

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

Laura Souza Santos

Biocarvão como alternativa no cultivo *in vitro* de pitaia e morangueiro

Montes Claros
2019

Laura Souza Santos

Biocarvão como alternativa no cultivo *in vitro* de pitaia e morangueiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Luiz Arnaldo Fernandes

Coorientadora: Claudinéia Ferreira Nunes

Montes Claros
Fevereiro de 2019

Santos, Laura Souza

5237b Biocarvão como alternativa no cultivo *in vitro* de pitaita e morangueiro /
2019 Laura Souza Santos. Montes Claros, 2019.

32 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Área de concentração em Produção Vegetal,
Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Luiz Arnaldo Fernandes.

Banca examinadora: Prof. Luiz Arnaldo Fernandes, Prof.^a Claudinéia
Ferreira Nunes, Prof.^a Clivia Carolina Fiorilo Possobom, Prof.^a Luciana
Cardoso Nogueira Londe, Prof. Demerson Arruda Sanglard.

Inclui referências: f. 28-32.

1. Morango -- cultivo. 2. Carvão. 3. Tecidos vegetais -- cultura e meios
de cultura. I. Fernandes, Luiz Arnaldo (Orientador). II. Universidade
Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 631.4

ELABORADA PELA BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA DO ICA/UFGM
Josiel Machado Santos / CRB-6/2577

Laura Souza Santos

Biocarvão como alternativa no cultivo *in vitro* de pitaia e morangueiro

Aprovada pela banca examinadora constituída pelos professores:

Luciana Cardoso Nogueira Londe
(EPAMIG)

Luiz Arnaldo Fernandes
(UFMG)

Claudinéia Ferreira Nunes
(UFMG)

Clivia Carolina Fiorilo Possobom
(UFMG)

Demerson Arruda Sanglard
(UFMG)

Luiz Arnaldo Fernandes
(Orientador – UFMG)

Montes Claros, 21 de fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, dono da minha, por me guiar a cada passo e ter me dado forças para enfrentar todas as dificuldades e por ter me capacitado para chegar onde cheguei. Aos meus pais Isnaldo e Valdenice, pelo amor incondicional, por não medirem esforços para que eu concluísse o mestrado e por sempre me proporcionarem a melhor educação.

Às minhas irmãs Alba e Marcela, pelo amor, respeito e apoio.

Agradeço também, ao meu namorado Guilherme, por ter me ajudado nos momentos de dificuldades, por me acalmar nos momentos de desespero, por ser meu companheiro e meu melhor amigo.

Ao meu orientador Luiz Arnaldo, pelo qual, sou muito grata por todos os ensinamentos, pela paciência, por me atender em todos os momentos que precisei, independente do horário, por me deixar sempre segura e amparada, e por ter me dado apoio em todas as etapas da realização do meu mestrado.

À Claudinéia, por ter me ensinado a técnica da cultura de tecidos, e por ter aceitado o desafio de ser a minha coorientadora. Serei sempre muito grata pela presença, durante toda a montagem, avaliação e parte escrita da minha dissertação. E principalmente por todo o carinho e cuidado comigo. Você foi uma verdadeira “mãe”!

Tenho muito a agradecer a Claudinéia e ao Luiz Arnaldo, eles tinham sempre uma palavra de consolo, mas sempre me corrigiam quando eu falhava em algum momento. Aprendi com eles, não somente, a pesquisar ou escrever seguindo regras acadêmicas, mas aprendi principalmente a ser um ser humano melhor, e mais preparado para as diversas situações que nos deparamos durante a vida. Quero levá-los sempre comigo!

Agradeço também a toda equipe do laboratório de biotecnologia e ao grupo GECULT, por todo apoio e contribuição em todos os momentos da realização do trabalho.

Ao Márcio da empresa Multiplanta – Tecnologia Vegetal, por gentilmente ter disponibilizado as mudas de morangueiro para realização do experimento.

À Flávia, que foi e continua sendo um anjo na minha vida, pessoa que encontro paz e refúgio e que tem um coração cheio de bondade e amor. Um dos maiores presentes que Deus me deu!

Aos meus amigos por sempre estarem presentes na minha vida, em especial, Flavia, Érika, Willy, Cris, Thainá, Maria Antônia e Vitor.

Agradeço a Universidade Federal de Minas Gerais, e a CAPES pelo fornecimento de bolsa. E a todos que direta ou indiretamente contribuíram com para a realização do meu mestrado.

A todos o meu grande e sincero OBRIGADA!

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Brotos de pitaia (*Hylocereus undatus* Haw) cultivados em frascos de cultivo vedados com tampas que permitem trocas gasosas (mod. Bio-Sama PP63 ®) (A), tampas convencionais de polipropileno (B) e meios de cultura contendo biocarvão de cana-de-açúcar (C) e carvão ativado (D). Brotos de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) cv. Oso Grande cultivados em meio de cultura com a adição de nitrato de prata (AgNO_3) (E) e meio de cultura com nitrato de prata e biocarvão de cana-de-açúcar e (F). 16
- Figura 2. Espectro FTIR do biocarvão produzido a partir de bagaço de cana de açúcar 17
- Figura 3. Cultivo *in vitro* de morangueiro com tampas com orifício (A) nas doses 0 g L-1 (B) e 4g L-1 (C), de biocarvão de bagaço de cana-de-açúcar e 2 g L-1 de carvão ativado (D). Cultivo *in vitro* de morangueiro com tampas sem orifício (E) nas doses 0 g L-1 (F) e 4 L-1 (G) de biocarvão de bagaço de cana-de-açúcar e 2 g L-1 de carvão ativado (H). Cultivo *in vitro* de pitaia com biocarvão e doses de nitrato de prata nas doses 0 μM L-1 (I), 5 μM L-1 (J), 20 μM L-1 (k) e 40 μM L-1 (L) de nitrato de prata. Cultivo *in vitro* de pitaia sem adição de biocarvão e doses de nitrato de prata nas doses 0 μM L-1(M), 5 μM L-1(N), 20 μM L-1(O) e 40 μM L-1 (P)..... 18
- Figura 4. Médias e intervalo de confiança (95%) do comprimento número e massa seca de raízes de pitaia (A, C e E, respectivamente) e para o morangueiro (B, D e F, respectivamente), em função de doses de biocarvão em frascos com (TO) e sem orifício (TSO) e tratamento controle (CT). Em cada dose, barras seguidas da mesma letra não diferem entre si. * Média significativamente diferente pelo teste t de Student ($\alpha = 0,05$), quando comparado ao tratamento controle 24
- Figura 5. Comprimento número e massa seca de raízes de pitaia (A, C e E, respectivamente) e para o morangueiro (B, D e F, respectivamente), em função de doses de nitrato de prata, com e sem biocarvão (BC). Em cada dose, barras seguidas da mesma letra não diferem entre si 27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atributos físico e químicos do biocarvão de bagaço de cana-de-açúcar	16
tabela 2 – Valores máximos de comprimento (comp), número e massa seca (ms) de raízes de pitaia e morangueiro e respectivas doses de biocarvão e carvão ativado (tratamento controle) com e sem tampas com orifício	22
tabela 3 – Valores máximos de comprimento, número e massa seca de raízes de pitaia e morangueiro e respectivas doses de nitrato de prata, com ou sem adição de biocarvão no meio de cultura para o cultivo <i>in vitro</i>	26

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	9
2	ARTIGO	10
2.1	Artigo 1- Biocarvão como alternativa no cultivo <i>in vitro</i> de pitaia e morangueiro	10
2.2	Introdução.....	12
2.3	Material e métodos	14
2.3.1	Material vegetal e condições experimentais	14
2.4	Produção e caracterização do biocarvão	15
2.5	Análise Estatística	17
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4	CONCLUSÕES	28
5	REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO GERAL

O setor de plantas micropropagadas busca continuamente tecnologias, para a produção de mudas de alta qualidade, principalmente, aquelas que oferecem melhores condições *in vitro* durante todo o processo de produção. Dentre as etapas do processo de micropropagação, a etapa final destinada à aclimatização das plantas merece destaque. O sucesso da aclimatização das plantas está diretamente envolvido com a constituição adequada da parte aérea e radicular e as condições *in vitro* em que essas plantas são cultivadas. O uso de biocarvão, tampas com membranas e nitrato de prata devem beneficiar o crescimento e desenvolvimento das plantas e promover uma melhor adaptação e maior sobrevivência a essas plantas em ambiente externo durante a etapa da aclimatização.

Na rotina da produção de plantas micropropagadas, tecnologias visando a uma melhor adaptabilidade das plantas, para a etapa de aclimatização, já são aplicadas, como exemplo, o uso da luz natural em associação com a redução do carboidrato. É fato que as plantas podem se adaptar a várias condições ambientais por meio da modificação do seu metabolismo. No entanto a readaptação às novas condições pode ser lenta e/ou difícil.

Nesse contexto, o presente trabalho discute alternativas para uma melhor adaptação das plantas, por meio de fatores ou alternativas voltadas para a vedação do ambiente de cultivo e componentes adicionais ao meio de cultura, com o propósito de alterar as concentrações de gases e o excesso de umidade no interior dos recipientes, na fase de enraizamento e alongamento das plantas *in vitro*.

No cultivo *in vitro*, as trocas gasosas são importantes para disponibilizar oxigênio, dióxido de carbono e vapor de água e eliminar o gás etileno produzido pela planta, que é prejudicial ao seu crescimento. Como uma forma de favorecer os efeitos positivos e minimizar os efeitos negativos citados anteriormente, o uso de tampas com orifícios vedados com membranas microporosas pode permitir trocas gasosas e facilitar o crescimento ótimo das culturas, no interior de recipientes de cultivo *in vitro* e, também, a adição ao meio de cultura do componente biocarvão que atua na retenção de gases, por mecanismos de adsorção na superfície das partículas. Outro fator importante é, ainda, a adição do componente nitrato de prata capaz de atuar, na rota da biossíntese do etileno, inibindo sua ação.

Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo geral comparar o biocarvão produzido, a partir de bagaço de cana-de-açúcar, resíduo abundante no Brasil, com tecnologias já empregadas no cultivo *in vitro*, tampas com membrana e nitrato de prata na micropropagação da pitiaia e do morangueiro.

2 ARTIGO

2.1 Artigo 1- Biocarvão como alternativa no cultivo *in vitro* de pitaia e morangueiro

RESUMO

No interior dos recipientes de cultivo de plantas micropropagadas, há restrições na disponibilidade de água, nas trocas gasosas entre o ambiente de cultivo e o ambiente exterior, e o acúmulo de gás etileno produzido pela planta é prejudicial ao seu crescimento. As trocas gasosas são importantes, pois disponibilizam oxigênio, dióxido de carbono e vapor de água e elimina o gás etileno retido no recipiente. Nessa ótica, foram conduzidos dois experimentos com o objetivo de avaliar a utilização de biocarvão de bagaço de cana-de-açúcar em frasco sem e com tampa com orifício (Experimento 1) e em combinação com nitrato de prata (Experimento 2) no cultivo *in vitro* de pitaia e de morangueiro. O Experimento (1) foi conduzido, em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5X2+2, com 6 repetições: cinco doses de biocarvão (0; 1; 2; 3; 4 g L⁻¹), dois tipos de tampa (com e sem orifício) e dois tratamentos adicionais com e sem carvão ativado comercial. O Experimento (2) foi conduzido, em delineamento inteiramente casualizado, esquema fatorial 5X2, com 6 repetições: cinco concentrações de nitrato de prata (0; 5; 10; 20; 40 µM L⁻¹), com ou sem biocarvão. O uso ou não de tampa com membrana não afetou o crescimento e o número de raízes da pitaia e do morangueiro, por outro lado, quando se utilizou tampa com membrana obteve-se maior produção de massa seca de raízes. A adição de até 4g L⁻¹ de biocarvão no meio de cultivo, independentemente da presença ou não de tampa com orifício, favoreceu o crescimento e desenvolvimento das raízes das plantas de pitaia e morangueiro. O nitrato de prata, isoladamente, proporcionou maior comprimento e massa seca de raízes de pitaia e maior massa seca de morangueiro e, a adição de biocarvão, no meio de cultura, diminuiu os efeitos do nitrato de prata no cultivo *in vitro*.

Palavras-chave: *Fragaria x ananassa* Duch. *Hylocereus undatus* Haw. Biochar. Cultura de tecidos. Nitrato de prata. Trocas gasosas.

2.1 ARTICLE 1 – Biochar as an alternative *in vitro* culture of pitaya and strawberry

ABSTRACT

The *in vitro* recipients interior are restricted in the availability of water, in the gas exchanges between the growing environment and the outside environment, and the accumulation of ethylene gas produced by the plant is detrimental to its growth. The gas exchanges are important because they provide oxygen, carbon dioxide and water vapor, and eliminate the ethylene gas trapped in the recipients' interior. In this context, two experiments were carried out with the objective of evaluating the use of biochar from sugarcane bagasse in recipients with or without lid with porous membrane (experiment 1) and in combination with silver nitrate (experiment 2) in the *in vitro* cultivation of pitaya and strawberry. The experiment 1 was carried out in a completely randomized design, in a 5X2+2 factorial scheme, with 6 replicates: five doses of biochar (0; 1; 2; 3; 4 g L⁻¹), two types of lid and two additional treatments with and without activated carbon. The experiment 2 was carried out in a completely randomized design, in a 5X2 factorial scheme, with six replicates: five silver nitrate concentrations (0; 5; 10; 20; 40 µM L⁻¹) with or without biochar. The use or not of lids with porous membrane did not affect the growth and the number of roots of pitaya and strawberry when *in vitro* conditions, on the other hand, when using lids with porous membrane was obtained greater roots dry matter yield. The addition of up to 4 g L⁻¹ of biochar in the culture medium, regardless of the use or not of lids with porous membrane, favored the growth and development of the pitaya and strawberry roots. The silver nitrate alone contributed to the greater length and dry mass of pitaya roots and greater dry mass of strawberry roots and, the addition of biochar in the culture medium decreases the silver nitrate effects *in vitro* culture.

Keywords: *Fragaria x ananassa* Duch. *Hylocereus undatus* Haw. Biochar. Tissue culture. Silver nitrate. Gas exchange.

2.2 INTRODUÇÃO

A micropropagação é empregada, para diversas espécies, como exemplo, pitia e morangueiro, com várias finalidades, seja para fins de pesquisa ou proporcionando benefícios como rápida propagação clonal para a comercialização de mudas.

Na condição *in vitro*, explantes são cultivados em recipientes vedados, os quais impedem a realização de trocas gasosas com o ambiente externo e favorecem o aumento da umidade relativa do ar, a concentração de gases, como o etileno, assim como a diminuição do gás carbônico e do oxigênio no seu interior. As respostas fisiológicas das culturas *in vitro* estão relacionadas a diferentes fatores, sejam endógenos, como o tipo e idade do material vegetal, ou exógenos, que podemos associar com o ambiente de cultivo, sejam trocas gasosas, concentração de gases e outros (HUSSAIN *et al.*, 2012). Nesse ínterim, é interessante ressaltar que os fatores exógenos, quando em excesso no interior dos recipientes, podem prejudicar a multiplicação e sobrevivência das plantas. Porém podem ser ajustados *in vitro* para promover uma melhor adaptação, crescimento e desenvolvimento da espécie de interesse (HUSSAIN *et al.*, 2012; NAING *et al.*, 2014; WAIKHOM; LOIUS, 2014).

As adaptações podem ser feitas de diversas formas, como a substituição das vedações convencionais por tampas com orifícios vedados com membranas microporosas ou, por meio da complementação do meio de cultura com componentes como biocarvão ou nitrato de prata, capazes de atuar na redução dos efeitos negativos dos fatores exógenos, como, por exemplo, a concentração do gás etileno.

As tampas com orifício vedado com membranas microporosas permitem as trocas gasosas entre o ambiente interno e externo dos frascos de cultivo *in vitro* (SANTANA *et al.*, 2011; MOHAMED; ALSADON, 2011; BATISTA, 2012), reduzindo, assim, o acúmulo de etileno no interior dos frascos. Também favorecem o aumento da transpiração, da concentração de gás carbônico, da umidade relativa do ar e da absorção de água e de nutrientes pelas plantas (XIAO; NIU; KOZAI, 2011; KOZAI, 2010). Em função desses efeitos, pode haver um aumento da capacidade fotossintética, da taxa de multiplicação e sobrevivência das plantas na fase de aclimatização (HAZARIKA, 2006).

A adição de carvão ativado ao meio de cultura tem a finalidade de reduzir a concentração do etileno produzido no interior dos frascos de cultivo *in vitro* (RODRIGUES *et al.*, 2017). As partículas de carvão ativado possuem cargas elétricas de superfície que adsorvem o etileno e outros compostos liberados pelo meio de cultivo *in vitro* e que podem prejudicar as plantas (GEORGE; SHERRINGTON, 1984).

O nitrato de prata é também uma opção que pode ser interessante por reduzir a ação do etileno, em condições *in vitro* (STEINITZ *et al.*, 2010; DONINI *et al.*, 2011), uma vez que os íons prata inibem a ação desse gás (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Outra possível alternativa é a utilização de biocarvões, compostos ricos em carbono obtidos por meio da pirólise (decomposição térmica na ausência ou presença parcial de oxigênio) de compostos orgânicos (BEESLEY; MARMIROLI, 2011; LEHMANN; JOSEPH, 2009). Os biocarvões possuem estrutura porosa e grupos funcionais de superfície que apresentam cargas elétricas (BUTNAN *et al.*, 2015) e funcionam como adsorventes de metais e de gases. Di Lonardo *et al.* (2013), trabalhando com cultivo *in vitro* de dois clones de álamo branco (*Populus alba* L.), verificaram que a adição de biocarvão

ao meio de cultura reduziu as concentrações de etileno, sendo uma boa opção para a melhoria das condições *in vitro* e da adaptação das plantas.

Apesar de existirem poucos relatos na literatura sobre os efeitos do uso de biocarvões no cultivo *in vitro*, o uso desses materiais como condicionadores de solo tem sido bastante estudado nos últimos anos. Nos cultivos em campo, os biocarvões melhoram as propriedades químicas, físicas e biológicas do solo (BUTNAN *et al.*, 2015), permitindo maior capacidade de retenção de água e nutrientes pelas plantas (ATKINSON; FITZGERALD; HIPPS, 2010; LEHMANN *et al.*, 2011; PAZ FERREIRO *et al.*, 2014) e, por serem formas mais estáveis de carbono, contribuem para a redução das emissões de gases de efeito estufa (KOOKANA *et al.*, 2011). Além disso, os biocarvões, por suas propriedades (elevada aromaticidade, cargas superficiais e porosidade), são considerados adsorventes eficazes de poluentes orgânicos e inorgânicos (BIAN *et al.*, 2014; WANG; JIANG; CHEN, 2014), sendo muito utilizados na remediação de ambientes contaminados por metais pesados (BEESLEY; MARMIROLI, 2011; AHMAD *et al.*, 2014).

Nos cultivos em solos, que receberam adição de biocarvões, verificam-se aumentos significativos no número de raízes finas (PRENDERGAST-MILLER; DUVALL; SOHI, 2014; SILVA *et al.*, 2017) e nas produtividades das plantas (XIANG *et al.*, 2017). Assim, os efeitos dos biocarvões, no sistema radicular das plantas e na adsorção de gases, são desejáveis para o cultivo *in vitro*.

Nessa perspectiva, visando à melhoria do ambiente interno dos recipientes de cultivo *in vitro*, principalmente, à redução de etileno e à produção de plantas com melhor adaptabilidade, para suportar a fase de aclimatização, as hipóteses deste estudo foram: (i) a utilização de tampas com membranas e a adição de biocarvão no meio de cultura favorecem o crescimento e desenvolvimento de plantas de pitaia e de morangueiro cultivadas *in vitro* e (ii) a adição de nitrato de prata e de biocarvão no meio de cultura substituem as tampas com membrana, na função de diminuir a concentração de gases no interior dos frascos de cultivo *in vitro*. Dessa forma, conduziram-se dois experimentos com o objetivo de avaliar a utilização de biocarvão em frasco sem e com tampa com membranas (Experimento 1) e em combinação com nitrato de prata (Experimento 2) no cultivo *in vitro* de pitaia e de morangueiro.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Material vegetal e condições experimentais

Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia do Centro de Pesquisas em Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, Campus Montes Claros. Os materiais vegetais utilizados foram propágulos de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) e sementes de pitaia (*Hylocereus undatus* Haw), fornecidos, respectivamente, pela empresa Multiplanta Tecnologia Vegetal, em Andradas e pela Universidade Federal de Lavras, em Lavras, ambas em Minas Gerais.

Os propágulos de morangueiro pré-estabelecidos *in vitro* apresentavam 2 cm de comprimento e duas a três brotações, oriundos do terceiro subcultivo da cv. Oso Grande.

As sementes de pitaia foram armazenadas em microtubos a 10°C em geladeira por um período de 15 dias. Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram submetidas à assepsia, de acordo com Nunes *et al.* (2008) e estabelecidas *in vitro*, individualmente, em tubos de ensaio (25 x 150 mm) com 10 mL do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Após 30 dias, as plântulas foram subcultivadas e transferidas, para meio MS acrescido de 4,44 µM de 6-benzilaminopurina (BAP), totalizando três subcultivos, visando à obtenção de número suficiente de explantes para os experimentos.

A partir de materiais vegetais obtidos, foram conduzidos dois experimentos. No primeiro experimento (Experimento 1), foram utilizados frascos com tampas com orifício que permitiam trocas gasosas (orifício vedado com membrana microporosa, modelo Bio-Sama PP63, Ultividros®) (Figura 1A), tampas convencionais de polipropileno sem orifício (Figura 1B) e doses de biocarvão de bagaço de cana-de-açúcar (Figura 1C) no enraizamento de explantes de pitaia e propágulos de morangueiro. No Experimento 2, foram avaliados o biocarvão de bagaço de cana-de-açúcar e as doses de nitrato de prata (AgNO₃), também, no enraizamento de explantes de pitaia e morangueiro.

No Experimento 1, utilizaram-se explantes de pitaia de, aproximadamente, 1 cm e propágulos de morangueiro de 2 cm de comprimento, com uma brotação, em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5X2+2, com 6 repetições e cinco explantes por frasco. Os tratamentos foram constituídos por cinco doses crescentes de biocarvão de bagaço de cana-de-açúcar (0; 1; 2; 3; 4 g L⁻¹), dois tipos de tampa (com e sem orifício) e dois tratamentos adicionais com 2 g L⁻¹ de carvão ativado (Figura 1D), para os dois modelos de tampa.

O Experimento 2 foi conduzido, em delineamento inteiramente casualizado, esquema fatorial 5X2, com 6 repetições e cinco explantes por frasco. Os tratamentos foram constituídos por cinco concentrações de nitrato de prata (0; 5; 10; 20; 40 µM L⁻¹), sem (Figura 1E) e com a adição de 4g L⁻¹ de biocarvão de bagaço-de-cana (Figura 1F).

Cada unidade experimental foi composta por um frasco de cultivo com capacidade para 250 cm³, contendo 40 mL de meio MS, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de ágar, 0,49 µM de Ácido Indolbutírico (AIB), modificados, de acordo com os tratamentos e pH do meio ajustado para ±5,8, antes da autoclavagem a 121°C e 1,2 atm, durante 20 minutos. As culturas foram mantidas, em sala de crescimento, a 25±2°C, irradiância de 36 µmol mol⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas LED de 20 W e fotoperíodo de 16 horas. Após 60 dias da instalação dos experimentos, os brotos foram retirados do meio de cultivo e separados, em partes aérea e raízes, as quais foram submetidas a uma assepsia com água destilada para retirada do excesso de meio aderido a elas. As variáveis avaliadas foram:

comprimento (cm) com o auxílio de uma régua milimetrada, número e massa seca de raízes. A secagem foi realizada, em estufa com circulação forçada de ar a 70°C, por 72 horas, até a obtenção de peso constante, medido em balança analítica de precisão.

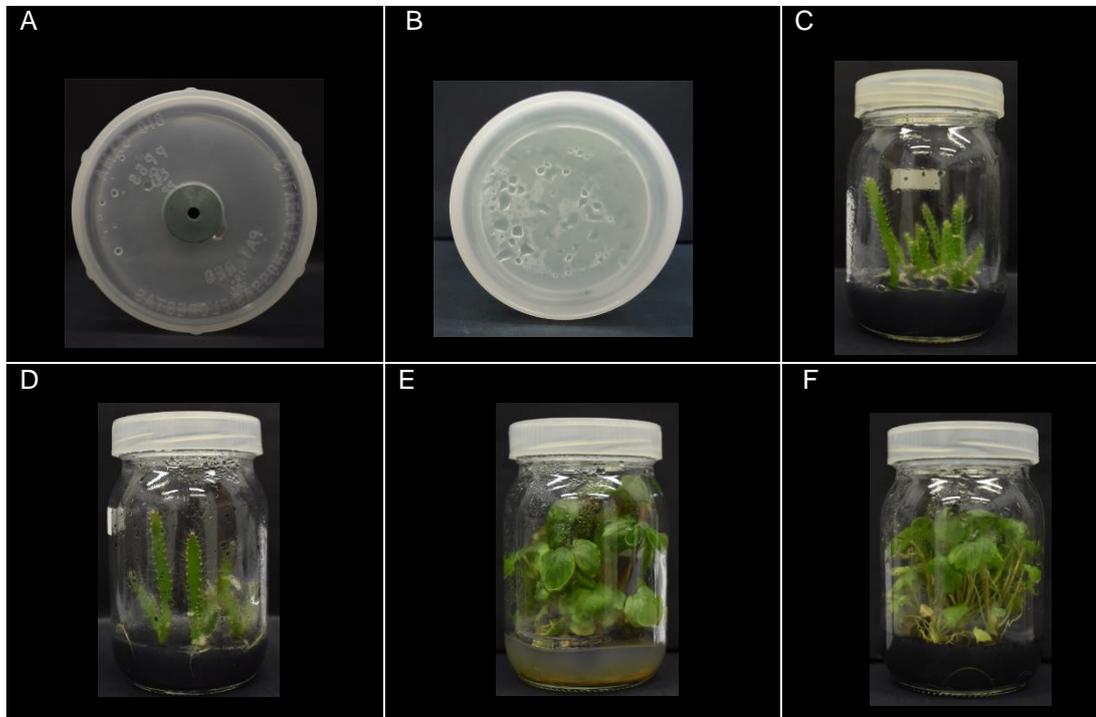


Figura 1. Brotos de pitiaia (*Hylocereus undatus* Haw) cultivados em frascos de cultivo vedados com tampas que permitem trocas gasosas (mod. Bio-Sama PP63 ®) (A), tampas convencionais de polipropileno (B) e meios de cultura contendo biocarvão de cana-de-açúcar (C) e carvão ativado (D). Brotos de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch) cv. Oso Grande cultivados em meio de cultura com a adição de nitrato de prata (AgNO_3) (E) e meio de cultura com nitrato de prata e biocarvão de cana-de-açúcar e (F).

Fonte: Da autora, 2019.

2.4 Produção e caracterização do biocarvão

O biocarvão foi obtido, a partir de colmos de cana-de-açúcar, após a extração de caldo. O bagaço utilizado foi seco ao ar e depois triturado para facilitar o processo de produção. Em seguida, foi submetido ao processo de pirólise a 350 °C, em um carbonizador tradicional simples, com tempo de duração de, aproximadamente, duas horas. A fim de controlar as condições de pirólise, a temperatura foi medida a cada 10 minutos, utilizando-se um termômetro infravermelho com mira laser. As medições foram realizadas na parte externa inferior do carbonizador. O biocarvão foi moído e passado em peneiras de 0,5 mm de malha, antes de ser adicionado ao meio de cultura, a fim de aumentar a relação área/volume, semelhante às partículas do carvão ativado e para a caracterização dos atributos físicos e químicos (Tabela 1).

O rendimento do biocarvão foi estimado pela relação entre massa do biocarvão e a massa da matéria-prima utilizada [(massa do biocarvão/massa de matéria-prima) x100].

A condutividade elétrica, pH e densidade foram determinados, de acordo com Rajkovich *et al.* (2012), e as cinzas de acordo como procedimento D1762-84 (ASTM, 2013).

O carbono total e o nitrogênio total foram determinados, usando um analisador elementar LECO CN-2000 (Leco Corp., St. Joseph, MI, USA). Os teores de nutrientes e de elementos-traços foram determinados via ICP-MS/MS (Agilent 8800 triple quadrupole ICP-MS/MS), após digestão por microondas (MARS 6 - Microwave Digestion System, CEM Mars Corporation) e ácido nítrico concentrado usando o método 3051 (USEPA, 1996). A análise de espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier foi realizada entre os comprimentos de onda 4000-400 cm^{-1} , 64 scans amostra e resolução de 2 cm^{-1} , por meio da técnica de pellets de KBr em que foram misturados 1 mg de biochar seco com 100 mg de KBr (Figura 2).

Tabela 1 – Atributos físico e químicos do biocarvão de bagaço de cana-de-açúcar

Atributos	Resultados
Rendimento (%)	29
Temperatura máxima	350°
Duração da carbonização (h)	2
pH	6,5
Condutividade elétrica (mS cm^{-1})	99,3
Densidade	0,28
Cinzas (%)	30
Carbono total (g kg^{-1})	283,5
Nitrogênio total (g kg^{-1})	12,3
Relação C/N (C Orgânico Total/ N total)	23/1
P (g kg^{-1})	23
K (g kg^{-1})	4,3
Ca (g kg^{-1})	18,2
Mg (g kg^{-1})	5,6
S (g kg^{-1})	1,2
Cu (mg kg^{-1})	145
Mn (mg kg^{-1})	784
Zn (mg kg^{-1})	826
Fe (mg kg^{-1})	2309
B (mg kg^{-1})	37

Fonte: Da autora, 2019.

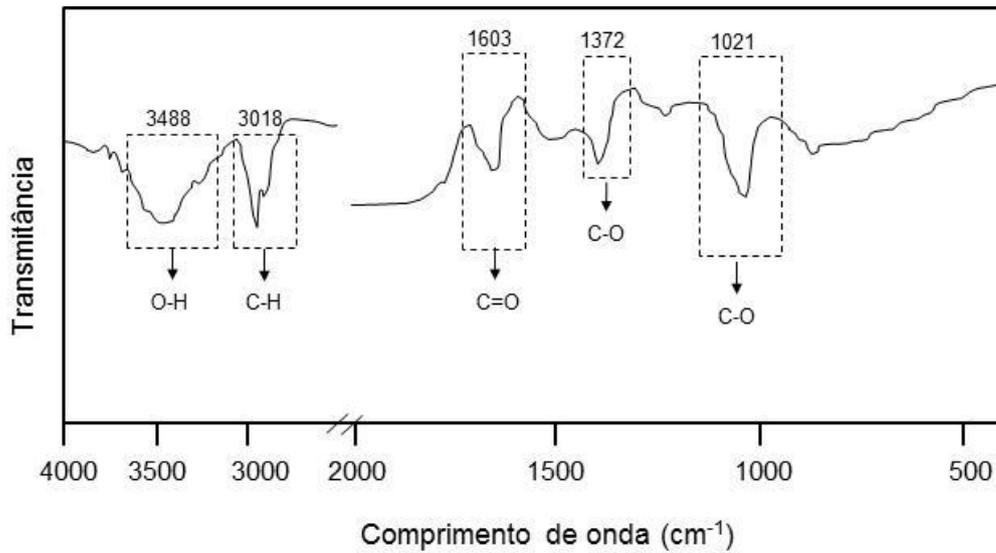


Figura 2. Espectro FTIR do biocarvão produzido a partir de bagaço de cana-de-açúcar.
Fonte: Da autora, 2019.

2.5 Análise Estatística

Para cada tratamento, foram calculados a média e o intervalo de confiança pelo teste t de Student a ($p < 5\%$). Para as dose de biocarvão e de nitrato de prata, quando significativas, foram ajustadas equações de regressão ($p < 5\%$), utilizando o programa estatístico R Studio.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para uma melhor adaptabilidade das plantas micropropagadas de pitaia e morangueiro (Figura 3), na fase de aclimatização, fatores como o uso de frascos com presença de orifício protegido por membrana microporosa, adição de biocarvão ou de nitrato de prata no cultivo *in vitro* representaram uma opção viável para as estratégias estabelecidas no estudo.



Figura 3. Cultivo *in vitro* de morangueiro com tampas com orifício (A) nas doses 0 g L⁻¹ (B) e 4g L⁻¹ (C), de biocarvão de bagaço de cana-de-açúcar e 2 g L⁻¹ de carvão ativado (D). Cultivo *in vitro* de morangueiro com tampas sem orifício (E) nas doses 0 g L⁻¹ (F) e 4 L⁻¹ (G) de biocarvão de bagaço de cana-de-açúcar e 2 g L⁻¹ de carvão ativado (H). Cultivo *in vitro* de pitaya com biocarvão e doses de nitrato de prata nas doses 0 μ M L⁻¹ (I), 5 μ M L⁻¹ (J), 20 μ M L⁻¹ (K) e 40 μ M L⁻¹ (L) de nitrato de prata. Cultivo *in vitro* de pitaya sem adição de biocarvão e doses de nitrato de prata nas doses 0 μ M L⁻¹(M), 5 μ M L⁻¹(N), 20 μ M L⁻¹(O) e 40 μ M L⁻¹ (P).

Fonte: Da autora, 2019.

Nesse sentido, verificou-se, para o fator tampas com e sem orifício, que não houve diferenças significativas para o comprimento (Figuras 4A e 4B) e número de raízes (Figuras 4C e 4D) da pitiaia e do morangueiro, respectivamente. A mesma observação foi constatada, para a massa seca de raízes de pitiaia (Figura 4E), independentemente da adição ou não de biocarvão no meio de cultura. Para os tipos de tampa, obtiveram-se diferenças significativas apenas para a massa seca de raízes do morangueiro, quando não foi adicionado biocarvão ao meio de cultivo (dose zero) e na dose 2g L^{-1} de biocarvão (Figura 4F).

O objetivo da utilização de tampas com membrana microporosa em frascos, para cultivos *in vitro*, é permitir as trocas gasosas entre o meio interno (interior do frasco) e o meio externo. Como influência do tipo de tampa no ambiente interno dos frascos, embora não seja objetivo do presente estudo, verificou-se menor formação de gotas de água, na parede interna dos frascos, que possuíam tampas com orifício. Batista *et al.* (2012), estudando a influência das trocas gasosas na pimenteira ornamental (*Capsicum annuum* L.), também, observaram menor umidade relativa no interior dos frascos com tampa com orifícios. Esses autores verificaram, ainda, que a utilização de tampas com membrana contribuiu para as maiores precocidade, rusticidade e massa seca e fresca das plantas.

De acordo com Santana *et al.* (2011), os orifícios nas tampas dos frascos permitem trocas gasosas entre o meio interno (interior dos frascos) e o meio externo, contribuindo, para a diminuição da quantidade de gás etileno, no interior dos frascos de cultivo *in vitro*. Esses autores constataram que os efeitos do orifício na tampa foram semelhantes à utilização de compostos, como o carvão ativado, na inibição da ação do etileno no interior dos frascos e para o crescimento de raízes de Araticum (*Annona glabra* L.). O acúmulo de etileno no interior dos frascos pode ter efeitos deletérios, como a mortalidade e abscisão das plantas cultivadas *in vitro* (BUFFA *et al.*, 2002). Plantas de pimenteira (*Capsicum annuum* L.) (MOHAMED; ALSADON, 2011), tomilho (*Thymus vulgaris* L.) (BANDEIRA *et al.*, 2007) e mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) (SÁ *et al.*, 2012), quando cultivadas *in vitro*, em frascos com tampas com orifício e, em função das maiores trocas gasosas com o meio externo, as plantas apresentaram melhor crescimento e desenvolvimento.

Quanto às doses de biocarvão no meio de cultivo, independentemente do tipo de tampa, não foi identificado efeito significativo para o comprimento de raízes de pitiaia (Figura 4A), enquanto, para o morangueiro, o comprimento de raízes aumentou linearmente (Figura 4B). Comparando a dose zero (6,18 cm) com a dose 4g L^{-1} (8,59 cm), observou-se que, em média, o comprimento das raízes, na maior dose de biocarvão, foi 1,4 vezes maior que na dose zero (Tabela 2).

Quando se comparou o comprimento de raízes de pitiaia, obtido no tratamento controle (CT), em que foi adicionado carvão ativado ao meio de cultivo, notaram-se maiores valores nos tratamentos sem biocarvão (dose zero), tanto para os frascos com tampas com e sem orifício e nas doses 1 e 2 g L^{-1} de biocarvão quando se utilizam frascos sem orifício (Figura 4A). Para o morangueiro, observaram-se menores valores nos tratamentos sem biocarvão, tanto nos frascos com tampas sem e com orifício e nas doses 1 e 3 g L^{-1} de biocarvão nos frascos com tampas sem orifício (Figura 4B). Dessa forma, em relação à variável comprimento de raízes, ressalta-se que o biocarvão é uma alternativa, para substituir o carvão ativado em meios de cultura, para o cultivo *in vitro* da pitiaia e do morangueiro.

No cultivo *in vitro*, a quantidade e o comprimento de raízes são características importantes à adaptabilidade das plantas, durante a fase de aclimatização. Corroborando com os resultados do presente estudo, outros autores também detectaram aumentos significativos, no comprimento de raízes, com a adição de biocarvão no meio de cultivo *in vitro* de alface (*Lactuca sativa* L.) e arábido (*Arabidopsis thaliana* L.) (VIGER *et al.*, 2014).

Conforme Xiang *et al.* (2017), as raízes são as interfaces entre as partículas de biocarvão e as plantas. Esses autores revisaram 136 artigos científicos que relacionam os efeitos do biocarvão às características do sistema radicular e destacaram que, de modo geral, em 32% e 9,9% dos trabalhos, a aplicação de biocarvão aumentou a biomassa e o diâmetro das raízes, respectivamente, enquanto, em 52% e 17% dos trabalhos, foi relatado o aumento do comprimento e número de pontas de raízes, respectivamente. Diante desses resultados, os autores concluíram que a aplicação de biocarvão beneficia muito mais o desenvolvimento morfológico das raízes, para aumentar a absorção de água e nutrientes que o aumento de biomassa, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho. De acordo com Viger *et al.* (2014), os biocarvões alteram o metabolismo das plantas, como, por exemplo, a biossíntese de auxina, que está relacionado ao aumento do sistema radicular.

O número de raízes da pitáia (Figura 4C) e do morangueiro (Figura 4D) aumentou linearmente com as doses de biocarvão, tanto nos tratamentos com frascos com tampa com orifício quanto naqueles com tampa sem orifício. Para a pitáia cultivada em frascos com tampa com orifício, o número de raízes aumentou 2,32 vezes da dose zero (12,94) para a dose 4 g L⁻¹ de biocarvão (30,11), enquanto, nos frascos sem orifício, o aumento da dose zero (11,03), para a dose 4 g L⁻¹ (32,04), foi de 2,90 vezes (Tabela 2). Mesmo sendo semelhante o aumento, as tampas sem orifício proporcionaram uma média maior, ou seja, a planta, ainda que em condições de ausência de trocas gasosas, apresentou resposta fisiológica satisfatória.

Para o morangueiro (Figura 4D), o aumento no número de raízes da dose zero (16,11) para a dose 4 g L⁻¹ (33,38) foi de 2,07 vezes, nos tratamentos correspondentes às tampas com orifício, e de 1,86 vezes (17,9 na dose 0 g L⁻¹ e 33,46 na dose 4g L⁻¹) para tampas sem orifício (Tabela 2).

Quando se comparou o número de raízes, obtidos no tratamento controle para a pitáia (Figura 4C) e para o morangueiro (Figura 4D), independentemente da presença de orifício nas tampas dos frascos de cultivo, verificou-se maior número de raízes com adição de biocarvão ao meio de cultivo. Por outro lado, Di Lonardo *et al.* (2013), trabalhando com cultivo *in vitro* de dois clones de Álamo branco (*Populus alba* L.), comparando a adição de biocarvão ou de carvão ativado no meio de cultura, não obtiveram diferenças significativas entre os tratamentos quanto ao número de raízes. No entanto esses autores demonstraram que a adição de biocarvão e carvão ativado contribuíram, positivamente, para o comprimento de parte aérea e número de raízes em relação aos tratamentos sem adição desses materiais.

A adição de biocarvão (Di LONARDO *et al.*, 2013) ou de carvão ativado reduz significativamente a concentração de etileno, no interior dos frascos de cultivo, por meio de mecanismos de adsorção desse composto às partículas desses materiais (MENSUALI-SODI *et al.*, 1993; HORNER *et al.*, 1977). Altas concentrações de etileno, no interior de recipientes de cultivo *in vitro*, podem inibir a organogênese, causar o colapso e a abscisão das folhas (GUZMÁN; ECKER, 1990). Todavia baixas concentrações de

etileno podem contribuir para o crescimento das plantas (KERBAUY, 2004). Efeitos positivos da adição de carvão ativado ao meio de cultivo também foi identificado por Firoozabady, Heckert e Gutterson (2006). Esses autores observaram aumentos significativos no enraizamento e nas brotações do abacaxizeiro cultivado *in vitro* com adição de carvão ativado ao meio de cultivo.

Na literatura, há poucos relatos sobre os efeitos do biocarvão como adsorvente de hormônios vegetais (Di LONARDO *et al.*, 2013). No entanto há vários estudos evidenciando a capacidade dos biocarvões de adsorver moléculas de defensivos agrícolas (SONG *et al.*, 2012; SOPEÑA *et al.*, 2012) e imobilizar poluentes orgânicos e inorgânicos (BIAN *et al.*, 2014). Por outro lado, durante o processo de pirólise, pode ocorrer a formação de alguns compostos orgânicos, como de etileno, que ficam adsorvidos às partículas do biocarvão produzido. De acordo com Spokas *et al.* (2010), o biocarvão pode liberar o etileno adsorvido produzido, durante o processo de pirólise para o meio. Dessa forma, para a utilização de biocarvão em cultivo *in vitro*, como no presente estudo, devem ser consideradas a presença e a quantidade de compostos tóxicos aos organismos. Além do etileno, dependendo das condições de pirólise e da matéria-prima, o biocarvão pode apresentar elevadas concentrações de dioxinas e furanos, por exemplo (FREE *et al.*, 2010).

Trabalhos recentes têm mostrado que as plantas podem absorver nanopartículas de carbono do biocarvão, o que pode inibir a expressão de genes relacionados ao metabolismo secundário, entre eles os da produção de etileno. A absorção das nanopartículas do biocarvão também pode afetar negativamente a expressão de um conjunto genes, como a via do ácido jasmônico e salicílico, que participam da sinalização do etileno, que estão relacionados à defesa das plantas, contra o ataque de insetos, patógenos e controle de estresses (VIGER *et al.*, 2014). Portanto, além dos efeitos do biocarvão relacionados à adsorção de etileno, devem-se considerar seus efeitos no metabolismo das plantas. Nesse sentido, muitos autores têm verificado efeitos positivos dos biocarvões, no desenvolvimento e na morfologia das raízes, melhorando a absorção de água e nutrientes (PRENDERGAST-MILLER; DUVALL; SOHI, 2014) e a produtividade das culturas (XIANG *et al.*, 2017).

Para a massa seca de raízes de pitaita, verificou-se que não houve diferenças significativas para doses de biocarvão, tanto para os frascos com e sem orifício na tampa. Também não foram verificadas diferenças significativas entre a massa seca de raízes obtidas no tratamento controle com aquelas obtidas nos demais tratamentos (Figura 4E).

Para o morangueiro, houve efeito significativo das doses de biocarvão para a produção de massa seca de raízes. Tanto para as plantas cultivadas, em frascos com tampa com orifício, quanto naquelas sem orifício, a produção de massa seca de raízes reduziu linearmente com o aumento das doses de biocarvão (Figura 4F). Nos tratamentos utilizando tampas com orifício, a redução de massa seca de raízes foi de 17,5 vezes, quando se comparou a dose zero (114 mg) com a dose 3 g L⁻¹ de biocarvão (6,9 mg), em que se obteve a menor produção. Para os tratamentos com tampa sem orifício, a redução foi de 4,9 vezes da dose zero (53,4 mg) para a dose 3 g L⁻¹ de biocarvão (10,8 mg), em que também se obteve a menor produção de massa seca de raízes (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores máximos de Comprimento (comp), número e massa seca (MS) de raízes de pitaia e morangueiro e respectivas doses de biocarvão e carvão ativado (tratamento controle) com e sem tampas com orifício

Variável	Tampa sem orifício			Tampa com orifício		
	Com biocarvão		Carvão ativado	Com biocarvão		Carvão ativado
	Dose (g L ⁻¹)	Max. valor		Dose (g L ⁻¹)	Max. Valor	
Pitaia						
Comp. (cm)	Ns	5,58*	4,01*	ns	4,89*	4,02*
Número	4	32,09	14,93	4	30,11	6,71
MS (mg)	Ns	7,61*	9,03*	ns	7,60*	8,02*
Morangueiro						
Comp. (cm)	4	8,59	7,79	ns	6,53*	9,46*
Número	4	33,46	14,53	4	33,38	18,70
MS (mg)	0	53,40	24,21	0	114,0	42,40

ns: não significativo; *: Média

Fonte: Da autora, 2019.

Verificou-se que, na dose zero de biocarvão, houve maior produção de massa seca de raízes, no tratamento de tampas com orifício, enquanto, nas demais doses de biocarvão e no tratamento controle, não houve diferenças significativas entre os tratamentos com e sem orifício nas tampas. Na dose zero de biocarvão, a produção de massa seca de raízes foi significativamente maior que a obtida no tratamento controle, tanto nos tratamentos com e sem orifício. Com o aumento das doses de biocarvão, houve uma redução linear na produção de massa seca de raízes, para o tratamento com orifício e quadrática, no tratamento sem orifício (Figura 4 F). Dessa forma, para o morangueiro, observa-se que, apesar de haver um aumento do número de raízes com as doses de biocarvão, as raízes foram mais finas, o que refletiu na menor produção de seca.

A partir dos resultados de massa seca de raízes, em que não houve diferenças significativas, para doses de biocarvão para a pitaia ou uma redução para o morangueiro, constatou-se que, nos tratamentos com biocarvão, as raízes foram mais finas com o aumento das doses de biocarvão no meio. Embora no presente estudo não tenha sido avaliado o diâmetro de raízes, visualmente, observou-se esse comportamento. Pelo fato de o biocarvão ter contribuído para o aumento do comprimento (Figuras 4A e 4B) e número de raízes (Figuras 4C e 4D) e, no entanto, reduzir a produção de massa seca (Figuras 4E e 4F), corrobora para a constatação de raízes mais finas nas plantas cultivadas *in vitro* com adição de biocarvão ao meio de cultivo. Silva *et al.* (2017) também verificaram maior número de raízes finas, em plantas de feijoeiro, quando se adicionou biocarvão ao solo. Provavelmente, como constatado por Viger *et al.* (2014), nanopartículas de biocarvão, quando absorvidas pelas plantas, podem afetar o seu metabolismo. Nesse caso de raízes mais finas, pode ser uma vantagem ecológica para a adaptação das plantas a solos de baixa disponibilidade de nutrientes.

A depender da espécie, condições heterotróficas de cultivo podem acarretar restrições na disponibilidade de água, nas trocas gasosas entre o ambiente de cultivo e o ambiente exterior. A ausência ou redução da aeração está diretamente relacionada com as respostas fisiológicas do material

in vitro, por exemplo, à baixa multiplicação dos explantes, que ocorre por altas concentrações de etileno e CO₂ dentro do frasco de cultivo, fazendo com que o controle do microambiente se torne essencial para reduzir distúrbios morfológicos e fisiológicos (MARINO; BERARDI, 2004; PARK *et al.*, 2004).

Ambientes de cultivo *in vitro* vêm sendo estudados para diversas culturas, evidenciando que as trocas gasosas, durante o cultivo, beneficiam o crescimento e desenvolvimento do explante multiplicado e, principalmente, promovem uma melhor adaptação da planta para a etapa de aclimatização, pois as trocas gasosas estão diretamente envolvidas na quantidade e na eficiência estomática da planta, além de pigmentos de acúmulo de metabólitos (SHA VALLI *et al.*, 2003; TSAY *et al.*, 2006; MOHAMED; ALSADON, 2010; IAREMA *et al.*, 2012).

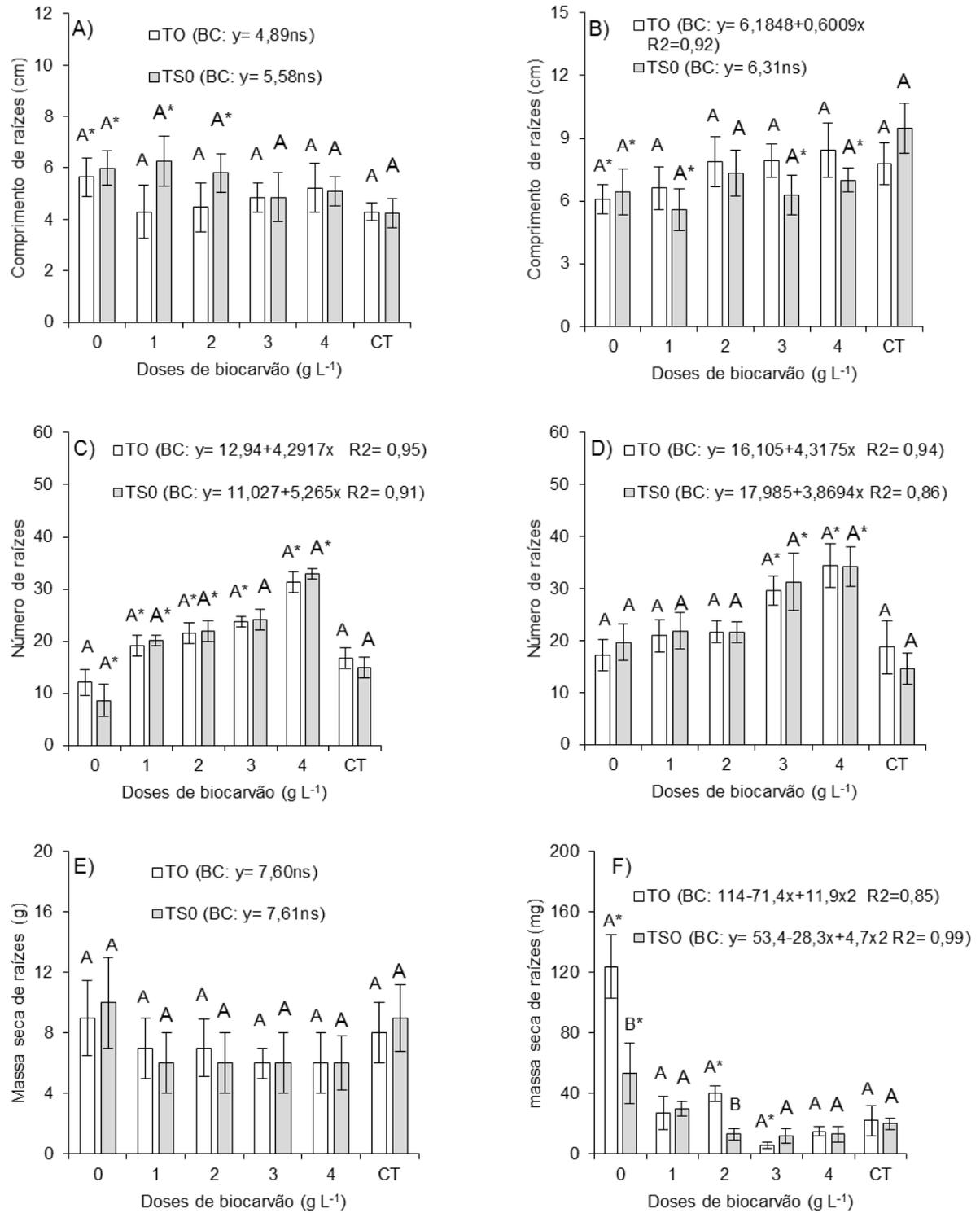


Figura 4. Médias e intervalo de confiança (95%) do comprimento número e massa seca de raízes de pitaia (A, C e E, respectivamente) e para o morango (B, D e F, respectivamente), em função de doses de biocarvão em frascos com (TO) e sem orifício (TSO) e tratamento controle (CT). Em cada dose, barras seguidas da mesma letra não diferem entre si. * Média significativamente diferente pelo teste t de Student ($\alpha = 0,05$), quando comparado ao tratamento controle.

Fonte: Da autora, 2019.

As variáveis comprimento, crescimento e massa seca de raízes da pitiaia e do morangueiro, em função das doses de nitrato de prata (AgNO_3), com ou sem adição de biocarvão ao meio de cultivo *in vitro*, são apresentadas na Figura (5). De modo geral, independentemente da dose de nitrato de prata, tanto para a pitiaia quanto para o morangueiro, houve diferenças significativas, para o comprimento e número de raízes, em função da adição ou não de biocarvão no meio de cultivo. Atenção maior deve ser dada para a massa seca de raízes, tanto para a pitiaia (Figura 5E) quanto para o morangueiro (Figura 5F), pois se observaram menores produções nos tratamentos com a presença de biocarvão ao meio de cultivo *in vitro*.

O objetivo da adição de nitrato de prata, em meios de cultivo *in vitro*, foi inibir a ação do etileno. No caso do presente estudo, o biocarvão, por meio da adsorção do etileno nas cargas de superfície das partículas, também, pode reduzir as concentrações do etileno, no interior dos frascos de cultivo *in vitro*, como discutido anteriormente. No entanto, por exemplo, a menor produção de massa seca de raízes do presente estudo pode ser atribuída à imobilização de íons prata (Ag^+) do nitrato de prata pelo biocarvão, por meio de reações de precipitação e adsorção.

De modo geral, em função de seus teores de cinzas, ricas em óxidos e hidróxidos de metais alcalinos (GLASER; LEHMANN, 2002), os biocarvões elevam o pH do meio e, conseqüentemente, pode ocorrer a precipitação de íons metálicos catiônicos (RAJAPAKSHA *et al.*, 2016; RIZWAN *et al.*, 2016) com o Ag^+ . Além disso, os biocarvões são adsorventes muito eficientes de íons metálicos catiônicos em virtude da elevada área superficial e porosidade das partículas e presença de grupos funcionais que exibem cargas elétricas negativas (BIAN *et al.*, 2014; TANG *et al.*, 2013). Tais propriedades do biocarvão podem ter contribuído para a inibição dos efeitos do nitrato de prata no presente estudo, promovendo a redução das concentrações de etileno no interior dos frascos de cultivo. De acordo com a Figura 2, o biocarvão utilizado no presente estudo apresenta grupos funcionais O-H, C-H, C=O e C-O que, ao serem desprotonados, exibem cargas negativas na superfície das partículas do biocarvão (Lu *et al.*, 2014).

Comparando os valores máximos estimados, por meio das equações ajustadas, em função das doses de nitrato de prata, verificou-se que a pitiaia apresentou maior comprimento e número de raízes nos tratamentos com biocarvão, no entanto a maior produção de massa seca ocorreu nos tratamentos sem biocarvão (Tabela 3). Para o morangueiro, os valores máximos de crescimento e número de raízes foram semelhantes entre os tratamentos com e sem biocarvão, sendo a produção de massa seca ligeiramente maior no tratamento sem biocarvão (Tabela 3). Sendo assim, pode-se inferir que o biocarvão proporcionou raízes mais finas, como já discutido anteriormente para os experimentos 1 e 2 e reduziu parcialmente os efeitos do nitrato de prata.

Destaca-se que, na ausência de biocarvão, a produção de massa seca de raízes foi 2,1 e 1,7 vezes maior que no tratamento com biocarvão, para a pitiaia e morangueiro, respectivamente (Tabela 3), mostrando não ser recomendada a adição conjunta do biocarvão e do nitrato ao meio de cultivo *in vitro*.

Tabela 3 – Valores máximos de Comprimento, número e massa seca de raízes de pitaia e morangueiro e respectivas doses de nitrato de prata, com ou sem adição de biocarvão no meio de cultura para o cultivo *in vitro*

Variáveis	Com biocarvão		Sem biocarvão	
	Nit. Prata ($\mu\text{M L}^{-1}$)	Maior valor	Nit. Prata ($\mu\text{M L}^{-1}$)	Maior valor
Pitaia				
Comprimento (cm)	22,6	7,4	ns	7,2*
Número	22,3	36,3	18,4	21,2
Massa seca (mg)	21,4	27,2	20,1	57,3
Morangueiro				
Comprimento (cm)	11,2	16,1	18,3	20,4
Número	40	30,1	30,4	33,2
Massa seca (mg)	20,2	23,1	21,3	38,5

ns: não significativo; *: media

Fonte: Da autora, 2019.

Estudos demonstrando os efeitos positivos da utilização de frascos de cultivo vedados com tampas compostas com orifícios e membrana microporosa, adição carvão ativado e nitrato de prata ao meio de cultura, visando à redução das concentrações de etileno no interior dos frascos de cultivo *in vitro*, têm sido explorados na literatura (BATISTA *et al.*, 2012; SANTANA *et al.*, 2011; GALDIANO JUNIOR *et al.*, 2012; STEINITZ *et al.*, 2010; DONINI *et al.*, 2011).

Os biocarvões, produzidos pelo processo de pirólise, e a adição de nitrato de prata, no meio de cultura, contribuíram de modo significativo ao aumento do comprimento, número e massa seca de raízes. Embora a adição simultânea de biocarvão e nitrato de prata no meio de cultura tenha promovido um efeito antagônico, nas plantas cultivadas, de acordo com os resultados do presente estudo, o biocarvão de bagaço de cana-de-açúcar mostrou-se ser uma alternativa viável, para melhorar as condições *in vitro*, na fase final do cultivo de pitaia e morangueiro.

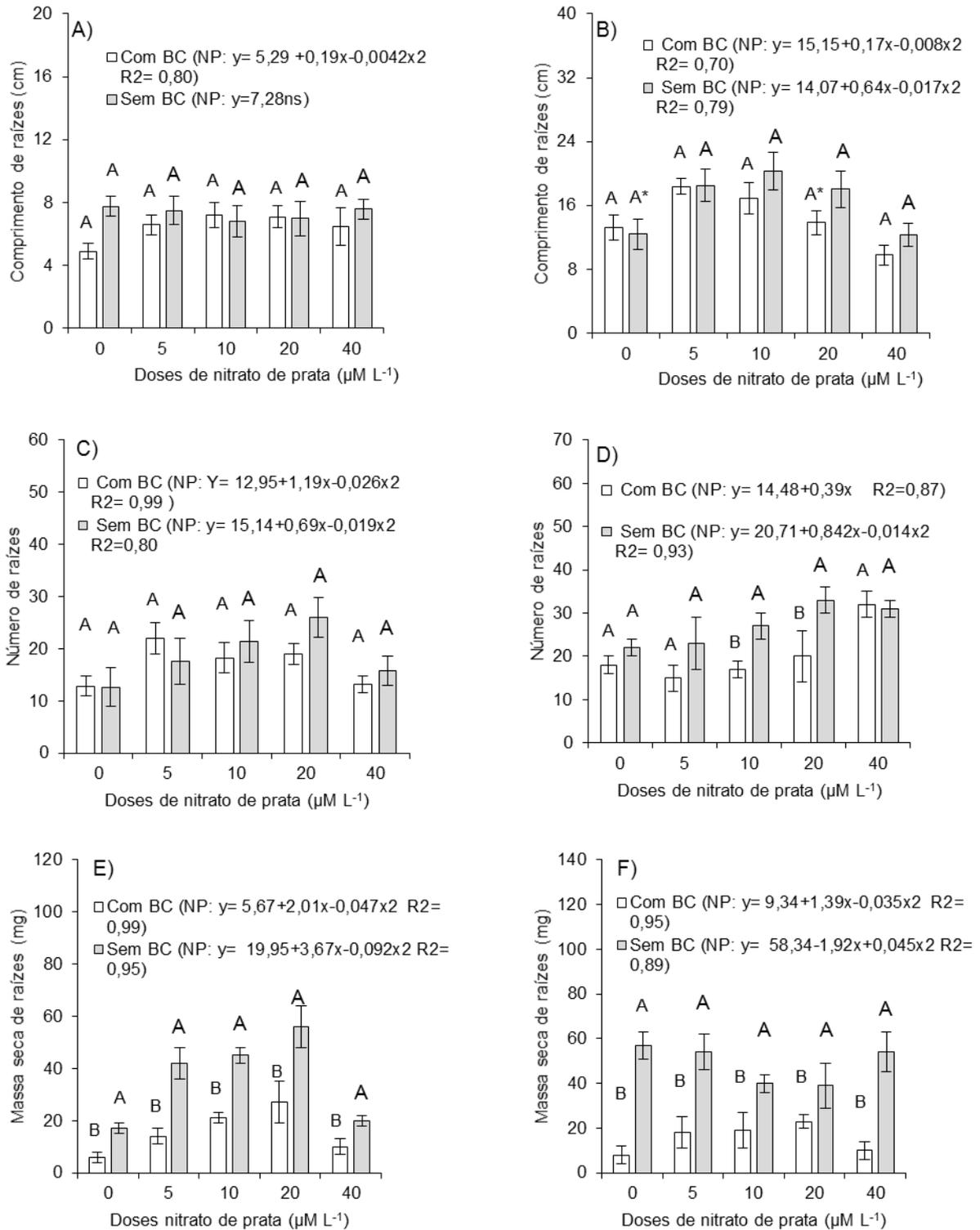


Figura 5. Comprimento número e massa seca de raízes de pitaia (A, C e E, respectivamente) e para o morangueiro (B, D e F, respectivamente), em função de doses de nitrato de prata, com e sem biocarvão (BC). Em cada dose, barras seguidas da mesma letra não diferem entre si.

4 CONCLUSÕES

O biocarvão de bagaço de cana-de-açúcar favorece o crescimento e o desenvolvimento das raízes de pitaia e de morangueiro, independentemente do uso de tampas com ou sem membranas para trocas gasosas.

Na presença do biocarvão ou carvão ativado, no meio de cultivo, não há diferença quanto ao tipo de tampa com ou sem membrana.

Na maior dose de biocarvão (4 g L^{-1}) ocorre maior crescimento das mudas quanto ao carvão ativado.

A utilização de tampas com orifício, biocarvão de bagaço de cana-de-açúcar e o nitrato de prata são alternativas viáveis para melhorar as condições do cultivo *in vitro* de pitaia e morangueiro. No entanto a adição conjunta de biocarvão e de nitrato de prata, em frascos com tampas sem membranas, não contribuíram positivamente para o sistema radicular das plantas.

5 REFERÊNCIAS

- AHMAD, M.; RAJAPAKSHA, A.U.; LIM, J.E.; ZHANG, M.; BOLAN, N.; MOHAN, D.; VITHANAGE, M.; LEE, S.S. OK, Y.S. Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: A review. **Chemosphere**, v. 99, p. 19-33, 2014.
- ASTM, D1762-84. Standard test method for chemical analysis of wood charcol. **American Society for Testing and Materials**, 84, p.1-2, 2013.
- ATKINSON, C.J.; FITZGERALD, J.D.; HIPPS, N. Potential mechanisms for achieving agricultural benefits from biochar application to temperate soils: a review. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 337, p. 1-18, 2010.
- BANDEIRA, J.M.; LIMA, C.S.M.; RUBIN, S.; RIBEIRO, M.V.; FALQUETO, A.R.; PETERS, J.A.; BRAGA, E.J.B. Diferentes tipos de vedações dos frascos e concentrações de sacarose na micropropagação de *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.472-4, 2007.
- BATISTA, D. S. **Influência de trocas gasosas, do etileno e de poliaminas na morfogênese *in vitro* de pimenteira ornamental (*Capsicum annuum* L.)**. 2012. 51 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.
- BEESELEY, L.; MARMIROLI, M. The immobilisation and retention of soluble arsenic, cadmium and zinc by biochar. **Environmental Pollution**, v.159, p.474-480, 2011.
- BIAN, R.; JOSEPH, S.; CUI, L.; PAN, G.; LI, L.; LIU, X.; ZHANG, A.; RUTLIDGE, H.; WONG, S.; CHIA, C.; MARJO, C.; GONG, B.; MUNROE, P.; DONNE, S. A three-year experiment confirms continuous immobilization of cadmium and lead in contaminated paddy field with biocharamendment. **Journal of Hazardous Materials**, v.272, p.121-128, 2014.
- BUFFA FILHO, WALDEMAR et al. Indução de Metabólitos Bioativos em Culturas de Células de *Maytenus ilicifolia*. **Eclét. Quím.**, São Paulo, v. 27, nesp., p. 403-416, 2002.
- BUTNAN, S.; DEENIK, J.L.; TOOMSAN, B.; ANTAL, M.J.; VITYAKONA, P. Biochar characteristics and application rates affecting corn growth and properties of soils contrasting in texture and mineralogy. **Geoderma**, v. 237, p.105-116, 2015.
- DI LONARDO, S.; VACCARI, F.P.; BARONTI, S.; CAPUANA, M., BACCI, L.; SABATINI, F.; LAMBARDI, M.; MIGLIETTA, F. Biochar successfully replaces activated charcoal for *in vitro* culture of two white poplar clones reducing ethylene concentration. **Plant Growth Regul**, v. 69, n. 1, p. 43-50, 2013.
- DONINI, LORENA PASTORINI; FIGUEIREDO, GEÓRGEA SOARES; SCHUCH, MÁRCIA WULFF. Nitrato de prata e diferentes tipos de vedação na multiplicação *in vitro* de oliveira 'Arbequina'. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 9, p. 1532-1535, 2011.
- FIROOZABADY, E.; HECKERT, M.; GUTTERSON, N. Transformation and regeneration of pineapple. **Plant Cell Tiss Org**, v. 84, p. 1–16, 2006.
- FREE, H. F.; MCGILL, C. R.; ROWARTH, J. S.; HEDLEY, M. J. The effect of biochars on maize (*Zea mays*) germination. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 53, n. 1, p.1-4, 2010.
- GALDIANO JUNIOR, R. F. Crescimento *in vitro* e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) com c arvão ativado sob dois espectros luminosos. **Cienc. Rural.**, Santa Maria., v. 42, n. 5, p. 801-807, 2012.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. Plant propagation by tissue culture. Basingstone. **Exegetics**, p. 709, 1984.
- GLASER, B.; LEHMANN, J.; ZECH, W. Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with charcoal: a review. **Biology Fertility of Soils**, v. 35, n. 4, p. 219-230, 2002.

- GUZMÁN, P.; ECKER, J.R. Exploiting the triple response of Arabidopsis to identify ethylene-related mutants. **Plant Cell**, n. 2, p. 513–523, 1990.
- HAZARIKA, B.N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Sci. Hort.** 108p. 105-120, 2006.
- HORNER, M.; MCCOMB, J. A.; MCCOMB, A.J.; STREET, H. E. Ethylenecproduction and plantlet formation by Nicotiana anthers cultured in the presence and absence of charcoal. **J. Exp. Bot.**, v. 28, p. 1365–1372, 1977.
- HUSSAIN, A.; QARSHI, I.A.; NAZIR, H.; ULLAH, I. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. In: **Recent advances in plant *in vitro* culture**. InTech, p 1–28, 2012.
- IAREMA, L. CRUZ, A. C. F.; SALDANHA, C. W.; DIAS, L. L. C.; VIEIRA, R. F.; OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C. Photoautotrophic propagation of Brazilian gingseng [*Paffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell Tiss Organ Cult.**, v. 10, p. 227 - 238, 2012.
- KERBAUY, G. B. *Fisiologia Vegetal*. Ed. **Guanabara Koogan**, São Paulo-SP, p. 452. 2004.
- KOOKANA, R. S.; SARMAH, A. K.; VAN ZWIETEN, L.; KRULL, E.; SINGH, B. Biochar Application to Soil: Agronomic and Environmental Benefits and Unintended Consequences Advances. In D. L. Sparks (Ed.), **Advances in Agronomy**, p.103-143, 2011.
- KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation - Environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, 10 p. 188-204, 2010.
- LEHMANN, J.; JOSEPH, S. (eds.). Biochar for Environmental Management: **Science and Technology**. Earthscan, London & Sterling, VA., p. 416, 2009.
- LEHMANN, J.; RILLIG, M. C.; THIES, J.; MASIELLO, C. A.; HOCKADAY, W. C.; CROWLEY, D.; LEE, RD.; MORRIS, LA. FISHER. Biochar effects on soil biota- A review. **Soil Biol**, Biochem, v. 43, p.1812–1836, 2011.
- LU, K.; YANG, X.; SHEN, J.; ROBINSON, B.; HUANG, H.; LIU, D.; BOLAN, N.; PEI, J.; WANG, H. Effect of bamboo and rice straw biochars on the bioavailability of Cd, Cu, Pb and Zn to *Sedum plumbizincicola*. **Agric. Ecosyst. Environ.**, n. 191, p.124-132, 2014.
- MARINO, G.; BERARDI, G. Different sealing materials for petri dishes strongly affect shoot regeneration and development from leaf explants of quince 'BA29'. **In vitro Cell Dev Biol Plant.**, v. 40, p. 384 – 388, 2004.
- MENSUALI-SODI, A.; PANIZZA M.; SERRA, G.; TOGNONI, F. Involvement of activated charcoal in the modulation of abiotic and biotic ethylene levels in tissue-cultures. **Sci Hortic**, v. 54, p. 49–57,1993.
- MOHAMED, M. A. H.; ALSADON, A. A. Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. **Sci Hort.**, 123, p. 295-300, 2010.
- MOHAMED, M.A.H.; ALSADON, A.A. Effect of vessel type and growth regulators on micropropagation of *Capsicum annuum*. **Biologia Plantarum**, v. 55, p.370-374, 2011.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p.473- 479, 1962.
- NAING, A. H.; JEON, S. M.; HAN, J.; LIM, S. H.; LIM, K. B.; KIM, C. K. Factors influencing *in vitro* shoot regeneration from leaf segments of *Chrysanthemum*. **Comptes Rendus Biol.**, v. 337, n. 6, p. 383–390, 2014.
- NUNES, C.F; PASQUAL; SANTOS, D.N.; CUSTÓDIO, T.N; ARAUJO, A.G.D. Diferentes suplementos no cultivo *in vitro* de embriões de pinhão-manso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 9-14, 2008.

PARK, S. W.; JEON, J. H.; KIM, H. S.; PARLK, Y. M.; ASWATH, C.; JOUNG, H. Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. **Sci. Hort.**, v. 99, p.199 - 205, 2004.

PAZ-FERREIRO, J.; LU, H.; FU1, S.; MÉNDEZ, A.; GASCÓ, G. Use of phytoremediation and biochar to remediate heavy metal polluted soils: **a review. Solid Earth**, v. 5, p.65-75, 2014.

PRENDERGAST-MILLER, M.; DUVALL, M.; SOHI, S. Biochar-root interactions are mediated by biochar nutrient content and impacts on soil nutrient availability. **European Journal of Soil Science**, v. 65, 173–185, 2014.

RAJAPAKSHA, A.U.; CHEN, S.S.; TSANG, D.C.W.; ZHANG, M.; VITHANAGE, M.; MANDAL S, et al. Engineered/designer biochar for contaminant removal/immobilization from soil and water: potential and implication of biochar modification. **Chemosphere**, v. 148, p.276–91, 2016.

RAJKOVICH, S.; ENDERS, A.; HANLEY, K.; HYLAND, C.; ZIMMERMAN, A. R.; LEHMANN, J. Corn growth and nitrogen nutrition after additions of biochars with varying properties to a temperate soil. **Biol. Fertil. Soils**, v. 48, p. 271-284, 2012 .

RIZWAN, M.; Ali, S.; QAYYUM, M. F.; IBRAHIM, M.; ZIA-UR-REHMAN, M.; ABBAS, T.; OK, Y. S. Mechanisms of biochar-mediated alleviation of toxicity of trace elements in plants: a critical review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 2230-2248, 2016.

RODRIGUES, Filipe Almendagna; REZENDE, Renata Alves Lara Silva; PASQUAL, Moacir; LOPES, Maria Teresa Gomes. Solidifying agents and activated charcoal for *in vitro* culture of *Solanum sessiliflorum*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 52, n.11, p.1123-1126, 2017.

SÁ, A. J.; LÉDO, A. S.; LÉDO, C. A. S.; PASQUAL, M.; SILVA, A. V. C.; SILVA JUNIOR, J. F. Sealing and explant types on the mangaba micropropagation. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 4, p. 406-414, 2012.

SANTANA, J. R. F.; PAIVA, R.; SOUZA, A. V.; OLIVEIRA, L. M. Effect of different culture tube caps and concentrations of activated charcoal and sucrose on *in vitro* growth and budding induction of *Annona glabra* L. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 5, p. 916-923, 2011.

SHA VALLI, K. P. S.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. **Biol Plant**, v. 46, p. 161 – 166, 2003.

SILVA, I. C. B.; BASILIO, J. J. N.; FERNANDES, L. A.; COLEN, F.; Sampaio, R. A. ; FRAZAO, L. A. . Biochars from different residues on soil chemical properties and common bean production. **SCIENTIA AGRICOLA**, v. 74, p. 378-382, 2017.

SONG, Y.; WANG, F.; BIAN, Y.; KENGARA, F.O.; JIA, M.; XIE, Z, JIANG, X. Bioavailability assessment of hexachlorobenzene in soil as affected by wheat straw biochar. **Journal of Hazardous Materials**, v. 217-218, p. 391–397, 2012.

SOPEÑA, F.; SEMPLE, K.; SOHI, S.; BENDING, G. Assessing the chemical and biological accessibility of the herbicide isoproturon in soil amended with biochar. **Chemosphere**, v. 88, n. 1, p. 77–83, 2012.

SPOKAS, K.A.; BAKER, J.M.; REICOSKY, D.C. Ethylene: potential key for biochar amendment impacts. **Plant and Soil**, v. 333, n. 1-2, p. 443–452, 2010.

STEINITZ, B.; BARR, N.; TABIB, Y.; VAKNIN, Y.; BERNSTEIN, N. Control of *in vitro* rooting and plant development in *Corymbia maculata* by silver nitrate, silver thiosulfate and thiosulfate ion. **Plant Cell Reports**, v. 29, p.1315-1323, 2010.

TANG, J.; ZHU, W.; KOOKANA, R.; KATAYAMA, A. Characteristics of biochar and its application in remediation of contaminated soil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.116, p. 653-659, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TSAY, H.; LEE, C.; AGRAWAL, D. C.; BASKRE, S. Influence of ventilation closure, gelling agente and explant type on shoot bud proliferation and hyperhydricity in *Scrophularia yoshimurae* – a medicinal plant. **In vitro Cell Dev Biol**, v. 42 p.445 – 449, 2006.

USEPA. **Method 3050B**: acid digestion of sediments, sludges, and soils. Revision 2. Washington, DC, p-12, 1996.

VIGER, M.; HANCOCK, R. D.; MIGLIETTA, F.; TAYLOR, G. More Plant Growth but Less Plant Defence? First Global Gene Expression Data for Plants Grown in Soil Amended with Biochar. **GCB Bioenergy**, v. 7, p. 658-672, 2014.

WAIKHOM, S. D.; LOUIS, B. An effective protocol for micropropagation of edible bamboo species (*Bambusa tulda* and *Melocanna bacifera*) through nodal culture. **Sci Word J.**, v. 2014, [8] p., 2014.

WANG, F.; J.I., R.; JIANG, Z.; CHEN, W. Species-dependent effects of biochar amendment on bioaccumulation of atrazine in earthworms. **Environmental Pollution**, v. 186, p. 241-247, 2014.

XIANG, Y.; DENG, Q.; DUAN, H.; GUO, Y. Effects of biochar application on root traits: a meta-analysis. **GCB Bioenergy**, v. 9, n. 10, p.1563–1572, 2017.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, p.149-158, 2011.