desenvolvimento da parte aérea.

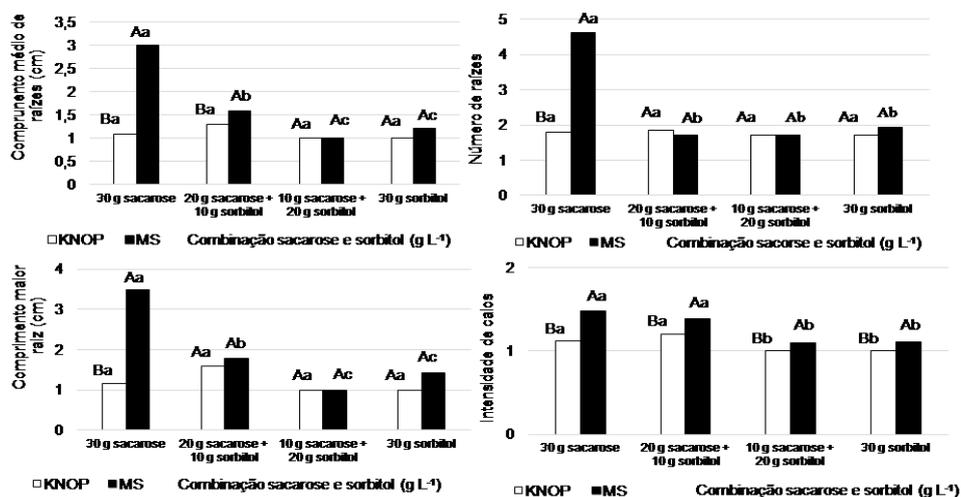


Figura 4 – Comprimento (cm) e número de raízes e intensidade de calos em morangueiro Pircinque, em função do meio de cultivo e combinação de sacarose e sorbitol. *Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro; letras maiúsculas comparam meios de cultura, e minúsculas, combinações entre sacarose e sorbitol.

As duas únicas variáveis em que não ocorreu interação entre os fatores foram o comprimento da maior raiz e o comprimento médio de raízes (tabela 2), e KNOP e MS não acarretaram diferenças significativas para ambas as variáveis. Entretanto a maior concentração de ágar (7 g L⁻¹) propiciou explantes com raízes de menor comprimento, diferentemente das concentrações de 5 e 6 g L⁻¹. Verifica-se, com isso, que o ágar pode ter sido um limitante na absorção dos nutrientes, dificultada pelo contato entre explante e meio de cultura, o que reduziu, conseqüentemente, o crescimento médio de raízes.

Tabela 2 – Comprimento de raízes (cm) de explantes de Pircinque em diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e concentrações do agente solidificante (5, 6 e 7 g L⁻¹). Legenda: ns – não significativo; CV – coeficiente de variação.

Fatores	Comprimento da maior raiz		Comprimento médio das raízes	
	Valor	Signif.	Valor	Signif.
Meio KNOP	2,22	ns	1,69	ns
Meio MS	2,39		1,83	
5 g L ⁻¹ ágar	2,17	ab*	1,73	ab
6 g L ⁻¹ ágar	2,77	a	2,00	a
7 g L ⁻¹ ágar	1,99	b	1,56	b
Média	2,30		1,76	
CV (%)	19,16		32,36	

* Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De acordo com a tabela 3, nota-se que houve interação entre os fatores para todas as variáveis relacionadas ao crescimento da parte aérea dos explantes.

Tabela 3 – Comprimento do explante e de brotações (cm) e número de brotações e folhas de Pircinque em meios de cultivo KNOP e MS e concentrações de ágar (5, 6 e 7 g L⁻¹). Legenda: CV – coeficiente de variação.

Ágar (g L ⁻¹)	Comprimento do explante				Comprimento das brotações				Número de brotações				Número de folhas			
	KNOP		MS		KNOP		MS		KNOP		MS		KNOP	MS		
5	3,54	Aa*	3,62	Ab	1,25	Aa	1,25	Ab	1,83	Aa	1,84	Ab	3,93	Bab	4,46	Ac
6	3,62	Ba	4,21	Aa	1,17	Ba	2,25	Aa	1,79	Ba	2,31	Aa	4,04	Ba	5,55	Aa
7	3,54	Ba	4,04	Aa	1,08	Ba	2,08	Aa	1,75	Ba	2,31	Aa	3,74	Bb	5,16	Ab
Média	3,76				1,51				1,97				4,48			
CV (%)	5,70				16,03				9,80				6,69			

*Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro.

Para as variáveis comprimento do explante e das brotações e número de brotações, o meio de cultura KNOP com 5 g L⁻¹ de ágar e o MS com 6 ou 7 g L⁻¹ de ágar favoreceram o crescimento da parte aérea das plantas de morangueiro cultivar Pircinque *in vitro*. Já para a avaliação do número de folhas, o tratamento mais satisfatório foi com o meio MS com 6 g L⁻¹ de ágar, gerando uma média de 5,55 folhas por explante.

O mesmo ocorreu para o número de raízes e para a intensidade de calos nos explantes, como demonstrado na tabela 4, em que o KNOP com 5 g L⁻¹ de ágar e o MS com 6 ou 7 g L⁻¹ de ágar favoreceram a emissão de um maior número de raízes e, em consequência disso, esses mesmos tratamentos acarretaram uma elevada calogênese na base dos explantes.

Tabela 4 – Número de raízes e intensidade de calos *in vitro* de morangueiro Pircinque em diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e concentrações de ágar (5, 6 e 7 g L⁻¹). Legenda: CV – coeficiente de variação.

Ágar (g L ⁻¹)	Número de raízes				Intensidade de calo			
	KNOP		MS		KNOP		MS	
5	2,22	Aa*	2,56	Ab	1,36	Aa	1,33	Ab
6	2,66	Ba	3,43	Aa	1,26	Bab	1,39	Aab
7	2,35	Ba	3,79	Aa	1,20	Bb	1,48	Aa
Média	2,83				1,22			
CV (%)	19,27				8,84			

* Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro.

Em geral, para as diferentes variáveis, a concentração de ágar mais adequada foi a de 6 g L⁻¹, sendo esta a mais usualmente utilizada no meio MS para inúmeras culturas, podendo variar de 5 a 8 g L⁻¹ para um crescimento adequado (REZENDE *et al.*, 2008). Os referidos autores destacam que o aumento da concentração de ágar promove a elevação do potencial osmótico do meio de cultivo, o que possivelmente dificulta a difusão dos nutrientes para os explantes e, conseqüentemente, reduz seu desenvolvimento.

Verifica-se que não houve interação entre os fatores na multiplicação *in vitro* de Pircinque; dessa forma, ambos foram analisados isoladamente (tabela 5). Para os meios de cultura, não foram observadas diferenças para as variáveis comprimento médio de raízes e intensidade de calos, e esta última não foi influenciada, também, pela utilização de carvão ativado. Similarmente, Villa *et al.* (2014) observaram que a adição de carvão ativado ao meio de cultura não promoveu a formação de calos na base dos explantes de amoreira-preta “Ébano” e porta-enxerto de videira “P1103”.

Tabela 5 – Comprimento do explante e comprimento médio de raízes (cm), número de raízes e intensidade de calo de Pircinque em diferentes meios de cultivo e em concentrações de carvão ativado (0, 2 e 4 g L⁻¹). Legenda: ns – não significativo; CV – coeficiente de variação.

	Comprimento de explante		Comprimento médio de raízes		Número de raízes		Intensidade de calo	
Meio KNOP	4,48	b*	3,35	ns	3,06	b	1,11	ns
Meio MS	5,05	a	3,33		3,84	a	1,17	
0 g L ⁻¹ carvão	3,19	b*	1,33	c*	2,32	b	1,08	ns
2 g L ⁻¹ carvão	5,41	a	4,00	b	4,02	a	1,17	
4 g L ⁻¹ carvão	5,69	a	4,69	a	4,03	a	1,17	
Média	4,77		3,34		3,45		1,14	
CV (%)	16,72		23,98		18,24		12,45	

* Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para o fator meio de cultivo, o MS promoveu explantes de maior comprimento e número de raízes. Em relação à utilização de carvão ativado, independentemente do meio de cultura, a adição de 4 g L⁻¹ resultou em um maior desenvolvimento *in vitro* de Pircinque, porém a concentração 2 g L⁻¹ não diferiu estatisticamente para o comprimento do explante e para o número de raízes. Estudos contrários, no entanto, mostram que a adição *in vitro* de carvão ativado pode reduzir a biomassa de explantes de frutíferas de clima temperado (VILLA *et al.*, 2014). Por outro lado, Adak *et al.* (2009) analisaram o efeito da auxina AIB e do uso de carvão ativado na fase de enraizamento durante a micropropagação de morangueiro cultivar Camarosa e relataram um aumento do número e do tamanho das raízes com o componente.

De acordo com Thomas (2008), o crescimento e o desenvolvimento das plantas podem ser favorecidos com o uso de carvão ativado no meio de cultura, pois ele possui características físicas que permitem a maior adsorção de algumas substâncias, fazendo efeito de antioxidante, por meio da adsorção irreversível de compostos tóxicos, e diminuindo o acúmulo de exsudatos, assim como aumentando a disponibilidade de vitaminas e melhorando o efeito de alguns fitorreguladores ao longo do tempo de cultivo.

No presente estudo, as concentrações de carvão ativado apresentaram interação com os dois meios de cultivo trabalhados para as variáveis comprimento médio de brotações, comprimento da maior raiz e número de brotações e folhas (tabela 6).

Tabela 6 – Comprimento médio de brotações, comprimento da maior raiz (cm) e número de brotações e folhas em Pircinque, em função do meio de cultivo e da concentração de carvão ativado (0, 2 e 4 g L⁻¹). Legenda: CV – coeficiente de variação.

	Comprimento das brotações				Comprimento da maior raiz				Número de brotações				Número de folhas			
	KNOP		MS		KNOP		MS		KNOP		MS		KNOP	MS		
0 g L ⁻¹	1,00	Ba*	2,22	Ab	1,00	Ab	2,05	Ab	1,71	Ba	2,57	Aa	3,41	Bb	4,20	Ab
2 g L ⁻¹	1,00	Ba	2,11	Ab	8,44	Aa	7,00	Aa	1,71	Ba	2,26	Ab	3,87	Ba	4,26	Ab
4 g L ⁻¹	1,00	Ba	2,78	Aa	8,94	Aa	6,44	Ba	1,71	Ba	2,77	Aa	3,98	Ba	5,86	Aa
Média	1,68				5,65				2,12				4,26			
CV (%)	10,49				21,65				10,66				5,72			

* Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro.

Constata-se que os meios MS + 4 g L⁻¹; KNOP + 2 ou 4 g L⁻¹ ou MS + 2 g L⁻¹; MS + 0 ou 4 g L⁻¹ e MS + 4 g L⁻¹ proporcionaram brotações de maior comprimento; raiz principal mais longa; maior número de brotações e de folhas, respectivamente. Todavia o meio de cultura MS, em geral para as quatro distintas variáveis, foi superior quando comparado ao KNOP, mostrando-se mais uma vez adequado para a utilização no protocolo de multiplicação desse cultivar italiano de morangueiro. Villa *et al.* (2014), em comparação a outro meio de cultura, identificaram que as concentrações de vitaminas do meio MS influenciaram de maneira positiva o crescimento das raízes, até o ponto de máximo.

Resultados antagônicos foram encontrados por Guson *et al.* (2012), que notaram que concentrações acima de 0,1375 g L⁻¹ de carvão ativado inibiram a formação de brotos, provavelmente porque, além de adsorver substâncias tóxicas, passaram a adsorver os nutrientes do meio de cultivo. Estudos já observaram, também, a influência negativa do carvão ativado para o número de folhas, possivelmente por compensar, com maior estímulo, o crescimento das folhas preexistentes ou do sistema radicular (VILLA *et al.*, 2014).

De acordo com a análise de variância demonstrada na tabela 7, houve interação entre os fatores estudados (meio de cultura e fontes de ferro) para as variáveis relacionadas à parte aérea, em que, para todas essas variáveis, o meio de cultivo MS associado ao Fe EDDHA como fonte de ferro foi mais eficiente para o desenvolvimento dos explantes. Assim como neste estudo, Christensen *et al.* (2008) relataram o incremento do número de brotações em hibisco, além do conteúdo de clorofila, área foliar e da massa seca dos explantes, com a utilização de Fe EDDHA em relação às mesmas dosagens de Fe EDTA. Similarmente, em pesquisas com aveleira propagadas *in vitro*, Garrison *et al.* (2013) verificaram que os explantes mantidos em meio de cultivo com Fe EDDHA apresentaram maior comprimento, concentração de clorofila e folhas mais largas do que aqueles multiplicados em Fe EDTA.

Tabela 7 – Comprimento do explante, comprimento de brotações (cm) e número de brotações e folhas de Pircinque em diferentes meios de cultivo e distintas fontes de ferro. Legenda: CV – coeficiente de variação.

	Comprimento do explante				Comprimento das brotações				Número de brotações				Número de folhas			
	KNOP		MS		KNOP		MS		KNOP		MS		KNOP	MS		
Fe EDTA	2,75	Ba*	4,46	Ab	1,00	Ba	2,04	Ab	1,71	Ba	2,57	Ab	3,86	Ba	4,62	Ab
Fe EDDHA	2,83	Ba	5,33	Aa	1,00	Ba	3,00	Aa	1,71	Ba	2,90	Aa	3,67	Ba	5,38	Aa
Média	3,84				1,76				2,22				4,38			
CV (%)	16,55				20,50				6,69				8,35			

* Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro.

Da mesma forma que nas variáveis da parte aérea, com a análise do sistema radicular se observaram resultados mais satisfatórios no meio de cultura MS com Fe EDDHA, quando comparado com o Fe EDTA (tabela 8).

Tabela 8 – Comprimento (cm) e número das raízes e intensidade de calo de explantes de morangueiro Pircinque em diferentes meios de cultivo e distintas fontes de ferro. Legenda: CV – coeficiente de variação.

	Comprimento da maior raiz				Comprimento médio de raízes				Número de raízes				Intensidade de calo			
	KNOP		MS		KNOP		MS		KNOP		MS		KNOP	MS		
Fe EDTA	1,00	Ba*	2,33	Ab	1,00	Ba	1,96	Ab	1,71	Ba	2,88	Ab	1,00	Bb	1,30	Ab
Fe EDDHA	1,00	Ba	3,96	Aa	1,00	Ba	2,75	Aa	1,71	Ba	3,52	Aa	1,40	Ba	1,49	Aa
Média	2,07				1,68				2,45				1,30			
CV (%)	24,55				20,05				18,95				3,76			

* Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro.

O enraizamento *in vitro* dos explantes de morangueiro foi beneficiado no meio de cultivo MS com o uso de Fe EDDHA; por outro lado, a intensidade de calos foi superior quando comparada aos outros tratamentos estudados. Vale ressaltar que essa formação de calogênese na base dos explantes pode ser prejudicial, já que é capaz de dificultar o desenvolvimento da parte aérea e, principalmente, do sistema radicular.

Ao estudar a influência dos dois meios de cultura e o número de folhas iniciais dos explantes, verificou-se que não ocorreu interação entre os fatores para as variáveis comprimento de brotações e comprimento médio de raízes, número de brotações, folhas e raízes e intensidade de calo (tabela 9). A presença ou ausência de folhas não influenciou o crescimento dos explantes, entretanto mais uma vez, para os meios de cultivo, ocorreram diferenças estatísticas significativas, em que o MS foi mais favorável para o desenvolvimento de Pircinque.

Tabela 9 – Comprimento de brotações e raízes (cm), número de brotações, folhas e raízes e intensidade de calos em Pircinque em diferentes meios de cultivo e número de folhas. Legenda: ^{ns} – não significativo; CV – coeficiente de variação.

	Comprimento das brotações		Comprimento médio das raízes		Número de brotações		Número de folhas		Número de raízes		Intensidade de calo	
KNOP	1,17	b*	1,00	b	1,85	b	3,47	b	1,76	b	1,35	b
MS	1,77	a	1,28	a	2,37	a	4,85	a	2,49	a	1,48	a
0 folha	1,37	^{ns}	1,25	^{ns}	2,02	^{ns}	4,03	^{ns}	2,13	^{ns}	1,34	^{ns}
2 folhas	1,52		1,11		2,17		4,23		2,05		1,44	
4 folhas	1,53		1,05		2,14		4,22		2,19		1,41	
Média	1,47		1,14		2,11		4,16		2,12		1,41	
CV (%)	19,61		21,74		10,31		9,27		13,07		5,92	

* Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em contrapartida, ao ser estudado o comprimento do explante principal e da maior raiz (cm), ocorreu interação entre os dois fatores avaliados (tabela 10) e, para ambos, o meio de cultivo MS destacou-se em relação ao meio de cultura KNOP; no fim da avaliação, a parte aérea mais longa foi aquela onde se deixaram duas ou quatro folhas na instalação do experimento e, para o comprimento da maior raiz, não diferiu a presença ou ausência de folhas e, ainda, dos explantes mantidos em KNOP com quatro folhas iniciais.

Tabela 10 – Comprimento do explante e da maior raiz (cm) em morangueiro Pircinque *in vitro* em diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e número de folhas (0, 2 e 4). Legenda: CV – coeficiente de variação.

	Comprimento do explante				Comprimento da maior raiz			
	KNOP		MS		KNOP		MS	
0	3,00	Ba	3,56	Ab	1,00	Bb	2,05	Aa
2	3,00	Ba	3,78	Aa	1,00	Bb	2,06	Aa
4	3,00	Ba	3,83	Aa	1,67	Aa	1,89	Aa
Média	3,36				1,61			
CV (%)	4,85				18,65			

* Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade de erro.

Tais resultados podem ser justificados pelo fato de que a presença de folhas auxilia a iniciação radicular e esse estímulo não pode ser atribuído à fotossíntese, já que o processo fotossintético é muito baixo durante o enraizamento; por isso, acredita-se que as folhas produzem alguma substância que promova o enraizamento (GRIMALDI *et al.*, 2008).

Ao avaliar a multiplicação dos explantes de morangueiro nos dois meios de cultivo e nas quatro concentrações distintas de BAP, vê-se que os dois fatores influenciaram isoladamente o comprimento dos explantes e o número de folhas (tabela 11).

Tabela 11 – Comprimento do explante (cm) e número de folhas de Pircinque em dois diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e concentrações de BAP (0, 1, 2 e 3 mg L⁻¹). Legenda: ^{ns} – não significativo; CV – coeficiente de variação.

	Comprimento do explante		Número de folhas	
KNOP	1,85	b*	3,13	b*
MS	2,74	a	4,60	a
0	2,78	a*	3,85	^{ns}
1	2,64	a	4,10	
2	1,98	b	3,88	
3	1,77	b	3,64	
Média	2,29		3,87	
CV (%)	15,15		19,46	

* Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação aos dois meios de sustentação, a composição básica do MS mais uma vez favoreceu o crescimento dos explantes, influenciando o maior crescimento e a quantidade de folhas, quando comparado ao KNOP. Todavia a concentração de BAP só foi significativa para o comprimento do explante, em que a ausência ou o uso de 1 mg L⁻¹ proporcionou partes aéreas mais alongadas; por sua vez, 2 e 3 mg L⁻¹ de BAP propiciaram tamanho mais reduzido e, assim, as concentrações mais elevadas do regulador de crescimento podem ter dificultado o desenvolvimento da parte aérea (VILLA *et al.*, 2014).

A Anova para comprimento e número de brotos e intensidade de calos foi significativa para a interação dos meios de cultura e as concentrações de BAP (figura 5). Percebe-se que o meio de cultivo MS com 1 mg L⁻¹ de BAP favoreceu a formação de maior número e comprimento de brotações, visto que as citocininas são utilizadas para quebrar a dormência apical dos brotos e aumentar a taxa de multiplicação, sendo essa maximização um dos objetivos da micropropagação (ROCHA *et al.*, 2010; SIVPARSAD & GUBBA, 2012).

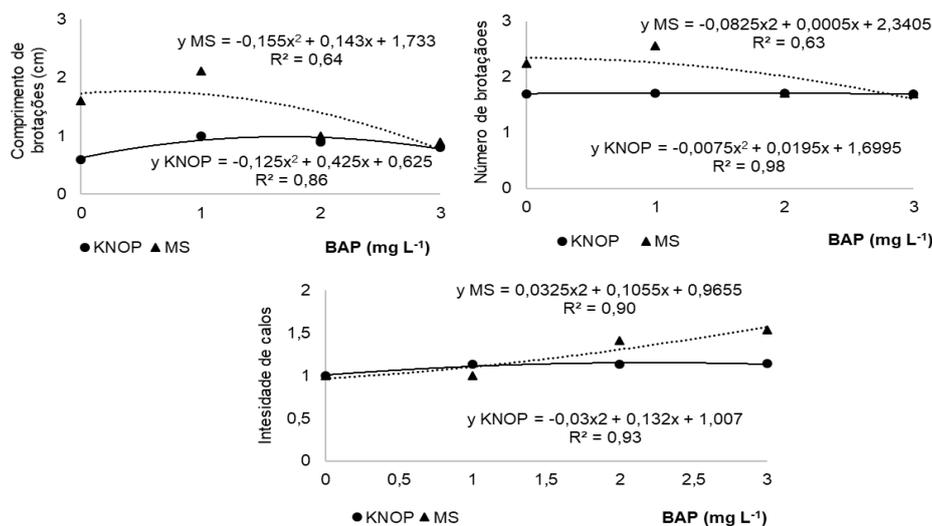


Figura 5 – Comprimento médio (cm) e número de brotações e intensidade de Pircinque em diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e concentrações de BAP (0, 1, 2 e 3 mg L⁻¹).

A concentração de valores próximos a 1 mg L⁻¹ corrobora aquela indicada por Dutra *et al.* (2012) no protocolo de multiplicação de morangueiro, cultivado em meio MS. Rocha *et al.* (2010), em

pesquisas com morangueiros *in vitro*, observaram comportamento quadrático quanto ao aumento da concentração de BAP para o comprimento das brotações, e estas sendo as maiores, obtidas no meio de cultura sem BAP. Em compensação, no cultivar trabalhado no presente estudo, a adição de 1 mg L⁻¹ foi mais eficiente.

Verifica-se que, tanto no KNOP quanto no MS, conforme aumentou a concentração da citocinina, houve uma tendência de aumento de calogênese; entretanto esse excesso de BAP no meio de cultura pode afetar negativamente o crescimento das brotações. A análise de variância para as variáveis do sistema radicular dos explantes também indicou interação entre os fatores meio de cultura e a concentração de BAP (figura 6) e, novamente, o meio de cultivo MS, com a adição de 1 mg L⁻¹ de BAP, favoreceu o desenvolvimento do sistema radicular, assim como da parte aérea, sendo superior ao KNOP nas três variáveis analisadas: comprimento médio e da maior raiz e número de raízes.

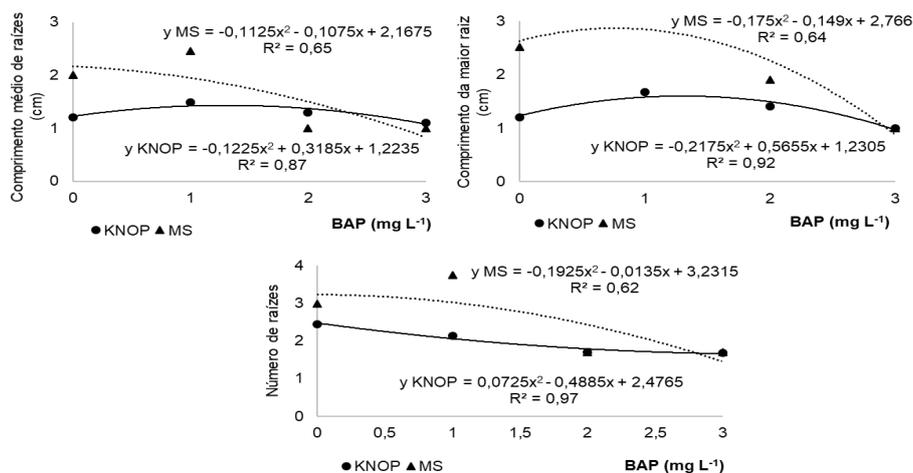


Figura 6 – Comprimento médio de raízes e maior raiz (cm) e número de raízes de Pircinque em diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e concentrações de BAP (0, 1, 2 e 3 mg L⁻¹).

Em pesquisas similares, Flores *et al.* (2015) demonstraram que os resultados obtidos com essa citocinina foram significativamente superiores aos do controle, uma vez que as plantas apresentaram um aumento considerável no número de segmentos nodais, crescimento dos brotos e, especialmente, em relação ao enraizamento. Em contrapartida, alguns estudos confirmaram a inibição da formação de raízes em meio de cultura com BAP, e uma das estratégias adotadas para minimizar esses efeitos é a transferência dos brotos para um meio nutritivo isento desse regulador de crescimento (SIVPARSAD & GUBBA, 2012).

Contudo constata-se que o enraizamento *in vitro* da cultura do morangueiro não é uma das etapas limitantes no processo de propagação, visto que não há necessidade de uma fonte de auxina para estimular a emissão de raízes, que ocorre durante a multiplicação, com adição da citocinina. Alam *et al.* (2010), da mesma forma, ressaltaram que muitas vezes a multiplicação *in vitro* de brotos ocorre concomitantemente ao enraizamento, não sendo necessária a adição de suplementos ao meio para induzir a regeneração de raízes.

Exceto para as variáveis comprimento da maior raiz e número de raízes *in vitro* de explantes de Pircinque, não houve interação entre os fatores meios de cultivo e concentrações de GA₃, como demonstrado na tabela 12.

Tabela 12 – Multiplicação *in vitro* de explantes de morangueiro Pircinque em dois diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e concentrações de GA₃ (0, 0,125, 0,250 e 0,375 mg L⁻¹). Legenda: ns – não significativo; CV – coeficiente de variação.

	Comprimento do explante		Comprimento das brotações		Número de brotações		Número de folhas		Comprimento médio de raízes		Intensidade de calos	
Meio KNOP	3,65	b*	1,31	b	2,00	b	4,10	b	1,00	b	1,38	ns
Meio MS	4,44	a	2,21	a	2,52	a	6,27	a	1,08	a	1,41	
0 mg L ⁻¹ GA ₃	3,55	c	1,65	ns	2,18	ns	4,85	b	1,05	ns	1,46	a
0,125 mg L ⁻¹ GA ₃	4,08	b	1,75		2,29		5,27	a	1,06		1,33	b
0,250 mg L ⁻¹ GA ₃	4,17	ab	1,83		2,22		5,17	ab	1,06		1,40	ab
0,375 mg L ⁻¹ GA ₃	4,38	a	1,80		2,37		5,43	a	1,00		1,41	ab
Média	4,04		1,76		2,26		5,18		1,04		1,40	
CV (%)	7,89		21,73		12,73		8,12		15,49		7,94	

* Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação aos meios de cultivo, para todas as variáveis explanadas na tabela 12, exceto intensidade de calos (na qual não houve diferença significativa entre os tratamentos), o MS possibilitou um maior crescimento e desenvolvimento dos explantes de Pircinque. Além disso, a adição do ácido giberélico influenciou o comprimento dos explantes, assim como o número de folhas e a intensidade de calos. Em geral, para essas três variáveis, as concentrações de 0,250 e 0,375 mg L⁻¹ de GA₃ foram satisfatórias, porém com resultados positivos também com apenas 0,125 mg L⁻¹ de GA₃ para o número de folhas ou, ainda, na ausência de GA₃ para a intensidade de calos.

Em contrapartida, quando se estudou o comprimento da maior raiz e o número médio de raízes, notou-se a interação entre ambos os fatores para essas variáveis (figura 7).

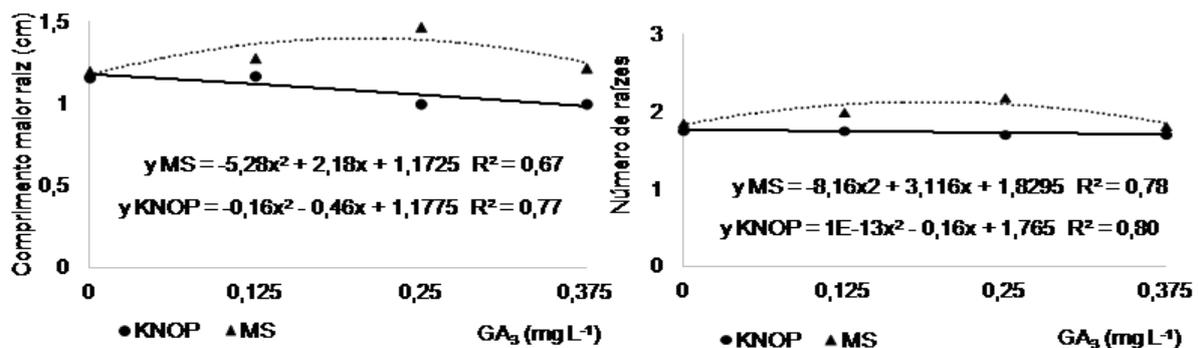


Figura 7 – Comprimento da maior raiz (cm) e número de raízes de Pircinque em diferentes meios de cultivo (KNOP e MS) e concentrações de GA₃ (0, 0,125, 0,250 e 0,375 mg L⁻¹).

Por meio da análise de regressão demonstrada na figura 8, constata-se que o desenvolvimento radicular no meio de cultivo MS com a adição de ácido giberélico foi favorecido quando comparado ao uso de KNOP com ou sem a presença de GA₃. Para ambas as variáveis analisadas, houve uma tendência de aumento no comprimento e no número de raízes até 0,250 mg L⁻¹ de GA₃ adicionado ao meio MS e, após esse ponto da curva, queda do desenvolvimento do sistema radicular de explantes de morangueiro Pircinque.

Na figura 8, verificam-se as variáveis comprimento do explante, comprimento de brotações e número de brotações e folhas no experimento de combinações de citocinina e carvão ativado em meios de cultivo líquido, em que, em geral, houve resultados satisfatórios quando se compara com o meio de cultura tradicional (sólido).

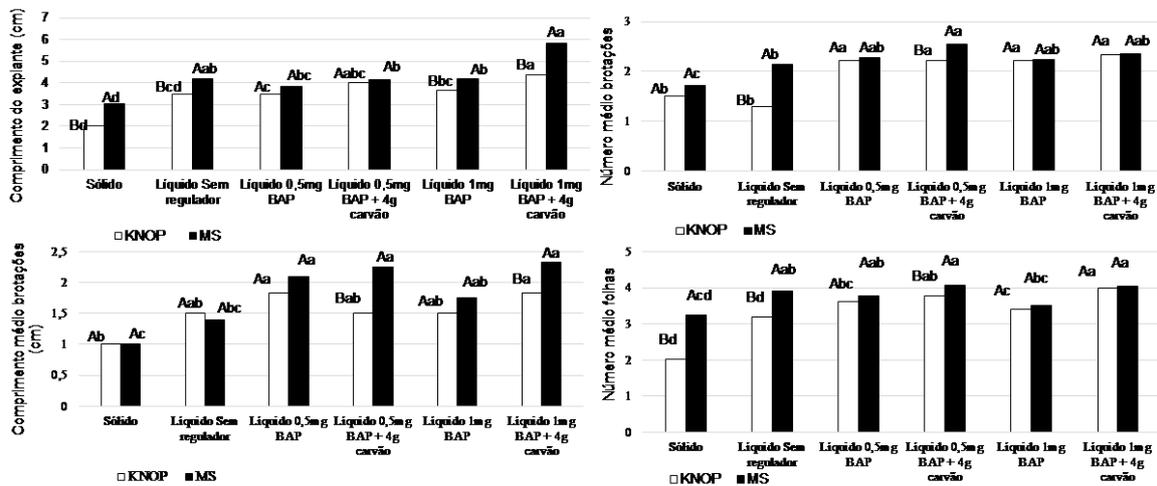


Figura 8 – Comprimento do explante, comprimento de brotações (cm) e número de brotações e folhas de Pircinque em diferentes meios líquidos e combinações de citocinina e carvão ativado. * Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro; letras maiúsculas comparam meios de cultura, e minúsculas, combinações de citocinina e carvão ativado.

O comprimento dos explantes foi superior quando utilizado o meio de cultura MS líquido com 1 mg BAP + 4 g carvão ativado, porém sem diferir dos meios líquidos MS sem regulador e KNOP com 0,5 mg BAP + 4 g carvão ativado. Já o comprimento médio das novas brotações foi maior na presença do meio líquido MS (0,5 ou 1 mg BAP com ou sem carvão) e do KNOP (sem regulador e com 0,5 ou 1 mg de BAP, sem a presença de carvão). Radmann *et al.* (2009) destacam a importância da avaliação do crescimento das brotações formadas durante a fase de multiplicação, já que esta é uma variável determinante na qualidade do material destinado à fase de enraizamento.

Em relação ao número médio de brotações, os destaques dos tratamentos foram para o uso de KNOP com 1 mg de BAP, independente do carvão ou com somente 0,5 mg de BAP, enquanto o meio MS foi superior com 0,5 mg de BAP com carvão ativado. Para o número médio de folhas, os tratamentos com maior destaque foram MS + 0,5 mg de BAP com carvão e MS ou KNOP, também com carvão, porém com 1 mg de BAP, não diferindo do MS somente com 0,5 mg de BAP ou sem regulador de crescimento. Em estudos com *Aechmea setigera*, Vasconcelos *et al.* (2015) também concluíram que o sistema de cultivo dupla fase proporciona um maior número de brotações regeneradas. Dessa forma, de acordo com Fermino Junior *et al.* (2014), o sistema de cultivo *in vitro* dupla fase surge como uma alternativa, podendo apresentar eficiência semelhante à do sistema convencional.

Similarmente, outros autores verificaram que o uso do sistema de cultura dupla fase foi eficiente na micropropagação e destacam esses resultados positivos em virtude da redução da manipulação em subcultivos (subdivisão e individualização), custos de produção e contaminação microbiológica (SCHERWINSKI-PEREIRA *et al.*, 2012).

As variáveis relacionadas ao sistema radicular dos explantes de morangueiro Pircinque cultivados em sistema dupla fase são demonstradas na figura 9, em que, para as quatro variáveis estudadas, os tratamentos que em geral se destacaram foram: MS + 0,5 mg ou 1 mg BAP + 4 g carvão de ativado. Além dos resultados satisfatórios demonstrados para essas variáveis, Scherwinski-Pereira *et al.* (2012) e Fermino Junior *et al.* (2014) confirmam que a presença da citocinina estudada (BAP) possibilita maior proliferação de brotos, assim como maior comprimento da parte aérea desses brotos regenerados.

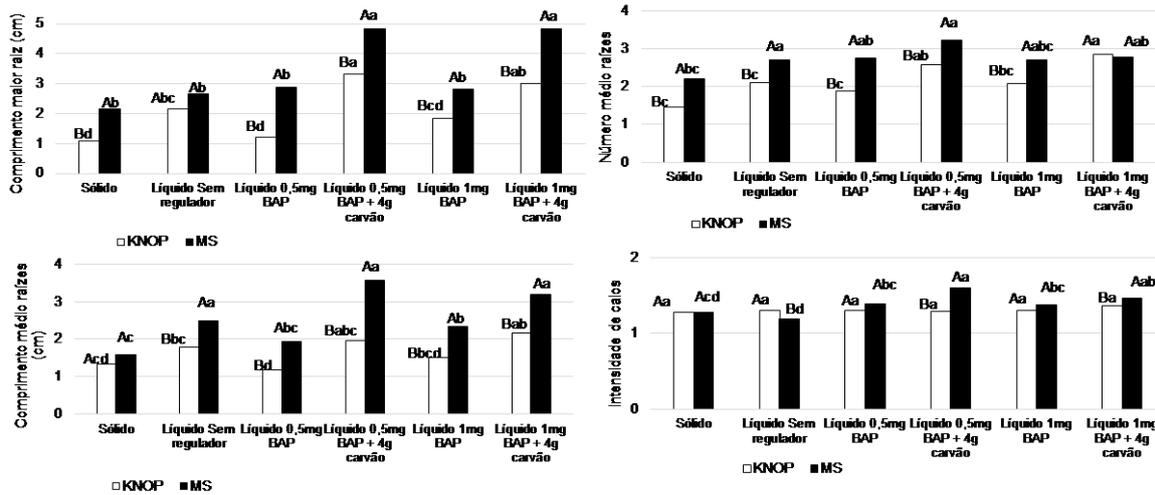


Figura 9 – Comprimento de raízes (cm), número médio de raízes e intensidade de calos de Pircinque em diferentes meios líquidos e combinações de citocinina e carvão ativado. * Significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro; letras maiúsculas comparam meios de cultura, e minúsculas, combinações de citocinina e carvão ativado.

De acordo com os resultados demonstrados nas figuras anteriores, observa-se que o sistema dupla fase é uma opção satisfatória de cultivo *in vitro*, já que apresenta a fase semissólida como suporte, constituída por meio de cultura facilmente disponível para os tecidos (SANDHYARANI *et al.*, 2011) e, posteriormente, o meio de cultura líquido, que aumenta o contato dos explantes com o meio de cultura.

CONCLUSÃO

O meio de cultivo MS demonstra maior eficiência no cultivo de explantes de Pircinque, exceto na etapa de estabelecimento, em que a maior sobrevivência dos meristemas é obtida em meio KNOP com uso de PPM®.

A adição de diferentes componentes ao meio de cultivo MS favorece a multiplicação de explantes de Pircinque, assim como o uso da técnica dupla fase, com adição de uma pequena lâmina do meio de cultura MS líquido, após a manutenção em meio sólido.

REFERÊNCIAS

- Adak, N., Kaynak, L., Pekmezci, M. & Gubbuk, H. The effect of various hormone types on *in vitro* propagation of strawberry. *Acta Horticulturae*. 2009; 829: 305-308. doi: 10.17660/ActaHortic.2009.829.46
- Alam, I., Sharmin, S. A., Naher, M. K., Alam, M. J., Anisuzzaman, M. & Alam, M. F. Effect of growth regulators on meristem culture and plantlets establishment in sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]. *Plant Omics Journal*. 2010; 3(2): 35-39.
- Assis, F. A., Rodrigues, F. A., Pasqual, M., Assis, G. A., Luz, J. M. Q., Costa, I. J. S., Costa, B. N. S. & Soares, J. D. R. Antioxidants in the control of microorganism contamination and phenol oxidation in *Eugenia pyriformis*. *Bioscience Journal*. 2018; 34(1): 49-58. doi: 10.14393/BJ-v34n1a2018-36311

- Besson, J. C. F., Oliveira, L. K., Bonett, L. P & Stefanello, S. Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. Revista Brasileira de Biociências. 2010; 8(1): 9-13.
- Biswas, M. K., Roy, U. K., Islam, R. & Hossain, M. M. Callus culture from leaf blade, nodal, and runner segments of three strawberry clones. Turk Journal Biology. 2010, 34: 75-80.
doi: 10.3906/biy-0708-7}
- Braga, F. T., Nunes, C. F., Favero, A. C., Pasqual, M., Carvalho, J. G. & Castro, E. M. Características anatômicas de mudas de morangueiro micropropagadas com diferentes fontes de silício. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 2009; 44(2): 128-132.
doi: 10.1590/S0100-204X2009000200003
- Calvete, E. O., Grando, M. F., Gomide, D. G., Maran, R. E., Suzin, M., Nienow, A. A. & Cecchetti, D. Agronomic and *in vitro* performance of micropropagated strawberry cultivars in different numbers of subculture. Revista Brasileira de Fruticultura. 2009; 31: 943-949.
doi: 10.1590/S0100-29452009000400005
- Christensen, B., Sriskandarajah, S., Serek, M. & Muller, R. *In vitro* culture of *Hibiscus rosa-sinensis* L.: influence of iron, calcium and BAP on establishment and multiplication. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2008; 93(2): 151-161.
doi: 10.1007/s11240-008-9354-4
- Dutra, L. F., Silva, N. D. G., Donini, L. P, Nino, A. F. P, Silva, F. O. X. & Vieira, F. C. B. Protocolos de micropropagação de plantas IV – Morangueiro. Pelotas: Embrapa Clima Temperado; 2012. 20 p.
- Fagherazzi, A. F., Grimaldi, F., Kretschmar, A. A., Molina, A. R., Gonçalves, M. A., Antunes, L. E. C., Baruzzi, G. & Rufato, L. Strawberry production progress in Brazil. Acta Horticulturae. 2017; 1156(1): 937-940.
doi: 10.17660/ActaHortic.2017.1156.138.
- Fermino Junior, P. C. P, Raposo, A., Nagao, E. O. & Pereira, J. E. S. Efeito de diferentes citocininas e sistema de cultura dupla-fase na micropropagação de Teca (*Tectona grandis* L.) estabelecida na Amazônia Sul-Occidental. Evidência. 2014; 14: 7-20.
- Flores, R., Maggio, L. P, Flôres, P. Z., Bempck, G. S., Auler, N. M. F., Carvalho, J. F. C., Godoi, R. S., Franzin, S. M., Becker, L. & Silveira, T. M. Otimização da produção de plantas *in vitro* de cultivares de *Ipomoea batatas*. Revista de Ciências Agrárias. 2015; 38(3): 429-437.
- Flores, R., Uliana, S. C., Pimentel, N. & Garlet, T. M. B. Sucrose and sorbitol on the *in vitro* conservation of *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken (Amaranthaceae). Journal of Biotechnology and Biodiversity. 2013; 4(3): 192-199.
- Garrison, W., Dale, A. & Saxena, P. K. Improved shoot multiplication and development in hybrid hazelnut nodal cultures by ethylenediamine di-2-hydroxyphenylacetic acid (Fe EDDHA). Canadian Journal of Plant Science. 2013; 93(3): 511-521.
doi: 10.4141/cjps2012-218
- Grimaldi, F., Grohskopf, M. A., Muniz, A. W. & Guidolin, A. F. Enraizamento *in vitro* de frutíferas da família Rosaceae. Revista de Ciências Agroveterinárias. 2008; 7(2): 160-168.
- Guson, R. R., Moraes, C. P & Ronconi, C. C. Influência de diferentes concentrações de carvão ativado no crescimento e enraizamento *in vitro* de *Cattleya pumila* Hook. Revista em Agronegócios e Meio Ambiente. 2012; 5(3): 551-563.
- Knop, W. Quantitative Untersuchungen über den Ernährungsprozess der Pflanzen. Landwirtschaftliche Versuchsstation Poland. 1865; 7(5): 93-107.
- Lima, S. S. Propagação vegetativa do *Protium* spp: *Protium heptaphyllum*, *Protium spruceanum* e *Protium guacayanum* [Dissertação de Mestrado]. Manaus: Universidade do Estado do Amazonas; 2012.
- Murashige, T. & Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plantarum. 1962; 15: 473-497.

- Oliveira, R. P. & Scivittaro, W. B. Produção de frutos de morango em função de diferentes períodos de vernalização das mudas. *Horticultura Brasileira*. 2009; 27(1): 91-95.
doi: 10.1590/S0102-05362009000100018
- Radmann, E. B., Bianchi, V. J., Oliveira, R. P. & Fachinelo, J. C. Multiplicação *in vitro* e alongamento das brotações micropropagadas do porta-enxerto "Tsukuba 1" (*Prunus persica* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*. 2009; 31(3): 656-663.
doi: 10.1590/S0100-29452009000300006
- Rezende, J. C., Pasqual, M., Carvalho, S. P., Pereira, A. R. & Villa, F. Influência do meio de cultura e concentração de ágar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas da embriogênese somática direta. *Scientia Agraria*. 2008; 9(1): 21-26.
doi: 10.5380/rsa.v9i1.9900
- Rocha, P. S. G., Oliveira, R. P., Scivittaro, W. B. & Santos, U. L. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. *Ciência Rural*. 2010; 40(9): 1922-1928.
doi: 10.1590/S0103-84782010000900011
- Sandhyarani, N., Kishor, R. & Sharma, G. J. Clonal propagation of triploid *Acorus calamus* Linn. using dual-phase culture system. *Journal of Crop Science & Biotechnology*. 2011; 14(3): 213-217.
doi: 10.1007/s12892-011-0028-0
- Scherwinski-Pereira, J. E., Lima, E. C. A., Silva, T. L., Mesquita, A. G. G., Maciel, S. A. & Costa, F. H. S. Doublephase culture system for large scale production of pineapple. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2012; 109(3): 263-269.
doi: 10.1007/s11240-011-0091-8
- Sivparsad, B. J. & Gubba, A. Development of an efficient plant regeneration protocol for sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cv. Blesbok. *African Journal of Biotechnology*. 2012; 11(84): 14982-14987.
doi: 10.5897/AJB12.2249
- Thomas, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*. 2008; 26(6): 618-631.
doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.08.003
- Vasconcelos, J. M., Leão, J. R. A., Raposo, A. & Fermino Junior, P. C. P. Sistemas de cultivo *in vitro* e aclimatização de *Aechmea setigera* Mart. ex Schult. & Schult. f. (Bromeliaceae). *Scientia Agraria Paranaensis*. 2015; 14(4): 240-246.
doi: 10.1818/sap.v14i4.9968
- Villa, F., Pasqual, M. & Silva, E. F. Micropropagação de híbridos de orquídea em meio Knudson com adição de vitaminas do meio MS, benzilaminopurina e carvão ativado. *Semina*. 2014; 35(2): 683-694.
doi: 10.5433/1679-0359.2014v35n2p683