

**Subcultivos *in vitro* de cultivares de mirtilheiro*****In vitro* subcultures of blueberry cultivars**

DOI:10.34117/bjdv6n7-315

Recebimento dos originais:03/06/2020

Aceitação para publicação:14/07/2020

**Patrícia Maciejewski**

Doutoranda em Agronomia pela Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel.

Campus da Universidade Federal de Pelotas - Centro - 96010900 - Pelotas, RS - Brasil

Caixa-postal: 354

E-mail: agropatriciam@gmail.com

**Aline Ramm**

Doutoranda em Agronomia pela Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel.

Campus da Universidade Federal de Pelotas - Centro - 96010900 - Pelotas, RS - Brasil

Caixa-postal: 354

E-mail: alineramm@yahoo.com.br

**Roseane Maidana Moreira**

Doutora em Agronomia pela Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel.

Campus da Universidade Federal de Pelotas - Centro - 96010900 - Pelotas, RS - Brasil

Caixa-postal: 354

E-mail: roseane\_moreira@hotmail.com

**Bruna Andressa dos Santos Oliveira**Doutoranda em Sistemas de Produção Agrícola Familiar pela Faculdade de Agronomia  
Eliseu Maciel

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel.

Campus da Universidade Federal de Pelotas - Centro - 96010900 - Pelotas, RS - Brasil

Caixa-postal: 354

E-mail: brunah.andressa@gmail.com

**Marilaine Garcia de Mattos**

Mestre em Agronomia pela Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel.

Campus da Universidade Federal de Pelotas - Centro - 96010900 - Pelotas, RS - Brasil

Caixa-postal: 354

E-mail: marimattos1@outlook.com

**Adriane Marinho de Assis**

Doutora em Agronomia pela Universidade Estadual de Londrina.

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel.

Campus da Universidade Federal de Pelotas – Centro - 96010900 - Pelotas, RS - Brasil - Caixa-postal: 354

E-mail: agroadri17@gmail.com

**Márcia Wulff Schuch**

Doutora em Agronomia pela Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel

Instituição: Universidade Federal de Pelotas

Endereço: Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel.

Campus da Universidade Federal de Pelotas – Centro - 96010900 - Pelotas, RS - Brasil - Caixa-postal: 354

E-mail: marciaws@hotmail.com

**RESUMO**

O número de subcultivos é um dos fatores que pode influenciar a multiplicação *in vitro* de diferentes espécies. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de multiplicação *in vitro* de explantes de duas cultivares de mirtilheiro no decorrer de sete subcultivos. Para isso o experimento foi instalado em delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema bifatorial. Os fatores de tratamentos foram subcultivos, com sete níveis (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) e cultivares com dois níveis (Misty e Woodard). As variáveis avaliadas foram o comprimento da brotação mais desenvolvida, número médio de brotações por explante, comprimento médio das brotações, número médio de gemas por explante e taxa de multiplicação. As cultivares Misty e Woodard apresentaram diferenças quanto ao potencial de multiplicação *in vitro*, sendo que ‘Woodard’ obteve os maiores resultados nas variáveis estudadas. Para ambas as cultivares os resultados satisfatórios ocorreram no sétimo subcultivo.

**Palavras-chave:** Micropropagação, *Vaccinium* spp, multiplicação

**ABSTRACT**

The number of subcultures is one of the factors that can influence the *in vitro* multiplication of different species. In this sense, the objective of this work was to evaluate the potential for *in vitro* multiplication of explants of two blueberry cultivars during seven subcultures. For this, the experiment was installed in a completely randomized design, in a two-factor scheme. The treatment factors were subcultures, with seven levels (1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7) and cultivars with two levels (Misty and Woodard). The variables evaluated were the length of the most developed shoot, average number of shoots per explant, average length of shoots, average number of buds per explant and multiplication rate. The cultivars Misty and Woodard showed differences regarding the potential for multiplication *in vitro*, and ‘Woodard’ obtained the highest results in the studied variables. For both cultivars, satisfactory results occurred in the seventh subculture.

**Keywords:** Micropropagation, *Vaccinium* spp, multiplication

**1 INTRODUÇÃO**

O mirtilheiro (*Vaccinium* spp.) é membro da família Ericaceae e pertence ao grupo das pequenas frutas (FAN et al., 2017). Existem cinco grandes grupos de mirtilheiro cultivados comercialmente ao redor do mundo: lowbush (*V. angustifolium* Ait.), highbush (*V. corymbosum* L.), half-high, rabbiteye (*V. ashei* Reade), e southern highbush (*V. corymbosum* e híbridos) (CASPERSEN et al., 2016; DEBNATH, 2016).

O mirtilo é um fruto rico em vitaminas, minerais, antocianinas, polifenóis e antioxidantes (PRIOR et al., 1998; DIAMANTI et al., 2014), devido a essas características e pelas oportunidades de negócio que apresenta, tem despertado a atenção de técnicos e produtores de frutas do Brasil (ANTUNES, 2006), principalmente do segmento da agricultura familiar, pois o cultivo desta frutífera requer uso intensivo de mão de obra, com baixo índice de mecanização, pode ser cultivada em pequenas áreas e apresenta alto valor agregado (MARANGON; BIASI, 2013).

Contudo, apesar das vantagens da cultura, a expansão de seu cultivo está limitada pela disponibilidade, qualidade e preço das mudas, resultantes da dificuldade de propagação da maioria das cultivares (PAGOT; HOFFMANN, 2003; MARANGON; BIASI, 2013). A propagação do mirtilheiro pode ser realizada por sementes, enxertia, estaquia, miniestaquia e microestaquia (NASCIMENTO et al., 2011), porém a produção comercial de mudas é basicamente obtida pela estaquia (MARANGON; BIASI, 2013). Apesar da estaquia preservar as características genéticas e uniformidade das mudas, é um método demorado, e apresenta resultados variáveis de acordo com a cultivar (LITWIŃCZUK, 2013; MEINERS et al., 2007), além de requerer grande quantidade de material propagativo para a confecção das mudas.

Neste contexto, a micropropagação é uma técnica de *cultivo in vitro*, que vem sendo utilizada com eficientes resultados para a produção de mudas no Uruguai (CASTILLO et al., 2004), e permite a formação de mudas em pequeno espaço e em curto período de tempo com alta qualidade fitossanitária (ROSSATO et al., 2015). Porém o crescimento e a multiplicação *in vitro* de brotos de diferentes espécies são afetados por muitos fatores, destacando-se a formulação e consistência do meio de cultura, reguladores de crescimento e suas concentrações, o tipo de explante utilizado e o número de subcultivos. Sendo o número de subcultivos um dos obstáculos encontrados na micropropagação de diferentes espécies, e diante da importância e escassez de trabalhos na literatura sobre este assunto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de multiplicação *in vitro* de explantes de duas cultivares de mirtilheiro no decorrer de sete subcultivos.

**2 MATERIAIS E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Propagação de Plantas Frutíferas pertencente ao Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), localizada no município Capão do Leão (31°48'13,57''S, 52°24'54,18''O e 14 m de altitude), RS, Brasil, de outubro de 2016 a dezembro de 2017.

Dois fatores experimentais foram estudados: subcultivos, com sete níveis (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) e cultivares com dois níveis (Misty e Woodard, pertencentes respectivamente aos grupos southern highbush e rabbiteye). Assim constitui-se um experimento em delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema bifatorial, com cinco repetições.

O material utilizado foi explantes de mirtilheiro, previamente estabelecidos *in vitro*. Cada unidade experimental correspondeu a um frasco de vidro de 250 mL contendo 30 mL de meio de cultura e quatro explantes com duas folhas cada. O meio de cultura utilizado constitui-se dos sais e vitaminas de Wood Plant Media (WPM) (LLOYD; McCOWN, 1981) suplementado com 100 mg L<sup>-1</sup> de mioinositol, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 5 mg L<sup>-1</sup> de 2iP (2-isopentenil adenina) e 6 g L<sup>-1</sup> de ágar. O pH foi ajustado para 5,0 antes da inclusão do ágar, e posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5 atm, por 20 minutos. Os frascos de cultivo foram mantidos em sala de crescimento, com 16 horas de fotoperíodo, temperatura de 25 ± 2°C e densidade de fluxo de fótons do período de luz de 42 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Os subcultivos e as avaliações foram realizados a cada 60 dias. As variáveis avaliadas foram o comprimento da brotação mais desenvolvida (cm), número médio de brotações por explante, comprimento médio das brotações (cm), e número médio de gemas por explante. Foi determinado também a taxa de multiplicação, a partir da divisão do número médio de gemas por explantes obtido aos 60 dias por dois (valor correspondente ao número de gemas por explante no início do experimento).

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk; à homocedasticidade pelo teste de Hartley; e, a independência dos resíduos por análise gráfica. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F (p≤0,05). Constatando-se significância estatística, os efeitos de cultivar foram comparados pelo teste t (p≤0,05) e, quando presente a interação dos fatores de tratamento, a diferença mínima significativa (DMS) do teste foi plotada no gráfico, as diferenças entre os níveis do tratamento foram consideradas significativas quando não houve sobreposição entre as barras verticais. Os efeitos dos subcultivos foram avaliados por modelos de regressão (p≤0,05), conforme segue:  $y = y_0 + ax$ ;  $y = y_0 + ax + bx^2$ ;  $y = y_0 + a/x + b/x^2$ , onde:  $y$  = variável resposta;  $y_0$  = variável resposta correspondente

ao ponto mínimo da curva;  $a$  = valor máximo estimado para a variável resposta;  $b$  = declividade da curva;  $x$  = número de subcultivos. A seleção do modelo foi baseada no baixo resíduo, baixo  $p$ -valor, e alto  $R^2$  e  $R^2$  adj.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

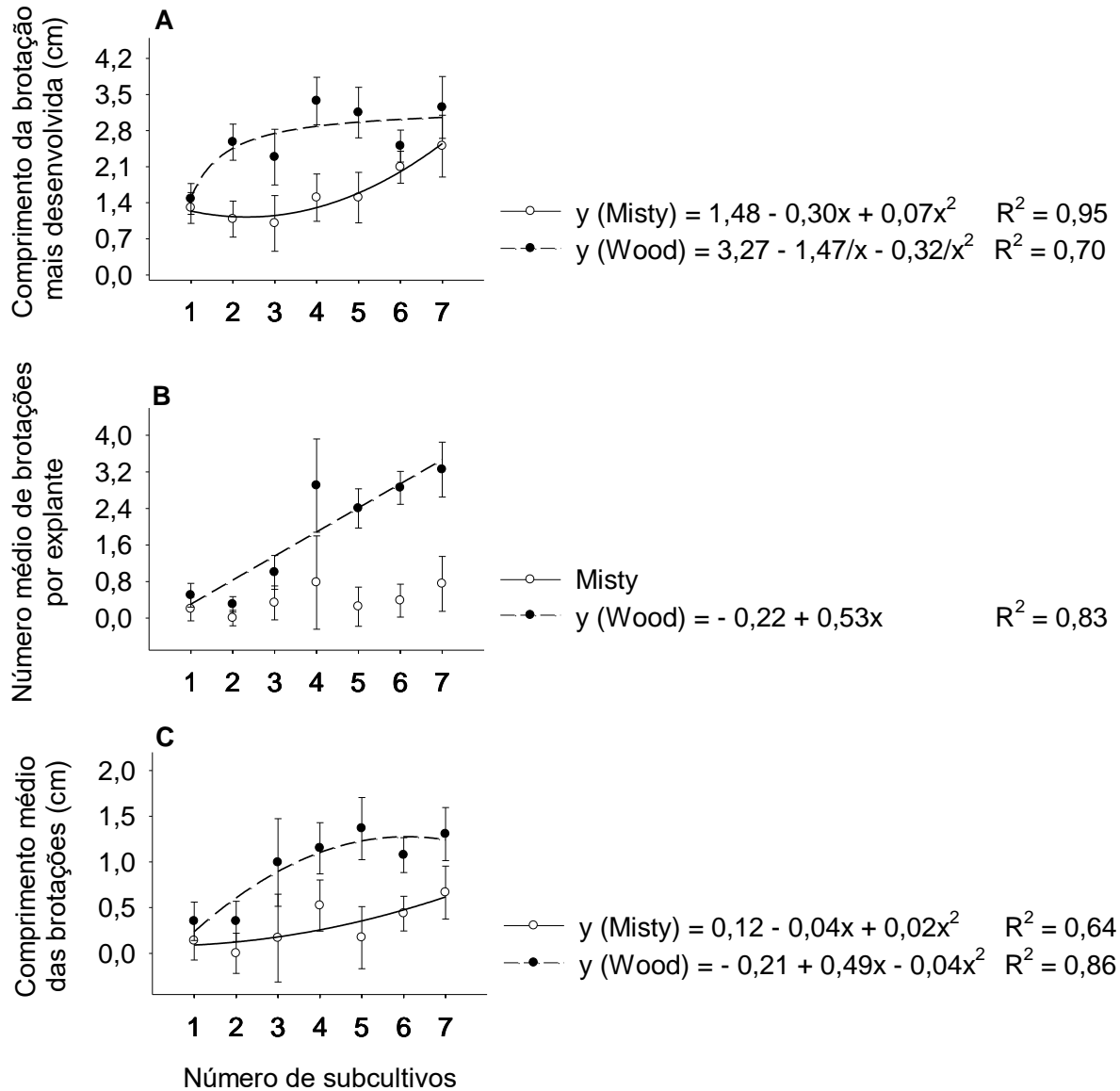
Os pressupostos do modelo matemático estabelecido foram atendidos e não foi necessária a transformação dos dados para todas as variáveis respostas estudadas. Para o comprimento da brotação mais desenvolvida ( $F = 3,00$ ,  $gl = 6$ ,  $p = 0,0137$ ); número médio de brotações por explante ( $F = 6,39$ ,  $gl = 6$ ,  $p < 0,0001$ ); comprimento médio das brotações ( $F = 6,64$ ,  $gl = 6$ ,  $p < 0,0001$ ); número médio de gemas por explante ( $F = 4,96$ ,  $gl = 6$ ,  $p = 0,0005$ ); e, taxa de multiplicação ( $F = 4,96$ ,  $gl = 6$ ,  $p = 0,0005$ ) foi verificada significância para a interação entre os fatores de tratamento testados (cultivar e subcultivo) (Figuras 1 e 2).

Nos subcultivos dois, três, quatro e cinco, a cultivar Woodard apresentou os maiores comprimentos da brotação mais desenvolvida em comparação a cultivar Misty. Foi ajustado modelo de regressão polinomial quadrático para a cultivar Misty ( $F = 39,8529$ ,  $p = 0,0023$ ) e inverso de segunda ordem para Woodard ( $F = 9,9388$ ,  $p = 0,0004$ ). Para a cultivar Misty, houve decréscimo no comprimento da brotação mais desenvolvida de 3,2% do primeiro ao terceiro subcultivo, e a partir desse subcultivo, ocorreram acréscimos até o último subcultivo (Figura 1 A). Para a espécie medicinal *Pfaffia tuberosa*, as maiores médias para brotação mais desenvolvida ocorreram no segundo e terceiro subcultivos, decrescendo no quarto e quinto subcultivo (FLORES et al., 2006).

Quanto as variáveis número médio de brotações por explante e comprimento médio das brotações, as cultivares não diferiram entre si do primeiro ao terceiro subcultivo. Enquanto que, do quarto ao sétimo subcultivo os maiores resultados foram encontrados para a cultivar Woodard. Para o número médio de brotações por explante foi ajustado modelo de regressão linear para ‘Woodard’ ( $F = 25,3348$ ,  $p = 0,004$ ), sendo que para ‘Misty’ não foi possível ajustar modelo de regressão (Figura 1 B). Para o comprimento médio das brotações ajustou-se modelo de regressão polinomial quadrático ambas as cultivares, Misty ( $F = 8,2165$ ,  $p = 0,0016$ ) e Woodard ( $F = 12,0094$ ,  $p = 0,0204$ ) (Figura 1 C). Santos et al. (2008) constatou aumento do número médio de brotações em abacaxi ornamental (*Ananas comosus* var. *bracteatus* (Lindl.)) em períodos sucessivos de subcultivo (até o quarto subcultivo), resultados semelhantes foram verificados por Solano et al. (2019) ao trabalhar com Baunilha (*V. planifolia*), onde os maiores números de brotações por explante ocorreram nos subcultivos seis a dez, já para a variável comprimento de brotações, a medida que os subcultivos

aumentavam, decréscimos no comprimento foram observados diferindo dos resultados encontrados no presente estudo.

Figura 1 - Comprimento da brotação mais desenvolvida (cm) (A), número médio de brotações por explante (B) e comprimento médio das brotações (cm) (C) de mirtilheiro para as cultivares Misty e Woodard (Wood) em diferentes subcultivos. UFPel, Pelotas/RS, 2017/18. (As barras verticais representam a DMS do teste t ( $p \leq 0,05$ )).



O número médio de gemas por explante e a taxa de multiplicação foram menores para a cultivar Misty, que não diferiu da 'Woodard' apenas no primeiro subcultivo. Para o número médio de gemas por explante foi ajustado modelo de regressão linear para a cultivar Misty ( $F = 12,3382$ ,  $p = 0,0171$ ) e polinomial quadrático para Woodard ( $F = 10,7217$ ,  $p = 0,0247$ ) (Figura 2 A). Para a taxa de multiplicação ajustou-se modelo de regressão linear para a cultivar Misty ( $F = 12,3382$ ,  $p = 0,0171$ ) e quadrático para Woodard ( $F = 10,7217$ ,  $p = 0,0247$ ) (Figura 2 B). Para cultivar Woodard,

tanto para número de gemas quanto para taxa de multiplicação houve acréscimos ao longo dos subcultivos, e a maior taxa de multiplicação ocorreu no último subcultivo (16,27). Koriesh et al. (2018) encontraram resultados similares para a variável número de gemas (folhas) em açafraão (*Curcuma longa* L.), apresentando comportamento crescente ao longo dos subcultivos, sendo o maior número de folhas obtido também no último subcultivo (sexto subcultivo).

Para a cultivar Misty houve decréscimos na taxa de multiplicação de 39,6 e 79,3% no segundo e terceiro subcultivos respectivamente, em relação ao primeiro, sendo que a maior taxa de multiplicação ocorreu no último subcultivo (6,99) (Figura 2 B). Corroborando com estes resultados Brahm e Oliveira (2004) em trabalho realizado com cultivares de morangueiro, obtiveram a maior taxa média de multiplicação no último subcultivo (quarto subcultivo), e observaram diferenças de multiplicação entre as cultivares, o mesmo ocorreu no trabalho de EL-Sayed et al. (2017) também com cultivares de morangueiro, onde as maiores taxas de multiplicação ocorreram no último subcultivo (sexto subcultivo).

Diante deste contexto é possível afirmar que tanto para Misty como para Woodard, os resultados satisfatórios foram obtidos no sétimo subcultivo (Figura 3). No entanto ocorreu grande variação nos percentuais entre diferentes cultivares de mirtilheiro, que pode ser justificado pelo potencial genético diferenciado de cada cultivar.

Figura 2 - Número médio de gemas por explante (A) e taxa de multiplicação (B) de mirtilheiro para as cultivares Misty e Woodard (Wood) em diferentes subcultivos. UFPel, Pelotas/RS, 2017/18. (As barras verticais representam a DMS do teste t ( $p \leq 0,05$ )).

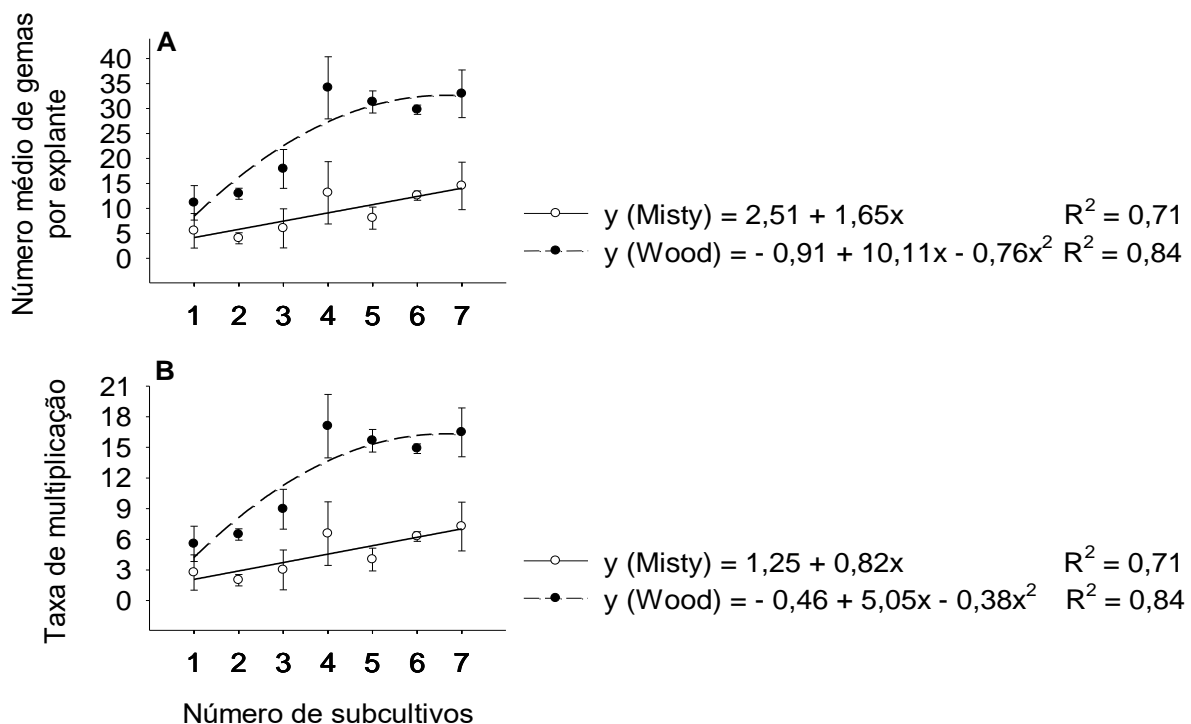


Figura 3 - Frascos com explantes de mirtilheiro das cultivares Misty e Woodard no sétimo subcultivo. UFPel, Pelotas/RS, 2017/18.



#### 4 CONCLUSÕES

‘Misty’ e ‘Woodard’ apresentam diferença pronunciada quanto ao potencial de multiplicação *in vitro*.

Para ambas as cultivares os resultados satisfatórios ocorrem no sétimo subcultivo.

A cultivar Woodard obteve os maiores resultados nas variáveis estudadas.

#### REFERÊNCIAS

ANTUNES, L.E.C. Introdução. In: RASEIRA, M. do C.B.; ANTUNES, L.E.C. (Ed.). **Cultivo do mirtilo** (*Vaccinium* spp). Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. p.13-16. (Embrapa Clima Temperado. Sistemas de produção, 8).

BRAHM, R.U.; OLIVEIRA, R.P. Potencial de multiplicação *in vitro* de cultivares de morangueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n.3, p. 507-510, 2004.



CASPERSEN, S.; SVENSSON, B.; HÅKANSSON, T.; WINTER, C.; KHALIL, S.; ASP, H. Blueberry-Soil interactions from an organic perspective. **Scientia Horticulturae**, v. 208, p. 78-91, 2016.

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, **Anais... Pelotas: Embrapa Clima Temperado**. 2004. p. 225-228.

DEBNATH, S.C. Temporary immersion and stationary bioreactors for mass propagation of true-to-type highbush, half-high, and hybrid blueberries (*Vaccinium* spp.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 92, p. 72-80, 2016.

DIAMANTI, J, MAZZONI, L., BALDUCCI, F., CAPPELLETTI, R., CAPOCASA, F., BATTINO, M., DOBSON, G., STEWART, D., MEZZETTI, B. Use of wild genotypes in breeding program increases strawberry fruit sensorial and nutritional quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 18, p. 3944–3953, 2014.

EL-SAYED, S. F.; EL-SAWY, A. M.; TAHA, S. S.; GOMAH, M. SH. Effect of benzylaminopurine concentration and number of subcultures on behavior of some strawberry cultivars *in vitro*. **Egyptian Journal of Plant Breeding**, v. 21, n. 1, p. 1-12, 2017.

FAN, S.; JIAN, D.; WEI, X.; CHEN, J.; BEESON, R.C.; ZHOU, Z.; WANG, X. Micropropagation of blueberry ‘Bluejay’ and ‘Pink Lemonade’ through *in vitro* shoot culture. **Scientia Horticulturae**, v. 226, p. 277-284, 2017.

FLORES, R.; MALDANER, J.; NICOLOSO, F.T. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 845-851, 2006.

KORIESH, E. M.; EMAN, I. M.; ABO EL-SOUD, I. H.; HEFNI, M. M. Use of biotechnology for multiplication of *Curcuma longa* L. plant during six subcultures. **Hortscience Journal of Suez Canal University**, v. 7, n. 2, p. 113-119, 2018.

LITWIŃCZUK, W. Micropropagation of *Vaccinium* Sp. by *in vitro* axillary shoot proliferation. In: LAMBARDI, M., OZUDOGRU, E.A., JAIN, S.M. (Eds.), *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants*. **Humana Press**, 2013, p. 63–76.

LLOYD, G., MCCOWN, B.H. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Washington, v.30, p. 421–427, 1981.

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

MEINERS, J., SCHWAB, M., SZANKOWSKI, I. Efficient in vitro regeneration systems for *Vaccinium* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, p. 169–176, 2007.

NASCIMENTO, D.C.; SCHUCH, M.W.; PEIL, R.M.N. Crescimento e conteúdo de nutrientes minerais em mudas de mirtilo em sistema convencional e semi-hidropônico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 4, p. 1155-1161, 2011.

PAGOT, E.; HOFFMANN, A. Produção de pequenas frutas. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 1., 2003, Vacaria. **Anais...** Vacaria: Embrapa Uva e Vinho, 2003. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. p. 9-17.

PRIOR, R.L., CAO, G., MARTIN, A., SOFIC, E., MCEWEN, J., O'BRIEN, C., LISCHNER, N., EHLENFELDT, M., KALT, W., KREWER, G., MAINLAND, C.M. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 2686–2693, 1998.

ROSSATO, M.; SCHUMACHER, P.V.; NETTO, A.P.C.; SOUZA, G.C.; REIS E.F.; STEIN, V.C. Multiplicação e enraizamento *in vitro* de gabirobeira. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v.11, n. 2, p.70-77, 2015.

SANTOS, M.D.M.; RIBEIRO, D.G.; TORRES, A.C. Brotações adventícias de abacaxizeiro ornamental sob o efeito de benzilaminopurina, ácido naftalenoacético e períodos de subcultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 9, p. 1115-1120, 2008.

SOLANO, M. C. P.; RUÍZ, J. S.; ARNAO, M. T. G.; CASTRO, O. C.; TOVAR, M. E. G.; BELLO, J. J. B. Evaluation of in vitro shoot multiplication and ISSR marker based assessment of somaclonal variants at different subcultures of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks). **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 25, p. 561-567, 2019.