

Tipo de ramo e efeito do ácido indol acético (AIA) no estabelecimento *in vitro* de três cultivares de mirtilo

Branch type and the effect of Indole acetic acid (IAA) on *in vitro* establishment of three blueberry cultivars

Luciane Couto da Silva^{1*} Márcia Wulff Schuch^{II} Joseane Almeida de Souza^I
Alan Cristiano Erig^{III} Luis Eduardo Corrêa Antunes^{IV}

- NOTA -

RESUMO

O mirtilo é uma promissora alternativa econômica que se adapta muito bem a pequenas propriedades. No entanto, o preço e a disponibilidade das mudas é o principal entrave desta atividade. A micropropagação é a técnica que vem sendo utilizada com sucesso para propagação de mudas de mirtilo. Com o objetivo de estabelecer *in vitro* cultivares de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) para a micropropagação, foram realizados dois experimentos. No experimento I, testou-se a fonte de explante, (segmentos nodais retirados de ramos herbáceos lenhosos) em três cultivares de mirtilo. No experimento II verificou-se o comportamento dos explantes originados de ramos herbáceos na presença e ausência do regulador de crescimento AIA adicionado ao meio de cultivo, dentre sete cultivares. Aos 7, 14 e 21 dias de cultivo avaliou-se a percentagem de contaminação fúngica e bacteriana, além da percentagem de explantes oxidados. Aos 30 e 45 dias de cultivo, além das variáveis analisadas anteriormente, foi avaliado a sobrevivência e o estabelecimento dos explantes. Os resultados permitiram concluir que explantes originados de ramos herbáceos apresentaram menor oxidação fenólica e baixa percentagem de contaminação fúngica e bacteriana, proporcionando um elevado índice de estabelecimento para as cultivares testadas. A adição do regulador de crescimento AIA no meio de cultivo favoreceu o estabelecimento *in vitro* de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade).

Palavras-chave: *Vaccinium ashei*, pequenas frutas, segmento nodal, regulador de crescimento, micropropagação.

ABSTRACT

Blueberry is a promising economic alternative that adapts very well in small farms. Nevertheless, the seedlings

*price and availability are the major obstacles of this field. Micropropagation is the more successful used technique for blueberry propagation. Therefore, two trials were carried aiming to establish *in vitro* some cultivars of 'blueberry' (*Vaccinium ashei* Reade) for further micropropagation. In the first trial, the source of explant of three cultivars was tested (nodal segments from herbaceous and woody branches). In the second trial, seven cultivars were assessed regarding to their explants behavior of herbaceous branches in the presence or non-presence of growth regulator (IAA) in the culture medium. At 7, 14th and 21st day of cultivation the percentage of fungal and bacterial contamination and explants oxidation percentage were assessed. At 30th and 45th day of cultivation it was evaluated the explants survival and establishment, besides the variables assessed previously. The explants originated from herbaceous branches showed less phenolic oxidation and low percentage of fungal and bacterial contamination, providing high rates of *in vitro* plant establishment for the cultivars tested. The addition of IAA in the culture medium suited the *in vitro* establishment of blueberry (*Vaccinium ashei* Reade).*

Key words: *Vaccinium ashei*, small fruits, nodal segment, growth regulator, micropropagation.

Dentre as pequenas frutas, o mirtilo (*Vaccinium* spp) e a espécie que mais tem despertado o interesse de produtores do Sul do Brasil e de consumidores do mundo inteiro, por se tratar de uma promissora atividade econômica e também pelas propriedades nutracêuticas que a fruta apresenta. O *Vaccinium ashei* Reade pertence ao grupo rabbiteye do qual fazem parte as cultivares alvo deste estudo.

¹Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Fruticultura de Clima Temperado, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), Universidade Federal de Pelotas (UFPeL), CP 354, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: lucianecouto@yahoo.com.br *Autor para correspondência.

^{II}Departamento de Fitotecnia, FAEM, UFPeL, Pelotas, RS, Brasil.

^{III}Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Av. Marechal Floriano Peixoto, 43, Porto Internacional, 98995-000, Porto Xavier, RS, Brasil.

^{IV}Embrapa Clima Temperado, CP 403, BR 392, Km 78, Pelotas, RS, Brasil.

Atualmente as formas de propagação comumente utilizadas são a estaquia e a micropropagação. No Brasil, para mirtilo, amora-preta e framboesa, a estaquia é mais utilizada (COQUE et al., 1994). Entretanto, a estaquia apresenta baixo rendimento (MONTARROYOS, 2000), além de não garantir a sanidade das mudas. A micropropagação surge como alternativa utilizada com sucesso por GONZALEZ et al. (2000) para *V. corymbosum*.

Porém, para o sucesso da técnica, vários fatores e agentes são imprescindíveis, entre eles: a qualidade e o tipo de explante, o meio de cultura, as substâncias adicionadas a este, entre outros. O uso combinado de fitorreguladores promove respostas diferentes aos explantes SMAGULA & HARKER (1997) recomendam o uso de altas concentrações de 2iP com uma auxina para aumento e proliferação de brotações. No entanto, GEORGE (1996) afirma que o uso de excessivas concentrações pode resultar na regeneração de plantas morfológicamente diferentes.

Este trabalho teve como objetivo verificar a influência do tipo de ramo fornecedor de explantes e o efeito do fitorregulador AIA no estabelecimento *in vitro* de cultivares de mirtilo.

O trabalho foi realizado na Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Rio Grande do Sul, no período de setembro a dezembro de 2004, onde foram realizados dois experimentos. No experimento I, foram utilizados segmentos nodais de ramos herbáceos e lenhosos de plantas matrizes com 1,5 ano, cultivadas em casa-de-vegetação. Explantes de aproximadamente 15cm das cultivares “Delite”, “Florida” e “Powderblue” foram inoculados em meio WPM-Wood Plant Media (LLOYD & MCCOWN 1980), acrescido de 18 μ M de zeatina, em esquema bi fatorial (2x3), com seis tratamentos de quatro repetições.

No experimento II, foi testado o estabelecimento *in vitro* de sete cultivares (“Delite”, “Florida”, “Powderblue”, “Bluebelle”, “Bluegem”, “Briteblue” e “Woodard”) na presença e na ausência do fitorregulador (AIA) em esquema bi fatorial (2x7), totalizando 14 tratamentos com quatro repetições. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado para ambos os experimentos. Como explantes foram utilizadas brotações laterais novas de aproximadamente 15cm, originadas de ramos lenhosos dentro da sala de crescimento. O meio de cultura utilizado foi o WPM, acrescido de 73,8 μ M de 2iP com e sem AIA na

concentração de 5,7 μ M. O pH adotado para ambos os experimentos foi de 5,5 antes da inclusão do ágar na concentração de 6g L⁻¹ e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5atm por 20 minutos.

Para os dois experimentos, a desinfestação foi realizada pela imersão dos segmentos nodais em álcool 70% por 10 segundos e, em hipoclorito de sódio a 2,5%, adicionado de 2 gotas de Tween 20, durante 10 minutos, seguida de três lavagens com água autoclavada. Após a inoculação, os explantes permaneceram no escuro por sete dias. Depois eles foram levados para condições normais de sala de crescimento.

Aos sete, 14 e 21 dias de cultivo, em ambos os experimentos, foi avaliada a percentagem de contaminação fúngica e bacteriana, além da percentagem de oxidação. Aos 30 e 45 dias de cultivo, além das variáveis analisadas anteriormente, foi avaliada a sobrevivência e o estabelecimento.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan, através do uso do programa estatístico SANEST (ZONTA & MACHADO, 1987). Os dados em percentagem foram transformados em arco seno da raiz quadrada de x/100, em que x é o percentual obtido.

No experimento I, para a variável percentagem de oxidação dos explantes, verificou-se que não houve efeito significativo para o tipo de ramo e cultivares.

As percentagens de contaminação fúngica e bacteriana apresentaram diferença para o tipo de ramo doador de explante. Explantes de ramos herbáceos apresentaram menor contaminação fúngica e bacteriana respectivamente (0,16% e 8,16%) em ramos lenhosos (18,05% e 29,03%). Estes resultados concordam com SOUZA et al. (2004), que observaram menor contaminação em explantes de ramos herbáceos de araçazeiro.

As cultivares “Delite” e “Powderblue” não apresentaram diferença estatística para as variáveis sobrevivência e estabelecimento em se tratando do tipo de ramo. Entretanto, na cultivar “Florida”, os ramos herbáceos apresentaram maior sobrevivência. No estabelecimento, a “Delite” demonstrou superioridade sobre a “Powderblue”, quando utilizados ramos herbáceos. Resultados semelhantes foram obtidos por GONZALEZ et al. (2000) com ramos herbáceos de *V. corymbosum*, em que obtiveram maior estabelecimento *in vitro*. No entanto, a cultivar “Powderblue” não apresentou diferença estatística para o estabelecimento, independente do tipo de ramo utilizado como doador de explante (Tabela 1).

Tabela 1- Percentagem de sobrevivência e estabelecimento de explantes de mirtilo, cultivados *in vitro*, em função do tipo de ramo utilizado para as três cultivares doadoras de explantes.

Cultivar	% sobrevivência dos explantes		% estabelecimento dos explantes	
	30 dias de cultivo		45 dias cultivo	
	Ramos herbáceos	Ramo lenhoso	Ramos herbáceo	Ramo lenhoso
“Delite”	84,62 a A	61,96 a A	94,72 a A	61,96 a B
“Florida”	84,62 a A	1,34 b B	75,4 a b A	1,38 b B
“Powderblue”	44,48 b A	34,65 a B	44,48 b A	34,65 a A
“Média Geral”	53,32		4,15	

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e de maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Em relação à oxidação no experimento II, verificou-se efeito significativo para regulador de crescimento e altamente significativo para cultivar. A ação do AIA contribuiu para a redução da oxidação, vindo a favorecer o estabelecimento dos explantes. Dentre as cultivares, a “Delite” e a “Woodard” foram as que apresentaram a menor oxidação (Tabela 2). As diferentes taxas de oxidação correspondentes a cada cultivar podem estar relacionadas ao conteúdo de compostos fenólicos presentes nos tecidos e as suas características genéticas.

Para contaminação fúngica, obteve-se interação entre cultivar e AIA, sendo relativamente baixa aos 45 dias com média de (12,81%). Na presença do AIA a Woodard e Bluegem apresentaram menor contaminação (Tabela 2). Para a variável contaminação bacteriana, não houve efeito significativo dos tratamentos, a qual apresentou valor médio de 3,93%. As baixas taxas de contaminações são muito inferiores às encontradas por ECCHER & NOE (1989) com *V. corymbosum*, (63,5%).

Para sobrevivência e estabelecimento aos 45 dias, houve efeito altamente significativo ($\alpha=0,01$) para fitoregulador e cultivar. A Delite e Woodard não apresentaram diferença estatística (Tabela 2). O uso do AIA, proporcionou em média, maior sobrevivência e estabelecimento (58,6% e 43,13%), e na ausência (31,5% e 17,37%) respectivamente. GONZALEZ et al., (2000) também obtiveram resultados favoráveis *in vitro* com *V. corymbosum* usando AIA combinada com 2iP. Por outro lado, BERASTEGUI et al. (2003) com *V. vitis idaeau* obtiveram resultados inferiores com combinação de AIB e 2iP.

Conclui-se que, explantes caulinares provenientes de ramos herbáceos são adequados para o estabelecimento *in vitro* de *Vaccinium ashei* Reade, e que a presença do fitoregulador ácido-indolacético AIA no meio de cultivo reduz a oxidação dos explantes, favorecendo seu estabelecimento.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa à pesquisadora Joseane Almeida de Souza.

Tabela 2 - Percentagem de contaminação fúngica, oxidação, sobrevivência e estabelecimento de explantes de mirtilo aos 45 dias de cultivo, em função de sete cultivares na presença ou ausência do AIA.

Cultivares	Contaminação fúngica		Oxidação Com AIA	Sobrevivência Com AIA	Estabelecimento Com AIA
	Com AIA	Sem AIA			
“Woodard”	1,38 a B	29,05 a A	1,39 c	73,66 a b	52,57 a b
“Bluegem”	0 a B	15,49 a b A	36,86 b	41,36 c d	17,13 c
“Delite”	5,31 a A	15,46 a b A	4,04 c	82,76 a	63,40 a
“Bluebelle”	2,90 a A	8,06 ab c A	73,44 a	11,53 e	9,81 c
“Florida”	11,61 a A	1,42 b c A	58,51 a b	16,98 d e	13,34 c
“Powderblue”	5,27 a A	1,40 b c A	33,54 b	47,48 b c	31,34 b c
“Briteblue”	1,38 a A	0 c A	52,76 a b	44,72 b c d	28,80 b c

*Medias seguida de mesma letra minúscula nas colunas, e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade de erro.

REFERÊNCIAS

- BERASTEGUI, A. et al. Regeneracion de plantas por cultivo *in vitro* de *Vaccinium vitis idaea*. In: Reunion Latinoamericana de Fisiologia Vegetal, 11.; REUNION ARGENTINA DE FISILOGIA VEGETAL, 34.; CONGRESSO URUGUAYO DE FISILOGIA VEGETAL, 2003, Punta del Este. **Actas...** Punta del Este, Manantiales, Uruguay, 2003. 3p.
- COQUE, M. et al. **El cultivo del frambueso y la zarzamora**. Oviedo, Spain: Servicio Central de Publicaciones del Principado de Asturias, 1994. 77p.
- ECCHER, T.; NOE, N. Comparison between 2iP and zeatin in the micropropagation of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*). **Acta Horticulturae**, The Hague-Holanda n.241, p.185-190,1989.
- GEORGE, E.F. Plant propagation by tissue culture, Part 2: **In practice**. Edington: Exegetics London-Inglaterra, 1996.
- GONZALEZ, M.V. et al. Micropropagation of berry fruit species using nodal segments from field-grown plants. **Association of Applied Biologists**, n.137, p.73-78 2000.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use os shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, v.30, p.421-427, 1980.
- MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, Brasília, n.36 e 37, p.5-10, 2000.
- SMAGULA, J.M.; HARKER, J. Cramberry micropropagation using a lowbush blueberry medium. **Acta Horticulturae**, n.446, p.343-347, 1997.
- SOUZA, J.A. et al. Estabelecimento *in vitro* de araçá, cv. Irapuã: Efeito do tipo de ramo e do regime de luz submetido à planta matriz. In: CIC – CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 13 ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2004, Pelotas, RS. **Anais...** Pelotas: UFPEL, 2004. p.7.
- ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. **SANEST – Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Pelotas: DMEC/IFM/UFPEL, 1987. 138p.