

Substratos e formas de imersão de auxina no cultivo *in vitro* de mirtilheiros cv. Duke

Substrates and forms of immersion of auxin in the in vitro cultivation of blueberries cv. Duke

Samila Silva Camargo¹, Aline Meneguzzi², Ana Luiza Arruda³, Gabriela Maciel Paiano⁴, Leo Rufato⁵

Resumo

O mirtilheiro é uma espécie geralmente produzida em pequenas propriedades e nos últimos anos tem despertado interesse de grande parte dos consumidores em função das suas propriedades nutracêuticas, com destaque a sua capacidade antioxidante. Dessa forma, busca-se sempre a obtenção de mudas com qualidade e homogeneidade, características essas, que podem ser atribuídas a técnica de micropropagação, que possibilita a obtenção de um grande número de plantas, em um curto espaço de tempo. Nesse sentido, foi verificado nesse estudo, a influência de diferentes substratos (meio de cultura com agente solidificante e, vermiculita e TNMix® com adição de meio de cultura líquido) e formas de imersão do regulador de crescimento (sem auxina, com imersão da base e ao meio de cultura) no cultivo *in vitro* de explantes de mirtilheiro 'Duke'. O estudo compreendeu um delineamento inteiramente casualizado, com um esquema fatorial 3 x 3 (três substratos: meio de cultura WPM, vermiculita e TNMix® e três formas de imersão do AIB: ausência de auxina, ao meio de cultura e imersão da base do explante), totalizando assim, nove tratamentos, com cinco repetições de cinco explantes cada. O cultivo de explantes *in vitro* de mirtilheiro cv. Duke em substrato vermiculita e meio WPM líquido, sem a adição de auxina, favorece o crescimento de brotações e raízes, assim como, o número de brotações e folhas.

Palavras-chave: *Vaccinium* spp., micropropagação, regulador de crescimento.

Abstract

The blueberry is a species usually produced in small properties and in recent years has aroused interest of the great part of the consumers in function of its nutraceutical properties, emphasizing its antioxidant capacity. In this way, we always seek to obtain seedlings with quality and homogeneity, which can be attributed the micropropagation technique, which makes it possible to obtain a large number of plants in a short period of time. In this sense, the influence of different substrates (culture medium with solidifying agent and vermiculite and TNMix® with addition of liquid culture medium) and forms of immersion of the growth regulator (without auxin, with immersion of the base and To the culture medium) in the in vitro culture of explants of myriad 'Duke'. The study consisted of a completely

randomized design with a 3 x 3 factorial scheme (three substrates: WPM culture medium, vermiculite and TNMix® and three forms of IBA immersion: absence of auxin, culture medium and immersion of the explant base), totaling nine treatments, with five replicates of five explants each. The cultivation of in vitro explants of myriad cv. Duke in vermiculite substrate and liquid WPM medium, without the addition of auxin, favors the growth of shoots and roots, as well as the number of shoots and leaves.

Keywords: *Vaccinium spp.*, micropropagation, growth regulator.

Introdução

A produção de mirtilos está concentrada no Brasil nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais, basicamente em pequenas propriedades e estima-se uma área plantada no país, em torno de 400 hectares aproximadamente (CANTUARIAS-AVILÉS et al., 2014).

O mirtilo ganhou um notável interesse em todo o mundo devido às suas excelentes propriedades sensoriais e a presença de componentes saudáveis (SCALZO et al., 2013). São conhecidos por suas propriedades nutracêuticas, atribuídas ao alto teor e grande diversidade de antioxidantes naturais e polifenóis que ultrapassam outros alimentos funcionais (CANTUARIAS-AVILÉS et al., 2014), com destaque aos flavonoides, antocianinas e proantocianidinas (BROWNMILLER et al., 2009).

A procura pelo mirtilo no mercado interno tem sido grande, mas a expansão das áreas de cultivo não acompanha esta demanda (MARANGON & BIASI, 2013). De acordo com Damiani & Schuch (2009b), isso ocorre porque o mirtilheiro é normalmente propagado por estaquia, entretanto, a baixa produção de ramos para a produção de estacas e a dificuldade de enraizamento de algumas cultivares têm limitado sua propagação e os autores sugerem como alternativa para aumentar a disponibilidade de mudas dessa espécie, o uso da propagação *in vitro*.

O uso da técnica de micropropagação, além da produção de grande quantidade de plantas em curto período de tempo, permite a obtenção de plantas livres de doenças e a propagação de espécies difíceis de serem multiplicadas por outros métodos (DAMIANI & SCHUCH, 2009b). Nesse sentido, Faria et al. (2012) destacam a técnica como uma alternativa promissora para a produção comercial de mudas já que propicia a obtenção de mudas em quantidade, com elevado padrão de qualidade e aproveitamento do espaço físico.

Para que se obtenham resultados satisfatórios nas fases de multiplicação e enraizamento *in vitro*, é primordial o rigoroso controle quanto ao balanço hormonal no meio de cultura, sendo este último fator um dos mais relevantes para o sucesso dessa técnica, sendo assim, além das formulações básicas, o uso de reguladores de crescimento é fundamental para que se obtenha êxito na propagação de culturas *in vitro* (SCHUCH & ERIG, 2005; RODRIGUES et al., 2016).

Os meios de cultivo fornecem substâncias essenciais que desempenham várias funções, como o fornecimento de nutrientes necessários a sobrevivência do explante e seus componentes e podem ser utilizados para dirigir o crescimento e o desenvolvimento do material vegetal (CARVALHO, 2006), como por exemplo, para promover a indução de raízes e melhorar o sistema radicular formado, geralmente aos meios de cultura são acrescidos de auxina (LIU et al., 2013; SAINI et al., 2013).

Além do cultivo de mirtilheiros com meios de cultura tradicionais, com agentes solidificantes, vários estudos têm sido realizados a fim de verificar os melhores substratos para a espécie. Isso é justificado, pois um bom substrato para mirtilo deve apresentar uma boa porosidade, um pH ligeiramente ácido, uma capacidade de reter água e os nutrientes essenciais em todo o ciclo de vida das plantas, bem como permitir uma boa drenagem (MATOS et al., 2014). Black & Zimmerman (2006) e Ochmian et al. (2010) são exemplos de autores que compararam e verificaram diferenças favoráveis de acordo com o substrato usado no crescimento e produção de mirtilheiros 'Patriot', 'Bluecrop' e 'Sierra'.

Sendo assim, o uso de substratos adequados e reguladores vegetais (auxinas) na indução do enraizamento, podem auxiliar na produção das mudas e garantir o sucesso do protocolo de propagação *in vitro* (MENGESHA et al., 2013; OLIVEIRA-CAUDURO et al., 2016). Aliado a isso, o desenvolvimento de um sistema de enraizamento mais eficiente resulta em mudas com maior qualidade fisiológica e diminuição de perdas durante a fase de aclimatização (DAMIANI & SCHUCH, 2009a).

Nesse sentido, buscou-se verificar a influência de diferentes substratos (meio de cultura com agente solidificante e vermiculita e TNMix® com adição de meio de cultura líquido) e formas de imersão do regulador de crescimento (sem auxina, com imersão da base e ao meio de cultura) no cultivo *in vitro* de explantes de mirtilheiro 'Duke'.

Material e métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Micropropagação de Plantas Vegetais do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), em Lages (SC).

Explantos de mirtilheiro cv. Duke, já estabelecidos e cultivados *in vitro*, foram subcultivados em frascos de vidro transparente com capacidade de 250 mL e como prática de homogeneidade dos tratamentos, durante a repicagem, foram mantidas três folhas nos explantes de aproximadamente $3 \pm 0,5$ cm de comprimento.

Os tratamentos diferiram quanto aos substratos utilizados para o cultivo dos explantes: vermiculita; substrato comercial para plantas TNMix® e meio de cultura isolado WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980), sendo nos dois primeiros citados, a presença de WPM líquido, sem a presença de ágar, e para o último; o meio tradicional, com a presença do agente solidificante (6 g.L^{-1}) e além disso, em todos os três, a adição de 30 g.L^{-1} de sacarose e $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de mio-inositol. Além disso, foram estudadas três diferentes formas de imersão do regulador de crescimento AIB (ácido indolbutírico): testemunha (ausência da auxina); adicionado ao meio de cultura e; imersão da base dos explantes ao regulador, sendo nas duas situações, a concentração usada foi de 1 mg.L^{-1} de AIB.

Dessa forma, o estudo compreendeu um delineamento inteiramente casualizado, com um esquema fatorial 3×3 (três substratos e três formas de imersão do AIB), de nove tratamentos com cinco repetições e cinco explantes cada.

Os frascos com os distintos tratamentos foram transferidos para sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e intensidade luminosa de $27 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Após 45 dias de cultivo, as variáveis analisadas foram: comprimento da maior brotação e raiz (cm), comprimento médio de brotações e raízes (cm), número de brotações, folhas e raízes e intensidade de calos, com uma escala de 0 a 2, onde 0: ausência de calos, 1: presença de calos pequenos e 2: presença de calos grandes.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias, quando significativas, foram comparadas entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), sendo os dados numéricos transformados em raiz quadrada de $x+0,5$ e a escala referente a intensidade de calos, em $\log(x+K)$, onde x , é a média obtida de cada variável e K é igual a 1.

Resultados e discussão

Para todas as variáveis estudadas, houve interação entre os fatores substrato e formas de imersão da auxina testada (AIB), com nível de significância a 5% de probabilidade de erro, através do teste de Tukey.

Na figura 1, verifica-se que para a variável comprimento da maior brotação, os tratamentos que se destacaram foram com o uso do substrato TNMix® sem regulador ou com a auxina adicionada diretamente no meio de cultivo, com explantes de 7,17 e 7,85 cm, respectivamente. Na mesma figura, para o comprimento médio de brotações, mais uma vez o substrato comercial (2,37 cm) favorece o crescimento dos brotos, porém, sem diferir estatisticamente da vermiculita (2,60 cm) e em ambos os casos, na ausência de AIB.

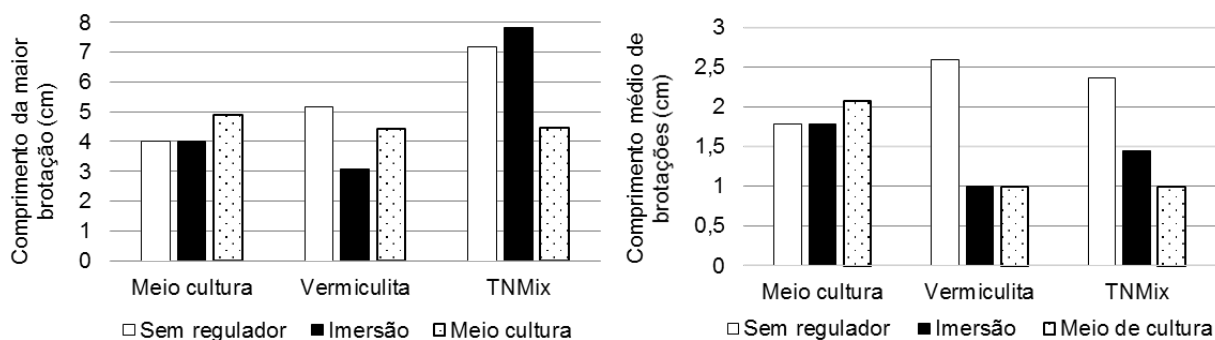


Figura 1. Comprimento da maior brotação e médio de brotações (cm), em explantes de mirtilleiro 'Duke' cultivados *in vitro* em diferentes substratos e formas de imersão de AIB.

Esses resultados distintos são justificados pelas características físicas e alguns atributos químicos dos substratos que podem influenciar na formação e desenvolvimento inicial das plantas, tais como o pH (BASTOS et al., 2007) e a porosidade, que afetará conseqüentemente, a retenção de água no substrato, que nesse caso, trata-se do meio de cultivo específico para a cultura do mirtilleiro.

Em relação ao comprimento da maior e médio de raízes, o comportamento dos fatores estudados foi similar para as duas variáveis, como visualizado na figura 2.

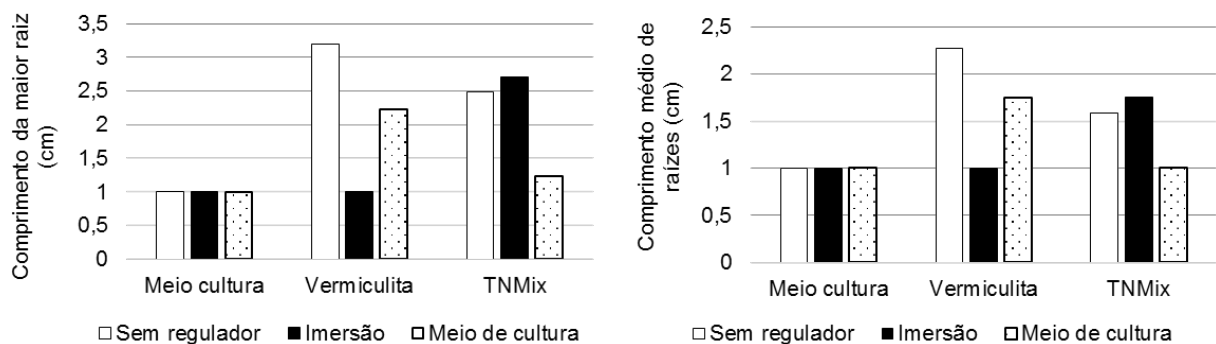


Figura 2. Comprimento da maior raiz e médio de raízes (cm), em explantes de mirtilheiro 'Duke' cultivados *in vitro* em diferentes substratos e formas de imersão de AIB.

O tratamento que proporcionou maior desenvolvimento radicular foi com o uso do substrato vermiculita, na ausência da auxina no meio de cultivo, tanto para o comprimento da maior raiz (3,20 cm), assim como, para o comprimento médio de raízes (2,27 cm). Similarmente, em estudos com enraizamento de duas cultivares de mirtilheiro, Damiani & Schuch (2009a), verificaram que o uso de substratos alternativos ao ágar (perlita expandida e vermiculita), atuam positivamente no enraizamento e promovem o aumento do número e comprimento de raízes. Um fator importante aliado a esses resultados, é que o uso de substratos inertes, como a perlita e a vermiculita também podem auxiliar na redução dos custos com o ágar (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998), característica desejada em função dos investimentos necessários durante o cultivo *in vitro* das distintas espécies, que incluem toda a estrutura do laboratório, acrescido dos reagentes e componentes que são sempre renovados durante a produção de mudas.

O número de brotações e de folhas de explantes de mirtilheiro 'Duke' também foram influenciados pelos dois fatores estudados (Figura 3). Mais uma vez, foi contabilizado um maior número de brotações com o uso de vermiculita, sem a presença de AIB, assim como para a quantificação de folhas, entretanto, para essa variável, esse tratamento não diferiu do substrato comercial TNMix® sem auxina ou com a imersão da base dos explantes no regulador. Esses resultados contrariam aos encontrados por Rodrigues et al. (2016) com *Oncidium baueri*, onde quanto aos substratos, a vermiculita não é indicada para substituir o ágar, entretanto, os autores indicam a fibra de coco tanto na fase de multiplicação, quanto no enraizamento e

ainda, para essa espécie, a utilização do regulador de crescimento AIB é dispensável para a formação de raízes.

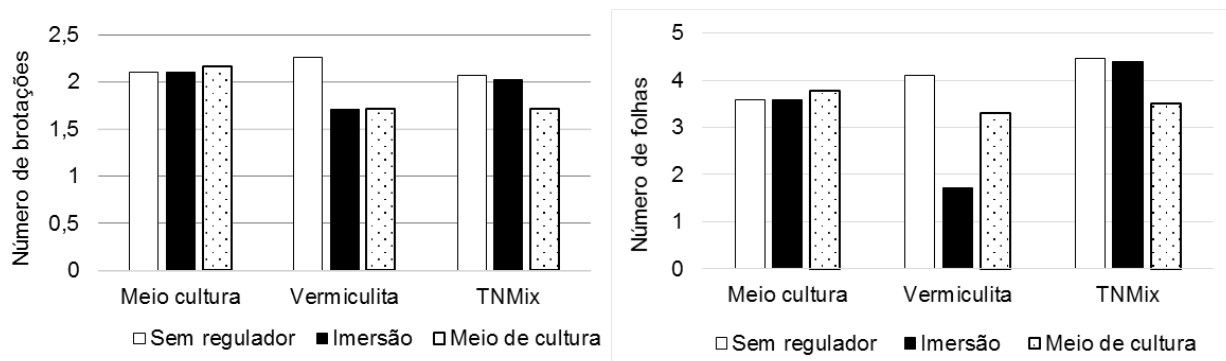


Figura 3. Número de brotações e folhas, em explantes de mirtilleiro 'Duke' cultivados *in vitro* em diferentes substratos e formas de imersão de AIB.

Na figura 4 verifica-se que o substrato comercial TNMix®, sem regulador ou com imersão na base dos explantes, favoreceu a formação de um maior número de raízes, com médias de 2,23 e 2,32 raízes por explante, seguido dos tratamentos com o uso de vermiculita, sem auxina (2,08 raízes) e com a mesma no meio de cultivo líquido (2,05 raízes).

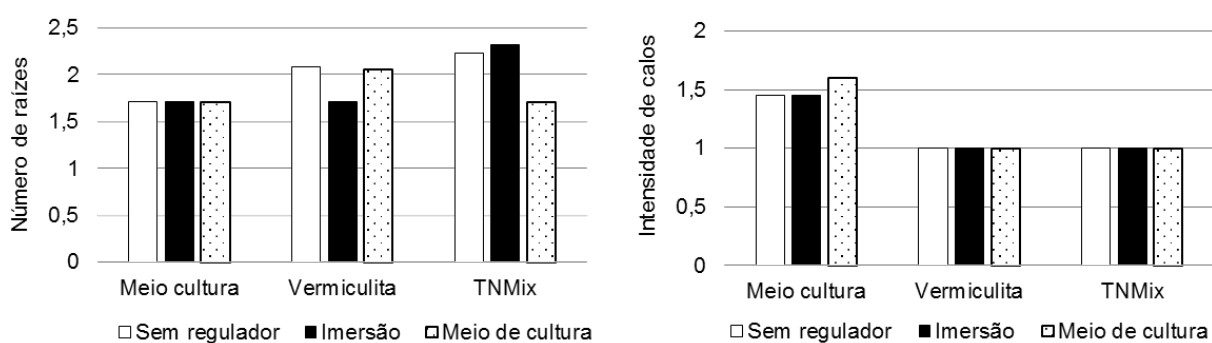


Figura 4. Número de raízes e intensidade de calos (escala de 0 a 2), em explantes de mirtilleiro 'Duke' cultivados *in vitro* em diferentes substratos e formas de imersão de AIB.

Ainda na figura 4, são demonstradas a intensidades de calos nos diferentes tratamentos, onde independentemente da forma de contato ou não com o AIB, a maior formação de calogênese ocorreu no cultivo em meio de cultura tradicional para a cultura do mirtilleiro. De acordo com Radmann, Fachinello & Peters (2002), a

formação de calos na base das brotações pode ocorrer em função de uma concentração excessiva AIB no meio de cultura e podendo ser tóxica, o que compromete a rizogênese, crescimento da parte aérea, como também a sobrevivência das plantas na fase de aclimatização, entretanto, no presente estudo a quantidade da auxina não influenciou a calogênese nos explantes.

Em geral, nas condições desse estudo, a vermiculita sem adição da auxina favoreceu o crescimento a multiplicação e enraizamento dos explantes de mirtilheiro cv Duke. Resultados semelhantes foram encontrados por Damiani & Schuch (2009a), onde o elevado índice de enraizamento e de desenvolvimento da parte aérea, também em mirtilheiros, foram atribuídos ao fato dos autores usarem um substrato quimicamente inerte (perlita, assim como a vermiculita), com pH neutro e retenção iônica desprezível e, dessa forma, não houve alteração na composição do meio de cultura, bem como suas propriedades químicas, como o pH.

Conclusões

O cultivo de explantes *in vitro* de mirtilheiro cv. Duke em substrato vermiculita e meio WPM líquido, sem a adição de auxina, favorece o crescimento de brotações e raízes, assim como, o número de brotações e folhas.

Referências

BASTOS, D. C. et al. Diferentes substratos na produção de porta-enxertos de caramboleira. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 312-316, 2007.

BLACK, B. L.; ZIMMERMAN, R. H. Industrial and municipal by products as substrates to highbush blueberry production. **Acta Horticulturae**, v. 574, p. 267-272, 2006.

CANTUARIAS-AVILÉS, T. et al. Cultivo do mirtilo: atualizações e desempenho inicial de variedades de baixa exigência em frio no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 139-147, 2014.

CARVALHO, J. M. F. C. et al. **Fatores Inerentes à Micropropagação**. Campina Grande, PB. 2006. (EMBRAPA. Documentos, 148).

DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Diferentes substratos e ambientes no enraizamento *in vitro* de mirtilo. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 563-566, 2009a.

DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Enraizamento *in vitro* de mirtilo em condições fotoautotróficas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1012-1017, 2009b.

FARIA, R. T. et al. **Produção de orquídeas em laboratório**. Londrina: Mecenas, 2012, 124p.

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

LIU, X. J. Enhanced nitrogen deposition over China. **Nature**, v. 494, p. 459–462, 2013.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, v. 30, p. 421-427, 1980.

MARANGON, M. A.; BIASI, L. A. Estaquia de mirtilo nas estações do ano com ácido incolbutírico e aquecimento do substrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 1, p. 25-32, 2013.

MATOS, S. et al. Avaliação dos compostos fenólicos e atividade antioxidante em mirtilos de diferentes proveniências geográficas. **Neonatology**, v. 100, p. 319– 341, 2014.

MENGESHA, A.; AYENEW, B.; TADESSE, T. Acclimatization of in vitro propagated pineapple (*Ananas comosus* (L.), var. Smooth Cayenne plantlets to *ex vitro* condition in Ethiopia. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, p. 317-323, 2013.

OCHMIAN, I.; GRAJKOWSKI, J.; SKUPIEN, K. Effect of substrate type on the field performance and chemical composition of highbush blueberry cv. Patriot. **Agricultural and Food Science**, v. 19, p. 69-80, 2010.

OLIVEIRA-CAUDURO, Y. et al. Micropropagação de abacaxizeiro com enraizamento *in vitro* e *ex vitro*. **Plant Cell Culture Micropropagation**, v. 12, n. 2, p. 53-60, 2016.

RADMANN, E. B.; FACHINELLO, J. C.; PETERS, J. A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento *in vitro* de porta-enxertos de macieira 'M-9'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, p. 624- 628, 2002.

RODRIGUES, D. B. et al. Growth regulators and substrats for *Oncidium baueri* Lindl. micropropagation. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 2901-2910, 2016.

SAINI, S. et al. Auxin: a máster regulator in plant root development. **The Plant Cell**, v. 32, n. 6, p. 741-757, 2013.

SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Micropropagação de plantas frutíferas. In: FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 155-173. 2005.