

FATORES QUE AFETAM A MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE MIRTILO

FACTORS THAT AFFECT THE *IN VITRO* MULTIPLICATION OF BLUEBERRY TREES

Alan Cristiano ERIG¹
Márcia Wulff SCHUCH²

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar a influência do tipo de citocinina, da qualidade da luz e da orientação do explante na multiplicação *in vitro* de brotos de mirtilo cv. Delite. No primeiro experimento, os tratamentos aplicados foram duas citocininas no meio de cultura (2iP [25 µM] e zeatina [18 µM]) e duas qualidades da luz (branca e verde). No segundo experimento, os tratamentos constituíram-se de duas citocininas utilizadas no meio de cultura (2iP [25 µM] e zeatina [18 µM]) e duas orientações dos explantes no meio de cultura (vertical e horizontal). Em ambos experimentos foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2. O meio de cultura basal, utilizado nos dois experimentos, constituiu-se pelos sais do WPM e as vitaminas de MS, adicionado de mio-inositol (100 mg.L⁻¹), sacarose (30 g.L⁻¹) e ágar (6 g.L⁻¹). Aos 30 dias de cultivo avaliou-se o número médio de brotos e de gemas por explante, o comprimento médio dos brotos e o comprimento do broto mais desenvolvido (maior). No segundo experimento determinou-se também a taxa de multiplicação. Concluiu-se que a multiplicação *in vitro* de brotos de mirtilo cv. Delite é favorecida com o cultivo dos explantes em meio de cultura com zeatina (18 µM) e sob luz branca. Os explantes cultivados horizontalmente no meio de cultura tiveram maior número médio de brotos.

Palavras-chave: cultura de tecidos, citocininas, qualidade da luz, orientação do explante, *Vaccinium* sp.

ABSTRACT

The objective of this work was to determine the cytokinin type, the light quality and the explant orientation in the culture medium that favor the *in vitro* multiplication of blueberry shoots cv. Delite. In the first experiment, the treatments applied were two cytokinins in the culture medium (2iP [25 M] and zeatin [18 µM]) and two light qualities (white and green). In the second experiment, the treatments were constituted of two cytokinins used in the culture medium (2iP [25 µM] and zeatin [18 µM]) and two explants orientations in the culture medium (vertical and horizontal). In both experiments the completely randomized experimental design was used, in factorial outline 2 x 2. The basal culture medium, used in the two experiments, was constituted by the WPM salts and the MS vitamins, added of myo-inositol (100 mg.L⁻¹), sucrose (30 g.L⁻¹) and agar (6 g.L⁻¹). To the 30 days in culture it were evaluated the mean number of shoots and buds for explant, the mean length of the shoots and the length of the shoot more developed (major). In the second experiment it was also determined the multiplication rate. It was observed that the *in vitro* multiplication of blueberry shoots cv. Delite is favored with the cultivation of the explants in culture medium with zeatin (18 µM) and under white light. The explants cultivated in the horizontal orientation in the culture medium had larger mean number of shoots.

Key-words: tissue culture, cytokinins, light quality, explant orientation, *Vaccinium* sp.

¹Eng. 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;

²Eng. Agrônoma, Dra., Professora do Departamento de Fitotecnia, FAEM / UFPel. Caixa Postal 354, CEP 96.010-900, Pelotas, RS. E-mail: marciaws@ufpel.tche.br;

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

INTRODUÇÃO

O mirtilo (*Vaccinium* spp) tem despertado interesse em produtores e consumidores devido, principalmente, a divulgação das propriedades antioxidantes e de combate aos radicais livres que a fruta apresenta, sendo por isso, também chamado de "fruta da longevidade". Entretanto, a demanda maior que a oferta, tanto no mercado interno como para exportação, não resultou em aumento significativo da área de cultivo no país, estimada em, aproximadamente, 27 hectares [20]. A expansão de seu cultivo está limitada pela disponibilidade, qualidade e preço das mudas [21; 20] devido, principalmente, a dificuldade de propagação da maioria das cultivares [21].

A propagação vegetativa de mirtilo é realizada por meio de estaquia, da micropropagação [1] e de rebentos [10]. O uso de rebentos permite a obtenção de mudas grandes e em curto período de tempo, porém, em pequeno número. Comercialmente, a produção de mudas é feita através de estaquia, mas os resultados práticos muitas vezes são insatisfatórios e variáveis com a cultivar [10]. A micropropagação é uma técnica que vem sendo utilizada com eficientes resultados para a produção de mudas de mirtilo no Uruguai, permitindo a obtenção de grande quantidade de plantas utilizando pequena quantidade de material vegetal original, e restringindo ou minimizando a limitação que a baixa oferta de mudas de mirtilo constitui para a expansão da cultura [4].

Na micropropagação de mirtilo, no estágio de estabelecimento *in vitro*, comumente se observa que alguns explantes apresentam ativo crescimento, emitindo brotos alongados com várias gemas, enquanto outros, paralisam seu crescimento após a emissão de um único broto sem alongamento e com folhas grandes, o que dificulta sua posterior multiplicação. Isto também foi verificado por Eccher & Noè [6] em *Vaccinium corymbosum*.

Os explantes podem ser submetidos a alguns tratamentos para estimular uma maior proliferação durante a multiplicação *in vitro* [12]. Uma eficiente produção de brotos em *Quercus rubra* L. foi obtida por Vieitez *et al.* [26] combinando três tratamentos que favoreceram o crescimento das gemas laterais: excisão do ápice, cultivo na orientação horizontal e tratamento com citocininas. O cultivo de explantes na orientação horizontal no meio de cultura também favoreceu a obtenção de maior número de brotos e de gemas, e maior taxa de multiplicação do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido [8], e de marmeleiro cv. MC [7].

Para a quebra da dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares na multiplicação *in vitro*, as citocininas são indispensáveis, e o seu tipo e concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso nesta fase [12]. Na multiplicação *in vitro* de mirtilo (*Vaccinium* spp) as citocininas comumente utilizadas são o 2iP (N⁶-isopenteniladenina) e a zeatina, como demonstram os trabalhos de Gonzales *et al.* [11], Eccher & Noè [6], Reed & Abdelnour-

Esquivel [23], Jaakola *et al.* [14], Debnath & Mcrae [5] e Popowich & Filipenya [22].

Poucos estudos têm sido realizados buscando compreender o efeito da qualidade da luz no crescimento e desenvolvimento dos tecidos de espécies lenhosas cultivados *in vitro*. Entretanto, estes têm demonstrado que a qualidade da luz influencia a eficiência biológica dos fitorreguladores de crescimento adicionados ao meio de cultura, bem como o balanço hormonal nos tecidos. Conseqüentemente, a qualidade da luz disponibiliza uma ferramenta na manipulação da indução de balanços fisiológicos favoráveis a respostas específicas no crescimento das plantas [18]. No cultivo *in vitro* do porta-enxerto de macieira MM106, Casano [3] utilizou filtros de acetato celulose (tipo 'Lee Filters') para modificar o espectro luminoso, e verificou que a luz verde proporcionou a maior proliferação de brotos. Com a framboeseira (*Rubus idaeus* L.) cv. Batum, o maior número médio de brotos e de folhas, e a maior taxa de multiplicação foram obtidos com luz verde [9]. Porém, os melhores resultados para a taxa de proliferação de *Prunus* GF 655-2 cultivados em meio de cultura com benziladenina (BA) foram obtidos utilizando luz branca [2].

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi determinar a influência do tipo de citocinina, da qualidade da luz e da orientação do explante no meio de cultura na multiplicação *in vitro* de brotos de mirtilo cv. Delite.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho, constituído por dois experimentos, foi realizado 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 primeiro experimento, segmentos nodais de mirtilo cv. Delite com um broto sem crescimento (alongamento) e com duas a quatro folhas grandes, provenientes do estágio de estabelecimento *in vitro*, foram utilizados como explantes (Figura 1a). Os tratamentos aplicados consistiram de duas diferentes citocininas no meio de cultura (2iP [25 mM] e zeatina [18 mM]) e duas qualidades da luz sob as quais os explantes cresceram (branca e verde), no delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2. A luz verde foi fornecida por meio da modificação do espectro luminoso das lâmpadas fluorescentes brancas-frias (marca GE 40W) utilizando um filtro verde (número 738 *Jas green*) de acetato celulose, do tipo 'Lee Filters' (Walworth Ind. Estate, Andover, England). O filtro foi colocado sobre os frascos de cultivo, que 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⁻².s⁻¹. Para o tratamento luz branca (testemunha) os frascos foram mantidos no mesmo ambiente, porém, não cobertos pelo filtro.

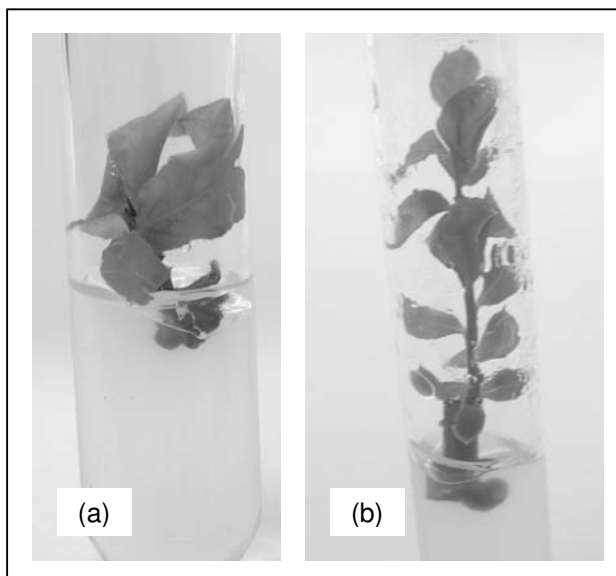


FIGURA 1 – Segmento nodal de mirtilo cv. Delite com um broto sem crescimento (alongamento) e com duas a quatro folhas, proveniente do estágio de estabelecimento *in vitro*, utilizado como explante no experimento I (a); broto emitido por segmento nodal que, após fracionamento, originou os segmentos caulinares utilizados como explantes no experimento II (b). UFPel, Pelotas, RS, 2005.

No segundo experimento, os explantes consistiram-se de segmentos caulinares de mirtilo cv. Delite, com três gemas, comprimento de 0,5 a 1 cm, sem folhas e com o ápice excisado, obtidos pelo fracionamento de brotos alongados emitidos por segmentos nodais previamente estabelecidos *in vitro* (Figura 1b). Os tratamentos constituíram-se de duas diferentes citocininas utilizadas no meio de cultura (2iP [25 mM] e zeatina [18 mM]) e duas orientações dos explantes no meio de cultura (vertical e horizontal), no delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2. Após a inoculação, os frascos com os explantes foram mantidos em 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 $42 \text{ mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes brancas-frias (marca GE 40W).

O meio de cultura basal, utilizado nos dois experimentos, constituiu-se pelos sais do WPM – ‘Wood Plant Media’ [17] e as vitaminas de MS [19], adicionado de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de mio-inositol, $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose e $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ágar, conforme Gonzales *et al.* [11], e ainda acrescido de citocinina (2iP ou zeatina) conforme o tratamento. O pH foi ajustado para 5,2 e, posteriormente, os meios foram autoclavados a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. Foram utilizados frascos de 250 mL com 30 mL de meio de cultura. Em ambos experimentos foram utilizadas quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída de um frasco com cinco explantes.

Aos 30 dias de cultivo avaliou-se o número médio de brotos por explante, o número médio de gemas por explante, o comprimento médio dos brotos e o comprimento do broto mais desenvolvido. No segundo experimento, a partir do número médio de

gemas por explante, determinou-se a taxa de multiplicação, dividindo-se o número de gemas por explante obtido aos 30 dias de cultivo por três (valor correspondente ao número de gemas por explante no início do experimento).

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 [27]. Os dados do número médio de brotos por explante, do número médio de gemas por explante e da taxa de multiplicação foram transformados segundo raiz quadrada de $x + 0,5$, onde x é o número obtido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento I: Obteve-se efeito significativo para o tipo de citocinina no número médio de brotos, e interação entre o tipo de citocinina e a qualidade da luz no número médio de gemas, comprimento médio de brotos e comprimento do broto mais desenvolvido.

O maior número médio de brotos (1,27) foi obtido utilizando-se a zeatina (na concentração de 18 mM) no meio de cultura (Tabela 1). Com a adição de 2iP (na concentração de 25 mM) no meio de cultura, observou-se que os explantes não retomaram o crescimento, isto é, mantiveram o mesmo número de brotos do início do experimento (um broto). Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Eccher & Noè [6] com *Vaccinium corymbosum* cv. Bluehaven, onde a zeatina proporcionou um maior número de brotos comparado ao 2iP. Estes mesmos autores relatam que com $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de zeatina ou 2iP no meio de cultura (91,2 mM e 98,4 mM, respectivamente) a proliferação de brotos com zeatina

foi o dobro daquela obtida com 2iP. Reed & Abdelnour-Esquivel [23] estudaram o uso de zeatina (na concentração de 18,24 mM) para o início do cultivo *in vitro* de 22 espécies de *Vaccinium*, incluindo *Vaccinium myrtillus* L. e *Vaccinium vitis-idaea* L., e esta se mostrou

eficiente para as duas espécies, mas especialmente, para *Vaccinium vitis-idaea* L. Por outro lado, na multiplicação *in vitro* de *Vaccinium myrtillus* L. e *Vaccinium vitis-idaea* L. a eficiência da zeatina igualou-se à influência do 2iP [14].

TABELA 1 – Número médio de brotos, número médio de gemas, comprimento médio de brotos (cm) e comprimento do broto mais desenvolvido (cm) em explantes de mirtilo cv. Delite, aos 30 dias após o início dos tratamentos, em função do tipo de citocinina e da qualidade da luz. UFPel, Pelotas, RS. 2005.

Variável	Citocinina	Qualidade da luz		Média
		Branca	verde	
Número médio de brotos*	zeatina (18 µM)	1,35	1,20	1,27a
	2iP (25 µM)	1,00	1,00	1,00b
Média		1,17	1,10	
Número médio de gemas*	zeatina (18 µM)	9,04aA	4,57aB	6,63
	2iP (25 µM)	1,33bA	1,38bA	1,36
Média		4,43	2,78	
Comprimento médio de brotos (cm)*	zeatina (18 µM)	1,07aA	0,46aB	0,76
	2iP (25 µM)	0,13bA	0,15bA	0,14
Média		0,60	0,31	
Comprimento do broto mais desenvolvido (cm)*	zeatina (18 µM)	1,77aA	0,92aB	1,35
	2iP (25 µM)	0,22bA	0,25bA	0,24
Média		1,00	0,59	

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

Para o número médio de gemas, o melhor resultado foi obtido com zeatina no meio de cultura (18 mM) e sob luz branca (Tabela 1). Quando se utilizou 2iP no meio de cultura (25 mM), tanto sob luz branca como sob a verde, da mesma forma que o observado para o número médio de brotos, verificou-se que não houve retomada de crescimento dos explantes, isto é, estes permaneceram da mesma forma do início ao fim do experimento. O número médio de gemas nos explantes cultivados em meio de cultura com zeatina (18 mM) sob luz branca foi, aproximadamente, 6,5 vezes superior aquele obtido com 2iP no meio de cultura sob luz branca.

O comprimento médio de brotos e o comprimento do broto mais desenvolvido também foram superiores com zeatina no meio de cultura (18 mM) e sob luz branca (Tabela 1). Estes foram, aproximadamente, oito vezes superiores em meio de cultura com zeatina (18 mM) sob luz branca, comparado aos obtidos com 2iP no meio de cultura (25 mM) sob luz branca. Resultados semelhantes foram obtidos por Eccher & Noè [6] com *Vaccinium corymbosum* cv. Bluehaven, onde baixas doses de zeatina produziram efeitos mais favoráveis que o 2iP. Estes autores verificaram que os explantes cultivados com 2iP produziram poucos brotos longos, enquanto que, os explantes cultivados em meio com zeatina originaram um grande número de brotos maiores que 0,5 cm.

Em relação à qualidade de luz verificou-se que o convencional, isto é, a luz branca (quando associada a zeatina) propiciou resultados superiores. Na cultura de tecidos de plantas a fonte de luz, geralmente, utilizada na sala de crescimento é a lâmpada fluorescente branca-fria [15], citada em 90% dos trabalhos científicos [16]. Como a função da qualidade da luz no crescimento e desenvolvimento das plantas ainda não está bem esclarecida, segundo Hahn *et al.* [13], ela pode variar com a espécie de planta, o estágio de crescimento, as condições ambientais, a composição do meio de cultura e a ventilação da sala de crescimento. Por essa razão, estudos detalhados são necessários para correlacionar a qualidade da luz com as condições de crescimento, e inclusive, com os objetivos do cultivo.

Experimento II: Neste experimento, obteve-se efeito significativo para o tipo de citocinina, no número médio de brotos, número médio de gemas e taxa de multiplicação, e para a orientação do explante no meio de cultura, no número médio de brotos.

Da mesma forma que o observado no experimento I, a zeatina (na concentração de 18 mM) no meio de cultura foi superior ao 2iP (na concentração de 25 mM), favorecendo a obtenção do maior número médio de brotos (2,44 x 0,82, respectivamente), maior número médio de gemas (6,24 x 3,37, respectivamente) e maior taxa de multiplicação (2,08 x 1,12, respectivamente) (Tabela 2).

TABELA 2 – Número médio de brotos, número médio de gemas e taxa de multiplicação de explantes de mirtilo cv. Delite, aos 30 dias após o início dos tratamentos, em função do tipo de citocinina e da orientação do explante no meio de cultura. UFPel, Pelotas, RS. 2005.

Variável	Citocinina	Orientação do explante no meio de cultura		Média
		Vertical	horizontal	
Número médio de Brotos*	zeatina (18 µM)	2,28	2,59	2,44a
	2iP (25 µM)	0,53	1,13	0,82b
Média		1,30B	1,81A	
Número médio de gemas*	zeatina (18 µM)	6,86	5,64	6,24a
	2iP (25 µM)	3,35	3,39	3,37b
Média		4,96	4,45	
Taxa de multiplicação*	zeatina (18 µM)	2,29	1,88	2,08a
	2iP (25 µM)	1,12	1,13	1,12b
Média		1,66	1,49	

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

A orientação do explante, que como já mencionado anteriormente, apenas teve efeito sobre o número médio de brotos, proporcionou resultado superior quando inoculado horizontalmente no meio de cultura (1,81 brotos), comparado à orientação vertical (1,3 brotos) (Tabela 2). O melhor resultado obtido com os explantes cultivados na horizontal, possivelmente, se deve ao maior contato do explante com o meio de cultura, não apenas através da base cortada, mas de toda sua superfície, favorecendo a absorção de água, de nutrientes e de fitorreguladores de crescimento do meio, como a zeatina, que se mostrou eficiente na promoção da multiplicação e indução de gemas adventícias nos dois experimentos realizados neste trabalho. Esta superioridade, também pode estar relacionada à quebra da dominância apical, provocada pela orientação horizontal do explante no meio de cultura e pela excisão do ápice do explante, pois segundo Válio [25], o crescimento de brotos laterais está, geralmente, sob controle do ápice vegetativo. Como o transporte de auxinas na planta é polar, é provável que este transporte seja importante

para a regulação da inibição do desenvolvimento das gemas laterais [24]. Assim, a orientação horizontal do explante poderia estar inibindo esta translocação de auxina, favorecendo uma maior brotação das gemas laterais.

Para o comprimento médio de brotos e comprimento do broto mais desenvolvido nenhum dos fatores estudados (citocinina e orientação do explante no meio de cultura) teve efeito significativo, obtendo-se uma média de 0,19 cm (CV=41,93%) para comprimento médio de brotos, e 0,45 cm (CV=66,51%) para comprimento do broto mais desenvolvido.

CONCLUSÕES

A multiplicação *in vitro* de brotos de mirtilo cv. Delite é favorecida com o cultivo dos explantes em meio de cultura com zeatina (18 mM) e sob luz branca. Os explantes cultivados horizontalmente no meio de cultura resultaram em maior número médio de brotos.

REFERÊNCIAS

- ALÁRCON, J.S.M. Propagación de arándano y frambueso rojo. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 2., 2004, Vacaria, RS. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. p.31-38. (Documentos 44).
- BARALDI, R.; ROSSI, F.; LERCARI, B. *In vitro* shoot development of *Prunus* GF 655-2: interaction between light and benzyladenine. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.74, p.440-443, 1988.
- CASANO, S. **Effetti della qualità della luce sulla morfogenesi di specie arboree da frutto coltivate in vitro**. Pisa, 1995. 97f. Dissertazione (Dottorato di Ricerca in Ortoflorofrutticoltura), Università Degli Studi di Pisa, Pisa, 1995.
- 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, RS. **Palestras e Resumos...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. p.225-228. (Documentos 124).
- DEBNATH, S.; McRAE, K. An efficient *in vitro* shoot propagation of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) by axillary bud proliferation. **In vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, New York, v.37, p.243-249, 2001.
- ECCHER, T.; NOË, N. Comparison between 2iP and zeatin in the micropropagation of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*). **Acta Horticulturae**, Hague, n.241, p.185-190, 1989.
- ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Efeito da orientação do explante no meio de cultura, da concentração de sacarose e de ágar na multiplicação *in vitro* de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) cv. MC. **Revista Científica Rural**, Bagé, v.9, n.2, p.80-88, 2004.
- ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Multiplicação *in vitro* do porta-enxerto de macieira cv. Marubakaido: efeito da orientação do explante no meio de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.2, p.293-295, 2002.
- ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Tipo de luz na multiplicação *in vitro* de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) 'Batum'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.27, n.3, p.488-490, 2005.

10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. HAHN, E.J. et al. Blue and red light emitting diodes with or without sucrose and ventilation affect *in vitro* growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets. **Journal of Plant Biology**, New York, v.43, p.247-250, 2000.
14. 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.
15. KIM, S.J. et al. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.101, n.1-2, p.143-151, 2004.
16. KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F.J. Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. 'Grande Naine'). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.55, p.141-145, 1999.
17. 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.
18. MORINI, S.; MULEO, R. Effects of light quality on micropropagation of woody species. In: JAIN, S.M.; ISHII, K. **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 2003. p.3-35.
19. 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.
20. PAGOT, E. Diagnóstico da produção e comercialização de pequenas frutas. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 2., 2004, Vacaria, RS. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. p.9-18. (Documentos 44).
21. 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).
22. 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.
23. REED, B.M.; ABDELNOUR-ESQUIVEL, A. The use of zeatin to initiate *in vitro* cultures of *Vaccinium* species and cultivars. **HortScience**, Alexandria, v.26, p.1320-1322, 1991.
24. SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant Physiology**. California, Wadsworth Publishing Company, 1992. 682p.
25. VÁLIO, I.F.M. Auxinas. In: FERRI, M.G. (Coord.) **Fisiologia vegetal 2**. São Paulo: EPU, 2.ed., 1985. p.39-72.
26. VIEITEZ, A.M. et al. *In vitro* shoot proliferation determined by explant orientation of juvenile and mature *Quercus rubra* L. **Tree Physiology**, Victoria, v.12, n.2, p.107-117, 1993.
27. 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 08/03/2006

Aceito em 03/10/2006