

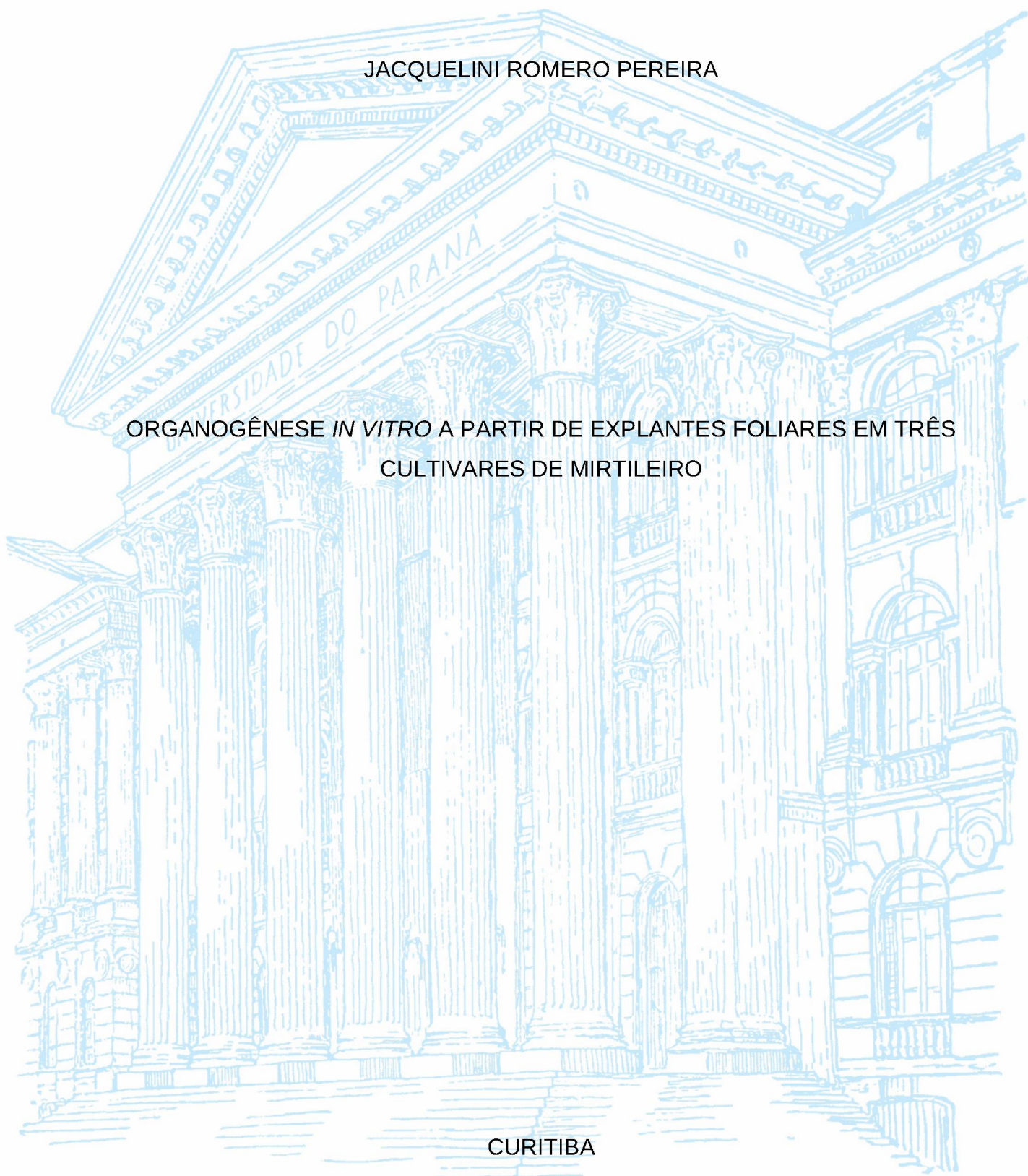
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JACQUELINI ROMERO PEREIRA

ORGANOGENESE *IN VITRO* A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES EM TRÊS
CULTIVARES DE MIRTILEIRO

CURITIBA

2022



JACQUELINI ROMERO PEREIRA

ORGANOGENESE *IN VITRO* A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES EM TRÊS
CULTIVARES DE MIRTILEIRO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Biasi

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Pereira, Jacqueline Romero

Organogênese *in vitro* a partir de explantes foliares em três cultivares de mirtilheiro / Jacqueline Romero Pereira. – Curitiba, 2022.

1 recurso online: PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal).

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Biasi

1. Mirtilo. 2. Organogênese. 3. Plantas cultivares. I. Biasi, Luiz Antonio. II. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal). III. Título.

Bibliotecária: Telma Terezinha Stresser de Assis CRB-9/944



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA
(PRODUÇÃO VEGETAL) - 40001016031P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **JACQUELINI ROMERO PEREIRA** intitulada: **ORGANOGENESE IN VITRO A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES EM TRÊS CULTIVARES DE MIRTILEIRO**, sob orientação do Prof. Dr. LUIZ ANTONIO BIASI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 05 de Setembro de 2022.

LUIZ ANTONIO BIASI

Presidente da Banca Examinadora

CAROLINA SMANHOTTO SCHUCHOVSKI AUGUSTO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

ALESSANDRA FERREIRA RIBAS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

A Deus e a espiritualidade pela vida e o amparo até aqui, mesmo nos momentos mais difíceis, sempre um farol de esperança.

Ao Ricardo, meu parceiro nesta caminhada, que segue me amparando e cuidando, e nunca deixa de acreditar nos nossos planos e nos de Deus.

Aos meus pais, principalmente meu pai Prof. Dr. João Arami que me guiou no caminho da educação e da pesquisa, e me ensinou o valor do conhecimento. A minha mãe Elisiane pelo dom da vida.

Aos meus irmãos, Belini, Patrícia, Priscila, Kawan, Thales e Eduardo pela irmandade e pelo apoio, principalmente à minha irmã Patrícia, minha parceira em tantos momentos preciosos.

Aos meus sobrinhos Gabriel, Carlos Daniel, Giovana, Melissa e Igor, por serem uma luz na minha vida e até participarem ativamente nas minhas missões.

Aos meus avôs paternos e maternos, pelo exemplo de trabalho duro e dedicação, com uma lembrança ao meu avô Moacir (*in memoriam*) e avó Aracy, pelo exemplo de bondade, carinho e dedicação destinados a mim.

Às minhas amigas Bruna, Suelen e Eduarda, que ouviram tantos desabafos ao longo destes anos, e em especial a minha amiga Eduarda que tanto me foi apoio e sonhou comigo nestes anos de estudo. Bem como minha amiga Ariane que participou como estagiária de iniciação científica e foi muito importante neste processo.

Ao Prof. Dr. Luiz Antonio Biasi por toda a dedicação, paciência e tranquilidade, por ser um exemplo de dedicação à ciência e de exímio pesquisador. Que nestes anos de mestrado e anos pandêmicos foi compreensivo e paciente com as dificuldades encontradas.

Aos professores da UFFS e UFPR que me propiciaram a base para alçar voos longos.

Ao programa, docentes e servidores da Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal da UFPR (PGAPV).

Uma única pergunta pode ser mais explosiva do que mil respostas.

(JOSTEIN GAARDER, 1991)

RESUMO

O mirtilheiro é uma espécie de clima temperado, que possui grande potencial de desenvolvimento no Brasil, principalmente na região sul do país, em vista das condições edafoclimáticas favoráveis. A produção de mudas desta espécie é majoritariamente feita de forma vegetativa. No entanto os métodos convencionais não apresentam a produção necessária para suprir o mercado interno, nem para promover o fomento da cultura. Uma das opções para a produção é a técnica de micropropagação, que em curto período de tempo e espaço reduzido, consegue produzir grande número de mudas. Desta forma, a elaboração de um protocolo de indução à organogênese até a formação de mudas é um fator essencial para a produção de mudas eficiente, especialmente para cultivares adaptadas às condições climáticas do sul do Brasil, tendo em vista que a maior parte dos estudos foi realizado com cultivares utilizadas no hemisfério norte. Desta forma, a presente pesquisa avaliou a resposta organogênica de explantes foliares não meristemáticos de três cultivares de mirtilheiro (Bluegem, Climax e Delite) do grupo Rabbiteye tratados com os reguladores vegetais Thidiazuron (TDZ), 6-(γ - γ -dimethylallylamino)-purine (2iP), 6-benzylaminopurine (BAP) e Zeatina (ZEA) nas concentrações 0; 0,5; 2,5; 5; 10; 20 μ M em meio de cultura Woody Plant Medium (WPM). Também foi realizada a etapa de multiplicação e aclimatização com enraizamento de mini estacas, utilizando o regulador vegetal ácido indol-3-butírico (AIB) nas concentrações 0, 250 e 500 mg L⁻¹. A indução da organogênese nas cultivares Bluegem e Delite foi possível com a utilização do regulador TDZ na concentração 0,5 μ M. Na cultivar Climax a organogênese foi observada com os reguladores vegetais TDZ e ZEA nas concentrações 0,5 e 10 μ M. Em nenhuma das três cultivares foram observados resultados significativos com os reguladores 2iP e BAP. A multiplicação foi possível com a utilização do regulador vegetal ZEA na concentração 2,5 μ M, sendo que esta promoveu o alongamento das brotações obtidas via organogênese. Para a aclimatização e enraizamento de mini estacas, o uso do regulador vegetal foi indiferente para as três cultivares avaliadas, cujo enraizamento de mini estacas e sobrevivência foi de 29,16% para Bluegem, 68,66% para Delite e 75% para Climax.

Palavras-chave: *Vaccinium virgatum*. Micropropagação. Citocininas. Rabbiteye.

ABSTRACT

The blueberry is a species of temperate climate, which has great potential for development in Brazil, mainly in the southern region of the country, in view of the favorable edaphoclimatic conditions. The production of seedlings of this species is mostly done vegetatively. However, conventional methods do not have the necessary production to supply the internal market, nor to promote the culture. One of the options for production is the micropropagation technique, which in a short period of time and reduced space, manages to produce a large number of seedlings. In this way, the elaboration of an organogenesis induction protocol until the formation of seedlings is an essential factor for the production of efficient seedlings, especially for cultivars adapted to the climatic conditions of southern Brazil, considering that most of the studies are in cultivars used in the northern hemisphere. Thus, the present research evaluated the organogenic response of non-meristematic leaf explants of three blueberry cultivars (Bluegem, Climax and Delite) from the Rabbiteye group treated with the plant regulators Thidiazuron (TDZ), 6-(γ - γ -dimethylallylamino)- purine (2iP), 6-benzylaminopurine (BAP) and Zeatin (ZEA) at concentrations 0; 0.5; 2.5; 5; 10; 20 μ M in Woody Plant Medium (WPM). The multiplication and acclimatization stage with rooting of mini cuttings was also carried out, using the plant regulator indole-3-butyric acid (IBA) at concentrations of 0, 250 and 500 mg L⁻¹. The induction of organogenesis in Bluegem and Delite cultivars was possible with the use of the TDZ regulator at a concentration of 0.5 μ M. In the Climax cultivar, organogenesis was observed with plant regulators TDZ and ZEA at concentrations of 0.5 and 10 μ M. In none of the three cultivars, significant results were observed with the 2iP and BAP regulators. Multiplication was possible with the use of the plant regulator ZEA at a concentration of 2.5 μ M, which promoted the elongation of shoots obtained via organogenesis. For the acclimatization and rooting of mini-cuttings, the use of the plant regulator was indifferent for the three evaluated cultivars, which rooting of cuttings and survival was 29.16% for Bluegem, 68.66% for Delite, and 75% for Climax

Key-words: *Vaccinium virgatum*. Micropropagation. Cytokinins. Rabbiteye.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – PLANTAS DE MIRTILEIRO CULTIVAR BLUEGEM EM FASE DE MULTIPLICAÇÃO QUE SERVIRAM COMO FONTE DE EXPLANTES PARA INDUÇÃO DE ORGANOGÊNESE.....	25
FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO E POSIÇÃO DOS EXPLANTES NA PLACA DE PETRI	26
FIGURA 3 – DETALHES DA INSTALAÇÃO DA ACLIMATIZAÇÃO DA CULTIVAR DELITE: A- SEGMENTAÇÃO DOS EXPLANTES; B – DISPOSIÇÃO DOS EXPLANTES NA CAIXA PLÁSTICA; C – DISPOSIÇÃO DAS CAIXAS PLÁSTICAS NA SALA DE CRESCIMENTO.....	29
FIGURA 4 – FORMAÇÃO DE CALOS E GEMAS DOS EXPLANTES FOLIARES DA CULTIVAR BLUEGEM TRATADA COM TDZ. A E C - EXPLANTE DO TRATAMENTO COM TDZ 0,5 μM ; B E D - EXPLANTE DO TRATAMENTO COM TDZ 20 μM ; SETAS BRANCAS: BROTAÇÕES GRANDES; SETAS PRETAS: BROTAÇÕES PEQUENAS.....	34
FIGURA 5 – FORMAÇÃO DE GEMAS NOS EXPLANTES FOLIARES DA CULTIVAR BLUEGEM COM 20 μM DE ZEA.....	35
FIGURA 6 – BROTAÇÕES ADVENTÍCIAS DA CULTIVAR DELITE COM TDZ; A- EXPLANTE DO TRATAMENTO COM TDZ 0,5 μM ; B - EXPLANTE DO TRATAMENTO COM TDZ 20 μM ; C – EXPLANTE DO TRATAMENTO COM TDZ 20 μM	39
FIGURA 7 – BROTAÇÕES DOS EXPLANTES DA CULTIVAR CLIMAX COM O REGULADOR VEGETAL ZEA E TDZ. A- EXPLANTE DO TRATAMENTO COM ZEA 20 μM ; B EXPLANTE DO TRATAMENTO COM TDZ 0,5 μM ; C – EXPLANTE DO TRATAMENTO COM TDZ 20 μM	43
FIGURA 8 – FORMAÇÃO DE CALOS E GEMAS DOS EXPLANTES FOLIARES DA CULTIVAR CLIMAX TRATADA COM TDZ E ZEA. A – TDZ COM 0,5 μM ; ZEA COM 20 μM	44
FIGURA 9 – BROTAÇÕES DAS CULTIVARES BLUEGEM, DELITE E CLIMAX, EM FASE DE MULTIPLICAÇÃO COM MEIO DE CULTURA WPM COM 2,5 μM DE ZEA PROVENIENTES DE ORGANOGÊNESE; A – CULTIVAR	

	DELITE ZEA; B – CULTIVAR CLIMAX TDZ; C – CULTIVAR BLUEGEM TDZ.....	46
FIGURA 10 –	EFEITO DO REGULADOR VEGETAL AIB NAS CONCENTRAÇÕES 0, 250 E 500 MG L ⁻¹ EM MINI ESTACAS DA CULTIVAR BLUEGEM. A – ENRAIZAMENTO DA CONCENTRAÇÃO 0 mg L ⁻¹ ; B – ENRAIZAMENTO NA CONCENTRAÇÃO 250 mg L ⁻¹ ; C – ENRAIZAMENTO NA CONCENTRAÇÃO 500 mg L ⁻¹	52
FIGURA 11 –	ENRAIZAMENTO DAS ESTACAS DA CULTIVAR DELITE NAS CONCENTRAÇÕES 0, 250 E 500 mg L ⁻¹ DE AIB. A – COMPARATIVO ENTRE O CRESCIMENTO DAS BROTAÇÕES; B – ENRAIZAMENTO DA CONCENTRAÇÃO 0 mg L ⁻¹ ; C – ENRAIZAMENTO NA CONCENTRAÇÃO 250 mg L ⁻¹ ; D – ENRAIZAMENTO NA CONCENTRAÇÃO 500 mg L ⁻¹	53
FIGURA 12 –	EFEITO DO REGULADOR VEGETAL AIB NAS CONCENTRAÇÕES 0, 250 E 500 mg L ⁻¹ EM MINI ESTACAS DA CULTIVAR CLIMAX. A – ENRAIZAMENTO DA CONCENTRAÇÃO 0 mg L ⁻¹ ; B – ENRAIZAMENTO NA CONCENTRAÇÃO 250 mg L ⁻¹ ; C – ENRAIZAMENTO NA CONCENTRAÇÃO 500 mg L ⁻¹	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – EFEITO DOS REGULADORES VEGETAIS NA ORGANOGÊNESE <i>IN VITRO</i> DE MIRTILEIRO DA CULTIVAR BLUEGEM A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES.....	32
TABELA 2 – EFEITO DOS REGULADORES VEGETAIS NA ORGANOGÊNESE <i>IN VITRO</i> DE MIRTILEIRO DA CULTIVAR DELITE A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES.....	37
TABELA 3 – EFEITO DOS REGULADORES VEGETAIS NA ORGANOGÊNESE <i>IN VITRO</i> DE MIRTILEIRO DA CULTIVAR CLIMAX A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES.....	41
TABELA 4 – EFEITO DOS REGULADORES VEGETAIS NA ORGANOGÊNESE <i>IN VITRO</i> DE MIRTILEIRO DA CULTIVAR BLUEGEM, DELITE E CLIMAX, A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES.....	44
TABELA 5 –MULTIPLICAÇÃO DE BROTOS PROVENIENTES DA INDUÇÃO ORGANOGÊNICA DE EXPLANTES FOLIARES DOS TRATAMENTOS COM TDZ E ZEA NA CULTIVAR BLUEGEM.....	46
TABELA 6 –MULTIPLICAÇÃO DE BROTOS PROVENIENTES DA INDUÇÃO ORGANOGÊNICA DE EXPLANTES FOLIARES DOS TRATAMENTOS COM TDZ E ZEA NA CULTIVAR DELITE COM MEIO DE CULTURA WPM SUPLEMENTADO COM 2,5 µM DE ZEA.....	48
TABELA 7 –MULTIPLICAÇÃO DE BROTOS PROVENIENTES DA INDUÇÃO ORGANOGÊNICA DE EXPLANTES FOLIARES DOS TRATAMENTOS COM TDZ E ZEA NA CULTIVAR CLIMAX COM MEIO DE CULTURA WPM SUPLEMENTADO COM 2,5 µM DE ZEA.	49
TABELA 8 – EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AIB 0, 250 E 500 mg L ⁻¹ NO ENRAIZAMENTO <i>EX-VITRO</i> COM SUBSTRATO VERMICULITA COMBINADO COM OS SAIS MINERAIS DO MEIO DE CULTURA WPM NO ENRAIZAMENTO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE MIRTILEIRO DAS CULTIVARES BLUEGEM', DELITE E CLIMAX.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AIB	– ácido indol-3-butírico
BAP	– 6-benzilaminopurina
C	– celsius
cm	– centímetros
2iP	– 2-isopenteniladenina
L	– litro
m ²	– metro quadrado
mg	– miligramas
mL	– mililitros
pH	– potencial hidrogeniônico
s	– segundos
TDZ	– thidiazuron
WPM	– wood plant medium
ZEA	– zeatina
μM	– micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	MIRTILEIRO.....	18
2.1.1	Grupo Rabbiteye.....	19
2.1.2	Cultivares.....	20
2.2	PROPAGAÇÃO.....	21
2.2.1	Micropropagação.....	21
2.2.2	Organogênese.....	22
2.2.3	Reguladores Vegetais.....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	25
3.2	MATERIAL VEGETAL.....	25
3.3	FASE DE INDUÇÃO DA ORGANOGÊNESE.....	25
3.4	FASE DE MULTIPLICAÇÃO.....	27
3.5	FASE DE ENRAIZAMENTO <i>EX-VITRO</i> E ACLIMATIZAÇÃO.....	28
3.6	ANÁLISE DE DADOS.....	30
4	RESULTADOS.....	31
4.1	FASE DE INDUÇÃO DA ORGANOGÊNESE.....	31
4.1.1	Cultivar Bluegem.....	31
4.1.2	Cultivar Delite.....	35
4.1.3	Cultivar Climax.....	39
4.2	SEGUNDA ETAPA DA INDUÇÃO DA ORGANOGÊNESE.....	43
4.3	FASE DE MULTIPLICAÇÃO.....	45
4.3.1	Cultivar Bluegem.....	45
4.3.2	Cultivar Delite.....	47
4.3.3	Cultivar Climax.....	48
4.4	FASE DE ENRAIZAMENTO <i>EX-VITRO</i> E ACLIMATIZAÇÃO.....	50
5	DISCUSSÃO.....	55
5.1	FASE DE INDUÇÃO POR ORGANOGÊNESE.....	55
5.2	FASE DE MULTIPLICAÇÃO.....	56
5.3	FASE DE ENRAIZAMENTO <i>EX-VITRO</i> E ACLIMATIZAÇÃO.....	57

6	CONCLUSÕES.....	59
7	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	60
	REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

As espécies frutíferas de clima temperado são de grande importância econômica para o Brasil, em vista de que o país se encontra entre os cinco maiores produtores mundiais de frutas de clima temperado (RETAMALES, 2011).

O mirtilheiro (*Vaccinium* spp.) é uma espécie de clima temperado, que faz parte do grupo das pequenas frutas. É um arbusto perene que pertence ao gênero *Vaccinium* da família Ericaceae, que possui em torno de 450 espécies (RETAMALES & HANCOCK, 2018; OLIVEIRA et al., 2020).

A cultura do mirtilheiro possui grande importância comercial na América do Norte, Europa, Ásia e alguns países do Pacífico. Também é produzido na América do Sul, principalmente no Chile, Peru e Argentina, que exportam os frutos no período de entressafra do hemisfério norte, tendo registrado um aumento de produção de mais de 500%, na América do Sul, entre 1996 e 2006 (RETAMALES, 2011; RETAMALES & HANCOCK, 2018). A produção mundial da cultura foi de 850.886 toneladas em 2020 (FAOSTAT, 2022).

O mirtilheiro é dividido em grupos de acordo com suas características (RETAMALES & HANCOCK, 2018). As primeiras cultivares foram introduzidas no Brasil pela Embrapa em 1983, sendo estas pertencentes ao grupo Rabbiteye por apresentarem melhor adaptação ao clima nacional (ANTUNES & PAGOT, 2016).

No Brasil, o mirtilheiro ainda é pouco conhecido, possuindo um grande potencial de expansão, principalmente nos estados da região sul do Brasil, devido às propriedades nutracêuticas, farmacêuticas e antioxidantes dos frutos, que atraem cada vez mais os consumidores, gerando um aumento da área de cultivo da cultura (BASU et al., 2010; SCHUCH & TOMAZ, 2019).

A propagação da espécie é geralmente de forma vegetativa, por meio da estaquia, com estacas lenhosas, herbáceas e semi-lenhosas, sendo este o método mais utilizado no Brasil (FACHINELLO, 2008; MARINO et al., 2014). No entanto os métodos de propagação pouco eficientes, bem como a falta de qualidade das mudas produzidas e a falta de um método de produção em larga escala são alguns dos entraves para o crescimento da cultura no país (PENÃ et al., 2012; SCHUCH & TOMAZ, 2019).

Mudas micropropagadas possuem crescimento vegetativo superior no primeiro ano quando comparadas à propagação por estaquia. O rejuvenescimento dos tecidos

não gera atrasos na produção de frutos e a quantidade de antioxidantes, especialmente polifenóis e flavonóides, foram positivamente afetados pela micropropagação (SOUZA et al., 2011; GOYALI et al., 2015).

A micropropagação já é utilizada para produção de mudas de mirtilheiro, mas o crescimento lento e a baixa taxa de multiplicação, ainda são pontos que precisam ser superados. Existem poucas pesquisas desenvolvidas com o grupo Rabbiteye, a maior concentração das pesquisas nos demais grupos, mais adaptados ao clima temperado (HUNG et al., 2016b). Desta forma, para o desenvolvimento da técnica é necessário o estabelecimento de protocolos eficientes para as cultivares mais adaptadas às condições edafoclimáticas brasileiras.

A organogênese a partir de gemas adventícias é uma técnica que tem apresentado bons resultados, para elevar a proliferação de gemas a partir de pequenas porções de tecidos (SCHUCHOVSKI et al., 2020).

Desta forma este trabalho buscou desenvolver um protocolo completo de propagação *in vitro*, por organogênese, de três cultivares de mirtilheiro do grupo Rabbiteye, definindo as melhores concentrações de reguladores vegetais para promover a organogênese a partir de explantes foliares e determinar a necessidade do uso de AIB para o enraizamento da cultura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MIRTILEIRO

O mirtilheiro é um arbusto perene, que faz parte do grupo das pequenas frutas, pertence à família Ericaceae e está alocado no gênero *Vaccinium* (GOUGH, 1993; SOUSA et al., 1995; FACHINELLO, 2008; WU et al., 2019). O número de espécies do gênero *Vaccinium* podem chegar a 450 (RETAMALES & HANCOCK, 2018).

Os frutos do mirtilheiro são caracterizados como pequenas bagas com sementes e apresentam, na sua maturidade, a cor azulada, podendo variar do claro ao intenso. A cor é afetada também pela presença ou não da pruína, que é uma substância esbranquiçada que geralmente recobre os frutos. A cor azulada é de responsabilidade das antocianinas presente nas células (SOUSA et al., 2007).

O crescimento do consumo de mirtilos se deve aos compostos polifenólicos, especialmente as antocianinas, que demonstraram ter propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-proliferativas, anti-obesidade e neuroprotetoras. Estão ligadas a processos antioxidantes benéficos ao não aparecimento de doenças vasculares e alguns cânceres, sendo então um produto benéfico à saúde tanto no consumo de frutas frescas, quanto pós elaborados (MILLER et al., 2019; RODRIGUEZ-MATEOS et al., 2019).

A cultura é produzida em larga escala principalmente na América do Norte que foi responsável por 51,7% da produção mundial em 2020, seguido pela América do Sul com 21,2% e Europa com 19,8% (FAOSTAT, 2022). As principais cultivares de mirtilheiro plantadas no mundo pertencem ao grupo Highbush (BRAZELTON & YOUNG, 2017).

Na América do Sul, as primeiras plantações foram realizadas em 1980 no Chile e em 1990 na Argentina, sendo que no Chile entre 2003 e 2014 ocorreu um aumento de 629% na área cultivada de mirtilheiro. Contando atualmente com as seguintes áreas plantadas Peru (3.800 ha), Brasil (400 ha), Uruguai (368 ha) e Colômbia (220 ha) (RETAMALES & HANCOCK, 2018).

As primeiras cultivares de mirtilheiro foram introduzidas no Brasil pela Embrapa em 1983, sendo estas pertencentes ao grupo Rabbiteye devido ao seu vigor, produtividade e tolerância ao calor. Dentre estas se encontram as cultivares Bluegem e Climax (ANTUNES & PAGOT, 2016).

No Brasil o mirtilo ainda é uma fruta pouco conhecida, sendo uma cultura em ascensão nos estados da região sul do Brasil (ANTUNES et al., 2004, BAÑADOS, 2006). O aumento da área de cultivo se deve à busca pelo maior consumo de produtos saudáveis, aspecto principal das pequenas frutas que possuem propriedades nutraceuticas e farmacêuticas (BASU et al., 2010; SCHUCH & TOMAZ, 2019).

Uma das principais dificuldades encontradas pelos produtores é a aquisição de mudas, a qual é limitada pela baixa disponibilidade, qualidade e elevado preço, resultantes da dificuldade de propagação da maioria das cultivares (PAGOT & HOFFMANN, 2003).

O mirtilheiro possui grande potencial para o cultivo pela agricultura familiar, em vista de ser uma grande oportunidade na área de fruticultura, por conta das propriedades dos frutos, bem como a alta rentabilidade e baixa utilização de insumos, contando com uma produção limpa e sustentável (SANTOS & RASEIRA, 2002; JULKOVSKI et al., 2021).

Um reflexo desse potencial é visto por conta da expansão do cultivo no Brasil, principalmente pelas condições edafoclimáticas favoráveis do país, bem como o aumento da demanda do consumo interno e das exportações que podem ser feitas nas entressafras dos países do hemisfério norte, que são grandes consumidores e produtores (ANTUNES et al., 2008; BRACKMANN et al., 2010; RETAMALES & HANCOCK, 2018).

A cultura do mirtilheiro é dividida em grupos de acordo com suas características sendo estas, Highbush (*Vaccinium corymbosum* L.), Rabbiteye (*Vaccinium virgatum* Ait.) e Lowbush (*Vaccinium angustifolium* Ait.). O grupo Highbush é separado ainda em Northern, Southern e Intermediate de acordo com a necessidade de frio e ainda o tipo half-high é encontrado em híbridos de Highbush e Lowbush (RETAMALES & HANCOCK, 2018). As cultivares de mirtilheiro são divididas em grupos, e a cultivar escolhida para produção é diretamente afetada pelas condições climáticas de cada local.

2.1.1 Grupo Rabbiteye

Os grupos comerciais são definidos por suas características de tamanho, morfologia e condições edafoclimáticas de produção. As cultivares do grupo

Rabbiteye são muito cultivadas no Noroeste do Pacífico dos EUA e no Chile, sendo as mais adaptadas às condições subtropicais. Entretanto, os botões florais não toleram temperaturas muito abaixo de zero (RETAMALES & HANCOCK, 2018).

As primeiras cultivares introduzidas no Brasil pertencem ao grupo Rabbiteye, dentre elas Bluegem, Climax e Delite. A maioria dos estudos realizados no Brasil com cultivares deste grupo são para a produção de mudas e adaptação, já que esta espécie pode adaptar-se a diferentes condições edafoclimáticas, principalmente à baixa quantidade de horas de frio acumuladas, sem alteração no desenvolvimento e produção da cultura (ANTUNES & PAGOT, 2016; MEDEIROS et al., 2018).

As principais características do grupo são o elevado vigor, plantas longevas, alta produtividade, alta tolerância ao calor e à seca. Possuem menor exigência em frio e um longo período entre floração e maturação de frutos, além de possuir frutos firmes e boa conservação pós-colheita, sendo o tempo de frio necessário em torno de 300 horas de frio abaixo de 7,2 °C (RASEIRA & ANTUNES, 2004).

As cultivares do grupo Rabbiteye possuem o maior conteúdo fenólico e de flavonoides em suas folhas, quando comparadas as cultivares dos demais grupos de mirtilheiro (LOHACHOOMPOL et al., 2008; WU et al., 2019). As plantas advindas deste grupo podem chegar a 10 metros de altura com porte vigoroso (ANTUNES & PAGOT, 2016).

Os frutos são considerados firmes e de boa duração pós-colheita, desde que corretamente acondicionados, por conta da alta perecibilidade e decomposição por patógenos característicos da cultura (SCHOTSMANS et al., 2007; ANTUNES et al., 2008).

2.1.2 Cultivares

A cultivar Bluegem é originária da Flórida, derivada de uma seleção de polinização livre chamada Tifton 31, possui frutos de bom sabor com sólidos solúveis em torno de 10,5 e 12,8° Brix e uma película com bastante pruína e que precisa de polinização cruzada, sendo geralmente a cultivar Woodard a mais indicada para esta polinização, além de possuir uma necessidade média de horas de frio em torno de 400 horas (ANTUNES et al., 2004).

Delite e Climax são cultivares advindas da mesma estação experimental, tendo variações na origem do material, sendo que a primeira possui frutos de

tamanho grande, sabor doce-ácido com teor de sólidos solúveis entre 10,8 e 12,5° Brix e uma casca bem escura. A cultivar Climax possui frutos de tamanho médio, com película de coloração azul-escura, polpa com bom sabor e, teor de sólidos solúveis variando entre 10° e 12,4° Brix. Uma diferença entre as duas cultivares é a casca, onde a Delite possui menos pruína que a cultivar Climax (ANTUNES et al., 2004).

2.2 PROPAGAÇÃO

A reprodução do mirtilheiro ocorre sexuadamente por meio de sementes e vegetativamente por meio de estacas. As sementes não são comumente usadas por conta da infidelidade ao genótipo da planta mãe. No Brasil a propagação em viveiros ocorre de forma vegetativa através de estacas (herbáceas, lenhosas e semi-lenhosas), e embora esse processo seja fácil, é demorado para a multiplicação em larga escala (FACHINELLO et al., 1995; PRODORUTTI et al., 2007; DEBNATH, 2016).

Um dos entraves para o crescimento da cultura é a obtenção de mudas. É impossível aumentar a disponibilidade de plantas em pouco tempo, utilizando os métodos convencionais (CASTILLO et al., 2004; PELIZZA et al., 2011). Os métodos de propagação pouco eficientes, bem como a falta de qualidades das mudas produzidas e a falta de um método de produção em larga escala são alguns dos entraves para o crescimento da cultura no Brasil (PENÃ et al., 2012; SCHUCH & TOMAZ, 2019).

Segundo Souza et al. (2011), a produção de mudas por micropropagação mostrou-se superior, em crescimento vegetativo, às mudas por estaquia e ainda sem atraso significativo na produção, por conta do rejuvenescimento da planta. Segundo Camargo et al. (2018), mudas micropropagadas possuem um maior teor de antocianinas, desta forma sendo uma técnica com bons resultados para a propagação da cultura.

2.2.1 Micropropagação

O cultivo *in vitro* consiste no crescimento e multiplicação de células, tecidos e órgãos ou partes de órgãos das plantas, usando técnicas que consistem em um meio nutritivo, condições assépticas e ambientais controladas, estas sendo iluminação e temperatura. A micropropagação baseia seu sucesso no conceito de totipotência da

célula vegetal, que seria a capacidade de uma única célula da planta originar embriões ou órgãos que formarão uma planta inteira (CARVALHO, 1996).

O processo se mostra vantajoso pela obtenção de um grande número de plantas a partir de um único explante, sendo um processo que não depende das condições edafoclimáticas, além da redução de tempo e melhores condições sanitárias quando utilizados meristemas, sendo que os indivíduos são geneticamente idênticos à planta provedora dos explantes (ERIG & SCHUCH, 2005; SANTOS, 2003; CABRAL et al., 2003).

Murashige (1974) nos direciona a três estádios para desenvolver o processo de propagação *in vitro*. No primeiro seria a seleção, desinfestação e cultura em meio nutritivo, em condições assépticas. No segundo teríamos a multiplicação dos propágulos em meio próprio para isso. O terceiro seria a transferência das partes aéreas desenvolvidas para meio de enraizamento, seguido do transplante das plantas obtidas para substrato ou solo, não esquecendo a aclimatação.

2.2.2 Organogênese

A organogênese *in vitro* é o processo de formação de novas gemas adventícias, que são assim denominadas por serem oriundas de tecidos não meristemáticos. A organogênese pode ser direta ou indireta, sem e com a formação de calos, respectivamente. Na organogênese indireta ocorre a indução de desdiferenciação das células vegetais, dando origem aos calos, para a posterior rediferenciação dos tecidos para a origem de gemas e eixos caulinares. A partir desta técnica é possível obter um grande número de plantas, utilizando pequenas quantidades de material vegetal originados de uma única planta matriz (GUERRA et al., 2016; MOURA et al., 2001).

Para o mirtilheiro, a técnica de organogênese se tornou uma opção viável para propagação *in vitro*, conforme relataram Schuchovski et al. (2020), indicando em seu estudo que TDZ na concentração de 0,5 μM no meio WPM, apresentou sucesso para a indução de brotações de mirtilheiro do grupo Rabbiteye. Ainda destacaram que tanto a organogênese direta, quanto a indireta, foram observadas neste estudo, e que se obteve sucesso na indução de brotações até a formação de raízes, resultando em plantas completas (SCHUCHOVSKI et al., 2020).

Segundo Cappelletti et al. (2016), na propagação *in vitro* de mirtilheiro 'Duke' do grupo Highbush, usando explantes foliares, com os reguladores vegetais 2iP, TDZ e Zeatina, o maior número de brotações ocorreu usando Zeatina, seguido de TDZ. Segundo Erig & Schuch. (2006) a Zeatina foi mais eficiente quanto ao número de brotos por explante e comprimento médio de brotos cultivados em luz branca. Os autores recomendam para a propagação *in vitro* de mirtilheiro a concentração de Zeatina 18 μ M (ERIG & SCHUCH, 2006).

Em diversos trabalhos foi verificado que a micropropagação de cultivares de mirtilheiro apresentam resultados satisfatórios, principalmente com o uso de Zeatina, mas devido ao alto custo desta, outros reguladores de crescimento foram sendo utilizados na micropropagação. O TDZ, um regulador alternativo com efeito de citocinina e auxina, vem sendo considerado uma alternativa para baixar custos, com benefícios para a proliferação *in vitro* de mirtilheiro. O sucesso da micropropagação afeta positivamente a expansão da cultura do mirtilheiro (ERIG & SCHUCH, 2006; CAPPELLETTI et al., 2016; SCHUCHOVSKI et al., 2020).

2.2.3 Reguladores Vegetais

Conforme as circunstâncias do ambiente, a planta desenvolve diferentes sinais para regular seu organismo para a situação em questão, e estes sinais estão correlacionados com os hormônios vegetais. Dentre os cinco hormônios mais abundantes e conhecidos, as citocininas e auxinas estão ligadas a divisão e alongamento celular (TAIZ et al., 2017).

Segundo Taiz et al. (2017), o efeito fisiológico mais conhecido das citocininas é a divisão celular, mas estas possuem importância em outros processos no desenvolvimento do vegetal, dentre estas a senescência foliar, mobilização de nutrientes, dominância apical, a formação e a atividade dos sistemas apicais, desenvolvimento floral, germinação de sementes e quebra de dormência de gemas, e ainda possui influência em aspectos regulados pela luz, embora seja a divisão celular o efeito central das citocininas.

Em uma pesquisa sobre divisão celular foi encontrada uma molécula que na presença de auxina, hormônio anteriormente descoberto, estimulava a divisão do tecido vegetal, esta molécula indutora de citocinese foi denominada cinetina, uma

citocinina sintética (TAIZ et al., 2017). A citocinina foi assim nomeada por induzir a citocinese (EVERT & EICHHORN, 2014).

Segundo Evert & Eichhorn (2014) as concentrações de auxinas e citocininas estão correlacionadas com a indução de determinado tecido vegetal. Na presença de maior concentração de auxinas ocorre a indução de raízes. Com a concentração de citocininas em maior quantidade, ocorre o desenvolvimento da parte aérea. Já em proporções de 1:1, ocorre a proliferação indiferenciada de calos.

A molécula denominada Thidiazuron é uma fenilureia sintética, sendo um regulador de crescimento potente que exhibe características relacionadas tanto às citocininas quanto às auxinas, sendo algumas das aplicações a proliferação de brotos adventícios, produção de calos e indução de embriogênese somática. Dada a potência da molécula para ser utilizada como regulador vegetal, esta pode ser usada em baixas concentrações (GUO et al., 2011; DINANI et al., 2018).

A utilização dos reguladores vegetais do grupo das citocininas são responsáveis pela indução da organogênese de forma eficiente na cultura do mirtilheiro (ERIG & SCHUCH, 2006; CAPPELLETTI et al., 2016; SCHUCHOVSKI et al., 2020). Bem como a suplementação de auxina promove a regeneração de raízes em explantes de mirtilheiro (SCHUCHOVSKI & BIASI, 2022a). Desta forma a utilização dos reguladores vegetais conforme correlação indicada por Evert & Eichhorn (2014), influencia o desenvolvimento vegetal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Micropropagação de Plantas do Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

3.2 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi retirado de plantas estabelecidas *in vitro* de três cultivares de mirtilheiro, Bluegem, Climax e Delite (Figura 1) em fase de multiplicação. Em meio WPM - Wood Plant Medium (LOYD & MCCOWN, 1980) com suplementação de 2,5 μM de 2iP, mantidos em sala de crescimento com 16 horas de fotoperíodo, temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ e densidade de fluxo de fótons no período de luz de 25 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

FIGURA 1 – PLANTAS DE MIRTILEIRO CULTIVAR BLUEGEM EM FASE DE MULTIPLICAÇÃO QUE SERVIRAM COMO FONTE DE EXPLANTES PARA INDUÇÃO DE ORGANOGÊNESE.

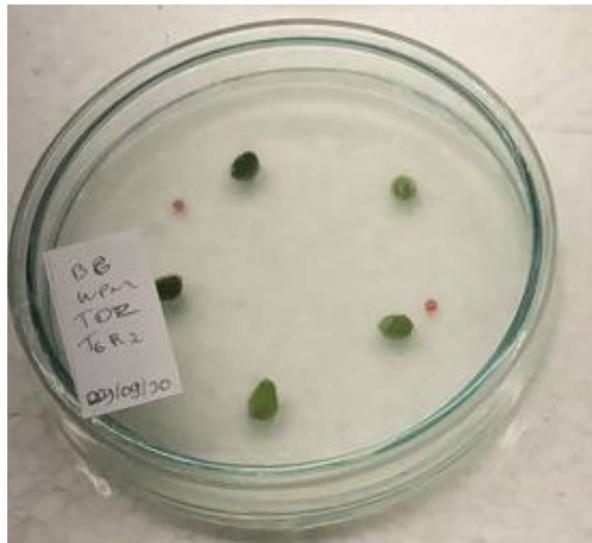
3.3 FASE DE INDUÇÃO DA ORGANOGÊNESE

A fase consistiu na indução da organogênese, e foi dividida em duas etapas. A primeira etapa foi realizada utilizando explantes foliares de três cultivares de mirtilheiro do grupo Rabbiteye (Bluegem, Climax e Delite), com quatro reguladores vegetais TDZ, 2iP, BAP e ZEA nas concentrações (0; 0,5; 2,5; 5; 10; 20 μM). O meio utilizado para o experimento foi o WPM - Wood Plant Medium (LLOYD & MCCOWN, 1980), acrescido das vitaminas do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), de 30 g L^{-1} de sacarose, e o regulador vegetal na concentração de cada tratamento, exceto a

ZEA, que foi esterilizada com filtros de 0,22 μm e adicionada ao meio de cultura em processo de resfriamento, após a autoclavagem em câmara de fluxo laminar. O pH foi ajustado para 5,2, o meio foi gelificado com 6 g L⁻¹ de ágar (Vetec™), autoclavado durante 20 minutos a 120°C e 1,0 atm, e vertido em placas de Petri de 9 cm com 15 mL de meio por placa, em câmara de fluxo laminar.

O preparo de explantes foi feito em câmara de fluxo laminar com o auxílio de placas de Petri, pinças e bisturis esterilizados, garantindo a assepsia do material. Foram colocados em cada placa de Petri cinco explantes foliares com a parte adaxial em contato com o meio de cultivo, com distância de 2 cm entre os explantes e, após, selados com plástico filme e mantidos em sala de crescimento com 16 horas de fotoperíodo, temperatura de 25±2°C e densidade de fluxo de fótons no período de luz de 25 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e mantidos nestas condições por 12 semanas.

FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO E POSIÇÃO DOS EXPLANTES NA PLACA DE PETRI



Na primeira etapa da pesquisa, o experimento foi instalado em esquema fatorial 4 x 6 (4 reguladores x 6 concentrações) sendo realizados experimentos individuais para cada cultivar (Bluegem, Climax e Delite). O delineamento em ambos os experimentos foi inteiramente casualizado com 5 repetições e cada placa de Petri com cinco explantes, totalizando 25 explantes por tratamento.

A segunda etapa do experimento foi realizada após as avaliações da primeira etapa, com os melhores tratamentos que foram os reguladores TDZ e ZEA nas concentrações 0,5 e 20 μM respectivamente. A concentração de TDZ foi escolhida pelo regulador ter apresentado os resultados superiores aos demais e ser a concentração mais baixa com resposta organogênica. A concentração de ZEA foi

escolhida por ter apresentado resposta organogênica, principalmente na cultivar Climax e ter apresentado um bom alongamento das brotações na fase de multiplicação. Os reguladores vegetais 2iP e BAP não foram utilizados por conta da baixa indução organogênica apresentada na primeira etapa e que os explantes com alguma resposta oxidaram durante a fase de aclimatização.

A instalação foi realizada nas mesmas condições da primeira etapa e o esquema experimental foi inteiramente casualizado, sendo 2 reguladores com 5 repetições em cada placa de Petri com cinco explantes, totalizando 50 explantes para cada cultivar.

As avaliações foram realizadas pela sobrevivência de explantes, explantes com organogênese, explantes com calos, número gemas pequenas e número de gemas grandes por explante, sendo que as três primeiras variáveis foram avaliadas pelo número total de explantes inicialmente inoculados, as duas últimas variáveis foram avaliadas pelo número de explantes com organogênese. Sendo que a diferenciação entre gemas pequenas e gemas grandes, foi a presença ou não dos primórdios foliares.

3.4 FASE DE MULTIPLICAÇÃO

A fase de multiplicação foi realizada após a avaliação da indução organogênica. Os explantes com organogênese foram transferidos para um meio de cultura com ZEA, conforme protocolo elaborado por Schuchovski & Biasi (2022a) para a etapa de multiplicação.

O meio utilizado foi o WPM - Wood Plant Medium (LLOYD & MCCOWN, 1980), acrescido das vitaminas do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), de 30 g L⁻¹ de sacarose e do regulador vegetal ZEA com 2,5 µM. Após foi ajustado o pH para 5,2 e adicionado 6 g L⁻¹ de ágar, que foi dissolvido em microondas e vertido 30 mL por frasco de vidro de 240 mL, autoclavados durante 20 minutos a 120°C e 1,0 atm.

A ZEA comumente esterilizada por filtração, nesta etapa foi esterilizada em autoclave, em vista dos resultados encontrados por Hart et al. (2016), cujo regulador vegetal não perde efeito em decorrência da temperatura empregada na autoclavagem.

Os explantes inteiros com as gemas formadas foram transferidos em câmara de fluxo laminar e acondicionados no novo meio com 5 explantes por frasco. A

avaliação foi feita após 6 meses depois da transferência do meio em placa de Petri para o meio em frasco. Sendo que este padrão foi adotado em decorrência da lentidão do crescimento *in vitro* da espécie.

Conforme o crescimento das 3 cultivares, Bluegem, Climax e Delite foram avaliadas conforme número de brotações por frasco contendo cinco explantes, comprimento médio de brotações (cm) e número de folhas da brotação e as brotações regeneradas por explante com organogênese relacionado com os explantes com organogênese na fase de indução da organogênese. Após a avaliação os explantes foram subcultivados seguindo um padrão de explantes com 2 a 3 cm e com 2 a 6 folhas e transferidos novamente para o meio de cultura WPM - Wood Plant Medium (LLOYD & MCCOWN, 1980), com 2,5 μM de ZEA.

3.5 FASE DE ENRAIZAMENTO *EX-VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO

O experimento foi realizado utilizando o material vegetal proveniente da fase de multiplicação dos explantes induzidos pela organogênese, estando estes em meio de cultivo WPM - Wood Plant Medium (LLOYD & MCCOWN, 1980) suplementado com 2,5 μM de ZEA.

O experimento foi realizado *ex vitro* em caixas plásticas, em sala de crescimento conforme protocolo elaborado por Schuchovski & Biasi (2022a), considerando o baixo custo da técnica conforme Pedrotti & Voltolini (2001) e o sucesso desta no enraizamento da cultura (MEINERS et al., 2007).

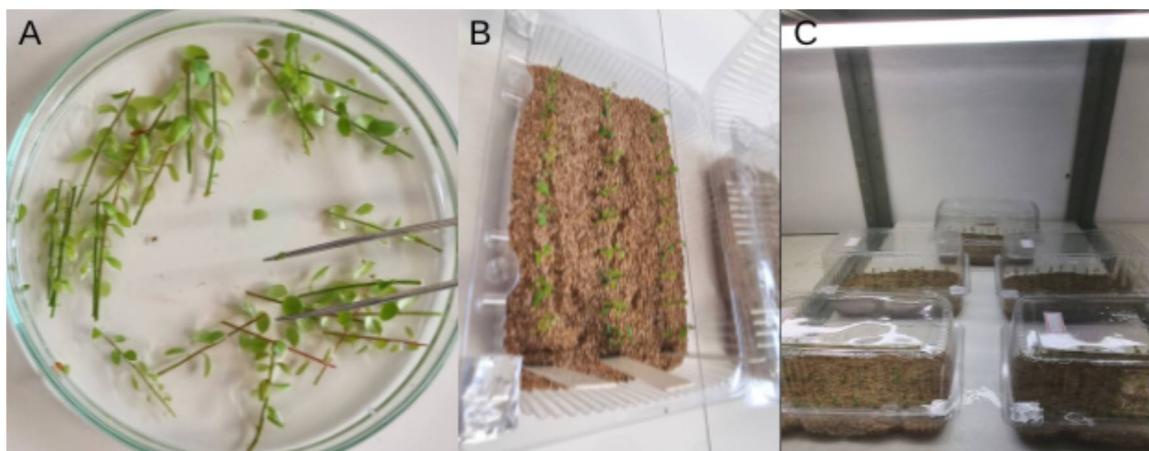
As caixas plásticas, com as dimensões 21 cm de largura, 14 cm de altura e 11 cm de profundidade, foram preparadas com 900 mL do substrato vermiculita autoclavada, acrescida de 200 mL dos minerais do meio WPM - Wood Plant Medium (LLOYD & MCCOWN, 1980) e 175 mL de água deionizada autoclavada. Os tratamentos consistiram nas concentrações de 0, 250 e 500 mg L^{-1} de AIB aplicados pela imersão da base das mini-estacas por 10 segundos em solução hidroalcoólica 9:1 (água deionizada:álcool).

O material vegetal foi preparado de forma diferente para cada cultivar (Bluegem, Climax e Delite), por conta da diferença no crescimento vegetativo. As brotações advindas da fase de multiplicação foram seccionadas com o auxílio de pinças, bisturis e placas de Petri com água deionizada autoclavada para não ocorrer a desidratação do material, sendo estas seccionadas com o tamanho referente a cada

cultivar, sendo retirada a parte apical das brotações.

Os explantes da cultivar Delite foram preparados com 3 cm de comprimento (Figura 3.A), já os explantes das cultivares Bluegem e Climax foram preparados com 2,5 a 3 cm de comprimento e todos tiveram as folhas da base retiradas para a realização dos tratamentos. As caixas foram levadas à sala de crescimento, conforme já descrito, deixadas entreabertas e dispostas ao acaso na prateleira (Figura 3.C).

FIGURA 3 – DETALHES DA INSTALAÇÃO DA ACLIMATIZAÇÃO DA CULTIVAR DELITE: A- SEGMENTAÇÃO DOS EXPLANTES; B – DISPOSIÇÃO DOS EXPLANTES NA CAIXA PLÁSTICA; C – DISPOSIÇÃO DAS CAIXAS PLÁSTICAS NA SALA DE CRESCIMENTO.



Os explantes foram tratados e dispostos nas caixas plásticas, sendo que o delineamento experimental empregado foi o delineamento em blocos ao acaso - DBC, sendo cada caixa plástica um bloco e com uma repetição de cada tratamento (Figura 3.B). Por conta das características de crescimento de cada cultivar, os experimentos foram instalados de diferentes formas. Para a cultivar Delite com 5 repetições e 10 unidades experimentais, totalizando 150 mini-estacas, para a cultivar Bluegem com 4 repetições e 5 unidades experimentais, totalizando 60 mini-estacas e para a cultivar Climax com 4 repetições e 10 unidades experimentais, totalizando 120 mini-estacas, sendo o experimento de cada cultivar realizado individualmente.

A avaliação foi feita 10 semanas após a instalação, sendo avaliados os seguintes parâmetros: com relação as estacas iniciais foram avaliadas mini-estacas vivas, enraizadas, com calos e com brotações, já com relação as estacas vivas foram avaliadas as variáveis de comprimento das brotações e número de folhas das brotações.

3.6 ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram avaliados quanto à homogeneidade das variâncias dos tratamentos pelo teste de Bartlett e submetidos a análise de variância, quando encontrada diferença entre os tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o software Sisvar® (FERREIRA, 2019), sendo que os dados não foram transformados.

4 RESULTADOS

4.1 FASE DE INDUÇÃO DA ORGANOGÊNESE

Para as três cultivares estudadas houve interação significativa entre os fatores tipo de citocinina e concentrações para todas as variáveis analisadas.

4.1.1 Cultivar Bluegem

Na análise da sobrevivência dos explantes, o TDZ e BAP foram superiores a 2iP e não diferiram da ZEA na concentração de 2,5 μM . Na concentração de 0,5 μM o TDZ foi superior à ZEA e ao 2iP e não diferiu do BAP. Na concentração de 5 μM não houve diferença significativa entre as citocininas. Na concentração de 10 μM , o TDZ e o BAP não diferiram e foram superiores à ZEA e ao 2iP, enquanto na testemunha, mesmo sem a presença dos reguladores, BAP foi superior a 2iP e não diferiu de TDZ e ZEA. Bem como na concentração de 20 μM TDZ, ZEA e BAP não diferiram entre si e foram superiores ao 2iP. Dentro de cada regulador, não houve diferença significativa entre as concentrações testadas para TDZ e BAP, enquanto para 2iP, a concentração de 5 μM foi superior à de 20 μM e não diferiu das demais. Para o regulador vegetal ZEA a concentração 10 μM foi inferior às demais, sendo que estas não diferiram entre si (Tabela 1).

TABELA 1 – EFEITO DOS REGULADORES VEGETAIS NA ORGANOGÊNESE *IN VITRO* DE MIRTILEIRO DA CULTIVAR BLUEGEM A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES.

Sobrevivência de Explantes (%)												
Concentrações	TDZ			ZEA			2iP		BAP			
0 µM	70,00	AB*	a**	60,00	AB	a	45,00	B	ab	88,00	A	a
0,5 µM	100,00	A	a	68,00	B	a	53,33	B	ab	80,00	AB	a
2,5 µM	100,00	A	a	70,00	AB	a	60,00	B	ab	92,00	A	a
5 µM	100,00	A	a	73,33	A	a	75,00	A	a	76,00	A	a
10 µM	100,00	A	a	0,00	C	b	56,00	B	ab	100,00	A	a
20 µM	100,00	A	a	76,00	A	a	32,00	B	b	72,00	A	a
Explantes Com Organogênese (%)												
Concentrações	TDZ			ZEA			2iP		BAP			
0 µM	0,00	A	e	0,00	A	b	0,00	A	a	0,00	A	a
0,5 µM	100,00	A	a	0,00	B	b	0,00	B	a	0,00	B	a
2,5 µM	60,00	A	b	30,00	B	a	0,00	C	a	4,00	C	a
5 µM	50,00	A	bc	13,33	B	ab	0,00	B	a	0,00	B	a
10 µM	32,00	A	cd	0,00	B	b	0,00	B	a	0,00	B	a
20 µM	20,00	AB	de	28,00	A	ab	0,00	B	a	0,00	B	a
Explantes Com Calos (%)												
Concentrações	TDZ			ZEA			2iP		BAP			
0 µM	70,00	AB	a	60,00	AB	a	45,00	B	a	88,00	A	a
0,5 µM	100,00	A	a	64,00	BC	a	33,33	C	a	80,00	AB	a
2,5 µM	100,00	A	a	60,00	B	a	55,00	B	a	84,00	AB	a
5 µM	100,00	A	a	73,32	A	a	70,00	A	a	72,00	A	a
10 µM	100,00	A	a	0,00	C	b	48,00	B	a	100,00	A	a
20 µM	100,00	A	a	40,00	BC	a	32,00	C	a	68,00	B	a
Gemas Pequenas por Explante (n.º)												
Concentrações	TDZ			ZEA			2iP		BAP			
0 µM	0,00	A	c	0,00	A	a	0,00	A	a	0,00	A	a
0,5 µM	21,60	A	a	0,00	B	a	0,00	B	a	0,00	B	a
2,5 µM	9,06	A	b	1,60	B	a	0,00	B	a	0,00	B	a
5 µM	9,90	A	b	0,00	B	a	0,00	B	a	0,00	B	a
10 µM	4,80	A	bc	0,00	A	a	0,00	A	a	0,00	A	a
20 µM	5,54	A	bc	3,70	A	a	0,00	A	a	0,00	A	a
Gemas Grandes por Explante (n.º)												
Concentrações	TDZ			ZEA			2iP		BAP			
0 µM	0,00	A	b	0,00	A	a	0,00	A	a	0,00	A	a
0,5 µM	8,08	A	a	0,00	B	a	0,00	B	a	0,00	B	a
2,5 µM	1,82	A	b	1,42	A	a	0,00	A	a	0,20	A	a
5 µM	0,62	A	b	1,33	A	a	0,00	A	a	0,00	A	a
10 µM	0,00	A	b	0,00	A	a	0,00	A	a	1,00	A	a
20 µM	0,74	AB	b	3,00	A	a	0,00	B	a	0,00	B	a

* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

** Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para a variável explantes com organogênese, TDZ foi superior a ZEA, e às outras citocininas nas concentrações 0,5, 2,5, 5 e 10 µM. Nas testemunhas das quatro

citocininas não ocorreu organogênese. Na concentração de 20 μM , ZEA foi superior a 2iP e BAP e não diferiu de TDZ. Analisando as concentrações de cada citocinina, observou-se que TDZ, na concentração de 0,5 μM , foi superior apresentando 100% de explantes com organogênese diferindo significativamente das demais concentrações, enquanto 2,5 e 5,0 μM não diferiram significativamente entre si. Com ZEA as concentrações de 2,5, 5 e 20 μM não diferiram significativamente entre si e a concentração de 2,5 μM foi superior à de 0,5 e 10 μM . Com o regulador vegetal BAP apenas ocorreu organogênese na concentração de 2,5 μM de BAP (4%) não havendo diferença significativa entre as concentrações dos reguladores. Para o regulador vegetal 2iP não ocorreu organogênese (Tabela 1).

Quanto à variável explantes com calos, TDZ foi superior as citocininas ZEA e 2iP e não diferiram de BAP nas concentrações 0,5, 2,5, e 10 μM , já na concentração 5 μM as citocininas não diferiram significativamente. Sendo que com 20 μM TDZ foi superior a ZEA, 2iP e BAP, sendo que BAP e ZEA não diferiram entre si e 2iP não diferiu significativamente de ZEA. Analisando as concentrações de cada citocinina, para TDZ, 2iP e BAP não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos, incluindo a testemunha que não recebeu nenhum regulador. Para ZEA a concentração 10 μM foi inferior pois neste tratamento todos os explantes morreram (Tabela 1).

Para a variável gemas pequenas por explante nas concentrações 0,5, 2,5 e 5 μM TDZ foi superior a ZEA, 2iP e BAP, sendo que estes não diferiram significativamente entre si. Nas concentrações de 10 e 20 μM os reguladores não diferiram entre si, e na testemunha, onde não houve a formação de gemas. Analisando as concentrações dentro de cada citocinina, ZEA, 2iP e BAP não apresentaram diferença significativa entre seus tratamentos. Para o regulador vegetal TDZ a concentração 0,5 μM (com 21,60 gemas por explantes) foi superior as demais, sendo que 2,5 e 5 μM (com 9,06 e 9,90 gemas por explante) foram superiores a testemunha e não diferiram de 10 e 20 μM (Tabela 1).

Na variável gemas grandes por explante o TDZ foi superior a ZEA, 2iP e BAP na concentração 0,5 μM e foi superior a BAP e 2iP em 20 μM , não diferindo significativamente de ZEA. Nas concentrações 2,5, 5 e 10 μM e na testemunha, TDZ, ZEA, 2iP e BAP não diferiram significativamente entre si. Quanto às concentrações dentro de cada citocinina, ZEA, 2iP e BAP não tiveram diferença significativa entre os

tratamentos, enquanto para TDZ 0,5 μM foi superior às demais concentrações com 8,08 gemas por explante (Tabela 1).

Os tratamentos com TDZ foram mais eficientes para a indução da organogênese, destacando-se a concentração de 0,5 μM com elevada taxa de regeneração de gemas adventícias pequenas e grandes, mas também apresentando grande estímulo para a proliferação de calos (Figura 4) em comparação às outras citocininas. O regulador vegetal ZEA, embora tenha promovido a proliferação de gemas adventícias em menor intensidade do que TDZ levou à formação de gemas com maior alongamento das brotações (Figura 5) do que as gemas encontradas com a utilização do TDZ (Figura 4.C).

FIGURA 4 – FORMAÇÃO DE CALOS E GEMAS DOS EXPLANTES FOLIARES DA CULTIVAR BLUEGEM TRATADA COM TDZ. A E C - EXPLANTE DO TRATAMENTO COM TDZ 0,5 μM ; B E D - EXPLANTE DO TRATAMENTO COM TDZ 20 μM ; SETAS BRANCAS: BROTAÇÕES GRANDES; SETAS PRETAS: BROTAÇÕES PEQUENAS

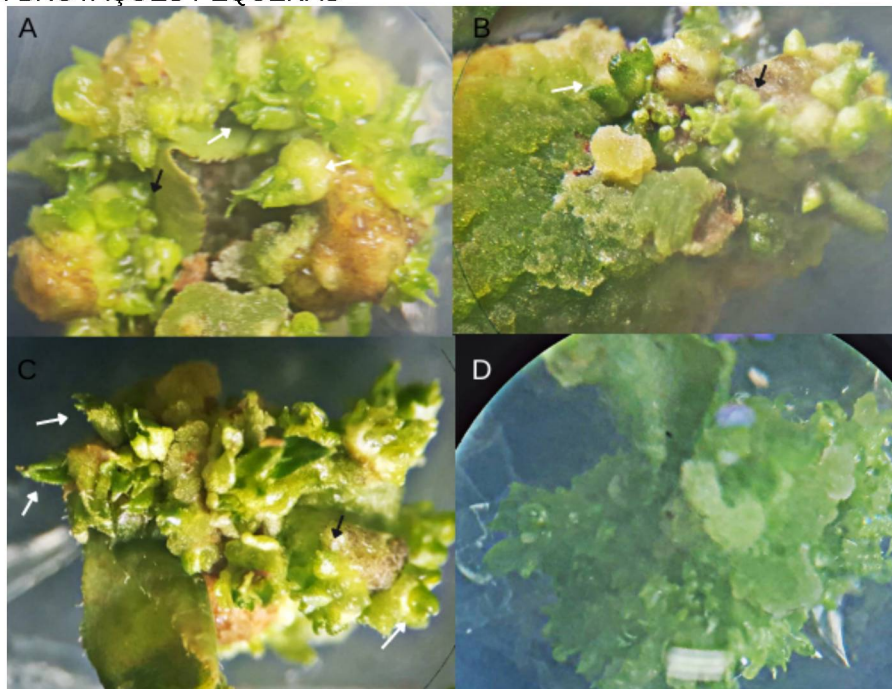


FIGURA 5 – FORMAÇÃO DE GEMAS NOS EXPLANTES FOLIARES DA CULTIVAR BLUEGEM COM 20 μM DE ZEA



4.1.2 Cultivar Delite

Na análise da sobrevivência de explantes na cultivar Delite, nas concentrações 2,5, 10 μM e na testemunha não ocorreu diferença significativa entre os reguladores testados. Na concentração 5 μM , TDZ, ZEA e BAP não diferiram significativamente entre si e foram superiores a 2iP. Nas concentrações 0,5 e 20 μM , TDZ e 2iP foram superiores a BAP e não diferiram de ZEA. Analisando as concentrações dentro de cada regulador, TDZ não apresentou diferença significativa entre as concentrações, já os reguladores vegetais ZEA, 2iP e BAP apresentaram diferença significativa. Para ZEA as concentrações 2,5, 5, 10, 20 μM e a testemunha foram superiores a concentração 0,5 μM . O regulador vegetal 2iP nas concentrações 0,5, 2,5, 10 μM e a testemunha foram superiores aos demais tratamentos e não diferiram de 20 μM , que por sua vez não diferiu de 5 μM . Para a citocinina BAP as concentrações 2,5, 5 μM e a testemunha foram superiores à 0,5 e 20 μM , não diferindo significativamente da concentração 10 μM (Tabela 2).

Quanto a explantes com organogênese, TDZ foi superior a ZEA, 2iP e BAP em todas as concentrações dos reguladores vegetais, sendo que para a testemunha não ocorreu diferença significativa entre as citocininas, pois poucos explantes formaram gemas na ausência dos reguladores. Analisando as concentrações dentro de cada regulador, apenas ocorreu diferença significativa para o TDZ, sendo que todas as concentrações foram superiores à testemunha e não diferiram significativamente

entre si. Os reguladores ZEA, 2iP e BAP não tiveram diferença significativa nas concentrações testadas (Tabela 2).

Para explantes com calos, TDZ foi superior a ZEA, 2iP e BAP nas concentrações 5 e 20 μM , sendo que na concentração 2,5 μM e a testemunha, TDZ e ZEA foram superiores a BAP e 2iP não diferiu significativamente dos demais. Nas concentrações de 0,5 e 10 μM , TDZ, 2iP e BAP não diferiram significativamente entre si e foram superiores a ZEA. Analisando as concentrações dentro dos reguladores, para TDZ e BAP não ocorreu diferença significativa entre as concentrações. Para ZEA, a testemunha e a concentração 2,5 μM não diferiram significativamente entre si e foram superiores as demais concentrações. Para 2iP, a concentração de 0,5 μM foi superior a 5 μM e não diferiu das demais (Tabela 2).

TABELA 2 – EFEITO DOS REGULADORES VEGETAIS NA ORGANOGÊNESE *IN VITRO* DE MIRTILEIRO DA CULTIVAR DELITE A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES.

Sobrevivência de Explantes (%)												
Concentrações	TDZ			ZEA		2iP		BAP				
0 µM	92,00	A*	a**	100,00	A	a	100,00	A	a	92,00	A	a
0.5 µM	92,00	A	a	60,00	AB	b	84,00	A	a	44,00	B	bc
2.5 µM	84,00	A	a	100,00	A	a	88,00	A	a	88,00	A	a
5 µM	84,00	A	a	100,00	A	a	40,00	B	b	88,00	A	a
10 µM	76,00	A	a	100,00	A	a	88,00	A	a	72,00	A	ab
20 µM	88,00	A	a	100,00	A	a	72,00	A	ab	8,00	B	c
Explantes Com Organogênese (%)												
Concentrações	TDZ			ZEA		2iP		BAP				
0 µM	0,00	A	b	0,00	A	a	4,00	A	a	0,00	A	a
0.5 µM	84,00	A	a	0,00	B	a	8,00	B	a	0,00	B	a
2.5 µM	84,00	A	a	0,00	B	a	4,00	B	a	0,00	B	a
5 µM	84,00	A	a	0,00	B	a	12,00	B	a	0,00	B	a
10 µM	76,00	A	a	4,00	B	a	12,00	B	a	0,00	B	a
20 µM	88,00	A	a	12,00	B	a	20,00	B	a	0,00	B	a
Explantes Com Calos (%)												
Concentrações	TDZ			ZEA		2iP		BAP				
0 µM	80,00	A	a	88,00	A	a	56,00	AB	ab	28,00	B	a
0.5 µM	84,00	A	a	28,00	B	b	80,00	A	a	4,00	B	a
2.5 µM	88,00	A	a	96,00	A	a	56,00	AB	ab	28,00	B	a
5 µM	88,00	A	a	20,00	B	b	28,00	B	b	32,00	B	a
10 µM	84,00	A	a	40,00	B	b	52,00	AB	ab	28,00	B	a
20 µM	92,00	A	a	40,00	B	b	48,00	B	ab	20,00	B	a
Gemas Pequenas por Explante (n.º)												
Concentrações	TDZ			ZEA		2iP		BAP				
0 µM	0,00	A	b	0,00	A	a	2,00	A	a	0,00	A	a
0.5 µM	8,83	A	a	0,00	B	a	2,80	AB	a	0,00	B	a
2.5 µM	9,65	A	a	0,00	B	a	1,00	B	a	0,00	B	a
5 µM	6,37	A	ab	0,00	A	a	1,06	A	a	0,00	A	a
10 µM	4,48	A	ab	2,40	A	a	0,00	A	a	0,00	A	a
20 µM	11,26	A	a	4,40	B	a	5,00	AB	a	0,00	B	a
Gemas Grandes por Explante (n.º)												
Concentrações	TDZ			ZEA		2iP		BAP				
0 µM	0,00	A	c	0,00	A	a	0,00	A	a	0,00	A	a
0.5 µM	15,50	A	a	0,00	B	a	0,00	B	a	0,00	B	a
2.5 µM	17,48	A	a	0,00	B	a	0,00	B	a	0,00	B	a
5 µM	9,95	A	b	0,00	B	a	0,00	B	a	0,00	B	a
10 µM	12,37	A	b	0,00	B	a	0,00	B	a	0,00	B	a
20 µM	11,45	A	b	0,00	B	a	0,00	B	a	0,00	B	a

* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

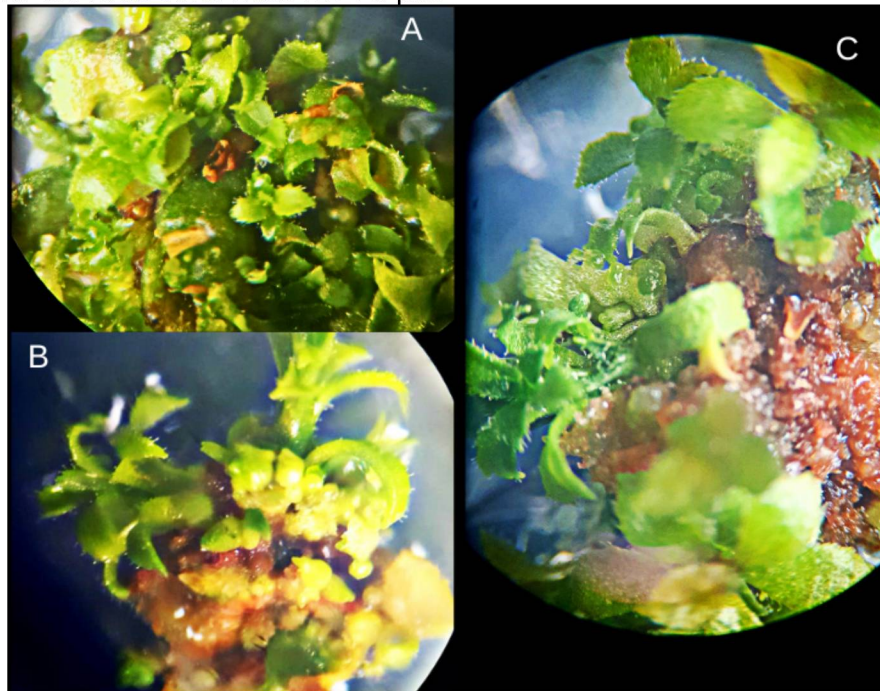
** Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Quanto a gemas pequenas por explante, nas concentrações de 5, 10 μM e na testemunha não houve diferença significativa entre os reguladores, enquanto nas concentrações 0,5 e 20 μM , TDZ foi superior a ZEA e BAP, e não diferiu significativamente de 2iP. Na concentração de 2,5 μM , TDZ foi superior a ZEA, 2iP e BAP. Analisando as concentrações dentro de cada citocinina, ZEA, 2iP e BAP, não tiveram diferença significativa entre as concentrações, já para TDZ ocorreu diferença significativa, sendo que as concentrações 0,5, 2,5, 5, 10 e 20 μM não diferiram significativamente entre si, sendo que 5 e 10 μM não diferiram da testemunha (Tabela 2).

Com a variável gemas grandes por explante, o regulador TDZ nas concentrações 0,5, 2,5, 5, 10 e 20 μM foi superior as demais citocininas ZEA, 2iP e BAP, apenas na testemunha não houve diferença significativa entre os reguladores porque não foram encontradas gemas grandes em nenhum tratamento. Analisando as concentrações dentro de cada citocinina, para ZEA, 2iP e BAP não houve diferença entre as concentrações já que não ocorreu a formação de gemas grandes. Para TDZ as concentrações 0,5 e 2,5 μM foram superiores às demais, sendo que 5, 10 e 20 μM não diferiram significativamente entre si e foram superiores à testemunha (Tabela 2).

A cultivar Delite mostrou potencial para a indução da organogênese, os resultados superiores foram encontrados com o regulador vegetal TDZ, com avaliações promissoras em todas as concentrações do regulador. Entretanto quando correlacionado o fator indução da organogênese com calogênese e produção de gemas, embora as concentrações mais altas tenham tido bons resultados, induziram em menor intensidade a formação de gemas grandes quando comparado ao tratamento com 0,5 μM e ao mesmo tempo apresentaram maior quantidade de calos nos explantes (Figura 6.B e 6.C).

FIGURA 6 – BROTAÇÕES ADVENTÍCIAS DA CULTIVAR DELITE COM TDZ; A- EXPLANTE DO TRATAMENTO COM TDZ 0,5 μM ; B - EXPLANTE DO TRATAMENTO COM TDZ 20 μM ; C – EXPLANTE DO TRATAMENTO COM TDZ 20 μM .



4.1.3 Cultivar Climax

Para a variável sobrevivência de explantes as citocininas TDZ, ZEA, 2iP e BAP não apresentaram diferença significativa nas concentrações 2,5, 5 μM e na testemunha. As citocininas ZEA, 2iP e BAP não diferiram significativamente entre si nas concentrações 10 e 20 μM e foram superiores a TDZ. Na concentração 0,5 μM , TDZ, ZEA e BAP não diferiram significativamente entre si e foram superiores a 2iP. No desdobramento das concentrações dentro de cada citocinina, os reguladores ZEA e BAP não obtiveram diferença significativa entre as concentrações. Para o regulador vegetal TDZ, ocorreu diferença significativa, sendo que as concentrações 0,5, 2,5, 5 μM e a testemunha não diferiram entre si e apresentaram as maiores taxas de sobrevivência, sendo que 0,5 e 5 μM não diferiram também da concentração de 10 μM e a concentração de 10 μM não diferiu significativamente de 20 μM , que apresentou a menor sobrevivência (28%). Para o regulador vegetal 2iP, as concentrações 10, 20 μM e a testemunha foram superiores a concentração de 0,5 μM e não diferiram significativamente das concentrações 2,5 e 5 μM (Tabela 3).

Conforme análise da variável explantes com organogênese, o TDZ foi superior a ZEA, 2iP e BAP nas concentrações 0,5, 2,5 e 5 μM . Já para a testemunha, não

ocorreu diferença significativa entre os diferentes reguladores e em 0,5 μM ZEA foi superior a 2iP e BAP, que não diferiram entre si. Já para a concentração 10 μM TDZ e ZEA foram superiores a 2iP e BAP, bem como para 20 μM ZEA foi superior a 2iP e BAP, mas não diferiu de TDZ. Para o desdobramento das concentrações dentro das citocininas, 2iP e BAP não tiveram diferença significativa entre as concentrações, enquanto com TDZ ocorreu diferença significativa, sendo as concentrações 0,5 e 2,5 μM superiores às demais exceto 5 μM . Para ZEA, as concentrações 10 e 20 μM foram superiores às demais e não diferiram significativamente da concentração de 0,5 μM (Tabela 3).

A variável explantes com calos, TDZ, ZEA, 2iP e BAP não tiveram diferença significativa nas concentrações 5, 10 μM e a testemunha, sendo que na concentração de 20 μM , ZEA e BAP foram superiores a TDZ, e não diferiram de 2iP. Para a concentração 0,5 μM TDZ, ZEA e BAP foram superiores a 2iP e na concentração 2,5 μM , TDZ foi superior a 2iP e não diferiu estatisticamente de ZEA e BAP. Para o desdobramento das concentrações dentro de cada citocinina, ZEA e BAP não tiveram diferença significativa entre as concentrações, para o regulador vegetal TDZ, as concentrações 0,5, 2,5, 5 e a testemunha foram superiores a 20 μM e não apresentaram diferença significativa de 10 μM . Para o regulador vegetal 2iP a testemunha apresentou 100% dos explantes com calo e foi superior as concentrações 0,5 e 2,5 μM e não diferiu de 5, 10 e 20 μM (Tabela 3).

Para a variável gemas pequenas por explante, TDZ, ZEA, 2iP e BAP não diferiram significativamente entre si nas concentrações 0,5, 10 μM e na testemunha, já para as concentrações 2,5 e 20 μM , TDZ foi superior a ZEA e não diferiu de 2iP e BAP. Para a concentração 5 μM , TDZ foi superior a BAP e não diferiu de ZEA e 2iP. Para a avaliação das concentrações dentro de cada citocinina, ZEA, 2iP e BAP não tiveram diferença significativamente entre as concentrações, já para TDZ as concentrações 2,5, 5 e 20 μM foram superiores a testemunha e não diferiram significativamente das concentrações 0,5 e 10 μM (Tabela 3).

TABELA 3 – EFEITO DOS REGULADORES VEGETAIS NA ORGANOGÊNESE *IN VITRO* DE MIRTILEIRO DA CULTIVAR CLIMAX A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES.

Sobrevivência de Explantes (%)											
Concentrações	TDZ		ZEA		2iP		BAP				
0 µM	100,00	A*	a	88,00	A	a	100,00	A	a	96,00	A a
0.5 µM	92,00	A	ab	96,00	A	a	60,00	B	b	96,00	A a
2.5 µM	96,00	A	a	100,00	A	a	88,00	A	ab	100,00	A a
5 µM	88,00	A	ab	92,00	A	a	80,00	A	ab	84,00	A a
10 µM	60,00	B	bc	92,00	A	a	100,00	A	a	84,00	AB a
20 µM	28,00	B	c	92,00	A	a	100,00	A	a	92,00	A a
Explantes Com Organogênese (%)											
Concentrações	TDZ		ZEA		2iP		BAP				
0 µM	0,00	A	d	4,00	A	b	0,00	A	a	4,00	A a
0.5 µM	84,00	A	a	28,00	B	ab	0,00	C	a	0,00	C a
2.5 µM	84,00	A	a	12,00	B	b	8,00	B	a	0,00	B a
5 µM	72,00	A	ab	20,00	B	b	8,00	B	a	0,00	B a
10 µM	48,00	A	bc	52,00	A	a	16,00	B	a	0,00	B a
20 µM	28,00	AB	c	52,00	A	a	16,00	BC	a	0,00	C a
Explantes Com Calos (%)											
Concentrações	TDZ		ZEA		2iP		BAP				
0 µM	100,00	A	a	76,00	A	a	100,00	A	a	88,00	A a
0.5 µM	88,00	A	a	100,00	A	a	0,00	B	c	88,00	A a
2.5 µM	92,00	A	a	60,00	AB	a	44,00	B	bc	80,00	AB a
5 µM	84,00	A	a	80,00	A	a	80,00	A	ab	76,00	A a
10 µM	60,00	A	ab	88,00	A	a	68,00	A	ab	84,00	A a
20 µM	28,00	B	b	92,00	A	a	68,00	AB	ab	88,00	A a
Gemas Pequenas por Explante (n.º)											
Concentrações	TDZ		ZEA		2iP		BAP				
0 µM	0,00	A	b	0,40	A	a	0,00	A	a	0,40	A a
0.5 µM	7,00	A	ab	5,83	A	a	0,00	A	a	0,00	A a
2.5 µM	14,61	A	a	3,90	B	a	6,40	AB	a	0,00	B a
5 µM	12,00	A	a	2,30	AB	a	4,80	AB	a	0,00	B a
10 µM	8,23	A	ab	4,11	A	a	7,00	A	a	0,00	A a
20 µM	13,00	A	a	1,46	B	a	3,80	AB	a	0,00	B a
Gemas Grandes por Explante (n.º)											
Concentrações	TDZ		ZEA		2iP		BAP				
0 µM	0,00	A	d	0,00	A	c	0,00	A	a	0,00	A a
0.5 µM	8,81	A	ab	0,00	B	c	0,00	B	a	0,00	B a
2.5 µM	5,10	A	bc	0,00	B	c	0,00	B	a	0,00	B a
5 µM	4,98	A	bc	1,80	AB	bc	0,00	B	a	0,00	B a
10 µM	11,18	A	a	6,46	B	b	0,00	C	a	0,00	C a
20 µM	1,40	B	cd	13,45	A	a	0,00	B	a	0,00	B a

* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

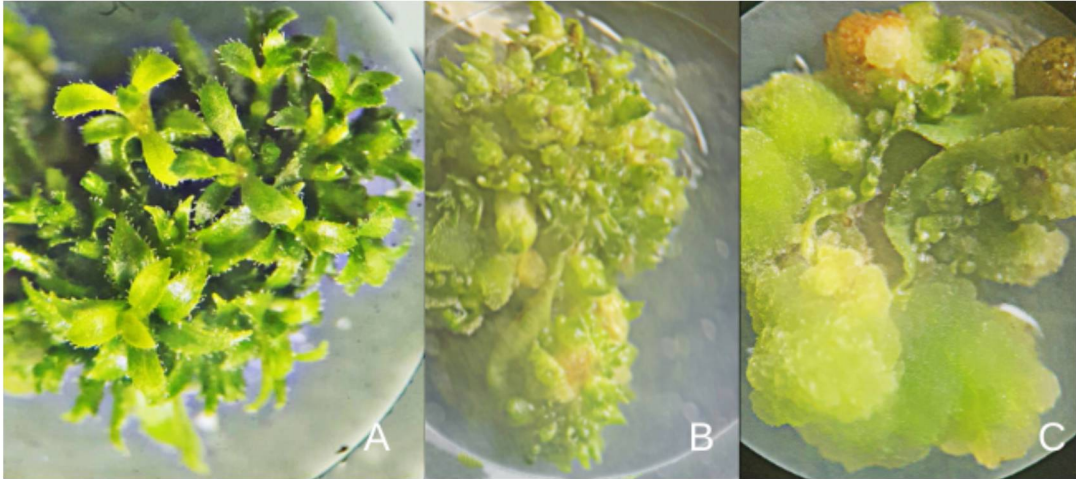
** Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para a variável gemas grandes por explante, a testemunha não apresentou diferença significativa já que não houve a formação deste tamanho de gemas. TDZ foi superior a ZEA, 2iP e BAP nas concentrações 0,5 e 2,5 μM , pois somente houve formação de gemas grandes com este regulador. Para a concentração 5 μM , TDZ foi superior a 2iP e BAP, que não apresentaram gemas grandes e não diferiu significativamente de ZEA, já para a concentração 10 μM , TDZ foi superior a ZEA, 2iP e BAP, sendo que ZEA foi superior a 2iP e BAP que não diferiram significativamente e não apresentaram formação de gemas grandes. Para a concentração 20 μM , ZEA foi superior a TDZ, 2iP e BAP (Tabela 3). Para o desdobramento das concentrações dentro de cada citocinina, 2iP e BAP não tiveram diferença significativamente entre as concentrações pois não houve a formação de gemas grandes nestas citocininas. Já para o regulador vegetal TDZ, ocorreu diferença significativamente, sendo que a concentração de 10 μM foi superior às demais e não diferiu significativamente de 0,5 μM . Para a citocinina ZEA, a concentração 20 μM foi superior as demais, sendo que 5 e 10 μM não diferiram significativamente entre si e nas demais concentrações não houve a formação de gemas grandes (Tabela 3).

A cultivar Climax também apresentou resultados superiores de organogênese, com o regulador vegetal TDZ, que nas concentrações de 0,5 e 2,5 μM apresentando taxa de 84% de regeneração via organogênese e maior quantidade de gemas pequenas e grandes. A porcentagem de explantes com calos foi alta, mas o tamanho destes foi menor (Figura 7.B e 7.C).

Já o regulador vegetal ZEA foi mais eficiente na indução à organogênese com a concentração de 20 μM do regulador, pela produção de gemas grandes e menor tamanho de calos (Figura 7.A).

FIGURA 7 – BROTAÇÕES DOS EXPLANTES DA CULTIVAR CLIMAX COM O REGULADOR VEGETAL ZEA E TDZ. A- EXPLANTE DO TRATAMENTO COM ZEA 20 μM ; B EXPLANTE DO TRATAMENTO COM TDZ 0,5 μM ; C – EXPLANTE DO TRATAMENTO COM TDZ 20 μM .



4.2 SEGUNDA ETAPA DA INDUÇÃO DA ORGANOGÊNESE

Para a cultivar Bluegem quando avaliadas as melhores concentrações dos reguladores vegetais usados na primeira etapa, TDZ foi superior a ZEA nas variáveis explantes com organogênese e gemas grandes por explantes, na variável explantes com organogênese a porcentagem em TDZ foi em média de 84% frente a 16,2% em ZEA e na variável gemas grandes por explantes TDZ obteve 20,29 brotações grandes por explante. As demais variáveis não apresentaram diferença significativa, sendo que a média de sobrevivência de explantes foi de 86%, explantes com calos com média de 90% e 3,26 gemas pequenas por explante (Tabela 4).

Para a cultivar Delite, as variáveis não apresentaram diferença significativa sendo que as médias para as variáveis foram, 100% sobrevivência de explantes, 87% explantes com organogênese, 100% explantes com calos, 11,7 gemas pequenas e 7,7 gemas grandes (Tabela 4).

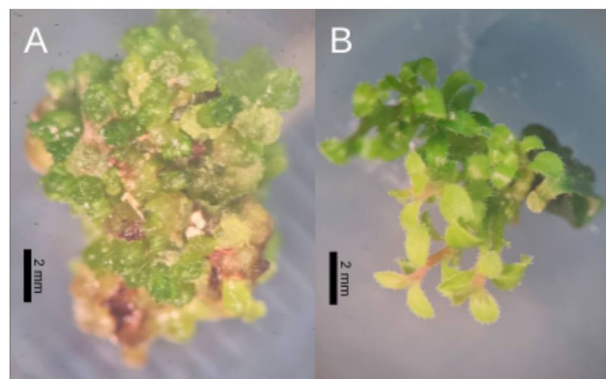
Com a cultivar Climax, para a variável sobrevivência de explantes, ZEA foi superior a TDZ com 100% de sobrevivência frente aos 88% com TDZ. Para explantes com organogênese, TDZ foi superior a ZEA com 88% de respostas organogênicas sendo superior aos 48% encontrados em ZEA. O TDZ foi superior à ZEA nas variáveis gemas pequenas e grandes por explante, com 20,6 gemas pequenas e 12,2 gemas grandes, frente às 2,8 gemas pequenas e 3,2 gemas grandes de ZEA Para a variável explantes com calos, não ocorreu diferença significativa. Para a cultivar Climax, foi visível que o alongamento das gemas grandes formadas foi maior em ZEA do que em TDZ (Figura 8).

TABELA 4 – EFEITO DOS REGULADORES VEGETAIS NA ORGANOGÊNESE *IN VITRO* DE MIRTILEIRO DA CULTIVAR BLUEGEM, DELITE E CLIMAX, A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES.

Bluegem					
Regulador Vegetal	Sobrevivência de Explantes (%)	Explantes Com Organogênese (%)	Explantes Com Calos (%)	Gemas Pequenas por Explante (n.º)	Gemas Grandes por Explante (n.º)
TDZ (20 µM)	88 a	84,0 a	92 a	5,12 a	20,29 a
ZEA (0,5 µM)	84 a	16,2 b	88 a	1,40 a	2,60 b
Média	86	50,1	90	3,26	11,44
CV%	23,26	51,90	16,48	105,41	43,76
Delite					
Regulador Vegetal	Sobrevivência de Explantes (%)	Explantes Com Organogênese (%)	Explantes Com Calos (%)	Gemas Pequenas por Explante (n.º)	Gemas Grandes por Explante (n.º)
TDZ (20 µM)	100 a	100 a	100 a	3,44 a	16,92 a
ZEA (0,5 µM)	100 a	84 a	100 a	5,67 a	10,52 a
Média	100	92	100	4,55	13,72
CV%	0,00	12,86	0,00	77,21	32,05
Climax					
Regulador Vegetal	Sobrevivência de Explantes (%)	Explantes Com Organogênese (%)	Explantes Com Calos (%)	Gemas Pequenas por Explante (n.º)	Gemas Grandes por Explante (n.º)
TDZ (20 µM)	88 b	88 a	88 a	20,6 a	12,2 a
ZEA (0,5 µM)	100 a	48 b	96 a	2,8 b	3,2 b
Média	94	68	92	11,7	7,7
CV%	8,24	26,31	10,87	42,74	48,07

* Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

FIGURA 8 – FORMAÇÃO DE CALOS E GEMAS DOS EXPLANTES FOLIARES DA CULTIVAR CLIMAX TRATADA COM TDZ E ZEA. A – TDZ COM 0,5 µM; ZEA COM 20 µM.



4.3 FASE DE MULTIPLICAÇÃO

As taxas de multiplicação e as quantidades de brotações foram avaliadas pelas médias das brotações dos tratamentos que apresentaram resposta na fase de indução por organogênese.

4.3.1 Cultivar Bluegem

Para a cultivar Bluegem nos tratamentos com TDZ foi possível observar crescimento de brotações em todos os tratamentos, sendo que com a concentração de 0,5 μM ocorreu a maior quantidade de brotações com 52 brotações no tratamento, com cerca de 2,44 cm de média de comprimento e média de 9,08 folhas por brotação, o maior comprimento de brotações foi com 5 μM com 2,96 cm e 13,43 folhas por explantes, em um total de 7 explantes (Tabela 5), 180 dias após o subcultivo do material. Sendo que as brotações não alongaram tanto quanto o esperado com média de 1,2 cm por brotação (Figura 9.C).

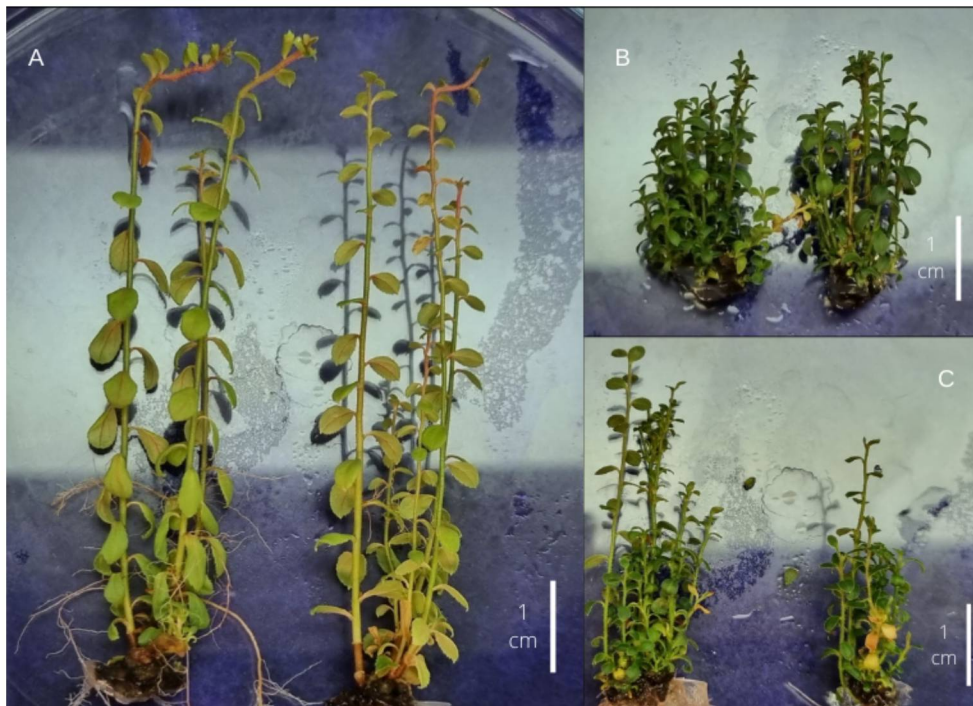
Quanto à variável número de brotações regeneradas por explante no regulador vegetal TDZ, conforme ocorreu o aumento da concentração do regulador, a quantidade de brotações regeneradas por explantes diminuiu, devido a oxidação de explantes por causa da calogênese, sendo a maior média de regeneração de brotos com 0,5 μM com 2,02 brotações regeneradas. Para o regulador vegetal ZEA, ocorreu a sobrevivência de explantes na concentração 20 μM , sendo que a taxa de regeneração foi de 9,71 brotações por explante com organogênese.

TABELA 5 – MULTIPLICAÇÃO DE BROTOS PROVENIENTES DA INDUÇÃO ORGANOGÊNICA DE EXPLANTES FOLIARES DOS TRATAMENTOS COM TDZ E ZEA NA CULTIVAR BLUEGEM.

TDZ				
Tratamentos na fase de indução	Nº total de brotações por tratamento	Brotações regeneradas por explante com organogênese (nº)	Comprimento médio de brotações (cm)	Nº médio de folhas por brotação
0,5 µM	52	2,08	2,44±1,23	9,08±4,69
2,5 µM	6	0,40	0,65±0,35	3,67±1,60
5 µM	7	0,56	2,96±0,33	13,43±3,33
10 µM	3	0,37	1,17±0,29	9,00±0,82
ZEA				
Concentrações	Nº total de brotações por tratamento	Brotações regeneradas por explante com organogênese (nº)	Comprimento médio de brotações (cm)	Nº médio de folhas por brotação
20 µM	68	9,71	1,9±1,03	9,10±4,04

*Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (DP).

FIGURA 9 – BROTAÇÕES DAS CULTIVARES BLUEGEM, DELITE E CLIMAX, EM FASE DE MULTIPLICAÇÃO COM MEIO DE CULTURA WPM COM 2,5 µM DE ZEA PROVENIENTES DE ORGANOGÊNESE; A – CULTIVAR DELITE ZEA; B – CULTIVAR CLIMAX TDZ; C – CULTIVAR BLUEGEM TDZ.



Nos tratamentos com 2iP e BAP, não foi possível avaliar a taxa de multiplicação em vista da oxidação dos explantes após a transferência para o meio de multiplicação, pois praticamente não ocorreu organogênese com estes reguladores. A

oxidação também afetou algumas repetições de TDZ e ZEA. Importante salientar que a alta proliferação de calos nos explantes advindos do regulador vegetal TDZ promoveram o aumento de compostos fenólicos no meio de cultura, que podem ter inibido o crescimento das brotações deste regulador.

4.3.2 Cultivar Delite

Para a cultivar Delite, a taxa de multiplicação dos tratamentos com TDZ, a maior quantidade de brotações ocorreu na concentração de 0,5 μM com 180 brotações por explante com tamanho médio de 3,75 cm e média de 15,12 folhas (Figura 9.A), sendo seguido da concentração 2,5 μM com 37 brotações com média de 3,55 cm e 16,97 folhas por brotação, em 10 μM ocorreram poucas brotações, mas brotações alongadas (Tabela 6). Em vista das brotações abundantes advindas da concentração 0,5 μM do referido regulador e a menor taxa de calogênese, não ocorreu o processo de inibição das brotações por compostos oxidativos, como ocorreu na cultivar Bluegem.

O regulador vegetal ZEA, obteve sobrevivência de explantes e crescimento de brotações apenas na concentração 20 μM com comprimento médio de 3,89 cm e 14,84 folhas por brotação.

Quanto à variável número de brotações regeneradas por explante no regulador vegetal TDZ, conforme ocorreu o aumento da concentração do regulador, a quantidade de brotações regeneradas por explantes diminuiu, devido a oxidação de explantes por causa da calogênese, sendo a maior média de regeneração de brotos com 0,5 μM com 8,57 brotações regeneradas. Para o regulador vegetal ZEA, ocorreu a sobrevivência de explantes na concentração 20 μM , sendo que a taxa de regeneração foi de 3,66 brotações por explante com organogênese. Desta forma os explantes advindos do tratamento com TDZ na indução da organogênese, na etapa de multiplicação apresentaram maior taxa de multiplicação das brotações na concentração 0,5 μM .

TABELA 6 – MULTIPLICAÇÃO DE BROTOS PROVENIENTES DA INDUÇÃO ORGANOGÊNICA DE EXPLANTES FOLIARES DOS TRATAMENTOS COM TDZ E ZEA NA CULTIVAR DELITE COM MEIO DE CULTURA WPM SUPLEMENTADO COM 2,5 μ M DE ZEA.

TDZ				
Tratamentos na fase de indução	Nº total de brotações por tratamento	Brotações regeneradas por explante com organogênese (nº)	Comprimento médio de brotações (cm)	Nº médio de folhas por brotação
0,5 μ M	180	8,57	3,75 \pm 2,8	15,12 \pm 6,76
2,5 μ M	37	1,76	3,55 \pm 1,92	16,97 \pm 6,49
5 μ M	11	0,52	2,39 \pm 1,86	14,09 \pm 6,42
10 μ M	4	0,21	12,68 \pm 10,18	21,25 \pm 7,46
20 μ M	10	0,45	1,63 \pm 0,69	12,00 \pm 3,74
ZEA				
Tratamentos na fase de indução	Nº total de brotações por tratamento	Brotações regeneradas por explante com organogênese (nº)	Comprimento médio de brotações (cm)	Nº médio de folhas por brotação
20 μ M	11	3,66	3,89 \pm 2,06	14,82 \pm 4,57

*Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP).

4.3.3 Cultivar Climax

Com a cultivar Climax, a média de brotações por tratamento com TDZ foi de 27 brotações (Tabela 7), a maior taxa de brotações foi verificada na concentração 0,5 μ M com 72 brotações, o comprimento médio de brotações foi de 2 cm e 9,79 folhas por brotação e com 2,5 μ M o comprimento das brotações foi de 1,55 com 7,94 folhas por brotação, sendo que as taxas de multiplicação são congruentes com o encontrado na cultivar Bluegem, em que as concentrações mais altas do regulador podem ter causado inibição do crescimento das gemas, o que não ocorreu com a concentração mais baixa de 0,5 μ M, com formação de brotações menos alongadas (Figura 9.C).

TABELA 7 – MULTIPLICAÇÃO DE BROTOS PROVENIENTES DA INDUÇÃO ORGANOGÊNICA DE EXPLANTES FOLIARES DOS TRATAMENTOS COM TDZ E ZEA NA CULTIVAR CLIMAX COM MEIO DE CULTURA WPM SUPLEMENTADO COM 2,5 μM DE ZEA.

TDZ				
Tratamentos na fase de indução	Nº total de brotações por tratamento	Eficiência na regeneração via organogênese (%)	Comprimento médio de brotações (cm)	Nº médio de folhas por brotação
0,5 μM	72	3,43	2,00 \pm 0,89	9,79 \pm 5,46
2,5 μM	33	1,57	1,55 \pm 0,64	7,94 \pm 4,11
5 μM	2	0,11	2,50 \pm 0,00	7,00 \pm 2,00
20 μM	1	0,14	2,00 \pm 1,00	14,00 \pm 7,00
ZEA				
Tratamentos na fase de indução	Nº total de brotações por tratamento	Eficiência na regeneração via organogênese (%)	Comprimento médio de brotações (cm)	Nº médio de folhas por brotação
0,5 μM	18	2,57	2,92 \pm 1,40	16,22 \pm 7,88
5 μM	83	16,60	3,63 \pm 1,93	19,66 \pm 8,57
10 μM	193	14,84	3,26 \pm 1,72	17,32 \pm 7,86
20 μM	142	10,92	2,89 \pm 1,60	17,74 \pm 8,19

*Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP).

Com a utilização do regulador vegetal ZEA a maior taxa de brotação ocorreu na concentração de 10 μM com 193 brotações, seguido de 142 brotações na concentração de 20 μM . A menor presença de calogênese nos explantes advindo da fase anterior pode ser responsável pelo melhor desenvolvimento da fase de multiplicação.

Quanto a variável número de brotações regeneradas por explante no regulador vegetal TDZ, conforme ocorreu o aumento da concentração do regulador, a quantidade de brotações regeneradas por explantes diminuiu, devido a oxidação de explantes por causa da calogênese, sendo a maior média de regeneração de brotos com 0,5 μM com 3,43 brotações regeneradas. Para o regulador vegetal ZEA, conforme o aumento da concentração do regulador ocorreu um aumento do número de brotações regeneradas, sendo que a taxa de regeneração foi de 16,6 na concentração 5 μM , de 14,84 brotações na concentração 10 μM e 10,92 na concentração 20 μM . Desta forma os explantes advindos do tratamento com ZEA na indução da organogênese, na etapa de multiplicação apresentaram maior taxa de multiplicação das brotações.

4.4 FASE DE ENRAIZAMENTO *EX-VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO

Neste experimento com a cultivar Bluegem foi possível observar diferença significativa entre os tratamentos para as variáveis porcentagem de estacas vivas e estacas com calo (Tabela 8). O tratamento com 500 mg L⁻¹ foi superior a 250 mg L⁻¹ e não diferiu da testemunha para a porcentagem de estacas vivas, para a porcentagem de estacas com calo, a testemunha foi superior as concentrações de 250 e 500 mg L⁻¹, sendo desta forma observado o enraizamento das mini-estacas em todas as concentrações do regulador AIB e na testemunha (Figura 10).

TABELA 8 – EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AIB 0, 250 E 500 mg L⁻¹ NO ENRAIZAMENTO *EX-VITRO* COM SUBSTRATO VERMICULITA COMBINADO COM OS SAIS MINERAIS DO MEIO DE CULTURA WPM NO ENRAIZAMENTO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE MIRTILEIRO DAS CULTIVARES BLUEGEM', DELITE E CLIMAX.

Bluegem						
Concentrações mg L ⁻¹	Estacas vivas (%)	Estacas enraizadas (%)	Estacas com calos (%)	Estacas com brotações (%)	Comprimento de brotações (n.º)	Número de folhas das brotações (n.º)
0	45 a*	20,0 a	12,5 a	20,0 a	0,87 a	3,90 a
250	40 b	35,0 a	5,0 b	28,8 a	1,30 a	4,21 a
500	45 a	32,5 a	5,0 b	37,5 a	0,90 a	2,83 a
Média	43,33	29,16	7,50	28,75	1,02	3,64
CV%	0,00	28,57	22,22	50,95	37,92	28,61
Delite						
Concentrações mg L ⁻¹	Estacas vivas (%)	Estacas enraizadas (%)	Estacas com calos (%)	Estacas com brotações (%)	Comprimento de brotações (n.º)	Número de folhas das brotações (n.º)
0	96 a*	68 a	20 a	86 a	2,38 a	8,76 a
250	76 a	60 a	4 a	66 a	1,94 a	7,56 a
500	94 a	78 a	18 a	78 a	2,12 a	7,98 a
Média	88,66	68,66	14	76,66	2,14	8,1
CV%	14,12	19,17	88,98	22,21	33,21	21,33
Climax						
Concentrações mg L ⁻¹	Estacas vivas (%)	Estacas enraizadas (%)	Calos (%)	Brotações (%)	Comprimento de brotações (n.º)	Número de folhas das brotações (n.º)
0	97,5 a*	65 a	0,25 a	87,5 a	1,40 a	6,70 a
250	100,0 a	80 a	2,50 a	82,5 a	1,31 a	6,07 a
500	97,5 a	80 a	0,00 a	82,5 a	1,79 a	6,50 a
Média (%)	98,33	75	0,91	84,16	1,49	6,42
CV%	2,92	32,96	321,37	13,14	37,23	35,15

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

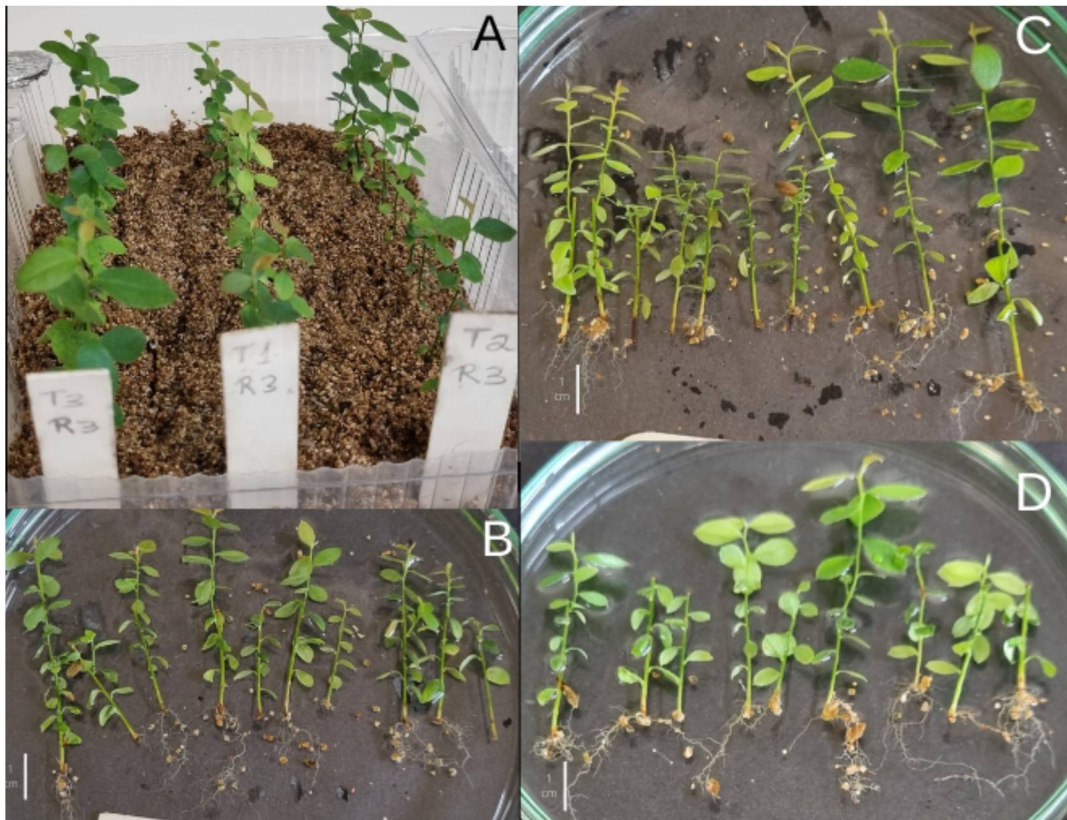
FIGURA 10 – EFEITO DO REGULADOR VEGETAL AIB NAS CONCENTRAÇÕES 0, 250 E 500 MG L⁻¹ EM MINI ESTACAS DA CULTIVAR BLUEGEM. A – ENRAIZAMENTO DA CONCENTRAÇÃO 0 mg L⁻¹; B – ENRAIZAMENTO NA CONCENTRAÇÃO 250 mg L⁻¹; C – ENRAIZAMENTO NA CONCENTRAÇÃO 500 mg L⁻¹.



As variáveis estacas enraizadas, brotações, comprimento das brotações e número de folhas por explante não tiveram diferença significativa entre os tratamentos.

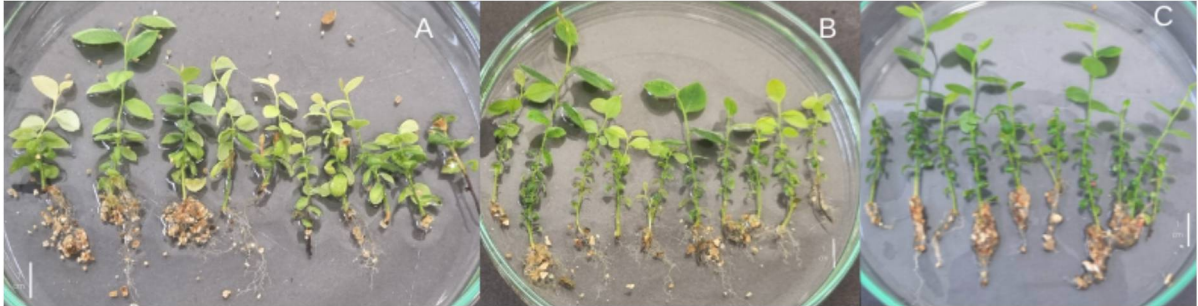
Neste experimento com a cultivar Delite, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para todas as variáveis analisadas (Tabela 8). Sendo que as variáveis apresentaram as seguintes médias, estacas vivas com 88,66%, estacas enraizadas com 68,66%, calos com 14%, brotações com 76,66%, comprimento das brotações com 2,14 cm e n.º médio de folhas por brotação de 8,1 (Tabela 8). Sendo assim, a cultivar Delite obteve enraizamento e não houve diferença significativa com a adição de regulador vegetal (Figura 11.B.C.D).

FIGURA 11 – ENRAIZAMENTO DAS ESTACAS DA CULTIVAR DELITE NAS CONCENTRAÇÕES 0, 250 E 500 mg L⁻¹ DE AIB. A – COMPARATIVO ENTRE O CRESCIMENTO DAS BROTAÇÕES; B – ENRAIZAMENTO DA CONCENTRAÇÃO 0 mg L⁻¹; C – ENRAIZAMENTO NA CONCENTRAÇÃO 250 mg L⁻¹; D – ENRAIZAMENTO NA CONCENTRAÇÃO 500 mg L⁻¹



Neste experimento com a cultivar Climax não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para todas as variáveis analisadas, sendo que ambas as concentrações do regulador quanto a testemunha, apresentaram mais de 95% de sobrevivência de explantes, a taxa de enraizamento nas concentrações de AIB não se diferiram, com 80% de enraizamento, com taxa de brotação em 82,5% com comprimento de brotações variando de 1,4 na testemunha, 1,31 com 250 mg L⁻¹ e 1,79 cm com 500 mg L⁻¹ (Tabela 8). Sendo desta forma observado enraizamento das mini estacas em todos as concentrações do regulador AIB e na testemunhas (Figura 12).

FIGURA 12 – EFEITO DO REGULADOR VEGETAL AIB NAS CONCENTRAÇÕES 0, 250 E 500 mg L⁻¹ EM MINI ESTACAS DA CULTIVAR CLIMAX. A – ENRAIZAMENTO DA CONCENTRAÇÃO 0 mg L⁻¹; B – ENRAIZAMENTO NA CONCENTRAÇÃO 250 mg L⁻¹; C – ENRAIZAMENTO NA CONCENTRAÇÃO 500 mg L⁻¹.



5 DISCUSSÃO

5.1 FASE DE INDUÇÃO POR ORGANOGÊNESE

Neste estudo sobre a indução organogênica em três cultivares de mirtilheiro do grupo Rabbiteye, 'Bluegem', 'Delite' e 'Climax', foi possível observar a formação de novas brotações adventícias com a utilização dos reguladores vegetais TDZ e ZEA.

Com a cultivar Bluegem e Delite os reguladores vegetais TDZ e ZEA promoveram a regeneração de brotações, TDZ promoveu resultados superiores com a concentração 0,5 μM e induziu com maior eficiência a formação de gemas pequenas. Sendo que com TDZ ocorreu diminuição de gemas grandes conforme o aumento da concentração do regulador, com 21,6 gemas por explante com 0,5 μM e 9,09 em 2,5 μM , bem como diminuiu o alongamento das brotações em relação àquelas encontradas com ZEA. O vigor da parte área pode ser reduzido com o aumento da concentração de TDZ, bem como ser afetado por conta da influência auxínica do TDZ (DEBNATH, 2009; GUO et al., 2011; DINANI et al., 2018).

Sendo que para a cultivar Delite nas concentrações de TDZ de 0,5 μM a 2,5 μM ocorreu o aumento de brotações com 8,84 e 9,65 brotos pequenos e 15,5 e 17,48 brotos grandes por explante, nas concentrações mais altas ocorreu diminuição das brotações, sendo que conforme houve aumento da concentração, ocorreu a maior formação de calos (Figura 6. A e B). Em estudo realizado por Schuchovski et al. (2020), com a mesma cultivar e regulador vegetal, a concentração de 0,5 μM foi superior em promover a organogênese, sendo que conforme o aumento da concentração de TDZ até 2,5 μM , ocorreu a diminuição da quantidade de brotações pequenas. Cappelletti & Mezzetti (2016) na pesquisa com *Vaccinium corymbosum* L. com a cultivar Duke obteve resultados semelhantes com o uso de TDZ nas concentrações 0,1 mg L^{-1} (0,45 μM) e 0,5 mg L^{-1} (0,91 μM), sendo que o regulador foi usado em concentração mais baixa que no presente estudo.

Já para BAP e 2iP não foram observados resultados significativos, demonstrando um menor de efeito sobre a indução da organogênese. Resultado diferente do observado por Vescan et al. (2011) com a cultivar Elliot com 2iP, onde com 0,5 mg L^{-1} foi possível observar a regeneração de brotações adventícias.

Na pesquisa utilizando a cultivar Climax, os resultados foram significativos com o regulador vegetal TDZ, que induziu a organogênese em todas as

concentrações testadas. As taxas mais elevadas de sobrevivência, porcentagem de explantes com organogênese e número de brotações pequenas foram obtidas com 0,5, 2,5 e 5 μM .

Com o regulador vegetal ZEA a organogênese foi observada com maior frequência nas concentrações de 10 e 20 μM , sendo que a concentração de 20 μM produziu maior quantidade de brotações grandes (Figura 7) o alongamento das brotações do tratamento em relação as concentrações de TDZ, sendo que o material dificultou a avaliação de formação gemas pequenas.

Em pesquisa realizada por Cappelletti et al. (2016) com a cultivar Duke foi verificado o crescimento equilibrado entre brotações e calos com a utilização de 2 mg L^{-1} (9,12 μM) de ZEA, sendo ainda observado o alongamento das brotações. Segundo Doğan (2019) a ação dos hormônios pode diferir de acordo com a espécie trabalhada, e a regeneração de células pode ser variável em relação a concentração de citocininas e auxinas.

Além da alta proliferação de brotos, o TDZ apresentou uma elevada formação de calos. Conforme estudo de Cappelletti et al. (2016) com a cultivar Duke. TDZ combinado com 2iP mostrou eficiência para o alongamento do caule e menor produção de calos, sendo assim uma opção para o uso do regulador vegetal.

Na segunda etapa da indução da organogênese, quando comparados os reguladores vegetais TDZ e ZEA, conforme experimento anterior, as concentrações 0,5 e 20 μM respectivamente, induziram a organogênese na cultivar climax, sendo importante salientar que visualmente o tratamento com TDZ possui maior quantidade de calos nos explantes (Figura 8.A), sendo que estes podem impactar o desenvolvimento das gemas na fase de multiplicação, enquanto ZEA com menor incidência de gemas, possui brotações mais desenvolvidas (Figura 8.B), sendo que TDZ teve média de 20,6 gemas pequenas e 12,2 gemas grandes frente as 2,8 gemas pequenas e 3,2 gemas grandes do tratamento com ZEA.

5.2 FASE DE MULTIPLICAÇÃO

A fase de multiplicação usando meio padrão WPM suplementado com 2,5 μM de ZEA, foi eficiente em promover o crescimento da parte aérea e desenvolvimento das brotações obtidas por organogênese nas três cultivares avaliadas. Zeatina se mostrou eficiente na multiplicação de brotos e alongamento de brotações na utilização

com biorreator com 1 μM (DEBNATH, 2011), bem como na multiplicação *in vitro* (ZHANG et al., 2006; SCHUCHOVSKI & BIASI, 2022b). Sendo que as taxas observadas por cultivar foram 52 brotações advindas do tratamento com 0,5 μM de TDZ e 68 brotações advindas do tratamento com ZEA com 20 μM . Com a cultivar Delite, cerca de 180 brotações advindas do tratamento com 0,5 μM de TDZ e 11 brotações no tratamento advindo de ZEA com 20 μM e com a cultivar Climax 72 brotações dos explantes advindos de TDZ com 0,5 μM e 193 brotações advindas do tratamento com 10 μM de ZEA e 142 brotações dos tratamentos advindos de 20 μM de ZEA.

O desenvolvimento das brotações foi superior nos tratamentos advindos de ZEA em relação àqueles advindos de TDZ, sendo que o número de brotações regeneradas em relação aos explantes com resposta, foi maior para os tratamentos advindos de ZEA. Com TDZ, as brotações foram superiores nas concentrações mais baixas, possivelmente em vista de uma menor ação de compostos fenólicos que foram produzidos nos tratamentos com maior concentração do regulador e gerando a maior incidência de calogênese (Figura 9.C). Por conta de ser uma característica forte de TDZ a induzir a maior formação de calos em detrimento da formação de brotações, por conta do efeito auxínico da molécula com o aumento da concentração desta (DEBNATH, 2009; GUO et al., 2011; DINANI et al., 2018).

5.3 FASE DE ENRAIZAMENTO *EX-VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO

Geralmente o regulador AIB é utilizado no enraizamento de explantes da cultura de mirtilheiro, nas concentrações de 1000 e 2000 mg L^{-1} no enraizamento *ex vitro* (ZHANG, 2006), com tratamentos com 500 mg L^{-1} no enraizamento *ex vitro* (SCHUCHOVSKI & BIASI, 2022a), com 0,5 mg L^{-1} para o enraizamento da cultivar Weiwa Kuahuat e 1,0 mg L^{-1} na cultivar Sierra no enraizamento *in vitro* (GUO et al., 2019), sendo que este uso se deve a esta ser uma auxina sintética estável.

Devido à não diferença estatística entre os tratamentos, e o sucesso do enraizamento tanto nas concentrações da auxina utilizada quanto na testemunha, o material em si das cultivares Bluegem, Climax e Delite apresentaram um bom desempenho de enraizamento. Desta forma nesta pesquisa com as três cultivares de mirtilheiro Rabbiteye, 'Bluegem', 'Delite' e 'Climax', e a auxina AIB, o material vegetal obteve boas taxas de sobrevivência e enraizou indiferentemente ao uso do regulador

vegetal. Resultados estes diferentes de autores como Zhang, 2006 e Schuchovski & Biasi (2022a), que obtiveram enraizamento *ex vitro* com a cultura com a utilização de AIB.

Já Hung et al. (2016a), com a cultivar Titan, sem a utilização de regulador vegetal e apenas testando a ventilação das brotações ocorreu o enraizamento de 100% das estacas. Sendo que também o enraizamento *ex vitro* é geralmente mais eficiente para a cultura (DEBNATH, 2007). Segundo Fan et al. (2017) com o mirtilheiro Rabbiteye cultivar Pink Lemonade, o enraizamento aumentou cerca de 14% e 32% *ex vitro* em relação a aclimatização *in vitro*.

A aclimatização *ex vitro* em ambiente controlado é capaz de realizar a diminuição de custos bem como a diminuição do tempo do processo (HUNG et al., 2016b). Desta forma sendo o enraizamento e aclimatização *ex vitro* eficiente sem o uso do regulador vegetal AIB.

6 CONCLUSÕES

A organogênese é uma técnica eficiente para o cultivo *in vitro* de mirtilheiro. A partir desta técnica é possível obter uma grande quantidade de plantas, utilizando pequenas quantidades de material vegetal originados de uma única planta matriz. A utilização de 0,5 μM de TDZ é eficiente para a indução da organogênese a partir de explantes foliares nas cultivares Bluegem, Climax e Delite, bem como 20 μM de ZEA na cultivar Bluegem e 10 μM de ZEA na cultivar Climax. As brotações advindas da indução por organogênese, podem ser multiplicadas em meio de cultura WPM com 2,5 μM de ZEA e o enraizamento pode ser realizado durante a aclimatização em caixas plásticas transparentes sem o uso de reguladores de crescimento.

7 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Cada pesquisa além de legar seus resultados mostra as melhorias que podem surgir, desta forma para solidificar a pesquisa da organogênese com mirtilheiro seria importante que durante a fase de indução, seja avaliado o surgimento da organogênese com avaliações semanais, bem como acrescentar a variável comprimento das brotações formadas, para que inclusive se possa apontar qual regulador promove mais rapidamente a organogênese, diminuindo assim o tempo da fase de indução e conseqüentemente redução no custo deste processo. Seria pertinente avaliar se o regulador vegetal TDZ induz a organogênese com concentrações mais baixas do que as utilizadas neste trabalho, visando à redução de calogênese e custo do processo. Outra linha de estudo seria avaliar a possibilidade da associação do regulador vegetal TDZ com os reguladores 2iP e BAP, para diminuir a calogênese formada.

REFERÊNCIAS

- ANTUNES, L. E. C.; GONÇALVES, E. D.; RISTOW, N. C.; CARPENEDO, S.; TREVISAN, R. Fenologia, produção e qualidade de frutos de mirtilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.8, p. 1011-1015, 2008.
- ANTUNES, L. E. C.; PAGOT, E. Técnicas de produção de framboesa e mirtilo. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Clima Temperado, Embrapa Uva e Vinho**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília-DF, 2016.
- BAÑADOS, M.P. Blueberry production in South America. **Acta Horticulturae**, n.715, p.165-172, 2006.
- BASU, A., M.; RHONE, T.J.; LYONS. Berries: emerging impact on cardiovascular health. **Nutrition Reviews**, v. 68, n. 3, p.168–177, 2010.
- BRACKMANN, A.; WEBER, A.; GIEHL, R. F. H.; EISERMANN, A. C.; SAUTTER, C. K. GONÇALVES, E. D.; ANTUNES, L. E. C. Armazenamento de mirtilo 'Bluegem' em atmosfera controlada e refrigerada com absorção e inibição do etileno. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 57, n.1, p. 06-11, 2010.
- BRAZELTON, C.; YOUNG, K. World Blueberry Statistics and Global Market Analysis, Spring Preview for GBC, **International Blueberry Organization**, Qujing City, Yunnan, 2017.
- CABRAL, G.B.; PIRES, M.V.V.; LACERDA, A.L.; CARNEIRO, V.T. de C. **Introdução in vitro, micropropagação e conservação de plantas de *Brachiaria* sp.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Comunicado Técnico, 101, 4p, 2003.
- CAMARGO. S., S.; SOUZA, A., L., K.; SCHUCH M., W.; VIZZOTTO, M. Métodos de propagação e intensidades de poda na produção e qualidade de mirtilos cv. Bluegem. **Revista da 15ª Jornada de Pós-graduação e Pesquisa**, v. 15, n. 15, p. 1281-1292, 2018.
- CAPPELLETTI, R.; MENEZZETTI, B. TDZ, 2iP and zeatin in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L. 'Duke') *in vitro* proliferation and organogenesis. **Acta Horticulturae**. n.1117, p.321-324, 2016.
- CAPPELLETTI, R.; SABBADINI, S.; MEZZETTI, B. The use of TDZ for the efficient *in vitro* regeneration and organogenesis of strawberry and blueberry cultivars. **Scientia Horticulturae**, v. 207, p. 117–124, 2016.
- CARVALHO, J.M.F.C. **Aplicacion de las tecnicas de cultivo in vitro en la multiplicación y mejora del algodón (*Gossypium hirsutum* L).** Tese de Doutorado em Engenharia Agrônoma – Departamento de Biologia Vegetal, Escuela Tecnica Superior de Ingenieros Agronomos de la Universidad Politecnica de Madrid, Madrid-España, 1996.

CASTILLO, A.; CARRAU, J. S. F.; LEONI, C.; PEREIRA, G. Investigación en arandanos en Uruguay: propagación *in vitro* y evaluación de variedades por INIA. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 2.; ENCONTRO DE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS, 1. **Palestras**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. p. 225-228, Pelotas, 2004. (Documentos, 124).

DEBNATH, S. C. A two-step procedure for adventitious shoot regeneration on excised leaves of lowbush blueberry. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 45, p.122–128, 2009.

DEBNATH, S. C. Propagation of *Vaccinium in vitro*. **International Journal of Fruit Science**, doi.org/10.1300/J492v06n02_04, Vol 6, Pages 47-71, 2007.

DEBNATH, S. C. Adventitious shoot regeneration in a bioreactor system and EST-PCR based clonal fidelity in lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.). **Scientia Horticulturae**, v. 128, n. 2, p. 124-130, 2011.

DEBNATH, S. C. Temporary immersion and stationary bioreactors for mass propagation of true-to-type highbush, half-high, and hybrid blueberries (*Vaccinium* spp.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, p. 72-80, 2016. <https://doi.org/10.1080/14620316.2016.1224606>.

DINANI, E. T.; SHUKLA, M. R.; TURI, C. E.; SULLIVAN, J. A.; SAXENA, P. K. Thidiazuron: Modulator of Morphogenesis *In Vitro*, In: AHMAD, N., FAISAL, M. (eds) **Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator**. Springer Singapore, p. 1-36. 2018. DOI:10.1007/978-981-10-8004-3_1.

DOĞAN, M. Zeatin ve Farklı Oksin Kombinasyonlarının Önemli Tıbbi Bitki *Limnophila aromatica* (Lamk.) Merr.'nin **In Vitro Mikroçoğaltımı Üzerine Etkisi**. Karaman, Türkiye, v. 22, n. 2, p. 323-329, 2019.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de luz na multiplicação *in vitro* de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) 'Batum'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 3, p. 488-490, 2005.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Factors that affect the *in vitro* multiplication of blueberry trees. **Scientia Agraria**, v.7, n.1-2, p.83-88, 2006.

EVERT, R., F.; EICHHORN, S., E. **Raven Biologia vegetal**. 8ª Edição, Editora Guanabara Koogan LTDA., Rio de Janeiro – RJ, 2014.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E.; FORTES, G. R. de L. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2. ed. Universidade Federal de Pelotas-UFPel, 179 p, 1995.

FACHINELLO, J. C. Mirtilo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 575-579, 2008.

FAN, S.; JIAN, D.; WEI, X.; CHEN, J.; BEESON, R. C.; ZHOU, Z.; WANG, X. Micropropagation of blueberry 'Bluejay' and 'Pink Lemonade' through *in vitro* shoot

culture. **Scientia Horticulturae**, v. 226, p. 277-284, 2017. DOI.org/10.1016/j.scienta.2017.08.052.

FAOSTAT, **FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2022. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acesso em: 15 de Maio de 2022.

FERREIRA, D.F. SISVAR: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista Brasileira de Biometria**, v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019. DOI: <https://doi.org/10.28951/rbb.v37i4.450>

GOUGH, R. E. The Highbush Blueberry and Its Management. **Food Products Press, an imprint of The Haworth Press**, Inc., 13904-1580, ISBN 1-56022-021-X, 10 Alice Street, Binghamton - NY, 1993.

GOYALI, J. C.; IGAMBERDIEV, A. U.; DEBNATH, S. C. Propagation Methods Affect Fruit Morphology and Antioxidant Properties but Maintain Clonal Fidelity in Lowbush Blueberry. **HortScience**, v. 50, n. 6, p. 9, 2015.

GUERRA, P. M.; NODARI, O. R.; FRAGA, F. P. H.; VIEIRA, N. L.; FRITSCHÉ, Y. Apostila de biotecnologia. **UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA-UFSC**, Florianópolis-SC. 2016. <http://fdgv.paginas.ufsc.br/files/2014/08/Apostila-Biotec-2016.1-Final.pdf>.

GUO, B.; ABBASI, B. H.; ZEB, A.; XU, L. L.; WEI, Y. H. Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 45, p. 8984–9000, 2011.

GUO, YX., ZHAO, YY., ZHANG, M.; ZHANG, L. Y. Development of a novel in vitro rooting culture system for the micropropagation of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) seedlings. **Cultura de Células, Tecidos e Orgãos Vegetais** 139, 615-620 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01702-7>

HART, D. S.; KEIGHTLEY, A.; SAPPINGTON, D.; NGUYEN, P. T. M.; CHRITTON, C.; SEEKINGER, C. R.; TORRES, K. C. Stability of adenine-based cytokinins in aqueous solution. **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, v. 52, p. 1-9, 2016. DOI: 0.1007/s11627-015-9734-5, 2016.

HUNG, C. D.; HONG, C.; KIM, S.; LEE, K.; PARK, J.; DUNG, C.; NAM, M.; CHOI, D.; LEE, H. *In vitro* proliferation and ex vitro rooting of microshoots of commercially important rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) using spectral lights. **Scientia Horticulturae**, v. 211, p. 248-254, 2016a. DOI.org/10.1016/j.scienta.2016.09.003.

HUNG, C. D.; HONG, C.; KIM, S.; LEE, J.; PARK, J.; NAM, M.; CHOI, D.; LEE, H. LED light for *in vitro* and *ex vitro* efficient growth of economically important highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, 152, 2016b. DOI:10.1007/s11738-016-2164-0.

JULKOVSKI, D. J.; ORO, I. M.; SEHNEM, S.; PIEKAS, A. A. S.; ZANELLA, A. Produção e comercialização de mirtilo: estudo de caso em uma empresa familiar.

Revista de Gestão dos Países de Língua Portuguesa, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 41–60, 2021. DOI: 10.12660/rgplp.v20n1.2021.81214. Disponível em: <https://bibliotecadigital.fgv.br/ojs/index.php/rgplp/article/view/81214>. Acesso em: 10 Abr. 2022.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, v.30, p.421-427, 1980.

LOHACHOOMPOL, V.; MULHOLLAND, M.; SRZEDNICKI, G.; CRASKE, J.; Determination of anthocyanins in various cultivars of highbush and rabbiteye blueberries. **Food Chem.**, 111 (2008), pp. 249-254

MARINO, S. R.; WILLIAMSON, J. G.; OLMSTEAD, J. W. Vegetative growth of three Southern Highbush blueberry cultivars obtained from micropropagation and softwood cuttings in two Florida locations. **HortScience horts**, 49(5), 556-561. Retrieved Feb 15, 2023, from <https://journals.ashs.org/hortsci/view/journals/hortsci/49/5/article-p556.xml>

MEDEIROS, S. G. J.; BIASI, L.A.; BONA, C.M.; CUQUEL, F.L. Phenology, production and quality of blueberry produced in humid subtropical climate. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n. 3: (e-540), 2018. http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-29452018000300703&script=sci_arttext.

MEINERS, J.; SCHWAB, M.; SZANKOWSKI, I. Efficient *in vitro* regeneration systems for *Vaccinium* species. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. v. 89, n. 2-3, p. 169–76, 2007. doi: 10.1007/s11240-007-9230-7

MILLER, K.; FEUCHT, W.; SCHMID, M. Bioactive compounds of strawberry and blueberry and their potential health effects based on human intervention studies: a brief overview. **Nutrients**, v. 11, n. 7, 2019. <https://doi.org/10.3390/nu11071510>.

MOURA, T. L.; ALMEIDA, W. A. B.; MENDES, B. M. J.; FILHO, F. A. A. M. Organogênese *in vitro* de citrus em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 240-245, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473–497, 1962.
MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant Physiology**, v.25, p.135-166, 1974.

OLIVEIRA, J. R.; SILVA, J. V. G.; AMOURIM, M. A. A.; SANTOS, M. N.; BATISTA, A. G. Produção de Pequenas Frutas no Brasil: Um Mercado em Potencial. **Enciclopédia Biosfera**, v. 17 n. 33, p. 363, 2020.

PAGOT, E.; HOFFMANN, A. Produção de pequenas frutas no Brasil. In: Seminário Brasileiro Sobre Pequenas Frutas. 1., 2003, Vacaria, RS. **Anais**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003.

PELIZZA, T. R.; DAMIANI, C. R.; RUFATO, A. R.; AFFONSO, L. B.; HAMERROTH, F. J.; SCHUCH, M. W. Aclimatização e crescimento de plântulas de mirtilheiro 'Climax' micropropagadas em função do substrato e da cobertura plástica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 898-905, 2011.

PEÑA, M. L. P.; GUBERT, C.; TAGLIANI, M. C.; BUENO, P. M. C.; BIASI, L. A. Concentrações e formas de aplicação do ácido indolbutírico na propagação por estaquia dos mirtilheiros cvs. Flórida e Clímax. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 57-64, 2012.

PEDROTTI, E. L.; VOLTOLINI, J. A. Enraizamento *ex vitro* e aclimatização do porta-enxerto de macieira M.9. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.23, n.2, p.234-239, 2001.

PRODORUTTI, D.; PERTOT, I.; GIONGO, L.; GESSLER, C. Highbush Blueberry: Cultivation, Protection, Breeding and Biotechnology. **The European Journal of Plant Science and Biotechnology**, Global Science Books, 2007.1(1), 44-56.

RASEIRA, M. C. B.; ANTUNES, L. E. C. (Ed.). **A cultura do mirtilo (*Vaccinium* sp.)**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 67p. (Documentos, 121)

RETAMALES, J. B. World temperate fruit production: characteristics and challenges. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. Especial, E., p. 121-130, 2011.

RETAMALES, J. B.; HANCOCK, J. F. **Blueberries**. 2nd Edition. Crop Production Science in Horticulture, Boston: CABI. 2018. 411p.

RODRIGUEZ-MATEOS, A.; ISTAS, G.; BOSCHEK, L.; FELICIANO, R. P.; MILLS, C.; BOBY, C.; GOMEZ-ALONSO, S.; MILENKOVIC, D.; HEISS, C. Metabólitos de antocianina circulantes mediam benefícios vasculares de mirtilos: insights de ensaios controlados randomizados, metabolômica e nutrigenômica. **The Journals of Gerontology: Series A**, v. 74, n. 7, p. 967–976, 2019.

SANTOS, A. M.; RASEIRA, M. C. B. **O cultivo do mirtilo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. 2002. 17p. (Documentos, 96).

SANTOS, E. K. Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. **Genética e Evolução Vegetal**. 1. ed., Porto Alegre: UFRGS, p.415-426. 2003.

SCHOTSMANS, W.; MOLAN, A.; MACKAY, B. Controlled atmosphere storage of rabbiteye blueberries enhances postharvest quality aspects. **Postharvest Biology and Technology**, v. 44, n. 3, p. 277-285, 2007.

SCHUCH, M. W.; TOMAZ, Z. F. P. Advances in the spread of vegetative blueberry. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, n. 1, e-041, 2019.

SCHUCHOVSKI, C.; SANT'ANNA-SANTOS, B.; MARRA, R.; BIASI, L. A. Morphological and anatomical insights into new shoot organogenesis of *in vitro* 'Delite' rabbiteye blueberries. **Heliyon**, v. 6, n. 11, e05468, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05468>.

SCHUCHOVSKI, C.; BIASI, L. A. Micropropagation of *Vaccinium virgatum* 'Delite': a rabbiteye cultivar adapted to mild winters. **Plant Biosystems**, v. 156, n. 5, p. 1117-1128, 2022a. <https://doi.org/10.1080/11263504.2021.2013335>.

SCHUCHOVSKI, C.; BIASI, L. A. *In vitro* establishment and multiplication of *Vaccinium virgatum* Ait. 'Delite'. **Acta Horticulture**, n. 1339, p. 191-198, 2022b. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2022.1339.25>.

SOUSA, J. S. I.; PEIXOTO, A. M.; TOLEDO, F. F. **Enciclopédia agrícola brasileira**, Piracicaba: Editora da Universidade de São Paulo 1995. 508p.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200021>.

SOUZA, A. L. K; SCHUCH, M, W; ANTUNES, L, E, C; SCHMITZ, J, D; PASA, M, S; CAMARGO, S, S; CARRA, B. Desempenho de mudas de mirtilo obtidas por micropropagação ou estaquia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.8, p.868-874. 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I., M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6ª Ed. Porto Alegre: Artmed Editora Ltda. 2017.

VESCAN, L. K; PAMFIL, D; CLAPA, D; FIRA, A; SISEA, C. R; POP, I. F; PETRICELE, I. V; CIUZAN, O; POP, R. Efficient micropropagation protocol for highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. 'Elliot'. **Romanian Biotechnological Letters**, Vol. 17, No. 1, p. 6893 - 6902, 2012.

WU, H.; CHAI, Z; HUTABARAT, R. P; ZENG, Q; NIU, L; Li, D; YU, H; HUANG, W. Blueberry leaves from 73 different cultivars in southeastern China as nutraceutical supplements rich in antioxidants. **Food Research International**, v. 22, p. 548-560, 2019.

ZHANG, Z.; LIU, H.; WU, L.; LI, Y. Technical System of Blueberry Micropropagation in China. **Acta Horticulturae**, (715), 421–426. doi:10.17660/actahortic.2006.715.