

Posição dos explantes na multiplicação *in vitro* de mirtilheiro cultivar O'neal

Position of explants during in vitro multiplication of blueberry cv. O'neal

¹Anal Luiza Arruda, ²Samila Camargo, ³Adrik Francis Richter, ⁴Fernanda Grimaldi, ⁵Gabriela Maciel Paiano, ⁶Priscila Santos da Silva, ⁷Aike Anneliese Kretzschmar

Resumo: O mirtilo (*Vaccinium* spp) tem despertado grande interesse dos produtores e consumidores devido, principalmente, às propriedades antioxidantes e de combate aos radicais livres que a fruta contém. Alguns fatores dificultam a expansão da fruta no Brasil, e um dos principais é a falta de mudas, devido a dificuldades de propagação de algumas cultivares. A propagação *in vitro* para o cultivo de mirtilo tem se mostrado uma boa alternativa para a produção de mudas da planta, sendo possível a obtenção de um grande número de mudas sadias em um curto espaço de tempo. O objetivo deste estudo foi avaliar a posição do explante no meio de cultura na multiplicação *in vitro* de mirtilheiro da cultivar O'neal. O experimento foi realizado no Laboratório de Micropropagação Vegetal (LMV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/UFSC). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, totalizando 2 tratamentos com 6 repetições por tratamento e 5 explantes por frasco. Após 45 dias de instalação do experimento foram avaliados: comprimento do maior broto, número de brotação, número de folhas, calos e mortos. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, e os tratamentos comparados estatisticamente pelo teste de Duncan à 5% de significância. O maior número de brotações, comprimento do maior broto e o número de folhas foram obtidos com o explante na orientação horizontal no meio de cultura. Não houve diferença significativa quanto à orientação vertical e horizontal do explante no meio de cultura para a presença de calos e o número de explantes mortos. Conclui-se que o explante inserido horizontalmente no meio de cultura influencia as principais variáveis responsáveis pela multiplicação dos mesmos.

Palavras Chave: *Vaccinium* spp; propagação *in vitro*; posição.

Abstract: The blueberry (*Vaccinium* spp) has provoked great interest of farmers and consumers due mainly to the antioxidant and anti-free radicals properties that the fruit contains. Some factors make the fruit expansion in Brazil hard, and one of the main factors is the lack of plants, due to propagation difficulties of some cultivars. The *in vitro* propagation for blueberry has been shown to be a good alternative for the production of plants, making it possible to obtain a large number of healthy plants in a short period of time. The objective of this study was to evaluate the position of the explant in the culture medium during the *in vitro* multiplication of blueberry, cultivar O'neal. The experiment was developed at the Plant Micropropagation Laboratory (LMV) of the

Santa Catarina State University (CAV / UDESC). The design was completely randomized, totaling 2 treatments with 6 replicates per treatment and 5 explants per flask. After 45 days of the experiment were evaluated: length of largest shoot, number of shoots, number of leaves, calluses and death of plants. The results were submitted to analysis of variance, and the treatments were compared statistically by the Duncan test at 5% of significance. The largest number of shoots, length of the largest shoot and number of leaves were obtained with the explant in the horizontal orientation in the culture medium. There was no significant difference in the vertical and horizontal orientation of the explant in the culture medium for the presence of calluses and the number of dead explants. It is concluded that the explant inserted horizontally in the culture medium influences the main variables responsible for their multiplication.

Keywords: *Vaccinium spp; in vitro propagation; position*

1. INTRODUÇÃO

O mirtilo pertence à família *Ericaceae*, subfamília *Vaccinoidea*, gênero *Vaccinium* (RASEIRA, 2006) e apresenta um grande número de espécies (FONSECA & OLIVEIRA, 2007). É um dos frutos que compõe o grupo dos chamados pequenos frutos, juntamente com a amora-preta, a framboesa e o morango, que apresenta a maior área cultivada no Brasil (ANTUNES, 2005).

Há muitas expectativas com o cultivo do mirtilo nos países do Hemisfério Sul, principalmente devido à época de colheita ocorrer concomitantemente com a plena entressafra dos países que são os maiores produtores mundiais (SANTOS, 2004).

Na região sul do Brasil, a cultura do mirtilo vem sendo considerada uma nova possibilidade na área de fruticultura, e isso se deve principalmente as suas propriedades nutracêuticas, alta rentabilidade, baixa utilização de insumos e facilidade de produção limpa, preservando o ambiente e a segurança alimentar (SANTOS & RASEIRA, 2002).

Porém, uma das principais dificuldades encontradas pelos produtores é a aquisição de mudas, a qual é limitada pela baixa disponibilidade, qualidade e elevado preço, resultantes da dificuldade de propagação da maioria das cultivares (PAGOT & HOFFMANN, 2003).

A micropropagação é uma técnica que vem sendo utilizada com eficientes resultados para a produção de mudas de mirtilo no Uruguai. De acordo com os mesmos autores, o método permite a obtenção de grande quantidade de plantas utilizando pequena quantidade de material vegetal original, restringindo ou

minimizando o problema causado pela baixa oferta de mudas, que se constitui em um dos principais entraves para a expansão da cultura. (CASTILLO et al, 2004).

Durante a multiplicação *in vitro*, alguns tratamentos podem ser dados aos explantes para estimular uma maior proliferação (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Vieitez et al. (1993) obtiveram uma eficiente produção de brotações em *Quercus rubra*, combinando três tratamentos que favoreceram o crescimento das gemas laterais: excisão do ápice, cultivo na orientação horizontal e tratamento com citocininas.

A posição do explante sobre o meio de cultura parece desempenhar função importante na calogênese e organogênese. Os autores ainda destacam que os explantes inoculados *in vitro* exibem polaridade na proliferação celular e na morfogênese, que por sua vez estão relacionados com a posição e/ou orientação em que o órgão ou tecido tem na planta intacta e, também sua orientação dentro do recipiente de cultivo (SANTOS et al., 2009).

Aliado a isso e a importância e necessidade de mudas de mirtilheiro com qualidade, busca-se com técnicas apropriadas e específicas oriundas da micropropagação, acelerar o processo de produção do material vegetal, já que em geral, diversas cultivares de mirtilo apresentam um crescimento lento mesmo na técnica de cultivo *in vitro*, quando comparadas com outras espécies frutíferas.

Diante do exposto, objetivou-se neste estudo avaliar o crescimento de explantes de mirtilheiro cultivar O'neal, durante a fase de multiplicação *in vitro*, em função da posição do explante (horizontal ou vertical) no meio de cultura já protocolado para a espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório de Micropropagação de Plantas, do Centro de Ciências Agroveterinárias CAV/UDESC, em Lages/SC.

Utilizou-se como fonte de explantes partes aéreas previamente estabelecidas e multiplicadas *in vitro* de mirtilheiro cultivar O'neal.

O meio de cultura utilizado foi o WPM - Wood Plant Medium (Lloyd e Mc Cown, 1981) suplementado com 2 mL L⁻¹ de 2iP, 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de

inositol e o pH ajustado para 4,8 antes da adição de 6 g L⁻¹ de ágar. Posteriormente, o meio de cultura foi autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos.

Os explantes padronizados com quatro folhas e aproximadamente 2 cm, foram inoculados no meio de cultura em duas orientações: 1) horizontalmente sobre a superfície do meio de cultura e 2) verticalmente, na posição normal, com a extremidade basal do segmento inserido no meio de cultura. Após a inoculação, os frascos contendo os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob um fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2°C e radiação de 27 μmol.m⁻².s⁻¹.

Dessa forma, o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, para a cultivar O^oneal com dois tratamentos com seis repetições cada e cinco explantes por frasco totalizando uma unidade experimental de 60 explantes.

Após 45 dias as variáveis analisadas foram: comprimento da maior brotação, número de brotações, número de folhas, calos e mortos. Os dados foram transformados em $\sqrt{x + 1}$, onde x representa o dado obtido. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e quando significativos os tratamentos foram comparados pelo teste de Duncan com auxílio do programa estatístico Assistat versão 7.7.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se diferença significativa para as variáveis número de brotações, número de folhas e comprimento do maior broto em relação à posição em que o explante foi inserido no meio de cultura.

As maiores médias para número de brotação (4,16), número de folhas (29,33) e comprimento do maior broto (2,63) foram obtidas nas plantas inseridas horizontalmente no meio de cultivo, diferindo dos explantes inoculados na orientação vertical conforme indicado pela tabela 1.

Tabela 1. Média do número de brotações e folhas, comprimento da maior brotação, presença de calos e explantes mortos de mirtilheiro cultivar “O’neal” inseridos de forma horizontal ou vertical no meio de cultura

Posição do Explante	Variáveis				
	Número de brotações	Número de Folhas	Comprimento do maior broto (cm)	Calos	Explantes mortos
Horizontal	4,16 a*	29,33 a*	2,63 a*	1,12ns	1,12ns
Vertical	1,16 b	10,33 b	0,55 b	1,07	1,14
CV (%)	30,55	32,00	20,96	22,16	23,00

*Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Duncan. ^{ns}: não significativo

Destaca-se a importância de avaliação e obtenção de resultados positivos das três variáveis citadas, já que representam a capacidade propagativa dos explantes nos tratamentos estudados e conseqüentemente, uma maior multiplicação dos mesmos.

Erig & Schuch (2002) observaram que na multiplicação do portaenxerto de macieira Marubakaido o número de brotações aos quarenta dias de cultivo foi maior nos explantes posicionados na orientação horizontal (5,81), quando comparado ao obtido para orientação vertical (3,78). Diversos autores afirmam que os explantes posicionados horizontalmente são mais eficientes por possibilitar um maior contato do explante com o meio de cultura, o que favorece a absorção dos componentes disponíveis (Erig & Schuch, 2002; Silva et al., 2005; Pereira et al., 2006; Erig & Schuch, 2006; Santos et al., 2009). Esta superioridade também está relacionada à quebra da dominância apical induzida pelo ápice vegetativo porque inibe a translocação das auxinas, cujo transporte é polar na planta e, dessa forma, estimula o crescimento das gemas laterais (Erig & Schuch, 2006; Santana et al., 2009).

A fim de verificar mais facilmente os dados apresentados na tabela 1, os mesmos são demonstrados em formato de figura, tanto para as variáveis que diferiram entre si (Figura 1) e além disso, onde os posicionamentos horizontal ou vertical do explante no meio de cultivo proporcionaram resultados estatisticamente iguais (desenvolvimento de calos e número de explantes mortos), demonstrados na figura 2.

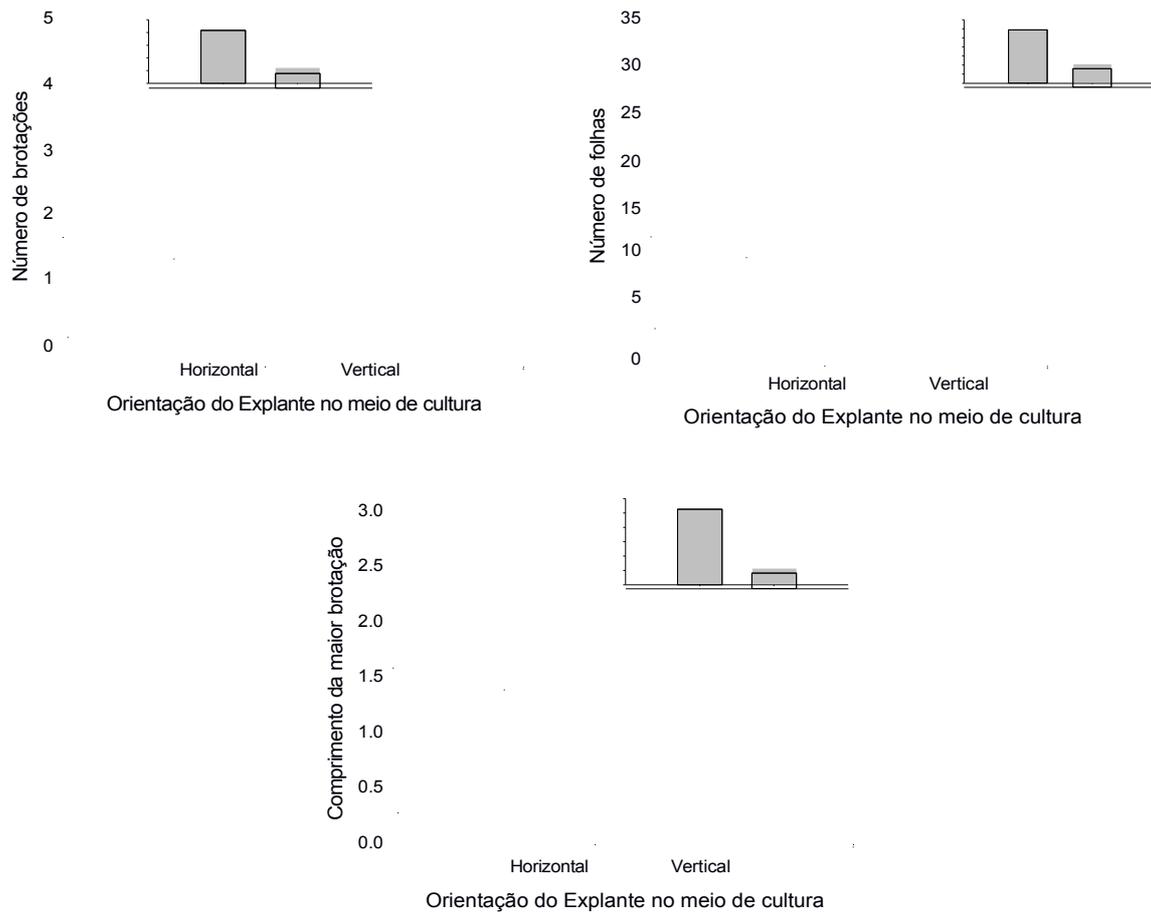


Figura 1. Comprimento do maior broto (cm) e número de brotos e folhas em explantes de mirtilheiro cv. O'neal, durante a fase de multiplicação *in vitro*, em contanto vertical ou horizontal com o meio de cultura.

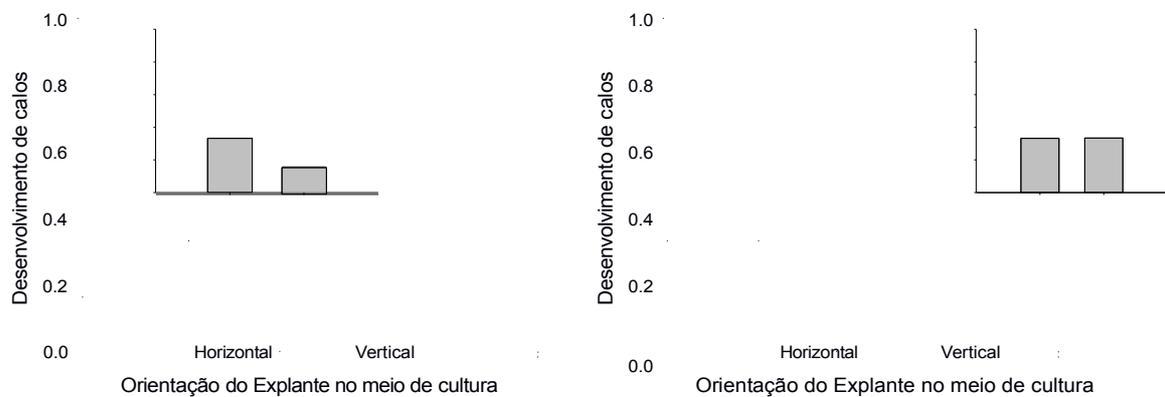


Figura 2. Desenvolvimento de calos e número de explantes mortos de mirtilheiro cv. O'neal, durante a fase de multiplicação *in vitro*, em contanto vertical ou horizontal com o meio de cultura. Como verificado na figura 2, os tratamentos não influenciaram nas variáveis presença de calos e número de explantes mortos. Diferente do esperado no delineamento desta pesquisa, quando os explantes foram inoculados ao meio de cultura de forma horizontal, não diferiram daqueles mantidos verticalmente. Esse resultado se torna bastante interessante, pois a maior área do explante em contato ao meio de cultivo e conseqüentemente, ao regulador de crescimento utilizado, tende a facilitar o desenvolvimento de calogênese, característica essa, que não é indicada quando busca-se a multiplicação dos propágulos, como no caso desse estudo.

4. CONCLUSÕES

A posição da inoculação de explantes de mirtilheiro „O'neal" influencia na multiplicação *in vitro*.

Explantes em contato com o meio de cultura horizontalmente, proporcionam um maior número de brotos e folhas e um maior comprimento de brotação, quando comparados com os inoculados verticalmente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, L. E. C. Potencial de produção de pequenas frutas em diferentes regiões do sul do Brasil. In: Encontro Nacional de Fruticultura de Clima Temperado, 8., 2005, Fraiburgo. **Anais...** Caçador: Epagri, 2005.360 p. p.61-62.

CASTILLO, A.; CARRAU, J.S.F.; LEONI, C.; PEREIRA, G. Investigación en arandanos en Uruguay: propagación *in vitro* y evaluación de variedades por INIA. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 2.; ENCONTRO DE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS, 1., 2004, Pelotas, RS. **Palestras e Resumos...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. p.225-228. (Documentos 124)

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Fatores que afetam a multiplicação *in vitro* de Mirtilo. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 7, n. 1-2, p. 83-88, 2006.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Multiplicação in vitro do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido: efeito da orientação do explante no meio de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 293-295, 2002.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Journal Combined Proceedings Plant Propagators' Society**, v. 30, p. 421-427, 1980.

PAGOT, E.; HOFFMANN, A. Produção de pequenas frutas no Brasil. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 2003, Vacaria, RS.

Anais... Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. p.9-17. (Documentos 37).

PEREIRA, F.D.; PINTO, J.E.B.P.; RODRIGUES, H. C. de A.; ROSADO, L.D.S.; BEIJO, L.A.; LAMEIRA, O.A. Proliferação in vitro de brotação de curauá utilizando diferentes volumes de meio. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v.2, n.2, p.53-106, 2006.

RASEIRA, M.C.B. Descrição da planta, melhoramento genético e cultivares. In: RASEIRA, M.C.B.; ANTUNES, L.E.C. **Sistemas de Produção – Cultivo do Mirtilo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. 99 p.

SANTANA, J. R. F.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M.; LIMA-BRITO, A.; PEREIRA, F. D.; NEPOMUCENO, C. F. Influence of explant polarity on morphogenesis responses of *Annona squamosa* L. cultivated in vitro. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, Feira de Santana, v. 9, n. 4, p. 263-268, 2009.

SANTOS, A. M. Situação e perspectivas do mirtilo no Brasil. In: Simpósio Nacional do Morango, 2., e Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercossul, 1. **Palestras ...** p.282-285, 2004. CD-room.

SANTOS, A. M.; RASEIRA, M. C. B. **A cultura do mirtilo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2002. 30 p.

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; BARBOSA, S.; PAIVA, P. D. de O.; VARGAS, D. P.; MARTINOTTO, C. Crescimento in vitro de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* A. St.- Hil.): influência da polaridade e luminosidade. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v. 5, n. 1, p. 19-26, 2009.

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; BARBOSA, S.; PAIVA, P. D. de O.; VARGAS, D. P.; MARTINOTTO, C. Crescimento in vitro de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* A. St.- Hil.): influência da polaridade e luminosidade. **Plant Cell Culture Micropropagation**, Lavras, v. 5, n. 1, p. 19-26, 2009.

SILVA, R. P. da; COSTA, M. A. P. de C.; SOUZA, A. da S.; ALMEIDA, W. A. B. de. Regeneração de plantas de laranja „Pêra“ via organogênese in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 12, p. 1153-1159, 2005.