

ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE MIRTILEIRO: CULTIVARES BLUECROP, DUKE E MISTY

IN VITRO ESTABLISHMENT OF BLUEBERRY: BLUECROP, DUKE AND MISTY CULTIVARS

TÂNIA REGINA PELIZZA¹, FABIANE NUNES SILVEIRA², JANAÍNAMUNIZ², FERNANDA GRIMALDI², LEO RUFATO³, AIKE ANNELIESE KRETZSCHMAR³

¹Eng. Agr., Pós doutoranda – Bolsista PRODOC/CAPES – Centro de Ciências Agroveterinárias/CAV/UDESC – Avenida Luiz de Camões 2090 – Bairro Conta Dinheiro – 88520.000 – Lages, SC – Brasil – email: trp_mestagro@hotmail.com – Autor para contato.

²Doutoranda em Produção Vegetal – Centro de Ciências Agroveterinárias/CAV/UDESC – Lages, SC – Brasil – e-mail: fabinhans29@yahoo.com.br; fernandagrimaldi@ymail.com

³Téc. em Agroecologia - IFSC-SMO - Doutoranda em Produção Vegetal/CAV/UDESC – Lages, SC – Brasil – e-mail: janainamuniz@gmail.com;

⁴Prof. Adjunto de Fruticultura – Departamento de Agronomia – Centro de Ciências Agroveterinárias/CAV/UDESC – Lages, SC – Brasil – email: leoruffato@yahoo.com.br; a2aak@cav.udesc.br

RESUMO

Agentes de contaminação de tecidos como bactérias e fungos são comuns em plantas *in vivo*, mas apresentam efeitos danosos sobre plantas em condições *in vitro*. A oxidação dos explantes pode levá-los à morte, ocasionando uma redução no percentual de obtenção de novas brotações, possíveis de originarem uma nova planta. Neste trabalho objetivou-se definir a assepsia mais adequada para o estabelecimento *in vitro* de mirtilheiro das cultivares Bluecrop, Duke e Misty. O experimento foi realizado, no Laboratório de Micropropagação de Plantas do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV/UDESC), em Lages (SC). Foram testados cinco tratamentos para a desinfestação dos explantes: (T1: 1 min álcool 70%; T2: 10 min NaOCl 2%; T3: 15 min NaOCl 2%; T4: 1 min álcool 70%; + 10 min NaOCl 2% e T5: 1 min álcool 70%; + 15 min NaOCl 2%) e três cultivares de mirtilheiro (Bluecrop, Duke e Misty), o que constituiu um fatorial 5 x 3. Foram avaliadas a porcentagem de contaminação fúngica, bacteriana e oxidação após 28 dias e o estabelecimento dos explantes aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de mirtilheiro, há um comportamento distinto entre as cultivares. A oxidação *in vitro* dos explantes de mirtilheiro é baixa. Para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de mirtilheiro, pode-se fazer o uso de imersão em solução de álcool 70%, durante 1 minuto ou em NaOCl 2% durante 10 minutos.

Termos para indexação: *Vaccinium* spp., biotecnologia vegetal, pequenas frutas.

ABSTRACT:

Tissue contaminants such as bacteria and fungi are common in plants *in vivo*, but produces devastating effects on plants under *in vitro* conditions. The oxidation of explants may lead to dead, or a reduction in the percentage of new shoots, and possible to develop a new plant. The objective of this study was to define the best asepsis for the *in vitro* establishment of blueberry cultivars Bluecrop, Duke and Misty. The experiment was conducted at the Laboratory of Plant

Micropropagation, of Agroveterinary Sciences Center (CAV / UDESC) in Lages (SC). Five treatments for asepsis of explants were tested (T1: 1 min alcohol, T2: 10 min 2% NaOCl, T3: 15 min 2% NaOCl; T4: 1 min alcohol + 10 min 2% NaOCl and T5: 1 min alcohol + 15 min 2% NaOCl) and three cultivars of blueberry (Bluecrop, Duke and Misty), arranged in a 5 x 3 factorial. We evaluated the percentage of fungal and bacterial contamination, oxidation after 28 days, and the establishment of explants after 45 days of *in vitro* culture. During the *in vitro* establishment of nodal segments of blueberry there is a distinct behavior between cultivars. The *in vitro* oxidation of blueberry explants is low. To establish *in vitro* nodal segments of blueberry, the use of alcohol 70% for 1 minute or NaOCl 2% for 10 minutes was successful.

Index terms: *Vaccinium* spp., plant biotechnology, small fruits.

INTRODUÇÃO

A micropropagação de plantas é uma forma de propagação clonal massal de um genótipo selecionado por técnicas de cultura *in vitro* (HARTMANN; KESTER, 1997) e é assim denominada em função do tamanho dos propágulos utilizados (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A grande aplicação prática da técnica de micropropagação encontra-se na produção comercial de plantas, o que permite rápida multiplicação de material e em curtos períodos de tempo e espaço (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A condição da planta-matriz, a descontaminação, a diminuição do tempo de manipulação do material vegetal, a seleção de explantes com maior vigor, e, principalmente, a

(Recebido em 02 de maio de 2013 e aprovado em 25 de novembro de 2013)

imersão dos explantes em agentes desinfestantes são as abordagens usualmente utilizadas durante o estabelecimento de protocolos de assepsia do material vegetal (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998; SKIRVIN et al., 1999).

Os principais contaminantes que afetam a cultura de tecidos de plantas são bactérias e fungos. Esses contaminantes são comuns em plantas *in vivo*, mas apresentam efeitos danosos sobre plantas em condições *in vitro* (SKIRVIN et al., 1999). De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), algumas substâncias com ação germicida são utilizadas para efetuar a desinfestação de explantes, como o etanol e o hipoclorito de sódio e de cálcio. Skirvin et al. (1999) também indicam a lavagem em água corrente por algumas horas ou até dias para remover detritos e limpar o explante, além do uso de detergentes, com o material vegetal em agitação ou não. Sedlák e Paprštejn (2012) utilizaram o cloreto de mercúrio na concentração de 0,15% para desinfestar explantes superficialmente. Traore et al. (2005) recomendaram o uso do fogo, obtido através da chama do bico de bunsen, por onde os explantes são submetidos por diferentes tempos, por três ou cinco segundos, seguido de um mergulho rápido em água estéril ou ainda, até a chama se extinguir por si mesma. Alcântara et al. (2011) indicaram, como melhor método de assepsia para o estabelecimento *in vitro*, a sequência de lavagem com água esterilizada, seguida de álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio à 2,5% por 20 minutos, fungicida a base de *benomyl* 1% por 20 minutos e três lavagens com água esterilizada.

Assim, conduziu-se este trabalho, com o objetivo de definir a assepsia mais adequada para o estabelecimento *in vitro* de mirtilheiro das cultivares Bluecrop, Duke e Misty.

MATERIAL E MÉTODOS

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

Os explantes, segmentos nodais com 1,5cm de comprimento, foram retirados de ramos herbáceos de plantas matrizes com aproximadamente um ano e meio de idade, acondicionadas em câmara de crescimento e previamente tratadas com biocidas: Cercobin® 700 WP – 0,7g.L⁻¹ e Kasumin® (2ml.L⁻¹), além da aplicação de Fosfito de Potássio (2,5ml.L⁻¹). Foram retirados segmentos de aproximadamente 30 cm, cujas folhas foram removidas. Após, foram seccionados e lavados em água corrente e detergente com auxílio de uma escova dental macia. Em seguida, foram levados para câmara de fluxo laminar, imersos nas soluções desinfestantes com adição de duas gotas de Tween 20, lavados por três vezes em água destilada esterilizada e, posteriormente, inoculados em tubos de ensaio, tamanho 20 x 150 mm, com 7 ml de meio nutritivo.

Utilizou-se o meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980), com 50% da concentração dos sais, adicionado de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 7 g.L⁻¹ de ágar. Ajustou-se o pH da solução com NaOH 1N para 5,0, antes da adição do ágar. Os explantes permaneceram em ambiente ausente de luz por sete dias e depois permaneceram em condições normais de sala de crescimento, sob temperatura de 25°C, fotoperíodo de 16 horas de luz e densidade de fluxo de fótons de 30 μmol. m⁻².s⁻¹ obtidos por lâmpadas fluorescentes brancas frias. Foram testados cinco métodos de assepsia: 1) imersão em álcool 70% durante 1 minuto; 2) imersão em NaOCl 2% durante 10 minutos; 3) imersão em NaOCl 2% durante 15 minutos; 4) imersão em álcool 70% durante 1 minuto + imersão em NaOCl 2% durante 10 minutos e 5) imersão em álcool 70% durante 1 minuto + imersão em NaOCl 2% durante 15 minutos e três cultivares de mirtilheiro (Bluecrop, Duke e Misty), que constituíram em experimento com delineamento inteiramente casualizado, arranjado em fatorial 5 x 3, com quatro repetições por tratamento, onde cada unidade experimental foi constituída por seis tubos com um explante cada.

As variáveis avaliadas foram a percentagem de contaminação fúngica, bacteriana e oxidação dos explantes aos 28 dias após o estabelecimento *in vitro*. Aos 45 dias,

foi avaliada a porcentagem de estabelecimento dos explantes.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias, quando significativas, foram comparadas entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), por meio do programa estatístico Winstat, quando os dados expressos em porcentagem foram transformados em arco-seno da raiz quadrada de $x/100$ e os dados numéricos foram transformados em raiz quadrada de $x+0,5$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi verificada interação entre os fatores cultivar e agentes desinfestantes para as variáveis: contaminação fúngica, contaminação bacteriana, explantes de mirtilheiro oxidados e estabelecidos aos 28 dias de cultivo *in vitro* (Tabela 1). Para as variáveis contaminações fúngica e bacteriana não foi verificado efeito significativo em relação ao fator cultivar (Tabela 1) e aos diferentes agentes desinfestantes testados (Tabela

2). Observou-se efeito significativo para as variáveis explantes oxidados e estabelecidos em ambos os fatores estudados (Tabela 1 e 2).

Dentre as cultivares de mirtilheiro avaliadas, 'Duke' apresentou maior percentual de explantes oxidados comparativamente à cultivar Bluecrop e igualou-se estatisticamente à 'Misty' (Tabela 1). Em trabalho conduzido por Silva et al. (2008), onde testaram a presença e a ausência da auxina ácido-indol-acético (AIA), no estabelecimento de diferentes cultivares de mirtilheiro em meio nutritivo WPM, acrescido de $73,8 \mu\text{M}$ de 2iP , estes não observaram efeito significativo na ausência do fitorregulador sobre a porcentagem de oxidação dos explantes. Porém, verificaram o comportamento distinto que ocorre entre as cultivares testadas Delite, Florida, Powderblue, Bluebelle, Bluegem, Briteblue e Woodard na presença do ácido-indol-acético (AIA). Neste trabalho, verificou-se que tal condição,

TABELA 1 – Porcentagem de explantes de mirtilheiro das cultivares Misty, Duke e Bluecrop com contaminação fúngica, bacteriana, oxidados e estabelecidos *in vitro*.

Cultivares	Contaminação Fúngica (%)	Contaminação Bacteriana (%)	Explantes Oxidados (%)	Explantes Estabelecidos (%)
Misty	19,47 a	20,03 a	6,96 ab	67,41 a
Duke	21,69 a	27,29 a	16,69 a	62,75 a
Bluecrop	16,70 a	25,02 a	4,18 b	28,17 b
<i>p</i>	ns	ns	0,02	< 0,01

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

TABELA 2 – Porcentagem de explantes de mirtilheiro com contaminação fúngica, bacteriana, oxidados e estabelecidos *in vitro*, com o uso de diferentes agentes desinfestantes.

Agente desinfestante	Contaminação fúngica (%)	Contaminação bacteriana (%)	Explantes oxidados (%)	Explantes Estabelecidos (%)
Álcool 70% 1 min	19,07 a	27,09 a	0,01 b	70,41 a
NaOCl 2 % 10 min	20,86 a	16,70 a	2,79 b	67,08 a
NaOCl 2% 15 min	16,70 a	23,34 a	2,79 b	47,63 ab
Álcool 70% 1 min + NaOCl 2% 10 min	23,36 a	27,80 a	11,12 ab	41,40 ab
Álcool 70% 1 min + NaOCl 2 % 15 min	16,70 a	27,09 a	22,93 a	37,45 b
<i>p</i>	ns	ns	< 0,01	< 0,01

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

ou seja, o comportamento distinto entre as cultivares, quando se faz referência à variável em questão, ocorreu com o uso de meio nutritivo WPM com 50% da concentração dos sais e sem a utilização de fitorregulador.

No presente trabalho, as cultivares que se estabeleceram com sucesso foram Misty e Duke, enquanto que 'Bluecrop' apresentou baixa porcentagem de oxidação, porém baixa porcentagem de explantes estabelecidos (Tabela 1). Erig e Fortes (2002), em trabalho conduzido no estabelecimento *in vitro* de gemas de pereira, verificaram que a cultivar de pereira Carrick apresentou maior percentual de explantes estabelecidos comparativamente à cultivar Garber. A mesma condição foi observada por Silva et al. (2008), quando verificaram, aos 30 e 45 dias de cultivo *in vitro*, que o estabelecimento de explantes de mirtilheiro está em função das cultivares utilizadas, assim como com o tipo de ramo doador dos explantes (herbáceo ou lenhoso). Observações relacionadas ao comportamento distinto entre as cultivares, quando de seu estabelecimento *in vitro*, conforme observaram os autores Erig e Fortes (2002) trabalhando com pereira e Silva et al. (2006) em mirtilheiro, estão de acordo com os resultados obtidos neste trabalho.

Dentre os diferentes agentes desinfestantes testados o uso de imersão em álcool 70%, durante 1 minuto + imersão em NaOCl 2% durante 15 minutos, resultou em maior percentual de explantes oxidados, comparativamente aos demais tratamentos, no entanto, igualou-se estatisticamente ao uso de imersão em álcool 70% durante 1 minuto + imersão em NaOCl 2% durante 10 minutos (Tabela 2). É possível verificar que, quando utilizado o agente desinfestante imersão em álcool 70% durante 1 minuto + imersão em NaOCl 2% durante 15 minutos pela maior expressão na oxidação dos explantes, ocorre, nesse tratamento, menor percentual de explantes estabelecidos, comparativamente aos tratamentos compostos por imersão em álcool 70% durante 1 minuto e imersão em NaOCl 2% durante 10 minutos.

A imersão de explantes em álcool 70% durante 1 minuto, isoladamente, não é uma prática muito usual no

estabelecimento *in vitro*, já que outros produtos de maior poder desinfestante estão disponíveis no mercado, o que subentende-se que proporcionariam melhores resultados, como o hipoclorito de sódio e de cálcio (Grattapaglia e Machado, 1998), o cloreto de mercúrio (Sedlák e Paprštejn, 2012) ou, ainda, o uso de fungicidas (Alcântara et al., 2011). No entanto, com base nos dados obtidos neste trabalho, verifica-se a viabilidade de uso apenas do álcool 70% durante 1 minuto como desinfestante de explantes de mirtilheiro, em função de sua eficiência no controle da contaminação fúngica e bacteriana, bem como no baixo percentual de explantes oxidados e pela alta porcentagem de explantes estabelecidos (Tabela 2).

O uso da imersão dos explantes de mirtilheiro em NaOCl 2%, durante 10 minutos, mostrou-se muito semelhante ao uso de imersão em álcool 70%, durante 1 minuto + imersão em NaOCl 2% durante 15 minutos (Tabela 2). No entanto, a fim de agilizar as atividades laboratoriais, que demandam tempo significativo, é possível lançar mão daquele agente desinfestante já que é possível obter os mesmos resultados com o uso de ambas as assepsias. De acordo com Skirvin et al. (1999), algumas espécies vegetais são bastante sensíveis à desinfestação com o hipoclorito de sódio, mas são menos sensíveis ao hipoclorito de cálcio, no entanto, esse produto é pouco estável, necessitando de uso imediato após seu preparo.

Conforme o observado neste trabalho, as assepsias com o uso de NaOCl apresentaram resultados distintos quanto à oxidação dos explantes, mostrando-se mais tóxicas na imersão em álcool 70% durante 1 minuto + imersão em NaOCl 2% durante 15 minutos, comparativamente ao uso imersão em NaOCl 2% durante 10 minutos e imersão em NaOCl 2% durante 15 minutos, bem como da imersão em álcool 70% durante 1 minuto. Garcia et al. (2008) em trabalho conduzido com uvaia (*Eugenia piryformis*), observaram o efeito oxidativo do hipoclorito de sódio e do hipoclorito de cálcio sobre a porcentagem de oxidação dos explantes, a qual aumenta linearmente com o aumento do tempo de exposição ao desinfestante.

De acordo com Moraes et al. (2007), em estudo conduzido com gemas axilares de abacaxizeiro (*Ananas comosus*), dentre diferentes concentrações de hipoclorito de sódio testadas, a concentração de 2% por 10 minutos resultou em maior número de gemas vivas. Ostrolucká et al. (2007) têm utilizado a assepsia de gemas apicais e axilares de mirtilheiro cv. 'Berkeley' com o uso de lavagens em água corrente, durante 1 hora seguida de imersão em etanol 70% durante 2 minutos e 0,1% de cloreto de mercúrio com três gotas de Tween durante 6 minutos, e, finalmente lavagem com água destilada estéril por três vezes. Segundo Montarroyos (2000), é necessário adequação de desinfetantes de acordo com a espécie e a sensibilidade do tecido a ser desinfetado.

CONCLUSÕES

Para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de mirtilheiro há um comportamento distinto entre as cultivares.

A oxidação *in vitro* dos explantes de mirtilheiro é baixa.

Para o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de mirtilheiro pode-se fazer o uso de imersão de explantes em álcool 70% durante 1 minuto ou a imersão dos explantes de mirtilheiro em NaOCl 2% durante 10 minutos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsas e pelo aporte de recursos financeiros ao projeto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCÂNTARA, B. K. et al. Methods of asepsis for *in vitro* establishment and germination of *Eucalyptus grandis*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. 3, p. 7-13, Aug. 2011.
- ERIG, A. C.; FORTES, G. R. L. Estabelecimento de pereira (*Pyrus spp.*) *in vitro* a partir de meristemas e gemas. **Ciência Rural**, v. 32, n. 4 p. 577-582, 2002.
- HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 6.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 770 p.
- GARCIA, M. M. et al. Estabelecimento *in vitro* de uvaia: tempo de desinfestação, desinfestante e meio de cultura. In: CIC - CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 17, ENPOS - ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, 10, 2008, Pelotas. **Anais...** Pelotas: FAEM/UFPel, 2008. CD-room.
- 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.
- 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.
- MONTARROYOS, A. V. V. **Contaminação *in vitro***. ABCTP Notícias, n. 36/37, p. 5-10, 2000.
- MORAES, A. M.; ALMEIDA, F. A. C.; CAZÉ FILHO, J. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de gemas axilares de abacaxizeiro. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v. 1, n. 2, p. 39-44, dez. 2007.
- OSTROLUCKÁ, M. G. et al. Protocol for micropropagation of selected *Vaccinium spp.* In: JAIN S. M.; HÄGGMAN H. (eds). **Protocols for Micropropagation of woody trees and fruits**, Springer, Berlin Heidelberg New York, p. 445-455, 2007.
- SKIRVIN, R. et al. Establishment of contaminant-free perennial plants *in vitro*. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 35, n. 4, p. 278-280, 1999.
- SILVA, L. C. et al. Meio nutritivo, reguladores de crescimento e frio no estabelecimento *in vitro* de mirtilo (*vaccinium ashei* reade) Cv. Delite. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, n. 4, p. 405-408, 2006.
- SILVA, L. C. et al. Tipo de ramo e efeito do ácido indol acético (AIA) no estabelecimento *in vitro* de três cultivares de mirtilo. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 522-525, 2008.

SEDLÁK J.; PAPRŠTEIN F. *In vitro* establishment and proliferation of red currant cultivars. **HortScience**, v. 3, n.1, p.: 21-25, 2012.

TRAORE, A. et al. Optimizing a protocol for sterilization and *in vitro* establishment of vegetative buds from mature douglas fir trees. **HortScience**, v. 40, n. 5, p. 1464-1468, 2005.