



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

**Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

**Área de concentração Fruticultura de Clima Temperado**

**Dissertação**

**Substâncias húmicas, reguladores vegetais e substratos na propagação  
de mirtilheiro 'Bluecrop'**

**Eliane Lima de Aquino**

Pelotas, 2020

**Eliane Lima de Aquino**

**Substâncias húmicas, reguladores vegetais e substratos na propagação  
de mirtilheiro 'Bluecrop'**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação da Dra. Adriane Marinho de Assis, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de concentração em Fruticultura de Clima Temperado, para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

**Orientadora:** Dra. Adriane Marinho de Assis– UFPel/FAEM

**Coorientadora:** Dra. Márcia Wulff Schuch – UFPel/FAEM

Pelotas, 2020

Eliane Lima de Aquino

**Substâncias húmicas, reguladores vegetais e substratos na propagação  
de mirtilheiro 'Bluecrop'**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Fruticultura de Clima Temperado, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: \_\_\_\_\_

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Adriane Marinho de Assis (orientadora)

Doutora em Agronomia pela Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Prof. Dra. Elisane Schwartz

Doutora em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Prof. Dra. Aline Ritter Curti

Doutora em Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Dra. Luana Borges Affonso

Doutora em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

## **Agradecimentos**

À minha mãe, Maria de Lourdes Lima de Aquino, que desde cedo ensinou-me que a educação é o bem mais precioso que podemos ter. Agradeço pelo amor, pelo apoio e por não medir esforços para dar tudo o que precisei, mesmo que isso significasse deixar de conseguir algo para si. Agradeço por cada ligação, por cada palavra de carinho que, mesmo de longe, fez-me recobrar as forças para continuar seguindo diante das dificuldades.

À minha irmã, Sílvia Lima de Aquino, por sempre me incentivar e apoiar para que eu buscasse um futuro melhor. Agradeço pelos conselhos, pelas correções em cada coisa que eu escrevo (mesmo que não façamos parte da mesma área acadêmica), pelos puxões de orelha (alguns necessários, outros não (risos)), mas que me fizeram perceber o quão é importante continuar seguindo nossos sonhos, mesmo que a sociedade diga que nós (negros e pobres) não devemos ter acesso à educação.

Ao meu irmão, Vagner Lima de Aquino, pelos conselhos, incentivo e palavras de conforto quando tudo parecia estar dando errado. Pelo carinho, mesmo de longe, pelo suporte e por, juntamente com minha irmã, serem exemplos daquilo que eu quero ser no futuro.

À minha avó, Belarmina Pereira de Andrade, pelo carinho que sempre teve comigo.

Ao meu namorado, Christian Lucas Teixeira, pelo amor, carinho, respeito, atenção e, acima de tudo, paciência nos momentos difíceis. Por ser meu melhor amigo, meu melhor amante e minha melhor companhia. Por sempre me lembrar que, mesmo que algo pareça não ter solução, em algum momento as coisas vão dar certo, de um jeito ou de outro. Pelotas não teria a mesma graça sem você.

À minha orientadora e coorientadora, Adriane Marinho de Assis e Márcia Wulff Schuch. Agradeço por terem aceitado me orientar, mesmo que eu tenha vindo de outra universidade. Pelo suporte, conselhos, ensinamentos, correções, palavras de incentivo, suporte em situações delicadas e pela amizade construída até aqui.

À Tainara Gris, amiga e colega de laboratório que tive o prazer de conhecer durante essa jornada. Pelo carinho, pela ajuda, pelas risadas e por dividir comigo o desespero de ser mestranda (risos).

À Zeni Tomaz, por toda a ajuda no experimento desde o começo. Pelas orientações, auxílio no desenvolvimento dos delineamentos experimentais e análises estatísticas deste trabalho. Pelos conselhos e pela amizade.

Aos colegas de laboratório Aline Ramm, Patrícia Maciejesk, Marilaine Mattos, Dianini Frolech, Patrícia Graosque e Jacqueline Barcelos, pela ajuda, pelas risadas de todas as manhãs, convivência e amizade.

À Universidade Federal de Pelotas e ao programa de Pós-Graduação em Fruticultura de Clima Temperado, pela oportunidade de realizar este curso e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

## Resumo

AQUINO, Eliane Lima de. **Substâncias húmicas, reguladores vegetais e substratos na propagação de mirtilheiro 'Bluecrop'**. Orientadora: Adriane Marinho de Assis. 2020. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, 2020.

Objetivou-se com este estudo avaliar a viabilidade da utilização de substâncias húmicas, reguladores vegetais e diferentes substratos na obtenção de mudas de mirtilheiro (*Vaccinium* sp.) 'Bluecrop' por micropropagação. Para tanto, foram realizados três experimentos, sendo que no primeiro avaliou-se a utilização de substâncias húmicas adicionados ao meio de cultura para a multiplicação *in vitro* dessa cultivar. Plântulas de mirtilheiro 'Bluecrop' estabelecidas *in vitro* foram segmentadas em explantes contendo duas gemas que foram inoculados em meio de cultura WPM (*Wood Plant Media*), contendo os diferentes tratamentos. O delineamento experimental foi em esquema fatorial 2x4 (ausência ou presença (100 mg.L<sup>-1</sup>) de 2-Isopenteniladenina) e quatro concentrações de substâncias húmicas (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 ml.L<sup>-1</sup>). Após 90 dias avaliou-se: porcentagem de sobrevivência, número de gemas, número de brotações, comprimento da maior brotação, massa da matéria fresca e seca total. No segundo experimento, avaliou-se o efeito das substâncias húmicas no enraizamento *in vitro* de plântulas de mirtilheiro. O delineamento experimental foi em esquema fatorial 2x4 (ausência ou presença (1,0 mg.L<sup>-1</sup>) de ácido indolbutírico) e quatro concentrações de substâncias húmicas (0,0; 1,0; 2,0 e 3,0 ml.L<sup>-1</sup>). Após 90 dias avaliou-se: porcentagem de sobrevivência, número de raízes, comprimento da maior raiz, massa da matéria fresca e seca total. No terceiro experimento testaram-se diferentes concentrações de ácidos húmicos e substratos no enraizamento *ex vitro* da frutífera. Utilizou-se o esquema fatorial 3x3 (três tipos de substratos (vermiculita, casca de arroz carbonizada e fibra de coco) e três concentrações de substâncias húmicas (0,0; 2,0, e 4,0 ml.L<sup>-1</sup>). Após 90 dias avaliou-se: porcentagem de sobrevivência, número de raízes, comprimento da maior raiz, massa da matéria fresca e seca total. Ao final dos experimentos concluiu-se, nas condições avaliadas, que a utilização de substâncias húmicas não interferiu positivamente na multiplicação e enraizamento do mirtilheiro 'Bluecrop', sendo que na multiplicação *in vitro* a utilização de 2iP mostrou melhores resultados, na etapa de

enraizamento *in vitro* dispensa-se o uso do AIB e no enraizamento *ex vitro* o substrato vermiculita é o mais indicado.

**Palavras-chave:** Cultivo *in vitro*. Ácidos húmicos. *Vaccinium* sp.

## Abstract

AQUINO, Eliane Lima de. **Humic substances, plant regulators and substrates in the propagation of blueberry 'Bluecrop'**. Advisor: Adriane Marinho de Assis. 2020. 77f. Dissertation (Master of Science) - Faculty of Agronomy Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas, Capão do Leão, 2020.

The objective of this study was to evaluate the feasibility of using humic substances, plant regulators and different substrates to obtain 'Bluecrop' blueberry seedlings (*Vaccinium* sp.) by micropropagation. For this, three experiments were carried out, the first of which evaluated the use of humic substances added to the culture medium for the *in vitro* multiplication of this cultivar. The 'Bluecrop' blueberry seedlings produced *in vitro* were segmented in explants containing two buds that were inoculated in WPM (*Wood Plant Media*) culture medium, containing the different treatments. The experimental design was in a 2X4 factorial scheme (absence or presence ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) of 2-Isopentenyladenine) and four concentrations of humic substances (0,0; 1,0; 2,0 and  $3,0 \text{ ml.L}^{-1}$ ). After 90 days it was evaluated: percentage of survival, number of buds, number of sprouts, length of the largest sprout, total fresh and dry matter mass. In the second experiment, the effect of humic substances on *in vitro* rooting of blueberry seedlings was evaluated. The experimental design was in a 2X4 factorial scheme (absence or presence ( $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) of indolbutyric acid) and four concentrations of humic substances (0,0; 1,0; 2,0 and  $3,0 \text{ ml.L}^{-1}$ ). After 90 days it was evaluated: percentage of survival, number of roots, length of the largest root, mass of fresh and total dry matter. In the third experiment, different concentrations of humic acids and substrates were tested in the *ex vitro* rooting of the fruit. The 3x3 factorial scheme (three types of substrates (vermiculite, carbonized rice husk and coconut fiber) and three concentrations of humic substances (0,0; 2,0 and  $4,0 \text{ ml.L}^{-1}$ ) were used. After 90 days it was evaluated: percentage of survival, number of roots, length of the largest root, total fresh and dry matter mass. At the end of the experiments it was concluded, under the evaluated conditions, that the use of humic substances did not positively interfere in the multiplication and rooting of the blueberry 'Bluecrop', and in the multiplication *in vitro* the use of 2iP showed better results, in the rooting stage *in vitro*, the use of IBA is dispensed with and in rooting *ex vitro* the vermiculite substrate is the most suitable.

**Keywords:** *In vitro* cultivation. Humic acids. *Vaccinium* sp.

## Lista de figuras

- Figura 1.** Mirtileiro cultivar Duke (*V. corymbosum*) cultivado em vaso (A) e detalhe das folhas (B) e dos frutos (C) em diferentes estágios de maturação. .... 19
- Figura 2.** Frutos de *Vaccinium corymbosum* cultivar Bluecrop. .... 22
- Figura 3.** Materiais utilizados na micropropagação (A) e procedimento de repicagem de explantes de mirtileiro cultivar Bluecrop, antes da montagem dos experimentos (B). .... 24
- Figura 4.** Produto comercial Solo Humics® ..... 27
- Figura 5.** Mirtileiro 'Bluecrop' cultivado *in vitro* para retirada dos explantes (A) e materiais utilizados na instalação do experimento (B). .... 35
- Figura 6.** Preparo dos meios de cultura nos frascos contendo as concentrações de substâncias húmicas. .... 36
- Figura 7.** Explantes de mirtileiro 'Bluecrop' submetidas aos tratamentos contendo substâncias húmicas (SH) e 2-Isopenteniladenina (2iP) (100 mg.L<sup>-1</sup>), com comprimento variando entre 2,07 e 4,46 cm, sendo: T1= 0 ml.L<sup>-1</sup> de SH + 2iP; T2= 1,0 ml.L<sup>-1</sup> de SH + 2iP; T3= 2,0 ml.L<sup>-1</sup> de SH + 2iP; T4= 3,0 ml.L<sup>-1</sup> de SH + 2iP, T5= 0 ml.L<sup>-1</sup> de SH ; T6= 1,0 ml.L<sup>-1</sup> de SH ; T7= 2,0 ml.L<sup>-1</sup> de SH ; T8= 3,0 ml.L<sup>-1</sup> de SH. .... 38
- Figura 8.** Massa de matéria fresca total dos explantes de mirtileiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e 2iP (100 mg.L<sup>-1</sup>) no meio de cultura *Wood Plant Media*. S/ 2iP= sem 2iP. C/ 2iP=Com 2iP. .... 41
- Figura 9.** Massa de matéria seca total dos explantes de mirtileiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e 2iP (100 mg.L<sup>-1</sup>) no meio de cultura *Wood Plant Media*. S/ 2iP= sem 2iP. C/ 2iP= com 2iP. .... 42
- Figura 10.** Mirtileiro 'Bluecrop' cultivado *in vitro* para retirada dos explantes (A) e materiais utilizados no experimento (B). .... 46

**Figura 11.** Plântulas de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidas aos diferentes tratamentos contendo substâncias húmicas e ácido indolbutírico (AIB), sendo: sendo: T1= 0 ml.L<sup>-1</sup> de SH + AIB; T2= 1,0 ml.L<sup>-1</sup> de SH + AIB; T3= 2,0 ml.L<sup>-1</sup> de SH + AIB; T4= 3,0 ml.L<sup>-1</sup> de SH + AIB, T5= 0 ml.L<sup>-1</sup> de SH ; T6= 1,0 ml.L<sup>-1</sup> de SH ; T7= 2,0 ml.L<sup>-1</sup> de SH ; T8= 3,0 ml.L<sup>-1</sup> de SH. ....48

**Figura 12.** Massa de matéria fresca total dos explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e AIB no meio de cultura *Wood Plant Media*. S/AIB = sem AIB, C/AIB = com AIB. ....51

**Figura 13.** Massa de matéria seca total dos explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e AIB no meio de cultura *Wood plant media*. S/AIB = sem AIB, C/AIB = com AIB. ....52

**Figura 14.** Preparo das embalagens plásticas com casca de arroz carbonizada para a instalação do experimento.....55

**Figura 15.** Mirtilheiro 'Bluecrop' cultivado previamente *in vitro* (A) e explante com 3 cm, utilizado na instalação do experimento (B). ....56

**Figura 16.** Explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos aos tratamentos com ácidos húmicos e vermiculita (A) e fibra de coco (B). ....57

**Figura 17.** Massa de matéria fresca total dos explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e diferentes tipos de substrato.....60

## Lista de Tabelas

**Tabela 1.** Taxa de multiplicação de explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e 2-Isopenteniladenina (2iP) ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) no meio de cultura *Wood Plant Media*, aos 90 dias de cultivo. Capão do Leão, 2019...37

**Tabela 2.** Número de brotações em explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e 2-Isopenteniladenina (2iP) ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) no meio de cultura *Wood Plant Media*, aos 90 dias de cultivo. Capão do Leão, 2019...39

**Tabela 3.** Comprimento da maior brotação em explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e 2-Isopenteniladenina (2iP) ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) no meio de cultura *Wood Plant Media*, aos 90 dias de cultivo. Capão do Leão, 2019. ....40

**Tabela 4.** Massa da matéria fresca em explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e 2-Isopenteniladenina (2iP) ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) no meio de cultura *Wood Plant Media*, aos 90 dias de cultivo. Capão do Leão, 2019. ....40

**Tabela 5.** Massa da matéria seca em explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e 2-Isopenteniladenina (2iP) ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) no meio de cultura *Wood Plant Media*, aos 90 dias de cultivo. Capão do Leão, 2019. ....42

**Tabela 6.** Número de raízes em explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e ácido indolbutírico (AIB) ( $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) no meio de cultura *Wood Plant Media*. Capão do Leão, 2019. ....48

**Tabela 7.** Comprimento da maior raiz em explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e ácido indolbutírico (AIB) ( $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) no meio de cultura *Wood Plant Media*. Capão do Leão, 2019.....49

**Tabela 8.** Massa da matéria fresca total em explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e ácido indolbutírico (AIB) ( $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) no meio de cultura *Wood Plant Media*. Capão do Leão, 2019.....50

**Tabela 9.** Massa da matéria seca total em explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e ácido indolbutírico (AIB) ( $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) no meio de cultura *Wood Plant Media*. Capão do Leão, 2019. ....51

**Tabela 10.** Porcentagem de sobrevivência em explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e diferentes substratos durante enraizamento *ex vitro*, aos 90 dias de cultivo. Capão do Leão, 2019. ....58

**Tabela 11.** Número de raízes em explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e diferentes substratos durante enraizamento *ex vitro*, aos 90 dias de cultivo. Capão do Leão, 2019. ....58

**Tabela 12.** Comprimento da maior raiz em explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e diferentes substratos durante enraizamento *ex vitro*, aos 90 dias de cultivo. Capão do Leão, 2019. ....59

**Tabela 13.** Massa da matéria seca total em explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e diferentes substratos durante enraizamento *ex vitro*, aos 90 dias de cultivo. Capão do Leão, 2019. ....61

## SUMÁRIO

1. <b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
2. <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1 Aspectos socioeconômicos da fruticultura .....	16
2.2 Pequenas Frutas.....	17
2.3. Mirtileiro: classificação botânica e morfologia .....	17
2.3 Cultivar Bluecrop.....	21
2.4 Propagação de mirtileiro .....	22
2.5 Substâncias húmicas .....	26
2.6 Reguladores vegetais.....	29
2.7 Substratos no enraizamento <i>ex vitro</i> .....	30
3. <b>CAPÍTULO I – Substâncias húmicas e 2-isopenteniladenina na multiplicação <i>in vitro</i> de mirtileiro ‘Bluecrop’</b> .....	33
3.1 Introdução .....	33
3.2 Material e Métodos.....	35
3.3 Resultados e discussão .....	37
3.4 Conclusão .....	43
4. <b>CAPÍTULO II – Substâncias húmicas e ácido indolbutírico no enraizamento <i>in vitro</i> de mirtileiro ‘Bluecrop’</b> .....	44
4.1 Introdução .....	44
4.2 Material e Métodos.....	45
4.3 Resultados e discussão .....	47
4.3 Conclusão .....	52
5. <b>CAPÍTULO III – Substâncias húmicas e substratos no enraizamento <i>ex vitro</i> de mirtileiro ‘Bluecrop’</b> .....	53
5.1 Introdução .....	53
5.2 Material e Métodos.....	55
5.3 Resultados e discussão .....	57
5.4 Conclusão .....	63
6. <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	64
7. <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	65

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura do mirtilheiro representa uma alternativa para os produtores do Sul do Brasil por ser rústica, rentável e demandar pouca quantidade de insumos, contribuindo com a preservação do meio ambiente e a segurança alimentar (ARRUDA et al., 2017). Além disso, a fruta vem despertando o interesse dos consumidores, devido a aparência e o sabor exótico, além de suas propriedades nutraceuticas (PIETTA; PALEZI, 2015).

As cultivares comerciais de mirtilheiro são divididas em três grupos principais, de acordo com suas características morfológicas: *Lowbush*, *Rabbiteye* e *Highbush* (*V. corymbosum* L.). Este último é subdividido em dois subgrupos, de acordo com a maior ou menor necessidade de horas de frio da planta, respectivamente: “*Northern Highbush Blueberry*” (NHB) e “*Southern Highbush Blueberry*” (SHB) (MATOS, 2015). Uma das cultivares promissoras para algumas regiões do Brasil é a ‘Bluecrop’ (*V. corymbosum* L.), pertencente ao subgrupo NHB e, segundo Antunes; Raseira (2006), considerada por muitos anos como a cultivar mais importante do mundo.

Para a expansão nas áreas de cultivo dessa frutífera é fundamental a utilização de mudas de qualidade. Embora a estaquia seja o método mais utilizado para a obtenção de mudas de mirtilheiro em escala comercial (SOUZA et al, 2011), dependendo da cultivar, a técnica nem sempre possui alto rendimento (PENÃ et al., 2012). Assim, uma alternativa para contornar tal fato é a micropropagação, técnica que possibilita a produção de mudas em quantidade, com qualidade e em um curto espaço de tempo (DAMIANI; SCHUCH, 2009b).

Vários fatores podem contribuir para o sucesso da micropropagação; dentre os quais está o tamanho e tipo do explante, as concentrações de reguladores de crescimento e a composição do meio de cultura (HORBACH et al, 2011).

Os reguladores de crescimento são responsáveis por induzir a proliferação de gemas axilares e aumentar a regeneração de explantes cultivados *in vitro*. Na multiplicação de mirtilheiro são utilizadas citocininas, como o 2iP ( $N^6$ -

isopenteniladenina) e a zeatina no meio de cultura (JAKOOLA et al. (2001), SILVA et al., (2006) e SCHUCH et al. (2008). Além disso, substâncias nutritivas e bioestimulantes, como as substâncias húmicas podem ser usadas no meio de cultura, a fim de promover melhor desenvolvimento das plantas cultivadas *in vitro*.

As substâncias húmicas estão presentes no solo e possuem efeitos no crescimento e desenvolvimento de várias espécies vegetais (BALDOTTO et al., 2009; BALDOTTO; BALDOTTO, 2013). No cultivo *in vitro* podem atuar como bioestimulante e seus efeitos foram comprovados em trabalhos sobre micropropagação de espécies ornamentais e medicinais, como as orquídeas (*Orchidaceae*) e o manjeriço (*Ocimum basilicum*) (CORDEIRO, 2010; SILVA et al., 2015). Por outro lado, no crescimento *ex vitro* os efeitos foram observados no acúmulo de biomassa e nutrientes pelas plantas, aumento do crescimento radicular, além de possuírem mecanismo de ação similar às auxinas (BALDOTTO et al., 2014).

Apesar dos resultados promissores, são escassos os estudos acerca da utilização das substâncias húmicas no cultivo *in vitro* e *ex vitro* de mirtilheiro e seus possíveis efeitos sobre o desenvolvimento da planta.

Além dessas substâncias, outro fator primordial no processo de produção de mudas de mirtilheiro é o substrato utilizado durante a aclimatização (MUNIZ, 2013), que é uma das etapas mais críticas da micropropagação. O mesmo deve possuir características físicas e químicas que atendam às necessidades da espécie a ser propagada (CUNHA et al., 2006). Considerando a diversidade de materiais a serem usados como substrato torna-se importante a identificação do mais adequado para cada cultivar de mirtilheiro, de forma a aperfeiçoar a etapa de aclimatização e o enraizamento *ex vitro*.

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de concentrações de substâncias húmicas no meio de cultura na fase de multiplicação e enraizamento *in vitro* de mirtilheiro 'Bluecrop', além de identificar o substrato e a concentração de substâncias húmicas mais adequada para o enraizamento *ex vitro* de mudas micropropagadas da cultivar supracitada.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos socioeconômicos da fruticultura

A fruticultura é um setor do agronegócio de grande importância para diversos países ao redor do globo. Neste cenário, a China lidera como maior produtor mundial, com cerca de 261 milhões de toneladas colhidas em 2014 (APEX BRASIL, 2017). Em segundo lugar na lista dos países que mais produzem frutas está a Índia, que em 2017 colheu cerca de 97 milhões de toneladas (THE TIMES OF INDIA, 2018).

O Brasil ocupa a terceira posição no ranking mundial, com cerca de 43,5 milhões de toneladas colhidas no ano de 2017 (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2018). No país, a fruticultura figura como um dos setores mais importantes do agronegócio e contribui direta e indiretamente para a geração de seis milhões de empregos, o que corresponde a 27% dos postos de trabalho ofertados pela área (ABRAFRUTAS, 2018).

A diversidade edafoclimática possibilita a produção de várias frutas em todas as regiões do Brasil. De acordo com os dados do IBGE (2018), as principais frutas produzidas no país são laranja (*Citrus sinensis*) (16.713.534 t), banana (*Musa* sp.) (6.752.171 t), melancia (*Citrullus lanatus*) (2.240.796 t), coco-da-baía (*Cocos nucifera*) (1.564.500 t), abacaxi (*Ananas comosus*) (1.766.986 t), mamão (*Carica papaya*) (1.060.392 t) e uva (*Vitis* sp.) (1.591.986 t) (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2018).

Mesmo com altos valores de produção anual a exportação de frutas frescas e derivados pelo Brasil ainda é pouco expressiva. Esse fato evidencia o consumo interno de frutas e os desafios enfrentados pelo país para comercializar seus produtos em outros mercados, como a dificuldade dos produtores em se adequarem às exigências do mercado externo, que preza por alta qualidade e por alimentos comprovadamente produzidos através de boas práticas agrícolas. Tais práticas exigem mudanças significativas nos sistemas de produção, que envolvem gestão do meio ambiente, relações trabalhistas, processos de pós-colheita e adoção de protocolos muitas vezes inacessíveis aos fruticultores (COSTA, 2016).

Com relação às frutíferas de clima temperado, estas representam cerca de 37,0% do valor total de exportações de frutas do país. A produção das mesmas está distribuída em 11 estados brasileiros, sendo que o Rio Grande do Sul responde por quase metade da produção brasileira, seguido de Santa Catarina, São Paulo, Paraná, Pernambuco, Bahia e Minas Gerais (FACHINELLO et al., 2011).

No Sul há o predomínio da produção de frutas sazonais, como a maçã (*Malus domestica*), a uva (*Vitis* sp.) e o pêssego (*Prunus persica*); porém, outras culturas de clima temperado, como o mirtilo (*Vaccinium* sp.) são cultivadas na região (CARVALHO; MIRANDA, 2009).

Analisando o panorama mundial de mirtilo observa-se que o cultivo concentra-se na América do Norte (EUA e Canadá), na Europa (Polônia e Alemanha) e países do Hemisfério Sul (Austrália, Argentina e Chile), sendo que entre os anos de 1988 e 2014 a produção mundial subiu de 144 para 540 mil toneladas por ano (FILHO et al., 2018). Em países do hemisfério Sul a produção dessa fruta é bastante promissora em função da época de colheita coincidir com a entressafra dos maiores produtores mundiais, o que representa uma oportunidade para exportação (MOURA, 2013).

No Brasil, dados sobre o cultivo da fruta ainda são escassos, mas supõe-se que este esteja restringido a 150 hectares. O Rio Grande do Sul é o principal produtor, com 270 toneladas colhidas em cerca de 60 produtores (G1, 2018). As demais plantações encontram-se nos estados de Santa Catarina, Sul do Paraná e Serra da Mantiqueira, São Paulo e Minas Gerais (MATHIAS; PIO, 2015).

## **2.2 Pequenas Frutas**

A denominação pequenas frutas refere-se a frutos pequenos e delicados, oriundos de regiões de clima frio e temperado que possuem em sua composição altas concentrações de vitamina A e C, flavonoides e substâncias antioxidantes, além de possuírem curta vida pós-colheita (BARBIERI; VIZZOTTO, 2012).

Os antioxidantes são substâncias capazes de proteger as células do corpo dos radicais livres, que são formados pela respiração e por diversos processos oxidativos que ocorrem no corpo humano e que contribuem para o aparecimento de doenças como tumores, inflamações, mal de alzheimer e problemas cardiovasculares (SILVA et al., 2010). O consumo diário de frutas vermelhas previne o aparecimento de tais enfermidades, além de fortalecer o sistema imunológico, se somado a uma alimentação saudável e atividades físicas regulares, melhorando a qualidade de vida e a capacidade do corpo de resistir a doenças (TAVARES et al., 2014).

Nesse grupo estão inseridas a amora-preta (*Rubus* spp.), o morango (*Fragaria x ananassa* Duch.), a framboesa (*Rubus idaeus*), a physalis (*Physalis peruviana*) e o mirtilo (CARVALHO; MIRANDA, 2009).

Tais frutas são consumidas principalmente como frutas frescas. Além disso, no mercado há a oferta de muitos outros produtos processados a partir dessas frutas, como geleias, iogurtes, néctares, sucos, purês, polpas pasteurizadas e congeladas e frutas liofilizadas (KROLOW, 2012).

### **2.3. Mirtilheiro: classificação botânica e morfologia**

O mirtilheiro (Figura 1), *blueberry* ou *arándano* (*Vaccinium* sp.) é uma frutífera da família Ericaceae, subfamília *Vaccinoideae*, gênero *Vaccinium* e subgênero *Cyanococcus*, nativa da América do Norte, Canadá e Estados Unidos (RASEIRA; ANTUNES, 2004; FACHINELLO, 2008;). O gênero possui cerca de 450 espécies, sendo que 40% destas se encontram na Ásia e no Pacífico, 26% na América do Norte e 6% na Europa (FONSECA; OLIVEIRA, 2007).



**Figura 1.** Mirtileiro cultivar Duke (*V. corymbosum*) cultivado em vaso (A) e detalhe das folhas (B) e dos frutos (C) em diferentes estágios de maturação. Foto: autor, 2020.

É uma planta arbustiva perene, podendo chegar a três metros de altura, adaptada a clima mais frio e exigente em baixas temperaturas para superação da dormência (HOFFMANN; ANTUNES, 2004).

O sistema radicular é superficial, sendo que grande parte das raízes são encontradas nos primeiros 60 centímetros do solo. As raízes podem ser finas e fibrosas até adventícias e originárias de um rizoma, mas estas características variam de acordo com a cultivar. (ANTUNES et al., 2013).

As folhas são simples e caducifólias, apresentam variação em relação a cor e tamanho de acordo com a espécie, podendo ser utilizadas para diferenciá-las (Figura 1).

Podem possuir de oito a dezesseis flores por gema em forma de racimo. As flores são completas, possuem cinco sépalas unidas, cinco pétalas também unidas, oito a dez estames e pistilo simples (ANTUNES et al., 2013). O fruto (Figura 1) é uma baga de cor azulada, de dimensão e formato que variam de

acordo com a espécie e cultivar e seu sabor é agridoce. Amadurece cerca de dois a três meses após a floração (MATOS, 2015).

As cultivares de mirtilheiro de interesse econômico são reunidas em três grupos principais: cultivares *Lowbush*, *rabbiteye* e *Highbush* (GALLETA; BALLINGTON, 1996). Tais grupos são descritos a seguir:

**Lowbush:** são arbustos de pequeno porte, com menos de meio metro de altura. Neste grupo estão incluídas plantas da espécie *Vaccinium angustifolium*, além do mirtilo do Canadá (*V. myrtilloides* e *V. boreale*) (GALLETA; BALLINGTON, 1996). Necessitam de 650 a 850 horas de frio anuais e a maior parte dos frutos produzidos (cerca de 97,0%) é destinada à indústria. Representam 31,0% da área plantada no mundo (CANTUARIAS- AVILÉS et al, 2014).

**Rabbiteye:** conhecida como “olho-de-coelho” (*V. ashei*), são plantas que podem atingir até quatro metros de altura, bastante vigorosas e produtivas, possuindo resistência à seca e ao calor, além de baixa exigência em frio (300 a 400 horas de frio anuais). Possuem frutos ácidos, firmes e com alta longevidade pós-colheita. A espécie é considerada pelos melhoristas como a que oferece melhores condições para melhoramento genético devido a sua resistência a intempéries (GALLETA; BALLINGTON, 1996). Representam cerca de 15,0% da produção mundial, sendo que 65,0% dos seus frutos são destinados à indústria de processados (CANTUARIAS- AVILÉS et al, 2014).

**Highbush:** arbustos altos, com dois metros de altura ou mais. Possuem necessidade em frio hibernal de 650 a 850 horas. Neste grupo estão incluídas as espécies *V. corymbosum* L. e *V. australe* small. A espécie *V. corymbosum* L. conta com cultivares que possuem maior ou menor necessidade de horas de frio, sendo “Northern Highbush Blueberry” (NHB) e “Southern Highbush Blueberry” (SHB), respectivamente (MATOS, 2015). Os mirtilheiros altos representam cerca de 55,0% da produção mundial e reúnem as cultivares mais importantes para o mercado. Metade da produção de frutos é destinada a indústria de processados e a outra metade destinada ao consumo *in natura*. As variedades comerciais desse grupo são as que detêm frutos com a melhor qualidade organoléptica (CANTUARIAS- AVILÉS et al, 2014).

No Brasil o mirtilheiro foi introduzido em 1983 pelo pesquisador da Embrapa Clima Temperado Alverides Machado dos Santos, em Pelotas – RS. Na época, plantas do grupo “*rabbiteye*” provenientes da Universidade da Flórida foram trazidas ao Brasil com o intuito de avaliar sua adaptação ao clima e solos brasileiros. Tal pesquisa deu início à difusão da cultura no país, pois permitiu a obtenção de informações sobre o manejo da planta nas condições climáticas brasileiras (HOFFMANN, 2004).

### **2.3 Cultivar Bluecrop**

A cultivar Bluecrop está inserida no grupo *highbush*, mais especificamente no subgrupo “*Northern Highbush Blueberry*” (NHB). Originou-se do cruzamento entre GM-37 (*Jersey x Pioneer*) x CU-5 (*Stanley x June*), realizado por Coville e Freeman em 1934 e lançada pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) em 1952 (RASEIRA; ANTUNES, 2004; DAL MOLIN et al., 2014).

Os frutos (bagas) (Figura 2) são de tamanho médio e necessitam permanecer na planta cerca de sete dias após a “maturação visual” para adquirir sabor agradável. Além disso, são frutos resistentes a rachaduras, com polpa firme de sabor subácido (MATOS, 2015). Assim como outras cultivares de mirtilheiro *Highbush*, seus frutos são destinados a indústria de alimentos processados e ao consumo *in natura*. As variedades comerciais desse grupo possuem frutos com a melhor qualidade organoléptica (CANTUARIAS- AVILÉS et al, 2014).



**Figura 2.** Frutos de *Vaccinium corymbosum* cultivar Bluecrop.  
Foto: MATOS, 2015.

Trata-se de um arbusto vigoroso e produtivo, ereto, resistente à seca e geadas, relativamente difícil de propagar através da estaquia e da micropropagação, por conta da baixa taxa de enraizamento (FIRA et al., 2008).

#### **2.4 Propagação de mirtilheiro**

O mirtilheiro pode ser multiplicado por meio de propagação sexuada ou assexuada, a partir da estaquia e micropropagação (FISCHER et al., 2008). A propagação por sementes é utilizada para fins de melhoramento genético, onde a variabilidade é uma característica desejável. Porém, em escala comercial esta frutífera é propagada, em sua maioria, através da estaquia (ERIG; SCHUCH, 2005).

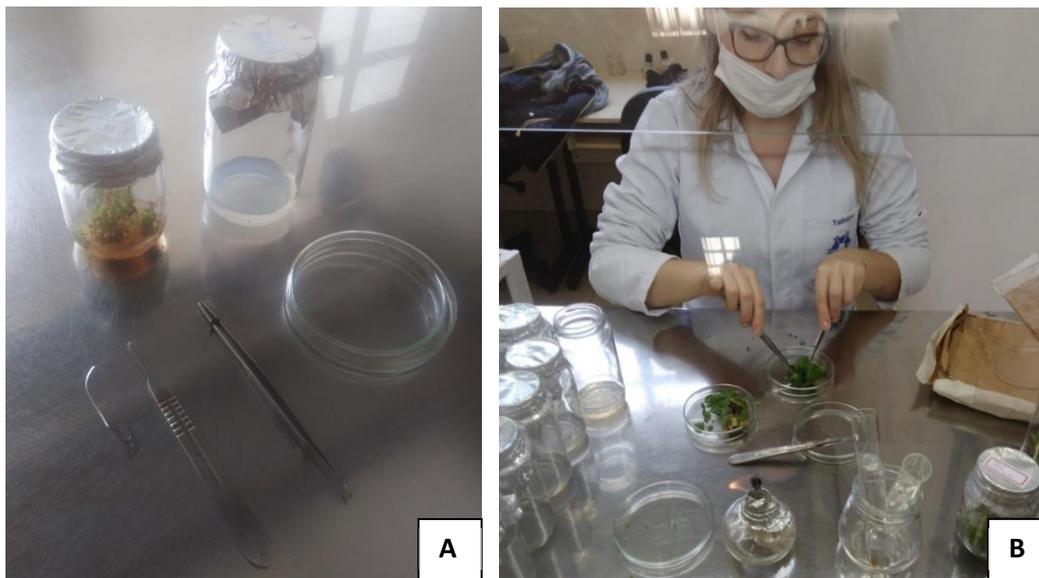
Vignolo et al. (2012), trabalhando com estacas das cultivares Delite, Bluebelle e Briteblue constataram maior taxa de enraizamento para a cultivar Briteblue (59%), com a utilização de 6.000 mg.L<sup>-1</sup> de ácido indolbutírico (AIB) . Já Koyama et al. (2019), observaram que a aplicação de 1.000 mg.L<sup>-1</sup> de AIB não influenciou no enraizamento de estacas de mirtilheiro 'Briteblue'.

Além da estaquia convencional, o mirtilheiro pode ser propagado por meio da miniestaquia. A técnica foi desenvolvida para plantas do gênero *Eucalyptus* e consiste em manter genótipos selecionados em viveiro (jardim miniclinal), sendo

as brotações dessas plantas coletadas em intervalos regulares para formação das mudas comerciais (WENDLING; SOUZA JUNIOR, 2003). Dentre as vantagens de utilização da miniestaquia estão a redução da área para formação de jardim miniclinal, redução dos custos com transporte e coleta das brotações e maior velocidade, qualidade e porcentagem de enraizamento das miniestacas (XAVIER et al., 2003). Trabalhos realizados com diferentes cultivares de mirtilheiro evidenciam os benefícios da utilização da miniestaquia (PELIZZA, 2009; FISCHER et al., 2012; RISTOW et al., 2012).

Considerando a baixa taxa de enraizamento na estaquia de algumas cultivares, a micropropagação é uma alternativa que permite a produção de grande quantidade de mudas em um curto espaço de tempo, com qualidade fitossanitária (DAMIANI; SCHUCH, 2009b). No Rio Grande do Sul, os primeiros protocolos de micropropagação de mirtilheiro foram desenvolvidos no Laboratório de Propagação de Espécies Frutíferas, pertencente ao departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel – Universidade Federal de Pelotas, através de experimentos orientados pela pesquisadora Márcia Wulff Schuch (SILVA et al., 2006; SILVA et al., 2007; SILVA et al, 2008).

Na micropropagação têm-se quatro etapas: na primeira é feito o estabelecimento do explante *in vitro*, coletado em campo ou em casa de vegetação, em meio de cultura apropriado; na segunda há a indução do crescimento de novos brotos (multiplicação), que serão repicados e novamente inoculados em meio de cultura para desenvolvimento de novos explantes (Figura 3A e 3B); na etapa três ocorre a formação de raízes nos explantes, enquanto a quarta refere-se à aclimatização desses explantes, onde as mudas serão transferidas gradualmente para a condição *ex vitro* (HARTMANN et al., 1997).



**Figura 3.** Materiais utilizados na micropropagação (A) e procedimento de repicagem de explantes de mirtilheiro cultivar Bluecrop, antes da montagem dos experimentos (B).  
Foto: autor, 2019.

No caso de espécies lenhosas como o mirtilheiro, a micropropagação normalmente é realizada por meio de segmentos nodais ou gemas axilares, onde se procede a inoculação desses segmentos em meio de cultura para multiplicação direta, sendo este material posteriormente enraizado *in vitro* ou *ex vitro* (PELIZZA, 2009).

Com relação à micropropagação de mirtilheiro e o desenvolvimento das mudas no campo, Souza et al. (2011), avaliando cultivares do grupo “*rabbiteye*” observaram maior crescimento vegetativo inicial das mudas micropropagadas em detrimento daquelas produzidas através da estaquia, devido ao rejuvenescimento promovido pelos sucessivos subcultivos *in vitro*. Resultados semelhantes foram obtidos por Litwinczuk et al. (2005), em experimento com o mirtilheiro ‘Hebert *highbush* (*V. corymbosum* L.). Além dessas pesquisas, Camargo et al. (2018), constataram maior crescimento inicial de mudas da cultivar Bluegen micropropagadas, em comparação com mudas produzidas por estaquia.

É importante salientar que o sucesso da micropropagação também está relacionado com fatores como tamanho e tipo do explante, concentrações de reguladores de crescimento utilizadas e composição do meio de cultura (HORBACH et al, 2011). Para a multiplicação de mirtilheiro pode ser usado o meio de cultura WPM (*Wood Plant Media*) (LLOYD; MCCOWN, 1981), que também é

amplamente usado para a produção comercial de mudas de outros arbustos e árvores (QUISEN; ÂNGELO, 2008).

Os meios de cultura podem ser acrescidos de reguladores de crescimento e substâncias nutritivas e bioestimulantes, a fim de favorecer a multiplicação e o desenvolvimento de plantas nessas condições. Os reguladores de crescimento comumente utilizados no cultivo *in vitro* de mirtilheiro são o 2iP (N<sup>6</sup>-isopenteniladenina) e a zeatina (citocininas), como demonstram os trabalhos de Jakoola et al. (2001), Silva et al. (2006) e Schuch et al. (2008). Em relação às substâncias estimulantes utilizadas na micropropagação podem-se citar os ácidos húmicos (SILVA et al., 2015).

Após a multiplicação do material propagativo com a utilização das citocininas procede-se ao enraizamento dos explantes, que pode ser feito *in vitro* ou *ex vitro*. Em ambos os casos são utilizados reguladores de crescimento da classe das auxinas para promover o crescimento de raízes adventícias, em especial o AIB (ácido indolbutírico), devido à sua eficiência em diversas espécies (HARTMANN et al., 1997).

No enraizamento *in vitro* uma das vantagens é o melhor controle das condições de trabalho, visto que esta é uma das etapas difíceis da micropropagação (LEITZKE et al., 2009). No entanto, mudas enraizadas *in vitro* podem apresentar problemas durante a fase de aclimatização, além do fato que o enraizamento *in vitro* aumenta o período de permanência das plantas em laboratório, elevando custos de produção (PELIZZA et al., 2012). Assim, o enraizamento de mudas *ex vitro* pode ser uma ferramenta para otimizar o processo de produção de mudas, garantindo plantas de qualidade e diminuindo custos de produção, visto que as plantas serão retiradas da sala de crescimento para enraizamento em condições de viveiro, diminuindo assim custos com energia elétrica e meios de cultura (TORMEN, 2017).

O enraizamento *ex vitro* permite ainda a formação de um sistema radicular mais funcional, evitando o aparecimento de calos que podem atrapalhar a conexão dos sistemas vasculares da planta e permitindo o crescimento de maior número de raízes secundárias (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Na micropropagação também é possível produzir mudas através da microestaquia para formação de jardim microclonal. Dentre as vantagens da microestaquia, se comparada à estaquia convencional, estão a maior porcentagem de enraizamento, maior vigor das raízes, maior uniformidade de mudas, diminuição do tempo de viveiro e maior taxa de sobrevivência de mudas no campo (PELIZZA et al., 2011).

De acordo com Ristow et al. (2012), a técnica de microestaquia é eficiente para a propagação do mirtilheiro 'Georgiagem', visto a porcentagem de enraizamento acima de 80% quando se utilizou os substratos turfa de musgo (*Sphagnum* sp) e as misturas turfa + perlita, turfa + perlita + fibra de coco, turfa + perlita + serragem. Pelizza et al. (2011), ao desenvolver experimentos para avaliar a capacidade de enraizamento de microestacas apicais e medianas de mirtilheiro 'Climax', observaram que a utilização de microestacas medianas em substrato Plantmax<sup>®</sup> + casca de arroz carbonizada (1:1) é mais indicada para a produção de mudas do mirtilheiro, por proporcionar maior porcentagem de enraizamento e sobrevivência das mesmas.

Tais resultados evidenciam que a taxa de enraizamento das microestacas dependerá do substrato utilizado e das características físicas e químicas do material, como porosidade, capacidade de retenção de água e pH.

## **2.5 Substâncias húmicas**

Os solos são meios ricos em microorganismos, que desempenham papel fundamental no processo de decomposição da matéria orgânica. A ação dos microorganismos sobre esse material dá origem a compostos orgânicos condensados (ácidos húmicos e fúlvicos), denominados substâncias húmicas (BALDOTTO; BALDOTTO, 2014).

As substâncias húmicas participam de grande parte das reações que ocorrem no ambiente, influenciando na transformação de compostos químicos e na disponibilidade de nutrientes no solo, contribuindo diretamente na estrutura e fertilidade do mesmo (CANELLAS et al., 2008). A definição exata de substâncias

húmicas é algo muito complexo, assim como a complexidade da sua composição. No entanto, na literatura encontra-se que tais substâncias podem ser definidas como o produto de reações de síntese secundárias, bióticas e abióticas, formando uma série de polímeros amorfos de coloração amarelada à preta, com alto peso molecular (BENITES et al., 2003).

Na agricultura as substâncias húmicas são comumente utilizadas como condicionadores de solo. Agem diretamente nas propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo, proporcionando maior capacidade de retenção de água e aeração. Elevam o poder tampão (diminuição das variações de pH) e promovem redução da toxidez de alguns íons metálicos através de sua ação complexante (CARON et al., 2015). Além disso, melhoram a agregação do solo, aumentam a CTC e a concentração de matéria orgânica, diminuindo a perda de nutrientes potenciais (GONZÁLEZ et al., 2010).

Em pequenas concentrações, possuem elevada ação estimulante no crescimento de plantas cultivadas *in vitro* (SILVA et al., 2015). Atualmente, existem produtos comerciais compostos por substâncias húmicas (ácidos húmicos e fúlvicos) para utilização na agricultura (Figura 4).



**Figura 4.** Produto comercial Solo Humics®.  
Foto: Autor, 2020.

Bernardes et al. (2011), em experimento com mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) 'Carmen' constataram a viabilidade do uso de substâncias húmicas na produção de mudas da planta, ao observarem maior

desenvolvimento de raízes e parte aérea com a aplicação de Codahumus 20<sup>®</sup> através de pulverização. Em outro estudo, Pires et al. (2010), trabalhando com a cultivar de tomateiro Vênus, verificaram que a aplicação de do mesmo produto comercial via fertirrigação combinada ao substrato fibra de coco promoveu aumento de firmeza dos frutos, além da redução da porcentagem de solubilização péctica.

A firmeza de frutos é um aspecto importante na avaliação da qualidade de tomates, pois indica a tolerância dos frutos ao manuseio e ao transporte até os pontos de comercialização (RESENDE et al., 2004).

Com relação ao cultivo *in vitro*, Baldotto et al. (2009), trabalhando com mudas micropropagadas de abacaxizeiro 'Vitória' (*Ananas comosus* L. Merrill), observaram que a aplicação de 15 mmol L<sup>-1</sup> de C de ácidos húmicos durante a aclimatização das plantas influenciou no desenvolvimento de raízes e crescimento da parte aérea, além de propiciar maior acúmulo de N, P, K Ca e Mg e aumento da relação clorofila a/ clorofila b.

Em estudos realizados sobre micropropagação com outras plantas hortícolas, como a *Cattleya warneri* 'Concolor', Silva et al. (2015), verificaram maior desenvolvimento nas mudas submetidas a tratamento com 4,16 mM de C.L<sup>-1</sup> de ácidos húmicos, sendo que a substância proporcionou incremento de 159% de massa da matéria fresca das raízes em comparação com o tratamento controle. Da mesma forma, Baldotto et al. (2014) observaram maior acúmulo de matéria seca e aceleração do crescimento de mudas de orquídeas do gênero *Cymbidium* sp. durante a aclimatização, quando as mesmas foram tratadas com ácidos húmicos extraídos de cama de frango e esterco bovino.

Rzepka-Plevnes et al. (2011), ao avaliarem a influência das substâncias húmicas no enraizamento *in vitro* de duas cultivares de morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) concluíram que a adição de ácidos húmicos ao meio de cultura na concentração de 1 mg.dm<sup>-3</sup> e 5 mg.dm<sup>-3</sup> foram mais benéficas para o desenvolvimento das plantas do que a utilização das auxinas ácido indolbutírico (AIB) e ácido naftaleno-acético (NAA) na concentração de 1 mg.dm<sup>-3</sup>, comumente empregadas na propagação *in vitro* dessa espécie.

Apesar desses trabalhos, informações sobre a utilização de substâncias húmicas no cultivo *in vitro* e *ex vitro* de mirtilheiro e seus possíveis efeitos sobre o desenvolvimento da planta são escassas, justificando estudos relacionados ao emprego dessa substância na propagação da frutífera.

## 2.6 Reguladores vegetais

Reguladores vegetais são substâncias de origem natural ou sintética que podem ser aplicados em plantas com o objetivo de incrementar a produção ou aumentar a qualidade de culturas de interesse econômico (COBUCCI et al., 2008). Dentro deste grupo encontram-se as auxinas, giberelinas, citocininas, retardadores, inibidores de etileno, além de outras moléculas com efeitos similares como o ácido jasmônico, o ácido salicílico e as poliaminas (CATO, 2006).

Os reguladores vegetais têm sido utilizados para controlar o crescimento de fruteiras de clima temperado como a macieira e a pereira, evitando-se a brotação excessiva e promovendo a floração e frutificação precoce em plantas jovens (MOUCO et al., 2011). No cultivo *in vitro* tais substâncias possuem a função de induzir e controlar a morfogênese quanto à regeneração de brotos e raízes, estimulando a expansão e divisão celular. Para este fim, destaca-se a utilização de auxinas e citocininas na suplementação dos meios de cultura (MORAIS et al., 2014).

As citocininas são substâncias responsáveis pela quebra de dominância apical, indução da proliferação de gemas axilares e aumento da regeneração *in vitro* (HU; WANG, 1983). Já as auxinas possuem a função de promover o crescimento de raízes adventícias nos explantes (HARTMANN et al., 1997). Para a micropropagação de mirtilheiro as citocininas comumente utilizadas são o 2iP (N<sup>6</sup>-isopenteniladenina) e a zeatina, além do AIB (ácido indolbutírico), pertencente à classe das auxinas (JAKOOLA et al., 2001; SILVA et al., 2006; SCHUCH et al., 2008). No enraizamento *ex vitro*, a utilização de AIB também aumenta o desenvolvimento de raízes nas estacas, bem como a uniformidade e qualidade das mesmas (PASQUALINI, 2013).

Schuch et al. (2008) constataram maior número de brotações com o uso da zeatina na multiplicação de mirtilheiro 'Clímax', em comparação com o 2iP. No entanto, as brotações formadas em meio de cultura suplementado com este regulador vegetal apresentaram pequeno tamanho e menor número de gemas por brotação. Resultados semelhantes foram encontrados por Silva et al. (2006), durante o estabelecimento *in vitro* de mirtilheiro 'Delite'. Além de maior número de brotações, o uso de zeatina promoveu maior porcentagem de sobrevivência de explantes, além de diminuir a oxidação do material.

A resposta do mirtilheiro à aplicação de AIB durante a estaquia varia de acordo com a cultivar, sendo muitas vezes indiferente de acordo com a concentração utilizada. Para a cultivar Briteblue, a aplicação de 1000 mg.L<sup>-1</sup> de AIB não influencia no desenvolvimento radicular das estacas, independente da forma de aplicação (via líquida ou através de talco) (KOYAMA et al., 2019). Trevisan et al. (2008) observaram resultados variáveis quanto a utilização de AIB durante enraizamento de estacas herbáceas de mirtilheiro 'Florida', 'Bluegen', 'Woodard', 'Bluebelle', 'Clímax' e 'Briteblue', não observando influência do regulador vegetal sobre o enraizamento até a concentração de 7500 mg.L<sup>-1</sup>.

Em outro estudo, Vignolo et al., (2012) constataram que a utilização de AIB até a concentração de 6000 mg.L<sup>-1</sup> não é suficiente para expressar o máximo potencial de enraizamento de estacas lenhosas das cultivares Bluebelle, Briteblue e Delite. Já no cultivo *in vitro*, a concentração de AIB utilizada no meio de cultura varia entre 7 a 9 µM L<sup>-1</sup> (DAMIANI; SCHUCH, 2009a; DAMIANI; SCHUCH, 2009b).

## **2.7 Substratos no enraizamento *ex vitro***

Assim como a utilização de reguladores de crescimento, durante o enraizamento *ex vitro* é de suma importância o emprego do substrato adequado para desenvolvimento das plantas. Kämpf (2000) define substrato como o meio onde as plantas desenvolvem suas raízes na ausência de solo, sendo que este possui o objetivo de fixar a planta e suprir suas necessidades nutricionais.

Segundo Cunha et al. (2006), o substrato adequado é aquele cujas características físicas e químicas atendam às necessidades da espécie a ser propagada. Entre as propriedades físicas podem ser citadas a densidade, a porosidade, a aeração e a capacidade de retenção de água do material (LACERDA et al., 2006), enquanto o pH e a condutividade elétrica estão entre as propriedades químicas dos substratos (KÄMPF, 2000). Outros aspectos a serem considerados na seleção de substratos são a disponibilidade e o custo do material (FONSECA, 2001).

De modo geral, para o cultivo de frutíferas o substrato ideal varia de acordo com a espécie e a cultivar. Para estaquia de pitangueira (*Eugenia uniflora*), recomenda-se o substrato Plantmax<sup>®</sup> (ANTUNES et al., 2012; PICOLLOTO et al., 2013). O mesmo substrato também é utilizado na germinação de sementes de pessegueiro (*Prunus persica* L. Batsh) (JÚNIOR et al., 2007), podendo ser combinado a outros materiais como o húmus (PICOLLOTO et al., 2007). Já para estacas herbáceas de amoreira-preta (*Rubus* spp.), pode-se utilizar a casca de arroz carbonizada (YAMAMOTO et al., 2013) e o substrato Plantmax<sup>®</sup>, combinado à vermiculita e à casca de arroz carbonizada (VILLA et al., 2006a).

Vários estudos foram realizados com o uso de substratos na produção de mudas de mirtilheiro *ex vitro*. Pelizza et al. (2012), avaliando as cultivares Bluebelle Woodard e Georgiagem constataram maior comprimento de raízes ao utilizar vermiculita de granulometria média como substrato no enraizamento *ex vitro* das plantas. Para altura média de plântulas, resultados superiores para a cultivar Woodard foram observados com a utilização de serragem curtida de pinus, enquanto que para as outras cultivares testadas não se obtiveram diferenças significativas.

Ristow et al. (2012), analisando os efeitos de diferentes substratos na produção de mudas de mirtilo 'Georgiagem' pelo processo de microestaquia (estacas retiradas de matrizes micropropagadas) obtiveram resultados superiores nos substratos turfa de musgo (*Sphagnum* sp.) e nas misturas de turfa + perlita, turfa + perlita + fibra de coco e turfa + perlita + serragem. Em outro estudo, Koyama et al. (2018), trabalhando com miniestacas de mirtilo 'Woodard' e 'Briteblue' constataram que a utilização de casca de arroz carbonizada como

substrato proporcionou maior porcentagem de sobrevivência e brotação de mudas para essas cultivares.

Dada a importância dos substratos para o enraizamento e desenvolvimento de mudas de mirtilo, torna-se importante a identificação do material mais adequado para cada cultivar, de forma a aperfeiçoar e otimizar o processo de enraizamento *ex vitro*.

### 3. CAPÍTULO I – Substâncias húmicas e 2-isopenteniladenina na multiplicação *in vitro* de mirtilheiro ‘Bluecrop’

#### 3.1 Introdução

Na região sul do Brasil a cultura do mirtilheiro (*Vaccinium* sp.) representa uma alternativa promissora, demandar pouca quantidade de insumos e possuir maior rusticidade, contribuindo com a preservação do meio ambiente e a segurança alimentar (ARRUDA et al., 2017). Além disso, a fruta vem sendo reconhecida pelos consumidores por suas propriedades nutracêuticas (SILVEIRA et al., 2007).

A cultivar Bluecrop está inserida no grupo *Highbush* e originou-se do cruzamento entre GM-37 (*Jersey* x *Pioneer*) x CU-5 (*Stanley* x *June*), realizado por Coville e Freeman em 1934 e lançada pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) em 1952 (RASEIRA; ANTUNES, 2004; DAL MOLIN et al., 2014). Seus frutos são de tamanho médio, possuem polpa firme e sabor subácido, sendo destinados a indústria de alimentos processados e ao consumo *in natura* (CANTUARIAS- AVILÉS et al, 2014).

Para a expansão nas áreas de cultivo é primordial o uso de mudas de qualidade. No caso do mirtilheiro, a propagação pode ser realizada de forma sexuada e assexuada (por estaquia ou micropropagação). No Brasil, a forma mais utilizada para obtenção de mudas comerciais é a estaquia (SOUZA et al, 2011). No entanto, dependendo da cultivar a técnica possui baixo rendimento (PENÃ et al., 2012). Assim, uma opção para contornar esses problemas é a micropropagação, por possibilitar a produção de mudas em quantidade e com qualidade em um curto espaço de tempo (DAMIANI; SCHUCH, 2009b).

Dentre os fatores que podem contribuir para o sucesso da micropropagação estão o tipo de explante, as concentrações de reguladores de crescimento e a composição do meio de cultura (HORBACH et al., 2011). Além disso, o meio de cultura pode ser suplementado com diferentes substâncias bioestimulantes, capazes de promover melhor desenvolvimento das plantas micropropagadas, sendo uma delas as substâncias húmicas (SILVA et al., 2015).

Tais substâncias são originadas do processo de decomposição da matéria orgânica por microorganismos (BALDOTTO; BALDOTTO, 2014) e influenciam ativamente a disponibilidade de nutrientes no solo, além de interferir diretamente na estrutura e fertilidade do mesmo (CANELLAS et al., 2008).

Os efeitos das substâncias húmicas em condições de campo são observados no acúmulo de biomassa e de nutrientes pelas plantas e no crescimento radicular, além de possuírem mecanismo de ação similar às auxinas (BALDOTTO et al., 2014). Na micropropagação seu efeito bioestimulante é observado com o uso de pequenas concentrações, promovendo incremento no crescimento de plantas (SILVA et al., 2015).

Vários estudos foram realizados com o uso de substâncias húmicas, como o de Bernardes et al. (2011), que observaram maior desenvolvimento de raízes nas mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) 'Carmen' com a aplicação de CODAHUMUS 20<sup>®</sup> através de pulverização. No cultivo *in vitro*, Baldotto et al. (2009), trabalhando com mudas micropropagadas de abacaxizeiro 'Vitória' (*Ananas comosus* L. Merrill), constataram que a aplicação de ácidos húmicos durante a aclimatização das plantas influenciou positivamente no desenvolvimento de raízes e crescimento da parte aérea das mudas.

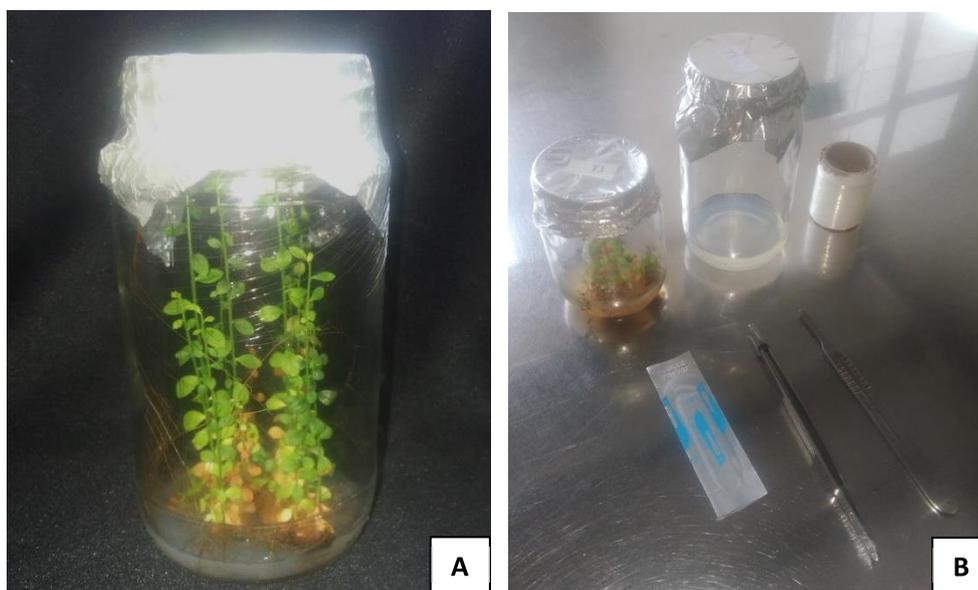
Em pesquisas sobre micropropagação de outras plantas hortícolas, como a *Cattleya warneri* 'Concolor', Silva et al. (2015), verificaram maior desenvolvimento nas mudas submetidas a tratamentos com doses de ácidos húmicos (4,16 mM de C.L<sup>-1</sup>), sendo que a substância proporcionou incremento de 159% de massa da matéria fresca das raízes em comparação com o tratamento controle. No entanto, são escassas na literatura informações acerca da utilização de substâncias húmicas no cultivo *in vitro* de espécies frutíferas lenhosas, em especial o mirtilheiro.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de concentrações de substâncias húmicas, combinado com o uso de 2-isopenteniladenina (2iP) no meio de cultura para a multiplicação *in vitro* de mirtilheiro 'Bluecrop'.

### 3.2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido no período de janeiro a abril de 2019, no Laboratório de Propagação de Plantas Frutíferas pertencente ao Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão - RS.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x4, composto por quatro concentrações de substâncias húmicas (SH) (0,1,0, 2,0 e 3,0 mL.L<sup>-1</sup> de SoloHumics®), adicionados ou não de 2-Isopenteniladenina (2ip) (100 mg.L<sup>-1</sup>). Cada tratamento foi constituído por quatro repetições, sendo utilizado um frasco com quatro explantes por repetição. Foram utilizados explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' contendo duas gemas (0,5 cm), cultivados previamente *in vitro* em meio de cultura *Wood Plant Media* (WPM) (Lloyd; McCown, 1980) por cinco subcultivos no mesmo laboratório (Figura 5A e 5B).



**Figura 5.** Mirtilheiro 'Bluecrop' cultivado *in vitro* para retirada dos explantes (A) e materiais utilizados na instalação do experimento (B).  
Foto: autor, 2019.

Os explantes foram inoculados em frascos de vidro transparente com capacidade de 200 mL, contendo 30 mL de meio de cultura WOOD PLANT MEDIA (*Wood Plant Media* – Lloyd; McCown, 1980), suplementado com 6 g.L<sup>-1</sup> de

ágar,  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose,  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de mio-inositol, além dos respectivos tratamentos (Figura 6), com pH ajustado para 5,8. Os frascos foram vedados com folha de papel alumínio e autoclavados a  $120^{\circ}\text{C}$  e 1,5 atm por 15 minutos.



**Figura 6.** Preparo dos meios de cultura nos frascos contendo as concentrações de substâncias húmicas.

Foto: autor, 2020.

O produto comercial utilizado (SoloHumics®) é um fertilizante organomineral com a seguinte composição: ácido húmico (25%), ácido fúlvico (5%), matéria orgânica (59%), carbono orgânico total (31%) e potássio (3%).

Após a transferência dos explantes para os frascos em câmara de fluxo laminar, os mesmos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , luminosidade de  $48 \mu\text{mols. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

Após 90 dias avaliou-se: porcentagem de sobrevivência, taxa de multiplicação (número de gemas obtidas após 90 dias dividido pelo número de gemas inicial (2)), número de brotações, comprimento da maior brotação (cm), massa de matéria fresca total (g) e massa da matéria seca total (g). Para tanto, utilizou-se balança analítica e régua comum, sendo a pesagem de matéria seca total realizada após a secagem das amostras em estufa a  $60^{\circ}\text{C}$  até massa constante.

Os resultados foram submetidos à análise de variância através do teste T a 5,0% de significância. Constatando-se significância estatística, os fatores qualitativos foram avaliados pelo teste T, os quantitativos avaliados por regressão e a interação entre os fatores avaliada pelo teste Tukey a 5% de significância. As avaliações foram realizadas no programa estatístico Sisvar.

### 3.3 Resultados e discussão

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para a porcentagem de sobrevivência, sendo que apenas com o uso de 3 ml.L<sup>-1</sup> e sem a presença de 2iP o valor foi de 96,87%.

A porcentagem de sobrevivência é uma variável importante nos estudos relacionados à produção de mudas. Quanto maior a quantidade de explantes vivos, maior será a possibilidade de rentabilidade na comercialização das mudas.

Para a taxa de multiplicação houve diferença significativa para presença de 2iP no meio de cultura. Tratamentos contendo a citocinina propiciaram maior número de gemas (Figura 7). Porém, quanto à concentração de substâncias húmicas, não se observou diferença significativa (Tabela 1).

**Tabela 1.** Taxa de multiplicação de explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e 2-Isopenteniladenina (2iP) (100 mg.L<sup>-1</sup>) no meio de cultura *Wood Plant Media*, aos 90 dias de cultivo. Capão do Leão, 2019.

Meio de cultura	Taxa de multiplicação				
	Concentração de substâncias húmicas (ml.L <sup>-1</sup> )				
	0,0	1,0	2,0	3,0	Média geral
Com 2iP	20,47a*	19,87a	19,36a	14,60a	18,57a
Sem 2iP	3,45b	4,60b	4,81b	3,00b	3,96b
<b>Média geral</b>	11,96 <sup>ns</sup>	12,23	12,08	8,80	
CV(%):43,00					

<sup>ns</sup>Não significativo. \*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste T a 5% de significância.



**Figura 7.** Explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidas aos tratamentos contendo substâncias húmicas (SH) e 2-Isopenteniladenina (2iP) ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ), com comprimento variando entre 2,07 e 4,46 cm, sendo: T1=  $0 \text{ mL.L}^{-1}$  de SH + 2iP; T2=  $1,0 \text{ mL.L}^{-1}$  de SH + 2iP; T3=  $2,0 \text{ mL.L}^{-1}$  de SH + 2iP; T4=  $3,0 \text{ mL.L}^{-1}$  de SH + 2iP, T5=  $0 \text{ mL.L}^{-1}$  de SH ; T6=  $1,0 \text{ mL.L}^{-1}$  de SH ; T7=  $2,0 \text{ mL.L}^{-1}$  de SH ; T8=  $3,0 \text{ mL.L}^{-1}$  de SH.

Fonte: autor, 2019.

Para o número de brotações não houve diferença significativa para a adição de substâncias húmicas no meio de cultura (Tabela 2). No entanto, verificou-se diferença significativa para a utilização de 2iP, sendo os tratamentos adicionados da citocinina superiores em relação aqueles sem a presença do regulador vegetal.

De acordo com Muleo; Morini (2006), o aumento da concentração de citocininas no tecido pode promover o crescimento de gemas laterais em função da redução do efeito inibitório das auxinas, partindo da hipótese que a dominância apical é afetada pelo balanço auxina/citocinina.

**Tabela 2.** Número de brotações em explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e 2-Isopenteniladenina (2iP) ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) no meio de cultura *Wood Plant Media*, aos 90 dias de cultivo. Capão do Leão, 2019.

Meio de cultura	Nº de brotações				Média geral
	Concentração de substâncias húmicas ( $\text{ml.L}^{-1}$ )				
	0,0	1,0	2,0	3,0	
Com 2iP	4,92a*	5,97a	4,22a	3,00a	4,53a
Sem 2iP	1,00b	1,00b	1,00b	0,87b	0,96b
<b>Média geral</b>	2,96 <sup>ns</sup>	3,48	2,61	1,93	

CV(%):45,22

<sup>ns</sup>Não significativo. \*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste T a 5% de significância.

O número de brotações e de gemas são variáveis diretamente relacionadas ao desenvolvimento das folhas, que são responsáveis pela fotossíntese e produção de fotoassimilados, fatores cruciais para a sobrevivência e crescimento das mudas (LIMA et al., 2007).

Pasa et. al. (2012), em estudo com a amoreira-preta 'Xavante' constataram que a utilização da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) promoveu maior número de brotação e de gemas, se comparado aos tratamentos onde o regulador de crescimento não foi utilizado. Resultados semelhantes foram verificados por Villa et al. (2006b) para a cultivar Brazos. No entanto, Erig; Schuch (2006), observaram que a adição de 2iP (25 mM) ao meio de cultura WPM não proporcionou aumento no número médio de brotações e gemas para mirtilheiro 'Delite.

Não houve diferença significativa no comprimento da maior brotação, tanto para utilização de 2iP quanto para as concentrações de substâncias húmicas, sendo que as médias dos tratamentos permaneceram entre 2,07 e 4,46 cm (Tabela 3).

**Tabela 3.** Comprimento da maior brotação em explantes de mirtilleiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e 2-Isopenteniladenina (2iP) (100 mg.L<sup>-1</sup>) no meio de cultura *Wood Plant Media*, aos 90 dias de cultivo. Capão do Leão, 2019.

Meio de cultura	Comprimento da brotação (cm)				
	Concentração de substâncias húmicas (ml.L <sup>-1</sup> )				Média geral
	0,0	1,0	2,0	3,0	
Com 2iP	3,90 <sup>ns</sup>	4,46 <sup>ns</sup>	3,81 <sup>ns</sup>	4,16 <sup>ns</sup>	4,08 <sup>ns</sup>
Sem 2iP	2,20	4,36	4,18	2,07	3,20
<b>Média geral</b>	3,05 <sup>ns</sup>	4,41	3,99	3,12	
CV(%):38,55					

<sup>ns</sup>Não significativo.

Para a massa de matéria fresca houve diferença significativa para utilização de 2iP e concentrações de substâncias húmicas, não havendo interação entre os fatores de estudo (Tabela 4).

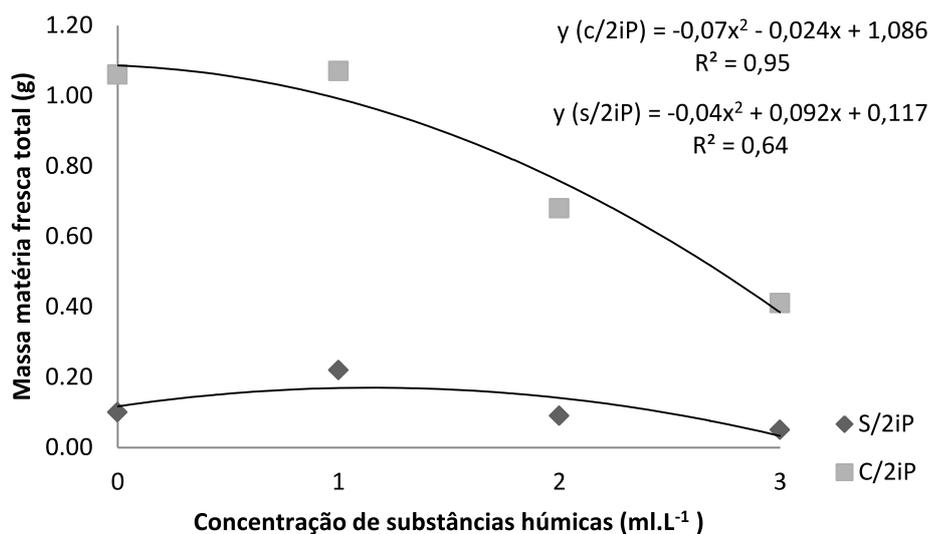
**Tabela 4.** Massa da matéria fresca em explantes de mirtilleiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e 2-Isopenteniladenina (2iP) (100 mg.L<sup>-1</sup>) no meio de cultura *Wood Plant Media*, aos 90 dias de cultivo. Capão do Leão, 2019.

Meio de cultura	Massa da matéria fresca total (g)				
	Concentração de substâncias húmicas (ml.L <sup>-1</sup> )				Média geral
	0,0	1,0	2,0	3,0	
Com 2iP	1,064a*	1,076a	0,680a	0,418a	0,81a
Sem 2iP	0,102b	0,225b	0,097b	0,057b	0,12b
<b>Média geral</b>	0,583 <sup>ns</sup>	0,650	0,389	0,238	
CV(%):49,92					

<sup>ns</sup>Não significativo. \*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste T a 5% de significância.

Tais resultados sugerem a importância da utilização de citocininas no meio de cultura para promover maior número de brotações, influenciando diretamente no ganho de massa pelas plantas.

Com relação à adição de substâncias húmicas, observou-se um decréscimo da massa de matéria fresca com o aumento da concentração, na presença e ausência de 2iP. Para essa variável, a concentração de 1,0 ml.L<sup>-1</sup> promoveu resultados superiores (Figura 8).



**Figura 8.** Massa de matéria fresca total dos explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e 2iP (100 mg.L<sup>-1</sup>) no meio de cultura *Wood Plant Media*. S/ 2iP= sem 2iP. C/ 2iP=Com 2iP.

O efeito bioestimulante das substâncias húmicas é observado com a utilização de pequenas concentrações da substância (de 1 mg de C.L<sup>-1</sup> a 5 mg de C.L<sup>-1</sup>) (NARDI et al., 2007; AGUIAR et al., 2013) e o sucesso da aplicação dessas substâncias depende de estudos preliminares que definam a melhor concentração utilizada (BALDOTTO; BALDOTTO, 2014).

Silva et al. (2015), constataram aumento na quantidade de matéria fresca de folhas das plântulas da orquídea *Cattleya warneri* nos tratamentos contendo 4,16 mM de C.L<sup>-1</sup> de ácidos húmicos extraídos de vermicoposto, com incremento de 81% em relação ao tratamento sem adição da substância.

Para a massa da matéria seca, houve interação entre os fatores, com diferença significativa na adição de 2iP e na concentração de substâncias húmicas. Assim como nas demais variáveis, nos tratamentos onde se utilizou a citocinina foram obtidas maiores médias de massa (Tabela 5).

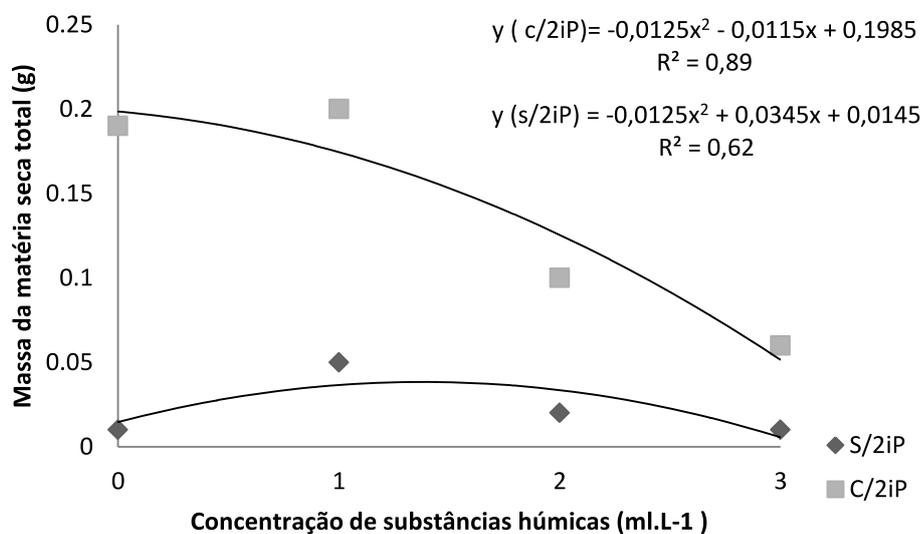
**Tabela 5.** Massa da matéria seca em explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e 2-Isopenteniladenina (2iP) ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) no meio de cultura *Wood Plant Media*, aos 90 dias de cultivo. Capão do Leão, 2019.

Meio de cultura	Massa da matéria seca total (g)				Média geral
	Concentração de substâncias húmicas ( $\text{ml.L}^{-1}$ )				
	0,0	1,0	2,0	3,0	
Com 2iP	0,198a*	0,203a	0,105a	0,069a	0,14a
Sem 2iP	0,017b	0,042b	0,035b	0,015b	0,02b
<b>Média geral</b>	0,107ab	0,129a	0,063ab	0,042b	

CV(%):57,27

<sup>ns</sup>Não significativo. \*Médias seguidas pela mesma letra na coluna (e na linha para média geral das concentrações de substâncias húmicas) não diferem entre si pelo teste T a 5% de significância.

Com o aumento da concentração de substâncias húmicas as médias de massa da matéria seca também sofreram declínio, evidenciando a importância de se utilizar pequenas concentrações do bioestimulante na propagação *in vitro* (Figura 9).



**Figura 9.** Massa de matéria seca total dos explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e 2iP ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) no meio de cultura *Wood Plant Media*. S/ 2iP= sem 2iP. C/ 2iP= com 2iP.

Observou-se que os tratamentos contendo 2iP, na concentração de 0 e 1  $\text{ml.L}^{-1}$  de substâncias húmicas foram superiores aos demais tratamentos para a variável massa de matéria seca total;

Baldotto et al. (2014) observaram maior acúmulo de matéria seca e aceleração do crescimento de mudas de orquídeas do gênero *Cymbidium sp.* durante a aclimatização, quando as mesmas foram tratadas com pequenas concentrações de ácidos húmicos extraídos de cama de frango ( $18,75\text{mmol L}^{-1}$ ) e esterco bovino ( $3,77\text{mmol L}^{-1}$ ). Silva et al. (2015) também observaram incremento na matéria seca de plântulas da orquídea *Cattleya warneri* nos tratamentos contendo baixas concentrações de ácidos húmicos extraídos de vermicoposto ( $4,16\text{ mM de C.L}^{-1}$ ). Tais resultados também evidenciam a importância da origem das substâncias húmicas, podendo este fato, assim como a composição do produto comercial, interferir nos resultados.

Com base no exposto, as concentrações de substâncias húmicas testadas neste estudo não influenciaram na etapa de multiplicação *in vitro* do mirtileiro 'Bluecrop'. Entretanto, é importante testar outras concentrações, além de comparar substâncias húmicas de diferentes origens, no intuito de identificar se outra concentração e/ou composição são eficientes para essa cultivar.

### **3.4 Conclusão**

A multiplicação *in vitro* de mirtileiro 'Bluecrop' pode ser feita com o uso de 2-Isopenteniladenina (2iP), sem a adição de substâncias húmicas.

## 4. CAPÍTULO II – Substâncias húmicas e ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* de mirtilheiro ‘Bluecrop’

### 4.1 Introdução

O mirtilheiro (*Vaccinium* sp.) é uma frutífera pertencente à família Ericaceae, nativa da América do Norte, Canadá e Estados Unidos (RASEIRA; ANTUNES, 2004; FACHINELLO, 2008). Por ser uma opção promissora para a comercialização, a cultura desperta o interesse de pesquisadores e produtores (PELIZZA et al., 2011).

Um dos entraves para a expansão da cultura no país é a dificuldade de propagação da planta, que possui baixa taxa de enraizamento quando propagada através da estaquia (PENÃ et al., 2012). Considerando este entrave, a micropropagação é uma alternativa para a propagação da frutífera, permitindo a produção de grande quantidade de mudas em um curto espaço de tempo, utilizando menos material propagativo e garantindo a qualidade fitossanitária das plantas (DAMIANI; SCHUCH, 2009b).

Dentre as etapas realizadas na micropropagação está o enraizamento, sendo comum o uso de reguladores de crescimento da classe das auxinas, como o ácido indolbutírico (AIB). As auxinas são responsáveis por estimular a divisão e o alongamento das células, culminando na formação das raízes (Ford et al., 2001). Além dos reguladores de crescimento, os meios de cultura utilizados na micropropagação de espécies vegetais podem ser acrescidos de substâncias nutritivas e bioestimulantes, como as substâncias húmicas (SILVA et al., 2015), a fim de favorecer o enraizamento da planta.

As substâncias húmicas estão presentes no solo e desempenham papel fundamental na disponibilidade de nutrientes e fertilidade do mesmo (CANELLAS et al., 2008). Possuem o poder de estimular diversos processos fisiológicos relacionados ao crescimento das plantas, sobretudo o desenvolvimento radicular através do aumento do transporte de íons e ativação das H<sup>+</sup>ATPases, possuindo função similar a das auxinas (AGUIAR et al., 2009; DOBSS et al., 2010; ZANDONADI et al., 2013).

Mudas que possuem raízes mais desenvolvidas têm melhores condições de se adaptar às condições de campo, podendo sobreviver a ambientes com baixa disponibilidade de água e nutrientes (AGUIAR et al., 2009). Em pequenas concentrações as substâncias húmicas são capazes de estimular o crescimento e enraizamento de plantas cultivadas *in vitro* (SILVA et al., 2015).

Vários estudos evidenciam os benefícios da utilização de substâncias húmicas na etapa de enraizamento *in vitro* de plantas. Silva et al. (2015), avaliando o desenvolvimento de plântulas de *Cattleya warneri* 'Concolor' submetidas a tratamentos com diferentes doses de ácidos húmicos verificaram maior desenvolvimento nas mudas da planta com a utilização de 4,16 mM de C.L<sup>-1</sup> da substância. Já Rzepka-Plevnes et al. (2011), ao avaliarem a influência dos ácidos húmicos no enraizamento *in vitro* de cultivares de morango (*Fragaria x ananassa* Duch.), constataram que a adição de ácidos húmicos ao meio de cultura foi mais benéfica para o desenvolvimento das raízes da planta do que a utilização das auxinas comumente empregadas na propagação *in vitro* dessa espécie.

Apesar dessas pesquisas, são escassos os estudos que tratam da utilização das substâncias húmicas na micropropagação do mirtilheiro e seus possíveis efeitos sobre o desenvolvimento da frutífera. Levando em consideração tais informações, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de concentrações de substâncias húmicas, combinado com o uso de ácido indolbutírico no meio de cultura para o enraizamento *in vitro* de mirtilheiro 'Bluecrop'.

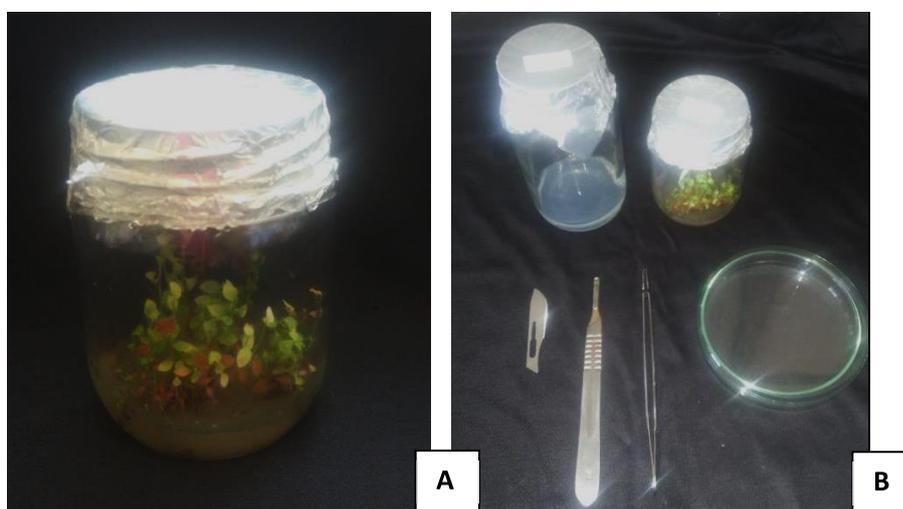
## 4.2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido no período de maio a agosto de 2019, no Laboratório de Propagação de Plantas Frutíferas pertencente ao Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão-RS.

O delineamento experimental utilizado foi em esquema fatorial 2x4, composto por quatro concentrações de substâncias húmicas (AH) (0;1,0; 2,0 e 3,0

ml.L<sup>-1</sup> de SoloHumics<sup>®</sup>), adicionados ou não de ácido indolbutírico (AIB) (0,0 ou 1,0 mg.L<sup>-1</sup>). Cada tratamento foi constituído por quatro repetições, sendo utilizado um frasco com quatro explantes por repetição. O produto comercial utilizado (SoloHumics<sup>®</sup>) é um fertilizante organomineral com a seguinte composição: ácido húmico (25%), ácido fúlvico (5%), matéria orgânica (59%), carbono orgânico total (31%) e potássio (3%).

Foram utilizados explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' contendo duas gemas (0,5 cm), cultivados *in vitro* em meio *Wood Plant Media* (WPM) (Lloyd; McCown, 1980), por cinco subcultivos no mesmo laboratório (Figura 10A e 10B).



**Figura 10.** Mirtilheiro 'Bluecrop' cultivado *in vitro* para retirada dos explantes (A) e materiais utilizados no experimento (B).  
Foto: autor, 2019.

Os explantes foram inoculados em frascos de vidro transparente com capacidade de 200 mL, contendo 30 mL de meio de cultura *Wood Plant Media* (WPM)(Lloyd; McCown, 1980), suplementado com 6 g.L<sup>-1</sup> de ágar, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1 g.L<sup>-1</sup> de mio-inositol, além dos respectivos tratamentos, tendo seu pH ajustado para 5,8. Antes da inoculação os frascos foram vedados com folha de alumínio e autoclavados a 120°C e 1,5 atm por 15 minutos.

Após a transferência dos explantes para os frascos em câmara de fluxo laminar, os mesmos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de

25 ± 2°C, luminosidade de 48 μmols. m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

Após 90 dias avaliou-se: porcentagem de sobrevivência, número de raízes, comprimento da maior raiz (cm), massa de matéria fresca total (g) e massa da matéria seca total (g). Para tanto, utilizou-se balança analítica e régua comum, sendo a pesagem de matéria seca total realizada após a secagem das amostras em estufa a 60°C até que as mesmas apresentassem massa constante.

Os resultados foram submetidos à análise de variância através do teste T a 5% de significância. Constatando-se significância estatística os fatores qualitativos foram avaliados pelo teste T, os quantitativos avaliados por regressão e a interação entre os fatores avaliada pelo teste Tukey a 5% de significância. As avaliações foram realizadas no programa estatístico Sisvar.

### **4.3 Resultados e discussão**

Não houve diferença significativa para a porcentagem de sobrevivência dentre os fatores, ou seja, em todos os tratamentos verificou-se 100% de explantes vivos.

Alta porcentagem de sobrevivência permite maior aproveitamento do material propagativo utilizado, além de aumentar a possibilidade de maior rendimento relacionado à comercialização de mudas, já que darão origem a um número maior de plantas.

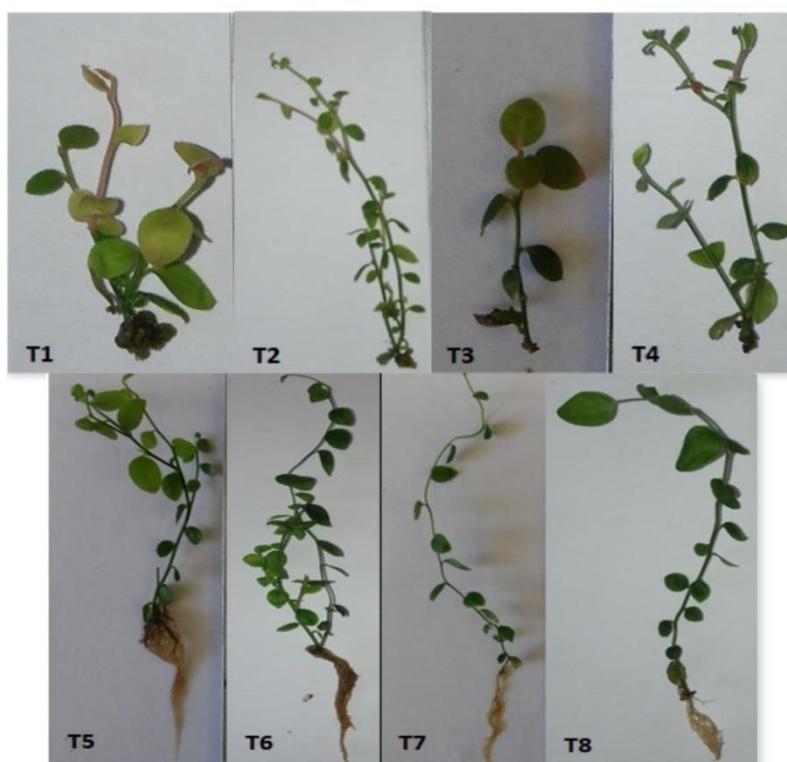
Com relação ao número de raízes, houve diferença significativa apenas a presença de ácido indolbutírico no meio (Tabela 6). O uso do AIB proporcionou médias de número de raízes mais baixas do que aqueles tratamentos sem o uso da auxina (Figura 11).

**Tabela 6.** Número de raízes em explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e ácido indolbutírico (AIB) ( $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) no meio de cultura *Wood Plant Media*. Capão do Leão, 2019.

Meio de cultura	Nº de raízes				Média geral
	Concentração de substâncias húmicas ( $\text{ml.L}^{-1}$ )				
	0,0	1,0	2,0	3,0	
Com AIB	0,00b*	0,00b	0,00b	0,06b	0,01b
Sem AIB	0,68a	1,00a	0,87a	1,18a	0,93a
<b>Média geral</b>	0,34 <sup>ns</sup>	0,50	0,43	0,62	

CV(%):83,80

<sup>ns</sup>Não significativo. \*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste T a 5% de significância.



**Figura 11.** Plântulas de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidas aos diferentes tratamentos contendo substâncias húmicas e ácido indolbutírico (AIB), sendo: sendo: T1=  $0 \text{ ml.L}^{-1}$  de SH + AIB; T2=  $1,0 \text{ ml.L}^{-1}$  de SH + AIB; T3=  $2,0 \text{ ml.L}^{-1}$  de SH + AIB; T4=  $3,0 \text{ ml.L}^{-1}$  de SH + AIB, T5=  $0 \text{ ml.L}^{-1}$  de SH ; T6=  $1,0 \text{ ml.L}^{-1}$  de SH ; T7=  $2,0 \text{ ml.L}^{-1}$  de SH ; T8=  $3,0 \text{ ml.L}^{-1}$  de SH.

Foto: Autor, 2019.

Tal fato pode estar relacionado, em parte, com a concentração hormonal endógena. Além disso, o adequado balanço hormonal favorece o crescimento de raízes, não necessitando de aplicações exógenas de reguladores vegetais (TREVISAN et al., 2008).

Os resultados do presente estudo corroboram com Rzepka-Plevnes et al. (2011), que ao avaliarem o enraizamento *in vitro* de duas cultivares de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) observaram que a aplicação de ácidos húmicos provenientes de terra negra e “solo enferrujado” no meio de cultura favoreceram o crescimento e desenvolvimento das raízes, além de aumentar a massa da matéria fresca das plantas, sendo os tratamentos com ácidos húmicos superiores aqueles onde se utilizou o AIB como suplemento do meio de cultura.

Camargo et al. (2017), testando a utilização de substratos e formas de imersão de auxina (AIB) no cultivo *in vitro* da cultivar Duke concluíram que a utilização de vermiculita e meio WPM líquido sem a utilização de AIB ( $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) favoreceu o crescimento de brotações e raízes das plantas micropropagadas. No entanto, Ostrolucká et al. (2004), ao trabalharem com diferentes cultivares de mirtilo obtiveram até 95% de enraizamento utilizando a concentração  $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB no meio de cultura, sendo que essa porcentagem variou entre as cultivares, o que demonstra a diferença da resposta das plantas ao uso de auxinas.

Para o comprimento da maior raiz foi observada diferença significativa apenas para a presença ou ausência de AIB (Tabela 7).

**Tabela 7.** Comprimento da maior raiz em explantes de mirtilero 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e ácido indolbutírico (AIB) ( $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) no meio de cultura *Wood Plant Media*. Capão do Leão, 2019.

Meio de Cultura	Comprimento da maior raiz (cm)				Média geral
	Concentração de substâncias húmicas ( $\text{ml.L}^{-1}$ )				
	0,0	1,0	2,0	3,0	
Com AIB	0,00b*	0,00b	0,00b	0,03b	0,007b
Sem AIB	1,24a	1,38a	1,28a	1,47a	1,34a
<b>Média geral</b>	0,62 <sup>ns</sup>	0,69	0,64	0,75	

CV(%):102,1

<sup>ns</sup>Não significativo. \*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste T a 5% de significância.

O desenvolvimento das raízes de uma muda pode influenciar diretamente na sobrevivência desta em condições de campo. Raízes mais desenvolvidas têm melhores condições de explorar o solo, facilitando a aclimatização e a adaptação

da planta a ambientes de baixa disponibilidade de água e baixa fertilidade (AGUIAR et al., 2009).

Espécies vegetais lenhosas apresentam dificuldade para enraizar por conta da maturidade do material propagativo. Nesse sentido, a micropropagação pode ser empregada para promover o rejuvenescimento dos explantes e aumentar as taxas de organogênese, sem necessitar da utilização de reguladores vegetais, sendo esta técnica bastante utilizada na cultura do eucalipto (TITON, 2001).

Para a massa de matéria fresca total dos explantes houve diferença significativa para a utilização de AIB e concentração de substâncias húmicas (Tabela 8).

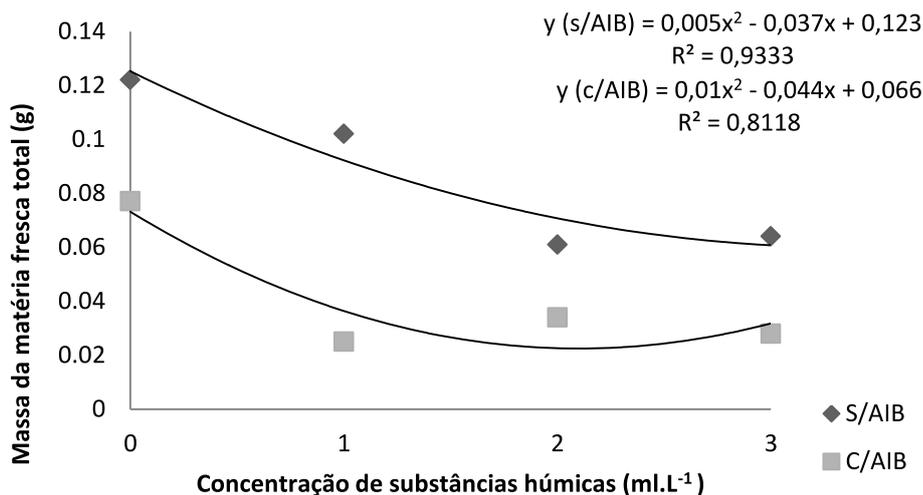
**Tabela 8.** Massa da matéria fresca total em explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e ácido indolbutírico (AIB) ( $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) no meio de cultura *Wood Plant Media*. Capão do Leão, 2019.

Meio de Cultura	Massa da matéria fresca total (g)				
	Concentração de substâncias húmicas ( $\text{ml.L}^{-1}$ )				
	0,0	1,0	2,0	3,0	Média geral
Com AIB	0,077a*	0,025b	0,034a	0,028a	0,040b
Sem AIB	0,122a	0,102a	0,061a	0,064a	0,087a
<b>Média geral</b>	0,099a	0,063ab	0,047b	0,045b	

CV (%):50,09

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna (e na linha para média geral das concentrações de substâncias húmicas) não diferem entre si pelo teste T a 5% de significância.

Para as concentrações de substâncias húmicas no meio, observou-se que as maiores médias foram obtidas sem a utilização do bioestimulante (Figura 12). Tais resultados são distintos aos registrados por Silva et al. (2015), que observaram acréscimos de até 159% na massa da matéria fresca de raízes de *Cattleya warneri* 'Concolor' utilizando ácidos húmicos provenientes de vermicomposto durante a multiplicação e o enraizamento *in vitro*.



**Figura 12.** Massa de matéria fresca total dos explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e AIB no meio de cultura *Wood Plant Media*. S/AIB = sem AIB, C/AIB = com AIB.

Assim como a variável anterior, em relação a massa da matéria seca total houve diferença significativa para a presença de ácido indolbutírico no meio de cultura e as concentrações de bioestimulante utilizadas (Tabela 9).

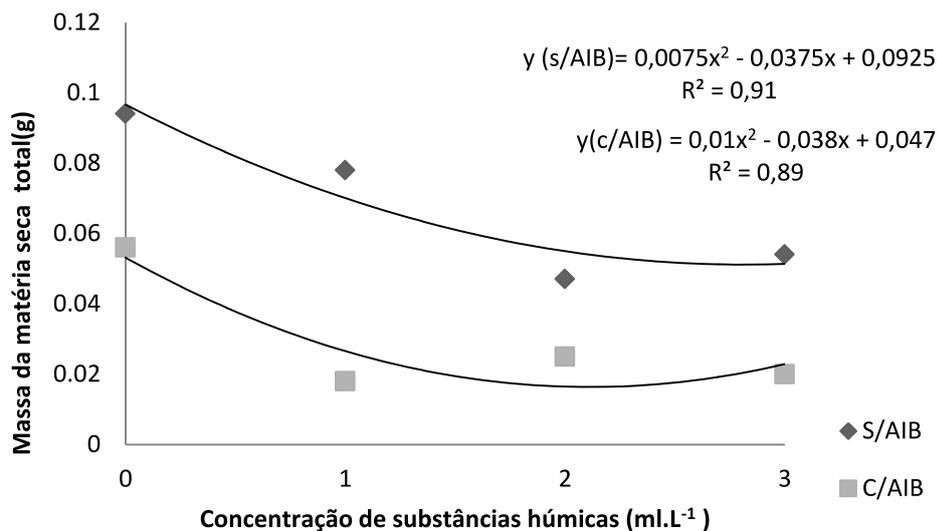
**Tabela 9.** Massa da matéria seca total em explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e ácido indolbutírico (AIB) (1,0 mg.L<sup>-1</sup>) no meio de cultura *Wood Plant Media*. Capão do Leão, 2019.

Meio de cultura	Massa da matéria seca total (g)				Média geral
	Concentração de substâncias húmicas (ml.L <sup>-1</sup> )				
	0,0	1,0	2,0	3,0	
Com AIB	0,056b*	0,018b	0,025a	0,020a	0,029b
Sem AIB	0,094a	0,078a	0,047a	0,054a	0,068a
<b>Média geral</b>	0,074a	0,047ab	0,036b	0,037b	

CV (%):50,21

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna (e na linha para média geral das concentrações de substâncias húmicas) não diferem entre si pelo teste T a 5% de significância.

Para as concentrações de substâncias húmicas, médias superiores foram observadas quando não se utilizou o bioestimulante (Figura 13).



**Figura 13.** Massa de matéria seca total dos explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e AIB no meio de cultura *Wood plant média*. S/AIB = sem AIB, C/AIB = com AIB.

Cabe ressaltar que a origem dos ácidos húmicos pode influenciar no efeito sobre as plantas cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. Dhanapal; Sekar (2014), ao comparar a resposta dos ácidos húmicos extraídos de leonardita e dois produtos comerciais durante a micropropagação de bananeira 'Grand naine' (*Musa accuminata*), constataram que tais produtos comerciais tiveram menor desempenho sobre o desenvolvimento dos explantes do que os ácidos húmicos provenientes de leonardita.

Deste modo, o desenvolvimento de novos estudos sobre o emprego das substâncias húmicas no enraizamento de mirtilheiro 'Bluecrop' é importante, com o objetivo de identificar se existe outra concentração ou produto adequado para o enraizamento *in vitro* desta cultivar.

### 4.3 Conclusão

O enraizamento *in vitro* de mirtilheiro 'Bluecrop' pode ser feito sem o uso de ácido indolbutírico (AIB) e sem a adição de substâncias húmicas.

## 5. CAPÍTULO III – Substâncias húmicas e substratos no enraizamento *ex vitro* de mirtilheiro ‘Bluecrop’

### 5.1 Introdução

O mirtilheiro (*Vaccinium* sp.) é uma frutífera nativa da América do Norte, Canadá e Estados Unidos (RASEIRA; ANTUNES, 2004; FACHINELLO, 2008). Seus frutos possuem excelentes características organolépticas e nutricionais, visto são que ricos em polifenóis, vitaminas e antocianinas (SILVEIRA et al., 2007).

Embora nos últimos anos o cultivo da frutífera tenha sido ampliado na região sul, uma das dificuldades para a expansão da cultura no país é dificuldade de propagação dessa planta, já que algumas cultivares possuem baixa taxa de enraizamento quando multiplicadas através da estaquia (PENÃ et al., 2012). Considerando tal problema, a micropropagação surge como uma alternativa para a produção de mudas da frutífera (DAMIANI & SCHUCH, 2009b).

O enraizamento de plantas micropropagadas pode ser feito em condições de viveiro ou de campo (*ex vitro*), sem a necessidade da infraestrutura de um laboratório. Em meio às vantagens do enraizamento *ex vitro* de plantas está a redução dos custos com infraestrutura e mão-de-obra, visto que as plantas serão retiradas da sala de crescimento para enraizamento em condições de viveiro, diminuindo assim custos com energia elétrica e meios de cultura (TORMEN, 2017). A técnica também permite a formação de um sistema radicular mais funcional, evitando o aparecimento de calos que podem atrapalhar a conexão dos sistemas vasculares da planta e permitindo o crescimento de maior número de raízes secundárias (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Neste método de propagação vários produtos podem ser utilizados para estimular o enraizamento de mudas, podendo se citar as substâncias húmicas. Estas substâncias desempenham papel fundamental na disponibilidade de nutrientes na estrutura do solo (CANELLAS et al., 2008), estimulam diferentes processos fisiológicos relacionados ao crescimento de plantas, sobretudo o

desenvolvimento de raízes, possuindo função similar a das auxinas (AGUIAR et al., 2009; DOBSS et al., 2010; ZANDONADI et al., 2013).

Estudos evidenciam os benefícios da utilização de substâncias húmicas na etapa de enraizamento *ex vitro* de plantas. Baldotto et al. (2009), em trabalho com mudas micropropagadas de abacaxizeiro 'Vitória' (*Ananas comosus* L. Merrill) observaram que a utilização de ácidos húmicos (fração das substâncias húmicas solúvel em meio alcalino) durante a aclimatização das plantas influenciou no desenvolvimento de raízes e crescimento da parte aérea, além de propiciar maior acúmulo de N, P, K Ca e Mg e aumento da relação clorofila a/ clorofila b. Em outro experimento, Meirelles et al. (2017) constataram maior produtividade em alface (*Lactuca sativa* L.) submetida a tratamento com ácidos húmicos combinados à aplicação de bactérias diazotróficas.

Assim como a utilização de substâncias que possam estimular o crescimento de raízes, durante o enraizamento *ex vitro* é de suma importância o emprego do substrato para promover o desenvolvimento das plantas. Para Cunha et al. (2006), substrato adequado é aquele cujas características físicas e químicas atendam às necessidades da espécie a ser propagada. Outros aspectos a serem considerados na seleção de substratos são a disponibilidade e o custo do material (FONSECA, 2001).

Para a produção de mudas de mirtilheiro, o substrato ideal varia de acordo com a cultivar. Pelizza et al. (2012) verificaram maior comprimento de raízes ao utilizar vermiculita de granulometria média para as cultivares Bluebelle Woodard e Georgiagem durante enraizamento *ex vitro*. Entretanto, Koyama et al. (2018), trabalhando com miniestacas de mirtilo 'Woodard' e 'Briteblue' concluíram que a utilização de casca de arroz carbonizada proporcionou maior porcentagem de sobrevivência e brotação de mudas para essas cultivares.

Levando em consideração tais estudos e a importância da produção de mudas para a expansão da cultura do mirtilheiro no Brasil, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da adição de substâncias húmicas e de três tipos de substratos no enraizamento *ex vitro* de brotações micropropagadas de mirtilheiro 'Bluecrop'.

## 5.2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido no período de agosto a novembro de 2019, no Laboratório de Propagação de Plantas Frutíferas e estufa pertencente ao Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão - RS.

O delineamento experimental utilizado foi em esquema fatorial 3x3, composto por três concentrações de substâncias húmicas (SH) (0, 2,0 e 4,0 ml.L<sup>-1</sup> de SoloHumics®), em diferentes substratos (vermiculita de granulometria média, casca de arroz carbonizada (CAC) e fibra de coco. Cada tratamento foi constituído por quatro repetições com dez plantas, sendo utilizada para cada repetição uma embalagem plástica transparente com tampa, formato retangular, com 16 cm de largura, 24 cm de comprimento e 5 centímetros de profundidade, marca Zettapack® (Figura 14).



**Figura 14.** Preparo das embalagens plásticas com casca de arroz carbonizada para a instalação do experimento.  
Foto: autor, 2019

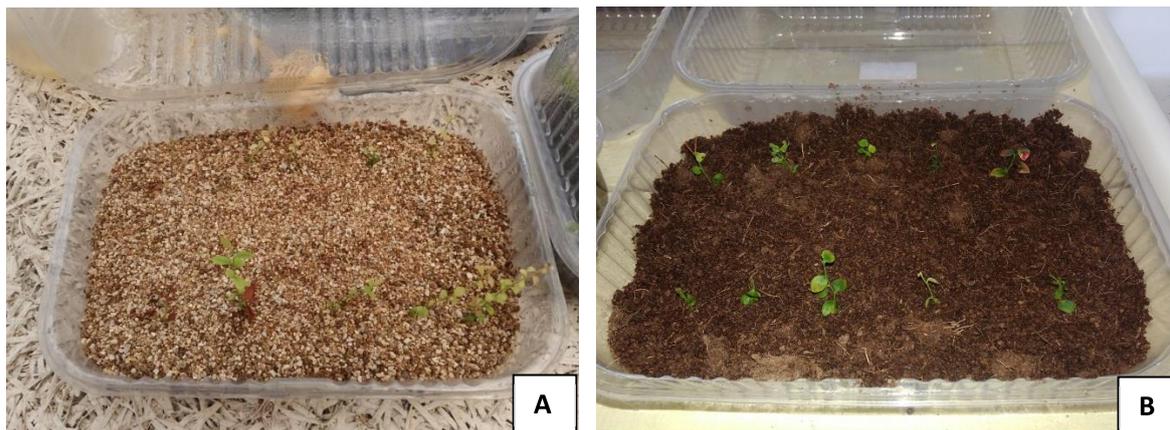
Foram utilizados explantes de mirtilheiro ‘Bluecrop’ com cerca de três centímetros de comprimento, sem ápices e sem raízes, cultivados previamente em meio *Wood Plant Media* (WPM) (Lloyd; McCown, 1980), por cinco subcultivos no mesmo laboratório (Figura 15A e 15B).



**Figura 15.** Mirtileiro 'Bluecrop' cultivado previamente *in vitro* (A) e explante com 3 cm, utilizado na instalação do experimento (B).  
Foto: autor, 2019.

O produto comercial utilizado (SoloHumics®) é um fertilizante organomineral com a seguinte composição: ácido húmico (25%), ácido fúlvico (5%), matéria orgânica (59%), carbono orgânico total (31%) e potássio (3%).

As embalagens plásticas foram mantidas em bancadas suspensas de madeira (com 2 m de largura, 1 m de comprimento e 70 cm de altura), em casa de vegetação com temperatura de 25°C (Figura 16<sup>a</sup> e 16B). As regas foram feitas em dias alternados de forma manual com o auxílio de um pulverizador manual de pressão marca Western®, com vazão máxima de 0,5L/min e pressão de trabalho 0,2 a 0,3 MPa, enquanto as aplicações (conforme o tratamento) foram realizadas uma vez por semana, sendo o produto comercial diluído na água da irrigação.



**Figura 16.** Explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos aos tratamentos com ácidos húmicos e vermiculita (A) e fibra de coco (B).

Foto: autor, 2020.

Após 90 dias avaliou-se: porcentagem de sobrevivência, número de raízes, comprimento da maior raiz, massa de matéria fresca total e massa da matéria seca total. Para tanto, utilizou-se balança analítica e régua comum, sendo a pesagem de matéria seca total realizada após a secagem das amostras em estufa a 60°C até que as mesmas apresentassem massa constante.

Os resultados foram submetidos à análise de variância através do teste T a 5% de significância. Constatando-se significância estatística os fatores qualitativos foram avaliados pelo teste T, os quantitativos avaliados por regressão e a interação entre os fatores avaliada pelo teste Tukey a 5% de significância. As avaliações foram realizadas no programa estatístico Sisvar.

### 5.3 Resultados e discussão

Para a porcentagem de sobrevivência houve diferença significativa apenas quanto ao tipo de substrato. Na vermiculita obteve-se as maiores médias, não diferindo significativamente da fibra de coco e da casca de arroz carbonizada na concentração de 2,0 mL<sup>-1</sup> de substâncias húmicas (Tabela 10).

**Tabela 10.** Porcentagem de sobrevivência em explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e diferentes substratos durante enraizamento *ex vitro*, aos 90 dias de cultivo. Capão do Leão, 2019.

Substrato	Sobrevivência (%)			
	Concentração de substâncias húmicas (ml.L <sup>-1</sup> )			
	0,0	2,0	4,0	Média geral
Vermiculita	87,5a*	77,5a	92,5a	85,8a
CAC	42,5b	50,0a	50,0b	47,5b
Fibra de coco	77,5a	62,5a	87,5a	75,8a
<b>Média geral</b>	69,16 <sup>ns</sup>	63,33	76,66	
CV(%): 27,50				

<sup>ns</sup>Não significativo; CAC = casca de arroz carbonizada. \*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste T a 5% de significância.

A casca de arroz carbonizada, embora possua pH próximo da neutralidade, baixa salinidade e alta porosidade, possui baixa capacidade de retenção de água (FERMINO & BELLÉ, 2000, KÄMPF, 200), fato que pode ocasionar estresse hídrico nas plantas em épocas mais quentes como o verão, causando mortalidade de mudas. Desse modo, embora o presente estudo tenha sido conduzido em casa de vegetação com temperatura controlada, pode-se inferir que a vermiculita e a fibra de coco propiciaram a diminuição desse estresse através da maior retenção de água, contribuindo para a maior sobrevivência de mudas.

Com relação ao número de raízes, novamente houve diferença significativa apenas para o tipo de substrato utilizado, sendo que a vermiculita propiciou as maiores médias, não diferindo significativamente dos demais na concentração de 4,0 ml.L<sup>-1</sup> (Tabela 11).

**Tabela 11.** Número de raízes em explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e diferentes substratos durante enraizamento *ex vitro*, aos 90 dias de cultivo. Capão do Leão, 2019.

Substrato	Número de raízes			
	Concentração de substâncias húmicas (ml.L <sup>-1</sup> )			
	0,0	2,0	4,0	Média geral
Vermiculita	1,65a*	1,87a	1,20a	1,57a
CAC	0,87b	0,87b	0,97a	0,90b
Fibra de coco	1,00ab	1,00b	1,02a	1,00b
<b>Média geral</b>	1,17 <sup>ns</sup>	1,25	1,06	
CV(%): 41,33				

<sup>ns</sup>Não significativo; CAC = casca de arroz carbonizada. \*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste T a 5% de significância.

O número e grau de desenvolvimento das raízes de uma muda podem influenciar diretamente na sobrevivência desta em condições de campo. Raízes mais desenvolvidas têm melhores condições de explorar o solo, facilitando a aclimatização e a adaptação da planta a ambientes de baixa disponibilidade de água e baixa fertilidade (AGUIAR et al., 2009). Quanto maior o número e quanto mais desenvolvidas forem as raízes das mudas, maior a chance de sobrevivência das plantas no campo.

Para o comprimento da maior raiz, houve diferença significativa para o tipo de substrato, sendo que a vermiculita propiciou as maiores médias que variaram de 1,84 cm a 2,93 cm. Observando a média geral, tratamentos com vermiculita foram superiores aos demais (Tabela 12).

**Tabela 12.** Comprimento da maior raiz em explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e diferentes substratos durante enraizamento *ex vitro*, aos 90 dias de cultivo. Capão do Leão, 2019.

Substrato	Comprimento da maior raiz (cm)			
	Concentração de substâncias húmicas (ml.L <sup>-1</sup> )			
	0,0	2,0	4,0	Média geral
Vermiculita	1,84a*	2,93a	2,87a	2,55a
CAC	0,63b	1,31b	0,85b	0,82b
Fibra de coco	1,00ab	0,98b	1,05b	1,12b
<b>Média geral</b>	1,17 <sup>ns</sup>	1,25	1,06	

CV(%): 41,42

<sup>ns</sup>Não significativo; CAC = casca de arroz carbonizada. \*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste T a 5% de significância.

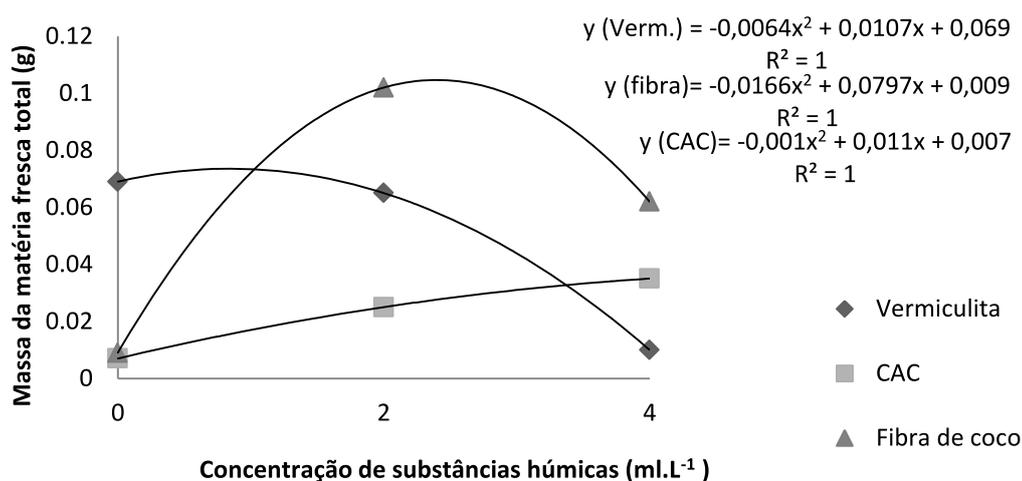
O baixo desempenho da casca de arroz carbonizada nas variáveis relacionadas ao desenvolvimento de raízes pode estar relacionado, em parte, com o fato de não promover boa fixação das plantas durante seu desenvolvimento, não sendo suficientemente densa e firme para o plantio de mudas muito pequenas. Assim, durante a irrigação as plantas podem sofrer tombamento por conta do impacto das gotículas de água nas folhas, prejudicando o desenvolvimento das mesmas.

Tais resultados corroboram com Pelizza et al. (2012), que em estudo com as cultivares de mirtilheiro Bluebelle Woodard e Georgiagem, observaram maior

comprimento de raízes ao utilizar vermiculita de granulometria média como substrato e AIB na concentração de  $250 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Analisando a utilização de substâncias húmicas, Baldotto et al. (2009), ao avaliarem o desempenho de mudas micropropagadas de abacaxizeiro 'Vitória' submetidas a tratamentos com ácidos húmicos isolados de vermicomposto e de torta de filtro, obtiveram incremento de 39% na área radicular das plantas.

Na avaliação da massa da matéria fresca total de plantas houve interação entre tipo de substrato e concentração de substâncias húmicas, onde cada substrato respondeu de forma diferente ao aumento da concentração de substâncias húmicas. Médias superiores foram observadas nos tratamentos com vermiculita e fibra de coco (Figura 17).



**Figura 17.** Massa de matéria fresca total dos explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e diferentes tipos de substrato.

Observando a análise de regressão para concentração de substâncias húmicas constata-se que concentrações acima de  $4,0 \text{ ml.L}^{-1}$  provocam declínio da matéria fresca total de explantes quando se utilizou vermiculita e fibra de coco. No entanto, para casca de arroz carbonizada observam-se resultados superiores com o aumento da concentração do bioestimulante. Isso pode se dever ao fato da casca de arroz carbonizada possuir baixa capacidade de retenção de água e dos nutrientes. Sendo assim, quanto maior a concentração de substâncias húmicas,

maior a disponibilidade destas para as plantas. Tal resultado também pode indicar uma possível interação entre substratos de origem orgânica e substâncias húmicas, ressaltando a importância de estudos sobre a combinação desses materiais.

Baldotto et al. (2009), em estudo com o abacaxizeiro 'Vitória' observaram incremento na matéria fresca da parte aérea e raiz de plântulas submetidas a tratamentos com ácidos húmicos provenientes de vermicomposto e torta de filtro, nas concentrações de 15,68 mmol L<sup>-1</sup> de C e 21,19 mmol L<sup>-1</sup> de C, respectivamente, concentrações mais baixas do que as utilizadas no presente estudo.

Analisando a interação entre os dois fatores, no tratamento onde se utilizou fibra de coco com a concentração de 2,0 ml.L<sup>-1</sup> de substâncias húmicas obteve-se a maior média, não diferindo significativamente da vermiculita na mesma concentração. Já para o tratamento onde não se utilizou bioestimulante, a fibra de coco obteve média mais baixa que a vermiculita, não diferindo significativamente da casca de arroz carbonizada.

Para a massa seca total houve diferença significativa para o substrato (Tabela 14) e interação entre substrato e concentração de substâncias húmicas.

**Tabela 13.** Massa da matéria seca total em explantes de mirtilheiro 'Bluecrop' submetidos às concentrações de substâncias húmicas e diferentes substratos durante enraizamento *ex vitro*, aos 90 dias de cultivo. Capão do Leão, 2019.

Substrato	Massa da matéria seca (g)			
	Concentração de substâncias húmicas (ml/L <sup>-1</sup> )			Média geral
	0,0	2,0	4,0	
Vermiculita	0,045Aa*	0,027ABa	0,006Bb	0,026a
CAC	0,003Ab	0,011Ab	0,016Aab	0,010b
Fibra de coco	0,004Bb	0,037Aa	0,030Aa	0,023a
CV(%): 51,95	0,017 <sup>ns</sup>	0,025	0,017	

<sup>ns</sup>Não significativo; CAC = casca de arroz carbonizada. \*Médias seguidas pela mesma letra na maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste T a 5% de significância.

Nos tratamentos com casca de arroz carbonizada a massa foi menor nas concentrações de 0,0 e 2,0 ml.L<sup>-1</sup>, tendo peso de 0,003 g e 0,011 g, respectivamente (Tabela 14). Para a concentração de 4,0 ml.L<sup>-1</sup> observaram-se médias mais baixas no tratamento com vermiculita (0,006 g), mas este não

diferenciou significativamente do tratamento contendo casca de arroz carbonizada. Nessa concentração, a fibra de coco obteve maiores médias. Analisando a média geral dos tratamentos com diferentes substratos, não se observou diferença significativa entre a vermiculita e a fibra de coco.

Baldotto et al. (2014), ao avaliarem o desenvolvimento de orquídeas do gênero *Cymbidium* sp. durante a aclimatização observaram que a aplicação de ácidos húmicos provenientes de cama de frango ( $18,75\text{mmol L}^{-1}$ ) e esterco bovino ( $3,77\text{mmol L}^{-1}$ ) resultaram em aumento do acúmulo de matéria seca pelas plantas em 21% e 28%, respectivamente, se comparado ao controle onde não houve aplicação do bioestimulante. Tal resultado sugere que, além da concentração utilizada, a origem das substâncias húmicas pode influenciar nos resultados obtidos.

Analisando a interação entre os fatores observa-se que no tratamento onde se utilizou vermiculita como substrato e sem substâncias húmicas obteve-se a maior média, não diferindo significativamente dos tratamentos fibra de coco com 2,0 e 4,0  $\text{ml.L}^{-1}$  de SH e vermiculita com 2,0  $\text{ml.L}^{-1}$  de SH.

Em suma, nas condições do presente estudo, entre os substratos testados, de modo geral, a vermiculita propiciou as maiores médias, seguida da fibra de coco; porém, outras pesquisas podem ser realizadas; inclusive, com a mistura desses materiais, que são resíduos agroindustriais. A escolha entre os substratos também dependerá do custo e da disponibilidade do material na região, priorizando aqueles com melhor custo-benefício. Com relação às substâncias húmicas, ressalta-se a importância de mais estudos acerca da utilização das mesmas na micropropagação, comparando substâncias oriundas de diferentes origens, além de testar concentrações menores, já que constatou-se declínio das médias de algumas variáveis avaliadas no enraizamento *ex vitro* da cultivar de mirtilheiro Bluecrop em concentrações mais altas.

## 5.4 Conclusão

O enraizamento *ex vitro* de mirtilheiro 'Bluecrop' pode ser feito sem a adição de substâncias húmicas, utilizando o substrato vermiculita ou fibra de coco.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O estudo da utilização de ácidos húmicos nas etapas da micropropagação de mirtilheiro 'Bluecrop' é de suma importância, visto a escassez de informações disponíveis sobre o tema e a diferença de resposta de espécies vegetais e cultivares à aplicação do bioestimulante.

- As substâncias húmicas são complexas e seus efeitos podem variar de acordo com uma série de fatores; dentre eles a concentração utilizada como suplementação ao meio de cultura, além da fonte de extração dos mesmos. Dessa forma, é necessário comparar produtos de diferentes origens, assim como testar outras concentrações do bioestimulante, com o objetivo de identificar se há eficácia na micropropagação do mirtilheiro 'Bluecrop'.

- A utilização de 2-Isopenteniladenina (2iP) durante a multiplicação do mirtilheiro 'Bluecrop' é importante, por proporcionar maior número de brotações e de gemas, não sendo necessária a utilização das substâncias húmicas durante este processo.

- Na fase de enraizamento *in vitro* dessa cultivar dispensa-se o uso de ácido indolbutírico (AIB) e de substâncias húmicas.

- No enraizamento *ex vitro* o substrato mais indicado para esta cultivar é a vermiculita e a utilização de substâncias húmicas provenientes de turfa não proporciona incremento no desenvolvimento de raízes durante esta fase.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAFRUTAS. **Relatório Cenário Hortifruti Brasil 2018**. Disponível em: <  
<https://abrafrutas.org/wp-content/uploads/2019/09/Relatorio-Hortifruti.pdf>>.

Acesso em: 15 out 2019.

AGUIAR, N. de O. et al. Distribuição de massa molecular de ácidos húmicos e promoção do crescimento radicular. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 1613-1623, 2009.

AGUIAR, N. O. et al. Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 362, n. 1-2, p. 161-174, 2013.

ANTUNES, L. E. C. et al. A cultura do mirtilheiro: morfologia da cultura, 2013. In: KRETZSCHMAR, A. A. et al. **Pequenas frutas**. Florianópolis: UDESC, 2013. 194 p.

ANTUNES, L. E. C. et al. Influência do substrato, tamanho de sementes e maturação de frutos na formação de mudas de pitangueira. **Embrapa Clima Temperado-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2012.

ANTUNES, L. E. C.; RASEIRA, M. C. B. Cultivo do mirtilo (*Vaccinium* spp). **Embrapa Clima Temperado-Sistema de Produção (INFOTECA-E)**, Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. 99p.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2018. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2018. 92 p.

APEX BRASIL. **Mercado de frutas na China: estudo setorial de mercados prioritários para exportação**. 2017. 68p. Disponível em: <  
<http://www.apexbrasil.com.br/Content/Imagens/965e1d39-c67d-46de-808b-0c3ba6f6b30a.pdf>>. Acesso em: 07 dez 2019.

ARRUDA, A. L. et al. Posição dos explantes na multiplicação in vitro de mirtilheiro cultivar O'neal. **Revista da Jornada da Pós Graduação e Pesquisa**, Bagé, v. 14, n. 14, p.1- 8, 2017.

BALDOTTO, L. E. B. et al. Aclimatização de orquídea (*Cymbidium* sp.) em resposta à aplicação de ácidos húmicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 5, p. 830-833, 2014.

BALDOTTO, L. E. B. et al. Desempenho do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à aplicação de ácidos húmicos durante a aclimatação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.33, n.4, p.979-990, 2009.

BALDOTTO, M. A.; BALDOTTO, L. E. B. Gladiolus development in response to bulb treatment with different concentrations of humic acids. **Revista Ceres**, Viçosa, v.60, n.1, p.138-142, 2013.

BALDOTTO, M. A.; BALDOTTO, L. E. B.. Ácidos húmicos. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, n. 7, 2014.

BARBIERI, R. L.; VIZZOTTO, M.. Pequenas frutas ou frutas vermelhas. **Embrapa Clima Temperado-Artigo em periódico indexado (ALICE)**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.33, n.268, p.7-10, 2012.

BENITES, V. M. et al. Extração e fracionamento quantitativo de substâncias húmicas do solo: um procedimento simplificado de baixo custo. **Embrapa Solos-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, Rio de Janeiro, 2003.

BERNARDES, J. M. et al. Efeito da aplicação de substância húmica em mudas de tomateiro. **Global Science and Technology**, Rio Verde, v. 4, n. 3, 2011.

CAMARGO, S. S. et al. Métodos de propagação e intensidades de poda na produção e qualidade de mirtilos cv. bluegem. **Revista da Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa-Congrega Urcamp**, Bagé, p. 1281-1292, 2018.

CAMARGO, S. S. et al. Substratos e formas de imersão de auxina no cultivo *in vitro* de mirtilheiros cv. Duke. **Revista da Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa-Congrega Urcamp**, Bagé, p. 2561-2570, 2017.

CANELLAS, L. P. et al. Humic acids crossinteractions with root and organic acids. **Annals of Applied Biology**, Reino Unido, v. 153, n. 2, p. 157-166, 2008.

CANTUARIAS-AVILÉS, T. et al. Cultivo do mirtilo: atualizações e desempenho inicial de variedades de baixa exigência em frio no Estado de São

Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 1, p. 139-147, 2014.

CARON, V. C. et al. Condicionadores do solo: ácidos húmicos e fúlvicos. **Piracicaba: ESALQ/USP – Divisão de Biblioteca**, 2015. 46p.

CARVALHO, J. M.; MIRANDA, D. L. As exportações brasileiras de frutas: um panorama atual. **Anais do Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural**, Porto Alegre, 2009.

CATO, S.C. **Ação de bioestimulante nas culturas do amendoim, sorgo e trigo e interações hormonais entre auxinas, citocininas e giberelinas**. 2006. 74p. Tese (Doutorado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2006.

COBUCCI, T. et al. Efeitos de reguladores vegetais aplicados em diferentes estágios de desenvolvimento do feijoeiro comum. In: **Embrapa Arroz e Feijão- Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 9., 2008, Campinas. Ciência e tecnologia na cadeia produtiva do feijão. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008.

CORDEIRO, F. C. **Efeito de ácidos húmicos e óxido nítrico no crescimento e metabolismo de raízes transformadas de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.)**. 2010, 115p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

COSTA, J. E. B. **A exportação brasileira de frutas frescas: desafios e soluções**. CNA Brasil, 12 de setembro de 2016. Disponível em: <[https://www.cnabrazil.org.br/assets/arquivos/artigostecnicos/artigo27\\_0.80186300%201514912075.pdf](https://www.cnabrazil.org.br/assets/arquivos/artigostecnicos/artigo27_0.80186300%201514912075.pdf)>. Acesso em: 15 out 2019.

CUNHA, A. de M. et al. Efeito de diferentes substratos sobre o desenvolvimento de mudas de *Acacia* sp. **Revista árvore**, Viçosa, v. 30, n. 2, p. 207-214, 2006.

DAL MOLIN, S. J. et al. Fenologia e aptidão de cultivares de mirtilo. **VII Seminário Brasileiro sobre Pequenas Frutas**, Vacaria, p. 31-40, 2014.

DAMIANI, C. R. et al. Luminosidade e IBA no enraizamento de microestacas de mirtilheiro dos grupos Rabbiteye e Southern Highbush. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, p. 650-655, 2009.

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

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

DHANAPAL, S.; SEKAR, D. S. Enhanced *in vitro* propagation of *musa acuminata* induced by humic acid from coal extract as compared with commercially available humic acid products. **International Journal of Research in Engineering and Technology**, Bangalore, v. 3, n.7, p. 300-307, 2014.

DOBBSS, L. B. et al. Bioactivity of chemically transformed humic matter from vermicompost on plant root growth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, n.58: 3681-3688, 2010.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Estabelecimento *in vitro* de mirtilo a partir de segmentos nodais. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 6, n. 1-2, p. 91-96, 2005.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Fatores que afetam a multiplicação *in vitro* de mirtilo. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 7, n. 1, p. 83-88, 2006.

FACHINELLO, J. C. et al. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 1, p. 109-120, 2011.

FACHINELLO, J. C. Mirtilo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal v.30, n. 2, 2008. Disponível em: <  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-29452008000200001](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452008000200001)>. Acesso em: 05 out 2019.

FACHINELLO, J.C. et al. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2.ed. Pelotas: UFPel, 1995. 179p.

FERMINO M. H.; BELLÉ, S. Substratos hortícolas. In: **Plantas Ornamentais: aspectos de produção**. Passo Fundo: EDIUBE, p. 29 -40, 2000.

FILHO, R. N. M et al. **Mirtilo: conheça a frutífera que está abrindo mercado em regiões subtropicais**. 2018. Disponível em: <  
<http://www.esalq.usp.br/cprural/boapratica/mostra/119/mirtilo-conheca-a-frutifera-que-esta-abrindo-mercado-em-regioes-subtropicais-.html>>. Acesso em 07 mar 2020.

FIRA, A.; CLAPA, D.; BADESCU, C. Aspects regarding the *in vitro* propagation of highbush blueberry cultivar bluecrop. **Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture**, Romania, v. 65, n. 1, p. 104-109, 2008.

FISCHER, D. L. de O. et al. Enraizamento de estacas semilenhosas de mirtilo sob o efeito de diferentes concentrações de ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 557-559, 2008.

FISCHER, D. L. de O. et al. Propagação de mirtilo a partir de miniestacas de diferentes tipos de ramos. In: **Embrapa Clima Temperado-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, Bento Gonçalves: SBF, 2012.

FONSECA, L. L.; OLIVEIRA, P. B. 2007. **A planta de mirtilo: morfologia e fisiologia** [WWW Document]. Divulgação Agro 556 n<sup>o</sup>2. Disponível em: <  
[http://www.inia.pt/fotos/gca/2\\_a\\_planta\\_de\\_mirtilo\\_morfologia\\_e\\_fisiologia\\_1369130315.pdf](http://www.inia.pt/fotos/gca/2_a_planta_de_mirtilo_morfologia_e_fisiologia_1369130315.pdf)>. Acesso em: 10 out 2019.

FONSECA, T. G. **Produção de mudas de hortaliças em substratos de diferentes composições com adição de CO<sup>2</sup> na água de irrigação**. 2001. 72f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2001.

FORD, Y. Y. et al. Adventitious rooting: examining the role of auxin in easy and a difficult-to-root plant. **Plant Growth Regulation**, New York City, v.10, p.1-11, 2001.

Fruits topple TOP to head growth chart. **The Times of India**, New Delhi, 30 de agosto de 2018. Disponível em: <<https://timesofindia.indiatimes.com/>>. Acesso em: 07 dez 2019.

FRUTICULTURA quer ampliar mercado. **ABRAFRUTAS**, Brasília, 28 de novembro de 2018. Disponível em: <<https://abrafrutas.org/2018/11/28/fruticultura-quer-ampliar-mercado/>>. Acesso em: 06 out 2019.

**G1**. Mirtilo cresce no mercado agropecuário e tem RS como principal produtor no país. 2018. Disponível em: <<https://radioaratiba.com.br/mirtilo-cresce-no-mercado-agropecuário-e-tem-rs-como-principal-produtor-no-país/>>. Acesso em: 08 mar 2020.

GALLETTA, G. J.; BALLINGTON, J. R. Blueberry, cranberries, and lingonberries In: JANICK, J.; MOORE, J. N. [Ed]. **Fruit breeding**. New York: J. Wiley, 1996. p. 1-108.

GONZÁLEZ, M. et al. Influence of organic amendments on soil quality potential indicators in an urban horticultural system. **Bioresource Technology**, New York City, v.101, p. 8897-8901, 2010.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformações genéticas das plantas**, v. 1, Brasília: Embrapa, p. 183-260,1998.

HARTMANN, H. T. et al. **Plant propagation: principles and practices**. 6. ed. New Jersey: Prentice Hall, . p. 549-622, 1997.

HOFFMANN, A. et al. Infraestrutura para propagação de plantas frutíferas. In: FACHINELLO, J. C. Propagação de Plantas Frutíferas. Brasília – DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 13-43, 2005.

HOFFMANN, A.; ANTUNES, L. E. C. Grande potencial. **Embrapa Uva e Vinho-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, Bento Gonçalves, 2004.

Disponível em: <  
<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/540193/1/HOFFMANNCultivarHFv5n27p282004.pdf>>. Acesso em: 10 out 2019.

HORBACH, Mi. A. et al. Micropropagação de plântulas de erva-mate obtidas de embriões zigóticos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 1, p. 113-119, 2011.

HU, C.Y.; WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud culture. In: EVANS, D.A. et al. **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan, p.117-227. 1983.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção agrícola municipal (PAM)**. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613>>. Acesso em: 10 nov 2019.

JAAKOLA, L. et al. Effect of N6-isopentenyladenine concentration on growth initiation in vitro and rooting of bilberry and lingonberry microshoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Países Baixos, v. 66, n. 1, p. 73-77, 2001.

JÚNIOR, A. W. et al. Substratos na formação de mudas para pessegueiro. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 29, n. 4, p. 569-572, 2007.

KÄMPF, A. N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. Guaíba: Agropecuária, 2000, 254p

KOYAMA, R. et al. Métodos de aplicação de ácido indolbutírico e épocas de coleta de estacas de mirtilo 'Briteblue'. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária)**, Pernambuco, v. 14, n. 3, p. 6542, 2019.

KOYAMA, R. et al. Multiplication of blueberry mini-cuttings in different growth media. **Agronomy Science and Biotechnology**, New York City, v. 4, n. 1, p. 28, 2018.

KROLOW, A. C. R. Beneficiamento de frutas vermelhas. **Embrapa Clima Temperado-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, Pelotas, v.33, n.268, p.96-103, 2012.

LACERDA, M. R. B. et al. Características físicas e químicas de substratos à base de pó de coco e resíduo de sisal para produção de mudas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 2, p. 163-170, 2006.

LEITZKE, L. N. et al. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento in vitro de amoreira-preta e framboeseira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 582-587, 2009.

LIMA, S. M. et al. Substratos para aclimatização de plantas micropropagadas de *Mentha viridis* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. S2, p. 672-674, 2007.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. H. Woody Plant Medium: A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. **HortScience**, Virgínia, v. 16, p. 453, 1981.

MATHIAS, J. ; PIO, R. Como plantar: Mirtilo. **Revista Globo Rural**, Editora Globo S.A., 2015. Disponível em: <http://revistagloborural.globo.com/GloboRural/0,6993,EEC17011434529,00.html>>. Acesso em: 15 out 2019.

MATOS, S. R. **Influência da localização geográfica de produção nas propriedades de mirtilos *Vaccinium corymbosum* L. cv. Bluecrop**. 2015, 81p. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Tecnologia Alimentar) - Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Viseu, Viseu, Portugal.

MEIRELLES, A. F. M. et al. Produtividade da alface (*Lactuca sativa* L.) em resposta à aplicação de ácidos húmicos e bactérias diazotróficas, em condições de campo. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 64, n. 5, 2017.

MORAIS, T. P. et al. Reguladores de crescimento vegetal no cultivo in vitro de *mentha x piperita* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 16, n. 2, p. 350-355, 2014.

MOUCO, M. A. do C. et al. Controle do crescimento vegetativo e floração de mangueiras cv. Kent com reguladores de crescimento vegetal. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.33, n.4, p. 1043-1047, 2011.

MOURA, G. C. **Aspectos de manejo e cultivares de mirtilo: qualidade e produtividade**. 2013, 130p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

MULEO, R.; MORINI, S. Light quality regulates shoot cluster growth and development of MM106 apple genotype *in vitro* culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdã, v.108, p.364-370, 2006.

MUNIZ, J. N. **Micropropagation and acclimatization of Physalis peruviana and Physalis alkekengi**. 2013. 70 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2013.

NARDI, S. et al. Relationship between molecular characteristics of soil humic fractions and glycolytic pathway and krebs cycle in maize seedlings. **Soil Biology and Biochemistry**, Reino Unido, v. 39, n. 12, p. 3138-3146, 2007.

OSTROLUCKÁ, M. G. et al. *In vitro* propagation of *Vaccinium* species. **Acta Universitatis Latviensis, Biology**, Riga, vol. 676, p. 207-212, 2004.

PASA, M. da S. et al. Qualidade de luz e reguladores de crescimento na multiplicação e enraizamento *in vitro* da amoreira-preta 'Xavante'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 8, p. 1392-1396, 2012.

PASQUALINI, A. P. de A. **Germinação de sementes e micropropagação de mirtilheiro**. 2013. 73p. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2013.

PELIZZA, T. R. et al. Enraizamento de plântulas de mirtilheiro em condição *ex vitro* com diferentes substratos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 1, p. 255-261, 2012.

PELIZZA, T. R. et al. Microestaquia em mirtilheiro com diferentes porções do ramo e substratos. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 2, p. 319-324, 2011.

PELIZZA, T. R. **Propagação de mirtilheiro através da micro e miniestaquia**. 2009. 110p. Tese (Doutorado em Fruticultura de Clima Temperado) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

PEÑA, M. L. P. et al. Concentrações e formas de aplicação do ácido indolbutírico na propagação por estaquia dos mirtilheiros cvs. Flórida e Clímax. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 57-63, 2012.

PICOLOTTO, L. et al. Diferentes misturas de substratos na formação de mudas de pessegueiro, em embalagem. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 8, n. 2, p. 119-125, 2007.

PICOLOTTO, L. et al. Influência do substrato e do armazenamento de sementes na emergência e desenvolvimento inicial de mudas de pitangueira. 11ª Jornada de Pós-graduação e Pesquisa. Santana do Livramento. Anais: **Urcamp – CONGREGA**, Bagé, 2013.

PIETTA, G. M.; PALEZI, S. C. Desenvolvimento de um iogurte sabor mirtilo à base de kefir e com reduzido teor de lactose. **Unoesc & Ciência-ACET**, Joaçaba, v. 6, n. 2, p. 163-172, 2015.

PIRES, C. R. F. et al. Qualidade textural de tomates cultivados em substratos orgânicos submetidos à aplicação de substâncias húmicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 11, p. 1467-1472, 2010.

QUISEN, R. C.; ÂNGELO, P. C. da S. Manual de procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental. **Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos**, Manaus, 2008.

RASEIRA, M. C. B.; ANTUNES, L. E. C. A Cultura do mirtilo. **Embrapa Clima Temperado-Documentos (INFOTECA-E)**, Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 67p.

RESENDE, J. M. et al. Atividade de enzimas pectinametilesterase e poligalacturonase durante o amadurecimento de tomates do grupo multilocular. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, p.206-201, 2004.

RISTOW, N. C. et al. Crescimento de plantas de mirtilo a partir de mudas micropropagadas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 1, p. 210-215, 2009.

RISTOW, N. C. et al.. Substratos para o enraizamento de microestacas de mirtilo cultivar georgiagem. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 1, p. 262-268, 2012.

RZEPKA-PLEVNES, D. et al. Effects of auxins and humic acids on in vitro rooting of strawberry (*Fragaria x ananassa Duch.*). **Journal of Food, Agriculture & Environment**, Finlândia, v. 9, n. 3&4, p. 592-595, 2011.

SANTOS, A. M.; RASEIRA, M. C. B. **A cultura do mirtilo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2002. 30p.

SCHUCH, M. W. et al. Micropropagação como técnica de rejuvenescimento em mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cultivar Climax. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 814-820, 2008.

SILVA, L. C. da et al. Efeito da iluminação e pré-lavagem das brotações de mirtilo cv. Florida no estabelecimento in vitro. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 13, n. 1, p. 127-129, 2007.

SILVA, L. C. da et al. Meio nutritivo, reguladores de crescimento e frio no estabelecimento in vitro de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cv. Delite. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 4, p. 405-408, 2006.

SILVA, L. C. da et al. Tipo de ramo e efeito do ácido indol acético (AIA) no estabelecimento in vitro de três cultivares de mirtilo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 522-525, 2008.

SILVA, M. A. C. da et al. Ácidos húmicos de vermicomposto estimulam o crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya warneri* (Orchidaceae). **Rodriguésia - Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 66, n. 3, p. 759-768, 2015.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-681, 2010.

SILVEIRA, N. G. A. et al. Teor de fenólicos e composição química do mirtilo do grupo *Highbush*. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, n.18, p.365-370, 2007.

SOUZA, A. L. K. et al. Desempenho de mudas de mirtilo obtidas por micropropagação ou estaquia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, p.868-874, 2011.

TAVARES, S. D. R. et al. Importância das frutas vermelhas na prevenção de doenças. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, Goiás, v.7, n.4, 2014.

TITON, M. Propagação clonal de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia e microestaquia. 2001. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

TORMEN, G. C. R. **Multiplicação *in vitro* e enraizamento *ex vitro* de *Eucalyptus cloeziana***. 2017, 92p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Faculdade de Engenharia Florestal, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, MT.

TREVISAN, R. et al. Enraizamento de estacas herbáceas de mirtilo: influência da lesão na base e do ácido indolbutírico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 402-406, 2008.

VIGNOLO, G. K. et al. Enraizamento de estacas lenhosas de três cultivares de mirtilheiro com diferentes concentrações de AIB. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 5, p. 795-800, 2012.

VILLA, F. et al. Micropropagação da amoreira-preta (*Rubus* spp.) e efeito de substratos na aclimatização de plântulas. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 47-53, 2006a.

VILLA, F. et al. Multiplicação *in vitro* de amoreira-preta cultivar Brazos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.2, p.266-270, 2006b.

WENDLING, I.; SOUZA JUNIOR, L. Propagação vegetativa de erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) por miniestaquia de material juvenil. In: **Congresso Sul-Americano da erva-mate**. Epagri: Chapecó, 2003.

XAVIER, A. et al. Propagação vegetativa de cedro-rosa por miniestaquia. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 2, p. 139-143, 2003.

YAMAMOTO, L. Y. et al. Substratos no enraizamento de estacas herbáceas de amora-preta 'Xavante'. **Embrapa Clima Temperado-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2013.

ZANDONADI, D. B. et al. Plant physiology as affected by humified organic matter. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, New York City, n.25: 12-25, 2013.