

MULTIPLICAÇÃO FOTOAUTOTRÓFICA DE MIRTILO ATRAVÉS DO USO DE LUZ NATURAL¹

CLÁUDIA ROBERTA DAMIANI² & MÁRCIA WULFF SCHUCH³

RESUMO - Com o objetivo de minimizar os custos da multiplicação *in vitro* convencional de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) e otimizar a produção de mudas micropropagadas desta espécie, este trabalho comparou o efeito da luz natural à artificial, através do cultivo dos explantes em diferentes locais de crescimento (casa de vegetação e sala de crescimento), durante duas estações do ano: verão e inverno, bem como o efeito de diferentes concentrações de sacarose adicionadas ao meio de cultura e diferentes tipos de vedação dos frascos de cultivo. Aos 60 dias de multiplicação *in vitro*, foram avaliados o número médio de brotações, o número médio de folhas, o comprimento médio das brotações, a taxa de multiplicação e a massa fresca total. Através dos resultados obtidos, verificou-se que o uso de diferentes materiais na vedação dos frascos não altera o comprimento das brotações, porém promove diferentes respostas na taxa de multiplicação, no número médio de folhas e, principalmente, na quantidade de massa fresca total. Explantes desenvolvidos em frascos fechados com filme plástico ou alumínio aumentam o número de folhas e a taxa de multiplicação. Por outro lado, explantes desenvolvidos em frascos fechados com algodão e em condições fotoautotróficas aumentam em grande escala a quantidade de massa fresca total. Em condições de micropropagação convencional, a adição de 15 g.L⁻¹ de sacarose ao meio de cultura favorece o aumento do número de folhas, a taxa de multiplicação, a massa fresca total e o desenvolvimento das brotações; no entanto, para a maioria das variáveis, não há diferença significativa do cultivo em ausência de sacarose. O desenvolvimento dos explantes, em diferentes locais de crescimento e em diferentes épocas do ano, apresenta respostas distintas em função da variável analisada.

Termos para indexação: *Vaccinium ashei*, fechamento dos frascos, casa de vegetação, sacarose.

PHOTOAUTOTROPHIC MULTIPLICATION OF BLUEBERRY BY USING NATURAL LIGHT

ABSTRACT- Aiming to minimize the costs of *in vitro* conventional multiplication of blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) and to optimize the production of micropropagated seedlings of this particular species, this work compared the effect between natural and artificial light by cultivating the explants in different growth places (greenhouse and growth room). Also, it was tested two seasons: summer and winter, as well as the effect of different sucrose concentrations added to the culture environment and different types of flasks sealing. During the 60 days of *in vitro* multiplication, it was assessed the average shoot number, multiplication rate and total fresh matter. It was verified that the use of different materials for sealing does not alter the shoot length; however, it promotes different performances on multiplication rate, on the average leaves number and mainly on the amount of total fresh matter. Explants grown in flasks closed with plastic film or aluminum increase the number of leaves and the multiplication rate. On the other hand, explants grown in flasks closed with cotton and under photoautotrophic conditions increase in great scale the amount of total fresh matter. Under conventional conditions of micropropagation the addition of 15 g.L⁻¹ sucrose to the culture environment favors the increase of leaves number, the multiplication rate, the total fresh matter and the shoot development. Nevertheless, for most of the variables the addition did not differ significantly from the cultivation in sucrose absence. The explants growth, under different growth places and year time, showed different performances regarding to the analyzed variable.

Index Terms: *Vaccinium ashei*, flasks closure, greenhouse, sucrose.

¹(Trabalho 175-07). Recebido em: 19-07-2007. Aceito para publicação em: 29-02-2008. Apoio: MCT, CNPq e FAPERGS.

²Bióloga, Dra., Bolsista DTI/CNPq. Laboratório de Micropropagação de Plantas frutíferas. Email: claudami2004@yahoo.com.br.

³Engenheira Agrônoma, Dra., Professora do Departamento de Fitotecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM)/Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Caixa Postal 354, CEP 96.010-900, Pelotas-RS. E-mail: marciaws@ufpel.tche.br. Pesquisadora CNPq.

INTRODUÇÃO

O mirtilo (*Vaccinium spp.*), pertencente à família Ericaceae, é uma fruta de clima temperado, que vem sendo pesquisada e produzida no Sul do Brasil, como uma nova alternativa na área de fruticultura. No entanto, uma das principais dificuldades encontradas pelos produtores é a obtenção 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). Para suprir estas dificuldades e oferecer aos produtores mudas com maior qualidade fitossanitária, a micropropagação *in vitro* vem sendo uma técnica utilizada com eficientes resultados. Em comparação às técnicas de propagação tradicional, a micropropagação apresenta significativas vantagens, entre as quais, a possibilidade de propagar rapidamente em larga escala novos genótipos, obter plantas livres de doenças e propagar vegetativamente espécies difíceis de serem propagadas por outros métodos. Entretanto, para que a aplicação da micropropagação na fruticultura se torne viável comercialmente e possa competir com os métodos tradicionais de propagação (estaquia, enxertia, mergulhia), é necessária a redução dos seus custos de produção (Altman, 1999).

A maioria dos fatores relacionados ao custo de produção das plantas micropropagadas está direta ou indiretamente ligada à natureza heterotrófica ou fotomixotrófica de crescimento das plantas na micropropagação convencional (Kozai & Kubota, 2001), onde os explantes são cultivados em frascos sem que ocorra troca gasosa, com alta umidade relativa do ar, alta concentração de etileno, baixa concentração de CO₂, baixa densidade de fluxo de fótons fotossintéticos e com sacarose como maior fonte de energia metabólica (Arigita et al., 2002). Explantes desenvolvidos sob este regime heterotrófico originam plantas com elevado conteúdo de água, com grande risco de desidratação e morte durante a aclimatização (Kubota & Kozai, 1992) ou com desordens anatômicas e fisiológicas que não possibilitam que a maquinaria fotossintética opere normalmente (Arigita et al., 2002). No entanto, muitos explantes ou plantas *in vitro* possuem a habilidade de se desenvolver de forma fotoautotrófica, sem sacarose no meio de cultura e sob condições ambientais que promovam a fotossíntese (Kozai, 1991). De acordo com Afreen et al. (2002), a micropropagação fotoautotrófica, além de aumentar o crescimento dos explantes *in vitro*, também minimiza os riscos de contaminação microbiana, reduz os custos de produção, melhora as características fisiológicas e facilita a aclimatização das plantas às condições *ex vitro*. Segundo Erig & Schuch (2005), o desenvolvimento de sistemas de micropropagação fotoautotrófica surge como possibilidades potenciais para aumentar a eficiência da micropropagação e auxiliar na redução de seus custos, viabilizando-a comercialmente.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade técnica da micropropagação fotoautotrófica de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade), cultivar Delite, com o uso de luz natural no inverno e verão, locais de crescimento, diferentes tipos de vedação dos frascos de cultivo, bem como diferentes

concentrações de sacarose, visando a reduzir os custos da multiplicação *in vitro* convencional e a favorecer a produção de mudas desta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em duas estações do ano, no período de inverno (julho/agosto de 2006) e verão (dezembro/janeiro de 2006-7), no Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas e na casa de vegetação pertencente ao Departamento de Fitotecnia, FAEM/UFPEL, Pelotas-RS. Foram utilizados como explantes segmentos com três gemas e folhas, sem o ápice caulinar de mirtilo (*Vaccinium ashei*) cv. Delite, cultivada *in vitro*. O meio de cultura utilizado foi WPM (Wood Plant Media – Loyd & McCown, 1980), adicionado de sacarose (conforme tratamento), mioinositol (100 mg.L⁻¹), 2iP (5 mg.L⁻¹) e ágar (6 g.L⁻¹). O pH foi ajustado para 5,0 antes da adição do ágar. O meio de cultura distribuído em Erlenmeyers, com capacidade de 250 mL, contendo 50 mL de meio cada, foi autoclavado à 120°C e 1,5 atm por 20 minutos. Os tratamentos consistiram das duas estações do ano, de três concentrações de sacarose (0; 15 e 30 g.L⁻¹), três tipos de vedação dos frascos (filme plástico, alumínio e algodão) e dois diferentes locais de crescimento: sala de crescimento (16 horas de fotoperíodo, densidade de fluxo de fótons no período de luz de 42 μmol.m⁻².s⁻¹ e temperatura de 25 ± 2°C) e casa de vegetação (luz natural e temperatura de 25 ± 2°C obtida através do uso de condicionador de ar acoplado a um sensor de temperatura, promovendo o aquecimento ou resfriamento do ambiente). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, fatorial 2x3x3x2, com quatro repetições por tratamento. Cada repetição constituiu-se de um frasco com cinco explantes. Aos 60 dias de cultivo, foram avaliados o número médio de folhas, o número médio de brotos por explante, o comprimento médio das brotações, a taxa de multiplicação e a massa fresca total. O número de folhas, número de brotos e a taxa de multiplicação foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$, e após a análise de variância as médias foram comparadas pelo teste de Duncan (p ≤ 0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A multiplicação dos explantes em condições fotoautotróficas (luz natural e ausência de sacarose) não alterou o comprimento médio das brotações, pois os resultados obtidos não diferiram estatisticamente daqueles obtidos pelo método convencional (presença de sacarose e luminosidade controlada). Da mesma forma, o cultivo em diferentes épocas do ano e o uso de diferentes tipos de vedação dos frascos não promoveu respostas significativas no comprimento das brotações. Para as variáveis número médio de folhas e taxa de multiplicação, verificou-se efeito isolado do tipo de vedação dos frascos, obtendo-se as maiores médias em explantes crescidos em frascos vedados com filme plástico, respectivamente, 7,67_a para número de folhas e 2,89_a para taxa de multiplicação, porém estes não diferiram estatisticamente do uso de alumínio (7,03_{ab} e 2,68_{ab}, respectivamente). Ao contrário do esperado, o fechamento com tampa de algodão, mesmo permitindo maiores trocas gasosas

quando comparado ao filme plástico e ao alumínio, apresentou resultados inferiores, obtendo-se 6,67h como média geral para o número de folhas e 2,56h para a taxa de multiplicação. De acordo com Grattapaglia & Machado (1998), o tipo de tampa utilizado tem grande influência no desenvolvimento da cultura, pois ela é que vai determinar o nível de trocas gasosas com o ambiente externo. Segundo os mesmos autores, o uso de polivinilcloreto (PVC), além de vedar a entrada de ácaros, trips e pulgões, fontes indesejáveis de contaminação nas salas de crescimento, favorece a penetração da luz em comparação com os outros tipos de tampas e em curtos ciclos de cultivo, reduz a vitrificação devido ao estímulo da transpiração, conseqüência da redução da fase gasosa do frasco por maior evaporação. Segundo Souza et al. (1999), o tipo de vedação dos frascos, além de interferir na passagem de luz para o interior dos frascos, altera a interceptação de luz pelos explantes, sua capacidade de transpiração e, devido à retenção de água, a quantidade de massa fresca.

Ainda com relação ao número médio de folhas e à taxa de multiplicação, observou-se interação tripla para ambas as variáveis, entre local de crescimento, época do ano e a concentração de sacarose (Fig. 1 A e B). Verificou-se que a adição de 30 g.L⁻¹ de sacarose no meio de cultura causa redução acentuada do número de folhas (Fig. 1 A), principalmente durante o verão, em condições de luminosidade natural e a redução de sacarose para 15 g.L⁻¹ aumenta o número de folhas, independentemente do local e da estação do ano, porém os valores obtidos nesta concentração não diferem estatisticamente do cultivo em ausência de sacarose, indicando que a adição da mesma não é necessária. Kubota & Tadokoro (1999), comparando a micropropagação fotoautotrófica e fotomixotrófica em tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), verificaram que o número de folhas por explante foi similar entre os dois sistemas; no entanto, quando cultivados fotoautotroficamente, as plântulas apresentavam maior vigor, e maior desenvolvimento de folhas e raízes.

Quanto à taxa de multiplicação, observou-se um comportamento similar ao número de folhas (Fig. 1 B). Explantes cultivados em meio livre de sacarose não apresentaram diferenças significativas na taxa de multiplicação quando cultivados em condições de luminosidade natural ou controlada, e nas duas estações do ano estudadas. Esses resultados concordam com os obtidos em *Paulownia fortunei* por Kozai & Kubota (2001), que, comparando as condições de crescimento fotomixotrófica e fotoautotrófica, verificaram que a taxa de multiplicação não foi influenciada pelas mesmas. Por outro lado, explantes de mirtilo cultivados na presença de sacarose e em alta concentração (30 g.L⁻¹), em ambas as estações do ano, demonstraram diminuição da taxa de multiplicação, principalmente durante o verão, em condições de luminosidade natural. Ao contrário dos resultados observados neste experimento, Kodym & Zapata-Arias (2001) verificaram que, em bananeira (*Musa* 'Grand Nain'), a taxa de multiplicação é altamente influenciada pelas estações do ano e condições de luminosidade. Os mesmos autores concluíram que o verão, por apresentar maiores intensidades luminosas e dias com longo fotoperíodo, promove significativo aumento da taxa de multiplicação, enquanto que o inverno, devido à baixa e

desfavorável luminosidade, causa um decréscimo na mesma.

Para a variável número médio de brotos por explante, houve também uma interação tripla entre a época do ano, o local de crescimento dos explantes e a concentração de sacarose. De acordo com os resultados obtidos (Fig. 2), somente durante o inverno e em explantes cultivados em sala de crescimento, a presença de sacarose no meio de cultura é importante, sendo obtido maior número de brotações na presença de 15 g.L⁻¹ de sacarose e decréscimo acentuado do número de brotações quando aumentada a concentração de sacarose para 30 g.L⁻¹. De acordo com Cao et al. (2003), a concentração ótima de sacarose no meio de cultura é espécie dependente. Os mesmos autores verificaram que, para a cultivar Georgiagem (*Vaccinium corymbosum* L.), pertencente ao grupo *Highbush*, a concentração ótima de sacarose no meio de cultura varia de 15 a 29 mM. No entanto, como observado neste experimento, para a maioria dos tratamentos, a presença de sacarose não influencia no desenvolvimento das brotações, principalmente durante o verão, onde os melhores resultados são verificados na ausência completa de sacarose e independentemente do local de crescimento. Estes resultados indicam que é possível realizar a multiplicação fotoautotrófica de mirtilo, utilizando luz natural e instalações simplificadas, como é o caso da casa de vegetação, bem como reduzir o índice de contaminação microbiana dos explantes, em virtude da remoção da sacarose do meio de cultura. De acordo com Hempel (1994), Zobayed et al. (2001) e Kozai et al. (2003), a micropropagação fotoautotrófica associada à luz natural, além de reduzir os custos de produção e os riscos de contaminação microbiana, também melhora as características fisiológicas e reduz o estresse da planta durante o processo de aclimatização, devido às condições ambientais de cultivo serem mais naturais quando comparado ao método convencional de propagação *in vitro*.

Quanto à massa fresca total, observou-se interação tripla entre local de crescimento, época do ano e concentração de sacarose (Fig. 3 A), e interação tripla entre tipo de vedação dos frascos, local de crescimento e concentração de sacarose (Fig. 3 B). Durante o verão, principalmente em explantes cultivados na casa de vegetação, ocorre um acentuado aumento da massa fresca, sendo superior aos demais tratamentos, tanto na ausência, quanto na presença de 15 g.L⁻¹ de sacarose (Fig. 3 A). Por outro lado, no inverno, explantes cultivados na casa de vegetação, provavelmente pela diminuição do fotoperíodo, necessitam de maiores concentrações de sacarose, observando-se aumento linear com a adição da mesma. Durante a micropropagação fotoautotrófica, devido à retirada da sacarose do meio de cultivo, faz-se necessário aumentar a concentração de CO₂ e a intensidade luminosa, de forma a favorecer a fotossíntese e o acúmulo de matéria seca. De acordo com Kozay & Nguyen (2003) e Santana et al. (2003), o fechamento dos frascos de cultivo com filtros permeáveis a gases ou tampas de algodão pode favorecer as trocas gasosas, aumentando a concentração de CO₂ e, simultaneamente, reduzindo a umidade relativa e a concentração de etileno. Esses resultados confirmam os dados obtidos neste experimento com relação à matéria fresca total, onde foi observado que, em explantes cultivados em meio sem a adição

de sacarose, o fechamento dos frascos com algodão promoveu um significativo aumento da matéria fresca (Fig. 3 B). Por outro lado, o fechamento dos frascos com algodão, concomitantemente ao aumento da sacarose, e o cultivo em sala de crescimento causaram uma drástica redução da matéria fresca. O fechamento dos frascos com alumínio ou filme plástico apresentou resultados semelhantes em ambos os locais de crescimento, verificando-se

que, na ausência de sacarose, existe uma baixa produção de massa fresca, sendo necessária a adição de sacarose. De modo geral, observou-se que, em condições de cultivo fotoautotrófico, o uso de algodão no fechamento dos frascos promove o aumento da matéria fresca, enquanto, na micropropagação convencional, maior quantidade de matéria fresca é obtida usando alumínio e a adição de 15 g.L⁻¹ de sacarose no meio de cultura.

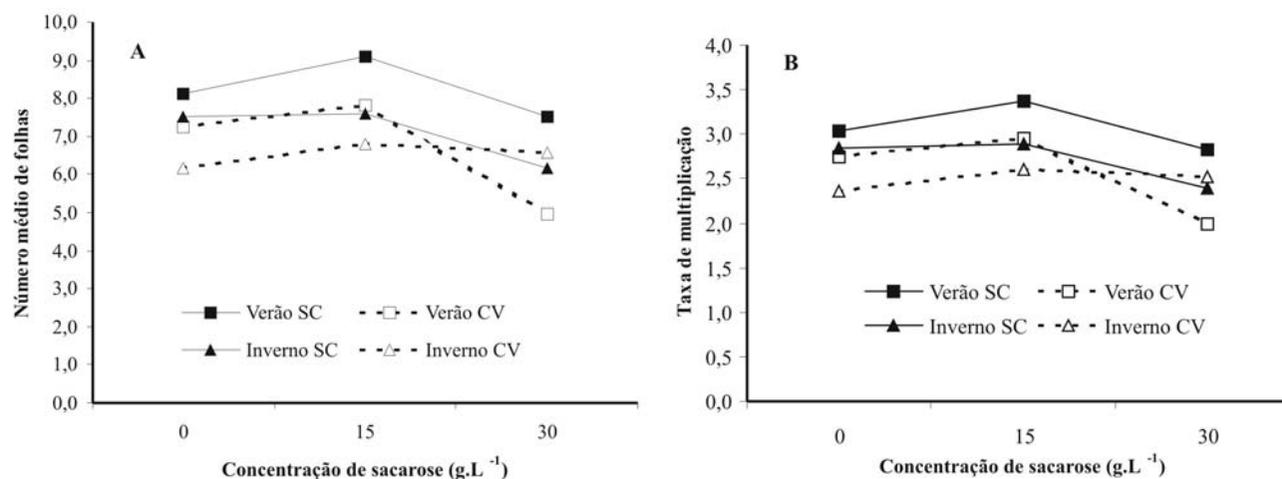


FIGURA 1. Efeito da época do ano, do local de crescimento e da concentração de sacarose, no número médio de folhas por explante (A) e na taxa de multiplicação (B), aos 60 dias de cultivo *in vitro* de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cultivar Delite. SC: sala de crescimento e CV: casa de vegetação.

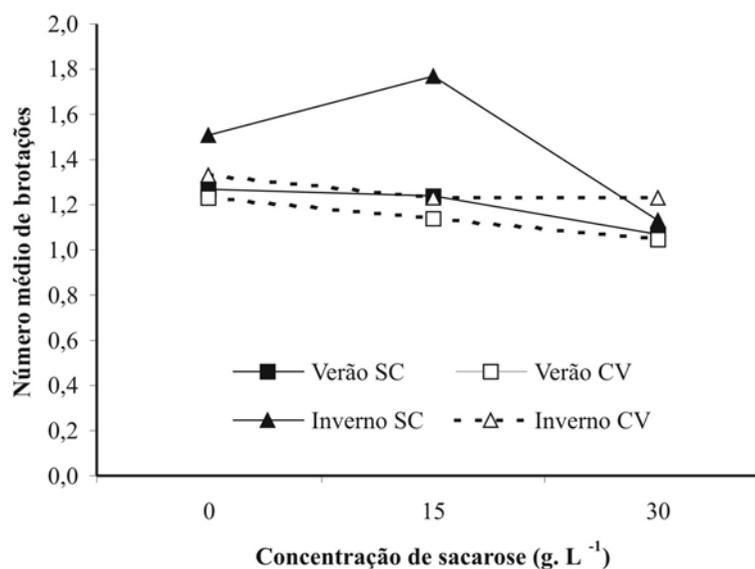


FIGURA 2 - Efeito da época do ano, do local de crescimento e da concentração de sacarose, no número médio de brotos por explante, aos 60 dias de cultivo *in vitro* de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cultivar Delite. SC: sala de crescimento e CV: casa de vegetação.

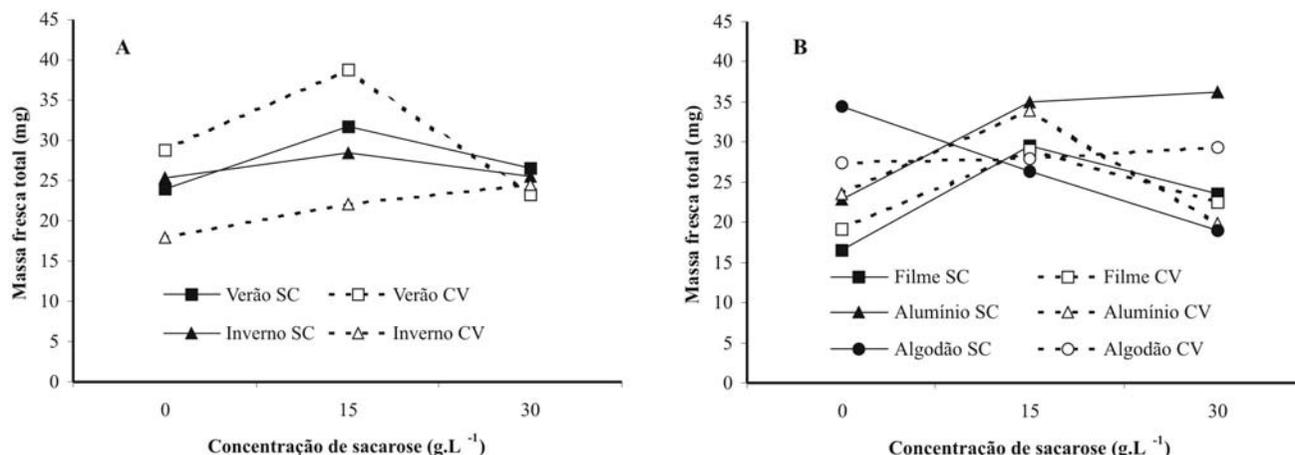


FIGURA 3 - (A) Efeito da época do ano, do local de crescimento e da concentração de sacarose e **(B)** Efeito do tipo de vedação dos frascos, do local de crescimento e da concentração de sacarose, na quantidade de massa fresca total por explante, aos 60 dias de cultivo *in vitro* de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cultivar Delite. SC: sala de crescimento e CV: casa de vegetação

CONCLUSÕES

1-Concluiu-se que o uso de filme plástico, seguido de alumínio, aumenta o número de folhas e a taxa de multiplicação; no entanto, o fechamento com algodão em condições fotoautotróficas promove o aumento da matéria fresca das brotações.

2-O local de crescimento não interfere na multiplicação *in vitro* de mirtilo, quando os explantes são cultivados na ausência ou em baixas concentrações de sacarose (15 g.L⁻¹).

REFERÊNCIAS

AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A.; KOZAI, T. Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: photosynthetic ability and growth of different stage embryos. *Annals of Botany*, London, v.90, p.11-19, 2002.

ALTMAN, A. Plant biotechnology in the 21st century: the challenges ahead. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, Valparaíso, v.2, n.2, p.51-55, 1999. Disponível em: <<http://www.ejb.org/content/vol2/issue2/full/1/>>. Acesso em: 15 out 2003.

ARIGITA, L.; GONZÁLEZ, A.; TAMÉS, R.S. Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v.115, p.166-173, 2002.

CAO, X.; FORDHAM, I.; DOUGLASS, L.; HAMMERSCHLAG, F. Sucrose level influences micropropagation and gene delivery into leaves from *in vitro* propagated highbush blueberry shoots.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture, The Hague, v.75, p.255-259, 2003.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.35, n.4, p.961-965, 2005.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, v.1, 1998. p.183-260.

HEMPEL, M. **From micropropagation to microponics (part II)**. *Practical Hydroponics & Greenhouses*, May/June, p.17-20, 1994. Disponível em: <<http://members.ozemail.com.au/~mhempel/publications/mponic2.htm>>. Acesso em: 15 out 2003.

KODYM A; ZAPATA-ARIAS, F. J.. Low-cost alternatives for the micropropagation of banana. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, The Hague, v.66, p.67-71, 2001.

KOZAI, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Eds.) *Micropropagation-technology and application*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.447-469.

KOZAI, T.; CHUN, C.; ISLAM, A.F.M.S.; KUBOTA, C.; OHYAMA, K. **Efficient production of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) propagules and transplants using single node leafy cuttings in closed systems with artificial lighting**. Disponível em: <http://www.mykz.affrc.go.jp/workshop/ws2000/proceedings/pdf/p106_kozai.pdf>. Acesso em: 20 out 2003.

- KOZAI, T.; NGUYEN, Q.T. Photoautotrophic micro-propagation of woody and tropical plants. In: JAIN, S.M.; ISHII, K. **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p.757-781.
- KOZAI, T; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v.114, p.525-537, 2001.
- KUBOTA, C.; KOZAI, T. Growth and net photosynthetic rate of *Solanum tuberosum in vitro* under forced and natural ventilation. **HortScience**, Alexandria, v.27, p.1312-1314, 1992.
- KUBOTA, C.; TADOKORO, N. Control of microbial contamination for large-scale photoautotrophic micropropagation. **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, New York, v.35, p.296-298, 1999.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagation Society**, Seattle, v.30, p.421-427, 1980.
- PAGOT, E.; HOFFMANN, A. Produção de pequenas frutas no Brasil. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 1., 2003, Vacaria, RS. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. p. 9-17. (Documentos 37).
- SANTANA, J.R.F.; PAIVA, R.; LEMOS, E.E.P.; NICIOLI, P.M.; NOGUEIRA, R.C. Enraizamento de *Annona glabra* L. em condições autotróficas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS, 1., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras, MG: UFLa/FAEPE, 2003. p.296.
- SOUZA, C.M. de; PINTO, J.E.B.P.; RODRIGUES, M.B.; MORAIS, A.R. de; ARRIGONI-BLANK, M. de F. Influência dos fatores físicos na regeneração de brotos em repolho. **Ciência e Agrotécnologia**, Lavras, v.23, n.4, p.830-835, 1999.
- ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN, F., KOZAI, T. Physiology of Eucalyptus plantlets grown photoautotrophically in a scaled-up vessel. **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, New York, v.37, p.807-813, 2001.