

ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE MIRTILO A PARTIR DE SEGMENTOS NODAIS

IN VITRO ESTABLISHMENT OF BLUEBERRY TREES STARTING FROM NODAL SEGMENTS

Alan Cristiano ERIG¹
Márcia Wulff SCHUCH²

RESUMO

Com o objetivo de definir a constituição do meio de cultura, o comprimento do explante e o estado físico do meio de cultura que favoreçam o estabelecimento *in vitro* de mirtilo, cvs. Flórida e Delite, dois experimentos foram realizados. No experimento I, onde segmentos nodais da cv. Flórida foram utilizados como explantes, estudou-se quatro diferentes constituições do meio de cultura WPM (T1: WPM - testemunha; T2: WPM + 24,6 µM de 2iP; T3: WPM + 24,6 µM de 2iP + 2,68 µM de ANA; e, T4: WPM + 24,6 µM de 2iP + 2,68 µM de ANA + 1,44 µM de AG₃). Os meios de cultura com as vitaminas de Gamborg, foram adicionados de mio-inositol (100 mg.L⁻¹), sacarose (30 g.L⁻¹) e ágar (6 g.L⁻¹). No experimento II, com material vegetal da cv. Delite, foram estudados dois estados físicos do meio de cultura (semi-sólido e líquido) e três comprimentos dos explantes - segmentos nodais (0,5; 1 e 1,5 cm). Neste experimento, o meio de cultura WPM com as vitaminas de Gamborg foi acrescido de 2iP (24,6 µM), mio-inositol (100 mg.L⁻¹) e sacarose (30 g.L⁻¹). Ao meio semi-sólido adicionou-se ágar (6 g.L⁻¹), e no meio líquido, chumaços de algodão sustentaram os explantes. No experimento I, o meio de cultura WPM + 24,6 µM de 2iP propiciou a maior percentagem de estabelecimento (70,74%). No experimento II, o comprimento do explante não teve efeito sobre o estabelecimento. Em relação ao estado físico do meio de cultura, a percentagem de estabelecimento foi superior utilizando-se o meio semi-sólido (79,23%), comparado ao meio líquido (0,74%).

Palavras-chave: cultura de tecidos, WPM, meio de cultura, 2iP, pequenas frutas.

ABSTRACT

With the objective of defining the culture medium constitution, the explant length and the physical state of culture medium to favor the *in vitro* establishment of blueberry, cvs. Flórida and Delite, were accomplished two experiments. In the experiment I, where nodal segments of the cv. Flórida were used as explants, it was studied four different constitutions of the WPM culture medium (T1: WPM - testimony; T2: WPM + 24.6 µM 2iP; T3: WPM + 24.6 µM 2iP + 2.68 µM NAA; and, T4: WPM + 24.6 µM 2iP + 2.68 µM NAA + 1.44 µM GA₃). The culture mediums with Gamborg vitamins, were added of myo-inositol (100 mg.L⁻¹), sucrose (30 g.L⁻¹) and agar (6 g.L⁻¹). In the experiment II, with vegetable material of the cv. Delite, were studied two physical states of the culture medium (semi-solid and liquid) and three explants lengths - nodal segments (0.5; 1 and 1.5 cm). In this experiment, the WPM culture medium with Gamborg vitamins was added of 2iP (24.6 µM), myo-inositol (100 mg.L⁻¹) and sucrose (30 g.L⁻¹). To the semi-solid medium agar was added (6 g.L⁻¹), and in the liquid medium, cotton wads sustained the explants. In the experiment I, the WPM culture medium + 24.6 µM 2iP propitiated the higher establishment percentage (70.74%). In the experiment II, the length of the explant did not have effect on establishment. In relation to the physical state of the culture medium, the establishment percentage was higher being used the semi-solid medium (79.23%), compared to the liquid medium (0.74%).

Key-words: tissue culture, WPM, culture medium, 2iP, small fruits.

¹Engenheiro Agrônomo, Dr., Pesquisador Bolsista de Pós-Doutorado do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas, 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: acerig@ufpel.tche.br Autor para correspondência;

²Engenheira 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.

INTRODUÇÃO

O mirtilo ('blueberry' ou 'arándano') pertencente à família das Ericáceas e ao gênero *Vaccinium*, é uma fruta de clima temperado que apresenta grande importância comercial, especialmente nos Estados Unidos e em alguns países da Europa [19]. Suas perspectivas de cultivo com sucesso são bastante animadoras nos países do hemisfério Sul, especialmente, devido à época de colheita coincidir com a plena entressafra dos países maiores produtores e, ao mesmo tempo, maiores consumidores [21]. Além disto, existe um mercado capaz de absorver 250.000 toneladas anuais de mirtilo, como é o caso dos Estados Unidos. Este mercado, de mais de 270 milhões de habitantes, possui fortemente arraigada em seus costumes o consumo desta fruta [17].

A região sul do Brasil tem grande potencial para a produção de pequenas frutas, destacando-se o mirtilo (*Vaccinium ashei*) [23]. Esta espécie apresenta alta rentabilidade, devido à baixa utilização de insumos e, até o momento, facilidade de produção limpa, resguardando o ambiente e a segurança alimentar [22]. No entanto, no Brasil, as áreas de cultivo de mirtilo ainda são incipientes, estima-se que sejam em torno de 20 hectares, estando restritas ao Rio Grande do Sul e a regiões serranas de Minas Gerais. A falta de um método eficiente de propagação tem dificultado a expansão desta cultura, visto que os viveiristas não dispõem de mudas de mirtilo para a comercialização [4].

A propagação do mirtilo pode ser realizada por sementes, rebentos e estacas. A propagação por sementes é útil no desenvolvimento de novas variedades, mas induz um longo período improdutivo e produz plantas diferentes da planta-matriz em muitas características. O uso de rebentos permite a obtenção de mudas grandes e em curto período de tempo, porém, em pequeno número [6]. Comercialmente, a produção de mudas é feita através de estaquia, mas os resultados práticos muitas vezes são insatisfatórios e variáveis com a cultivar [15; 6].

A micropropagação constitui-se num método de produção de mudas que apresenta várias vantagens, e é a modalidade, dentro da cultura de tecidos, que mais se tem difundido e, segundo Grattapaglia e Machado [9] encontrado aplicações práticas. No Uruguai, em resposta a crescente demanda de mudas de mirtilo por parte de viveiristas e produtores, a micropropagação tem sido difundida como um método eficiente de propagação de variedades de mirtilo em escala comercial, através de um sistema desenvolvido e patenteado pelo INIA – 'Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria' [2]. Segundo estes autores, a micropropagação permite a obtenção de uma grande quantidade de plantas utilizando pequena quantidade de material vegetal original, restringindo ou minimizando a limitação que a baixa oferta de mudas de mirtilo constitui para a expansão desta cultura. Enquanto isso, no Brasil, as pesquisas com esta espécie ainda são incipientes [3].

Na micropropagação de uma espécie, a primeira etapa é o estabelecimento *in vitro* de plantas, o que se inicia com a seleção dos explantes mais adequados para a micropropagação e termina com a obtenção de uma cultura livre de contaminantes visíveis e, suficientemente, adaptada às condições *in vitro*, de modo que apresente reação à aplicação de fitorreguladores na fase seguinte de multiplicação [9].

O objetivo deste trabalho foi definir a constituição do meio de cultura, o comprimento de segmentos nodais e o estado físico do meio de cultura que favoreçam o estabelecimento *in vitro* de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade), cvs. Flórida e Delite, para início da micropropagação.

METODOLOGIA

Os dois experimentos que compõem este trabalho foram realizados no Laboratório de Micropropagação de Plantas Frutíferas, do Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), na Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), em Pelotas, RS.

No experimento I, os tratamentos aplicados foram quatro diferentes constituições de fitorreguladores de crescimento adicionadas ao meio de cultura WPM – 'Wood Plant Media' [14] (T1: WPM - testemunha; T2: WPM + 24,6 μ M de 2iP [N⁶-isopenteniladenina]; T3: WPM + 24,6 μ M de 2iP + 2,68 μ M de ANA [ácido naftalenoacético]; e, T4: WPM + 24,6 μ M de 2iP + 2,68 μ M de ANA + 1,44 μ M de AG₃ [ácido giberélico]), no delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. Cada repetição constituiu-se por seis tubos de ensaio com um explante cada. Os segmentos nodais, com uma gema e comprimento aproximado de 1 cm, utilizados como explantes, foram obtidos de brotações novas de mudas de mirtilo da cv. Flórida mantidas em vasos na casa de vegetação. O meio de cultura WPM com as vitaminas de Gamborg *et al.* [7] foi acrescido de 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol, 30 g.L⁻¹ de sacarose, e adicionado ou não de fitorreguladores de crescimento conforme o tratamento. O pH foi ajustado para 4,8 antes da inclusão do ágar na concentração de 6 g.L⁻¹ e, posteriormente, foi autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Nos dois experimentos foram utilizados tubos de ensaio (150 x 20 mm) com 10 mL de meio de cultura.

No experimento II, foram testados dois estados físicos do meio de cultura (semi-sólido e líquido) e três comprimentos dos explantes (0,5; 1 e 1,5 cm), no delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 3, com cinco repetições por tratamento. Cada repetição constituiu-se por seis tubos de ensaio com um explante cada. Segmentos nodais com uma gema e comprimento conforme o tratamento, provenientes de brotações novas de

mudas de mirtilo da cv. Delite mantidas em vasos na casa de vegetação foram utilizados como explantes.

Neste experimento, utilizou-se o meio de cultura WPM com as vitaminas de Gamborg *et al.* [7] adicionado de 24,6 μM de 2iP, 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de mio-inositol, 30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose. O pH foi ajustado para 4,8 e, posteriormente, foi autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Ao meio semi-sólido adicionou-se ágar na concentração de 6 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ antes da autoclavagem. Para o meio líquido utilizou-se um chumaço de algodão no tubo de ensaio, para sustentação do explante.

As mudas doadoras de explantes nos dois experimentos, mantidas em vasos na casa de vegetação, foram pulverizadas semanalmente até 45 dias antes da coleta das brotações, com o antibiótico agrimicina (oxitetraciclina e sulfato estreptomycin), e os fungicidas cercobin (tiofanato-metílico) e kumulus (enxofre), nas doses de 2,4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 0,7 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e 3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, visando diminuir a contaminação *in vitro*. As brotações novas coletadas foram levadas ao laboratório, onde inicialmente sofreram uma toaleta, eliminando-se as folhas na altura do pecíolo, e cortando-as em segmentos caulinares com quatro a seis gemas, sendo, em seguida, desinfestadas. A desinfestação, realizada em câmara de fluxo laminar, constituiu-se primeiramente da imersão do material vegetal em álcool a 70% durante 15 segundos, seguido de hipoclorito de sódio com 2 - 2,5% de cloro ativo (água sanitária comercial) durante 5 minutos, adicionando-se uma gota de Tween 20. Na seqüência, o material vegetal foi lavado três vezes com água destilada e autoclavada, para posterior isolamento dos explantes.

Após a inoculação, os tubos de ensaio contendo os explantes foram mantidos no escuro, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, por um período de sete dias, visando evitar ou minimizar a oxidação fenólica. Em seguida, foram transferidos para sala de crescimento com 16 horas de fotoperíodo, temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e densidade de fluxo de fótons do período de luz de 42 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Aos 21 dias de cultivo foram avaliadas a percentagem de contaminação bacteriana, percentagem de contaminação fúngica e percentagem de oxidação, e os frascos que apresentaram contaminação ou oxidação, após registro, foram eliminados. Aos 35 dias de cultivo avaliou-se a percentagem de sobrevivência e a percentagem de estabelecimento. A sobrevivência foi indicada pela coloração verde do explante e o estabelecimento pela emissão de folhas ou broto a partir do explante. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade de erro, através do uso do SANEST [26]. Os dados em percentagem foram transformados em arco seno da raiz quadrada de $x/100$, onde x é o percentual obtido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I

A contaminação e a oxidação dos explantes não representaram entraves ao estabelecimento *in vitro* de mirtilo cv. Flórida. A contaminação bacteriana e a oxidação foram nulas, e a contaminação fúngica ocorreu, em média, em apenas 1,36% dos explantes. Estes resultados, provavelmente, se devem à manutenção das plantas-matrizes em ambiente limpo e protegido (casa de vegetação) e à pulverização prévia das mesmas com antibiótico e fungicidas, e reforçam a afirmativa de Montarroyos [16], de que a condição fitossanitária da planta-matriz determina o grau de facilidade do processo de eliminação de microrganismos contaminantes existentes no explante, durante a sua introdução *in vitro*. Segundo Jaakola *et al.* [11], a iniciação do cultivo *in vitro* de explantes de *Vaccinium* geralmente é limitada pela contaminação, especialmente quando o material vegetal é proveniente de plantas-matrizes mantidas no campo. Gonzales *et al.* [8] verificaram que a percentagem de contaminação e de necrose (oxidação) foi de 50% e 8%, respectivamente, no estabelecimento *in vitro* de mirtilo cv. Berkeley usando segmentos nodais de brotações de plantas-matrizes mantidas no campo. No estabelecimento *in vitro* de mirtilo cvs. Blue Belle e Delite, Silva *et al.* [24] também observaram maior percentagem de oxidação nos explantes provenientes de material vegetal do campo (12%), comparado aos explantes isolados de plantas da casa de vegetação (0,08%).

Para a sobrevivência dos explantes (indicada pela coloração verde do explante) obteve-se uma média de 88,64% aos 35 dias de cultivo *in vitro*, independentemente da constituição de fitorreguladores de crescimento adicionada ao meio de cultura. Gonzales *et al.* [8], obtiveram 42% de sobrevivência dos explantes no estabelecimento *in vitro* de mirtilo cv. Berkeley a partir de segmentos nodais, utilizando o meio de cultura WPM com as vitaminas de MS [18]. Segundo Erig e Schuch [5], a alta percentagem de sobrevivência de explantes nem sempre pode ser usado como indicativo de que haverá o estabelecimento de plantas a partir destes explantes. Muitas vezes os tecidos dos explantes continuam vivos (de coloração verde), no entanto, não emitem folhas ou brotos, isto é, não se estabelecem *in vitro*, o que pode ser justificado pelo grau de desenvolvimento da gema do explante.

Neste experimento, a alta percentagem de sobrevivência (88,64%) também deu lugar a uma alta percentagem de estabelecimento (70,74%) com o meio de cultura WPM acrescido de 24,6 μM de 2iP (Tabela 1). Nesta situação, apenas 17,9% dos explantes que sobreviveram não se estabeleceram *in vitro*, isto é, não emitiram folhas ou broto. Estes resultados estão de acordo com Jaakola *et al.* [11], onde a maior percentagem de estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de *Vaccinium vitis-idaea*,

aproximadamente 18%, também foi obtida com 24,6 μM de 2iP no meio de cultura. Resultados semelhantes foram observados por Gonzales *et al.* [8], na multiplicação *in vitro* de mirtilo cv. Berkeley, onde o

maior número de brotações por explante foi obtido com a adição de 25 μM de 2iP ou 18 μM de zeatina ao meio de cultura WPM.

TABELA 1 – Percentagem de estabelecimento de explantes (segmentos nodais) de mirtilo cv. Flórida, aos 35 dias de cultivo *in vitro*, em função da constituição de fitorreguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura WPM – ‘Wood Plant Media’ (Lloyd e McCown, 1980). UFPel, Pelotas, RS. 2005.

Meio de cultura	% de estabelecimento*
T1: WPM – testemunha	42,26ab
T2: WPM + 24,6 μM de 2iP	70,74a
T3: WPM + 24,6 μM de 2iP + 2,68 μM de ANA	43,21ab
T4: WPM + 24,6 μM de 2iP + 2,68 μM de ANA + 1,44 μM de AG_3	18,8b
Média	43,75
CV (%)	30,49

*Médias não seguidas pelas mesmas letras diferem pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade de erro.

A ausência de 2iP no meio de cultura (testemunha) e a presença de 2iP + ANA não diferiram estatisticamente do meio de cultura adicionado apenas de 2iP, obtendo-se 42,26%, 43,21% e 70,74% de estabelecimento, respectivamente (Tabela 1). A adição de 2iP + ANA + AG_3 ao meio de cultura proporcionou uma percentagem de estabelecimento de apenas 18,8%. Na multiplicação *in vitro* de mirtilo cv. Berkeley, Gonzales *et al.* [8] obtiveram o pior resultado com 2iP (25 μM) + AIA (3 μM) + AG_3 (1,5 μM) no meio de cultura. Segundo Grattapaglia e Machado [9], a adição de fitorreguladores tem o objetivo principal de suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta-matriz. Porém, segundo estes autores, nem sempre é benéfica a aplicação de fitorreguladores imediatamente após o isolamento do explante da planta-matriz, pois eles podem estimular respostas indesejáveis, como a formação de calo e, eventualmente, intoxicar os tecidos. Jaakola *et al.* [11] verificaram que a adição de auxina ao meio de cultura, no estabelecimento *in vitro* de *Vaccinium myrtillus*, estimulou a calogênese, ou então, o escurecimento e morte dos explantes (segmentos nodais). Segundo estes autores, nenhuma regeneração ocorreu a partir destes calos, a não ser quando os mesmos foram transferidos para um meio de cultura sem fitorreguladores de crescimento ou para um meio contendo apenas citocininas.

Por outro lado, a adição exclusiva do fitorregulador de crescimento 2iP ao meio de cultura mostrou-se indispensável para a

maximização do estabelecimento *in vitro* neste experimento (com 70,74% de estabelecimento) (Tabela 1), o que corrobora a afirmativa de Grattapaglia e Machado [9], de que a adição de citocininas é favorável ou, até necessária, para a iniciação e estabelecimento *in vitro* das culturas.

Experimento II

Da mesma forma que o observado no experimento I com a cv. Flórida, a contaminação e a oxidação dos explantes não se mostraram como problemas sérios ao estabelecimento *in vitro* de mirtilo cv. Delite, o que se deve, provavelmente, à manutenção das plantas-matrizes em ambiente limpo e protegido (casa de vegetação) e à pulverização prévia das mesmas com antibiótico e fungicidas. A contaminação bacteriana e a contaminação fúngica ocorreram, em média, em 0,96% e 7,26% dos explantes, respectivamente.

A oxidação foi nula nos explantes cultivados em meio semi-sólido, independentemente do comprimento dos explantes. No meio líquido, esta variou de zero (nula) a 13,46%, conforme o comprimento dos explantes (Tabela 2). Este resultado vai de encontro à afirmativa de Blake [1], de que o meio líquido poderia diluir substâncias inibitórias ao desenvolvimento dos explantes *in vitro*. Por outro lado, resultados semelhantes aos observados neste experimento foram verificados no cultivo *in vitro* de segmentos de ráquias de coqueiro anão [12], e de segmentos de ráquias de açazeiro [13], onde a maior percentagem de oxidação também ocorreu nos explantes cultivados em meio líquido.

TABELA 2 – Percentagem de oxidação aos 21 dias de cultivo *in vitro*, e percentagem de sobrevivência aos 35 dias de cultivo *in vitro*, de explantes (segmentos nodais) de mirtilo cv. Delite, em função do comprimento do explante e do estado físico do meio de cultura. UFPel, Pelotas, RS. 2005.

Comprimento do explante (cm)	% de oxidação*		% de sobrevivência*	
	semi-sólido	líquido	semi-sólido	líquido
0,5	0,0aB	13,46aA	97,19aA	70,74bB
1,0	0,0aB	10,96aA	99,27aA	77,53bB
1,5	0,0aA	0,0bA	99,28aA	100,0aA
Média		4,07		90,66
CV (%)		99,34		12,73

*Médias não seguidas pelas mesmas letras, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade de erro.

A sobrevivência dos explantes cultivados em meio semi-sólido foi superior à obtida em meio líquido, com exceção para o segmento nodal de 1,5 cm de comprimento, que não diferiu estatisticamente (Tabela 2). Mesmo a percentagem de sobrevivência dos explantes cultivados em meio

líquido sendo elevada (variando de 70,74% a 100%) (Tabela 2), a percentagem de estabelecimento, nesta condição, foi praticamente nula (0,74%) (Tabela 3). Este resultado reforça a afirmativa de Erig e Schuch [5], citada anteriormente.

TABELA 3 – Percentagem de estabelecimento de explantes (segmentos nodais) de mirtilo cv. Delite, aos 35 dias de cultivo *in vitro*, em função do estado físico do meio de cultura. UFPel, Pelotas, RS. 2005.

Estado físico do meio de cultura	% de estabelecimento*
semi-sólido	79,23a
líquido	0,74b
Média	39,98
CV (%)	41,63

*Médias não seguidas pelas mesmas letras diferem pelo teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade de erro.

Por outro lado, a alta percentagem de sobrevivência no meio semi-sólido (acima de 97%) também propiciou uma alta percentagem de estabelecimento (79,23%) (Tabela 3). No estabelecimento *in vitro* de mirtilo usando segmentos nodais, Popowich e Filipenya [20], obtiveram com a cv. Herbert, 90,9% de sobrevivência dos explantes e 40% de estabelecimento, utilizando meio WPM semi-sólido suplementado com 2iP. Grattapaglia e Machado [9] mencionam que meios semi-sólidos são comumente utilizados na fase de isolamento, embora em alguns casos sejam usados meios líquidos, como mostram os trabalhos de Gupta *et al.* [10] e de Skene e Barlass [25], com segmentos nodais de eucalipto e ápices de videira, respectivamente.

CONCLUSÕES

A adição de 24,6 μ M de 2iP ao meio de cultura WPM favorece o estabelecimento *in vitro* de mirtilo cv. Flórida.

O estabelecimento *in vitro* de mirtilo cv. Delite é favorecido com o uso de meio de cultura semi-sólido, e não é influenciado pelo comprimento do explante.

AGRADECIMENTOS

Ao Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) / Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); e A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

REFERÊNCIAS

- BLAKE, J. Tissue culture propagation of coconut, date and oil palm. In: DOODS, J.H. (ed.). **Tissue culture of trees**. London: Croom Helm, 1983. p.23-50.
- 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: SIMPOSIO NACIONAL DO MORANGO, 2.; ENCONTRO DE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS, 1., 2004, Pelotas, RS. **Palestras e Resumos...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. p.225-228. (Documentos 124).

3. CORRÊA, E.R.; FRAZON, R.C.; TREVISAN, R.; GONÇALVES, E.D.; RASEIRA, M.C.B. Germinação *in vitro*, do pólen de diferentes cultivares de mirtilo. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 2; ENCONTRO DE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS, 1., 2004, Pelotas. **Palestras e Resumos...** Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado, 2004. p.145-148. (Documentos 124).
4. DONADIO, L.C.; NACHTIGAL, J.C.; SACRAMENTO, C.K. **Frutas exóticas**. Jaboticabal: Funep. 1998. 279p.
5. ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.9, n.3, p.221-227, 2003.
6. FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.; KERSTEN, E.; FORTES, G.R.L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2.ed., Pelotas: Editora UFPel, 1995. 179p.
7. GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, v.50, p.151-158, 1968.
8. GONZALES, M.V.; LOPEZ, M.; VALDES, A.E.; ORDAS, R.J. Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from field-grown plants. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v.137, p.73-78, 2000.
9. 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.
10. GUPTA, P.K.; MASCARENHAS, A.F.; JÁGANNATHAN, V. Tissue culture of forest trees-lonal propagation of mature trees of *Eucalyptus citriodora* Hook, by tissue culture. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v.20, p.195-201, 1981.
11. JAAKOLA, L.; TOLVANEN, A.; LAINE, K.; HOHTOLA, A. Effect of N⁶-isopentenyladenine concentration on growth initiation *in vitro* and rooting of bilberry and lingonberry microshoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.66, p.73-77, 2001.
12. LEDO, A.S.; GOMES, K.K.P.; VIEIRA, G.S.S. Estabelecimento inicial de segmentos de ráquias de coqueiro anão em diferentes condições de cultura *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18., 2004, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, SC: SBF, 2004. 4p.
13. LEDO, A.S.; LAMEIRA, O.A.; BENBADIS, K.A.; MENEZES, I.C.; OLIVEIRA, M.S.P.; LEDO, C.A. Avaliação da oxidação de segmentos de ráquias de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) sob diferentes condições de cultura *in vitro*. **Revista Ciências Agrárias do Pará**, Belém, n.35, p.9-14, 2001.
14. 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**, v.30, p.421-427, 1980.
15. MAINLAND, C.M. Propagation and planting. In: ECK, P.; CHILDERS, N.F. **Blueberry culture**. New Brunswick: Rutgers University, 1966. p.111-131.
16. MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação *in vitro*. **ABCTP Notícias**, Brasília, n.36 e 37, p.5-10, 2000.
17. MONTEIRO, C. La expansión de la producción de arandanos en Uruguay y su relación con el Hemisferio sur. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 2; ENCONTRO DE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS, 1., 2004, Pelotas. **Palestras e Resumos...** Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado, 2004. p.233-241. (Documentos 124).
18. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p.473-497, 1962.
19. 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).
20. POPOWICH, E.A.; FILIPENYA, V.L. Effect of exogenous cytokinin on viability of *Vaccinium corymbosum* explants *in vitro*. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v.44, n.1, p.90-93, 1997.
21. SANTOS, A.M. Situação e perspectivas do mirtilo no Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 2; ENCONTRO DE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS, 1., 2004, Pelotas. **Palestras e Resumos...** Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado, 2004. p.281-284. (Documentos 124).
22. SANTOS, A.M.; RASEIRA, M.C.B. **A cultura do mirtilo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2002. 30p.
23. SHARPE, R.H. **Consultant's Report**. Pelotas: IICA/Embrapa – UEPAE de Cascata, 1980. 11p.
24. SILVA, L.C.; SCHUCH, M.W.; SOUZA, J.A.; ANTUNES, L.E.C. Efeito do local de coleta e desinfestação de explantes no estabelecimento *in vitro* de cultivares de mirtilo (*Vaccinium* spp.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18., 2004, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, SC: SBF, 2004. 4p.
25. SKENE, K.G.M.; BARLASS, M. Micropropagation of grapevine. **Proceedings of the International Plant Propagation Society**, v.30, p.564-570, 1980.
26. ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. **SANEST – Sistema de análise estatística para microcomputadores**. Registrado na SEI – Secretaria Especial de Informática, sob nº.066.060, Categoria A. Pelotas, 1984.

Recebido em 14/09/2005
Aceito em 12/12/2005