

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANIDADE**

ANA PAULA DE AZEVEDO PASQUALINI

GERMINAÇÃO DE SEMENTES E MICROPROPAGAÇÃO DE MIRTILEIRO

PONTA GROSSA

2013

ANA PAULA DE AZEVEDO PASQUALINI

GERMINAÇÃO DE SEMENTES E MICROPROPAGAÇÃO DE MIRTILEIRO

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Ponta Grossa para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de concentração: Agricultura.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub

PONTA GROSSA

2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

P284 Pasqualini, Ana Paula de Azevedo
Germinação de sementes e
micropropagação de mirtilheiro/ Ana Paula
de Azevedo Pasqualini. Ponta Grossa, 2013.
73f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia -
Área de Concentração: Agricultura),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio
Ayub.

1.Vaccinium ashei Reade. 2.Teste
tetrazólio. 3.Regulador vegetal.
4.Etileno. I.Ayub, Ricardo Antonio. II.
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Mestrado em Agronomia. III. T.

CDD: 634



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

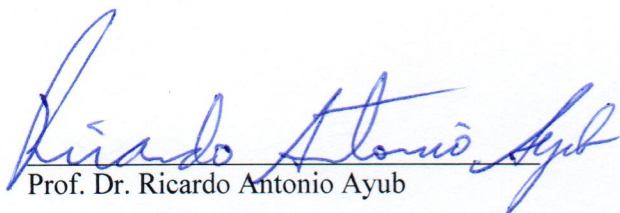
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

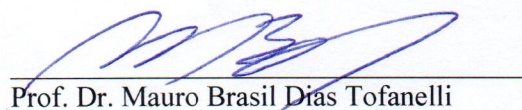
Título da Dissertação: “**Germinação e Micropropagação de Mirtilheiro Vaccinium Ashei**”.

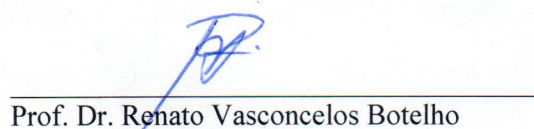
Nome: Ana Paula de Azevedo Pasqualini

Orientador: Ricardo Antonio Ayub

Aprovado pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub


Prof. Dr. Mauro Brasil Dias Tofanelli


Prof. Dr. Renato Vasconcelos Botelho

Data da Realização: 06 de dezembro de 2013.

DEDICO

Ao meu querido esposo, Augusto, pelo amor, carinho e companheirismo e por compartilhar dificuldades e alegrias, sempre estendendo sua mão amiga.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida, saúde e por guiar meus passos.

À minha mãe Alzira pelo seu amor incondicional.

Aos meus irmãos Cassia, Silvia, Carlos, Cassiano e Cezar pelo amor, amizade e companheirismo.

À minha sogra Rosecler, por sempre me acolher como uma filha.

Às minhas cunhadas Paola, Tatiana e Graciela, pela amizade e por tornarem minha vida em Ponta Grossa mais feliz.

Aos meus sobrinhos pelas alegrias que me proporcionam por ser tia.

Ao amigo e professor Ricardo Antonio Ayub, pela dedicação, confiança, ideias e orientação que tanto ajudaram no meu desenvolvimento acadêmico.

Ao professor Renato Vasconcelos Botelho, pela significativa orientação na redação dos trabalhos.

Aos amigos Bruna, Isis, Tânia, Precila, Alexandre, Letícia, Gabriella, Aline, Laíse e Jessé, pelo apoio durante as atividades e pelos momentos de descontração.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, aos professores e ao Programa de Pós Graduação em Agronomia, pela dedicação e estruturas que permitiram que o trabalho fosse realizado.

Ao Governo do Estado do Paraná pelo afastamento remunerado das atividades funcionais para realização do mestrado.

À Fundação Araucária pelo financiamento do projeto.

Aos funcionários da UEPG: Wilson Padilha, pela amizade e ajuda nas análises laboratoriais e Nilcéia, por sempre colaborar nas atividades administrativas.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa e para a conquista do título de Mestre em Agronomia.

Não sou o que deveria ser, mas não sou o que era antes.

(Martin Luther King)

RESUMO

Nos últimos anos, o cultivo do mirtilheiro (*Vaccinium ashei* Reade) tem despertado a atenção de produtores, comerciantes e consumidores. No entanto, a sua expansão é limitada em razão da indisponibilidade de variedades adequadas às diferentes regiões brasileiras, dificuldades de propagação e escassez de mudas de qualidade. Entender os processos envolvidos na germinação das sementes é importante quando se busca obter variabilidade genética e novas cultivares adaptadas a condições edafoclimáticas distintas. Já a micropropagação é uma alternativa para a obtenção de um grande número de mudas sadias, em curto espaço de tempo, através de propagação clonal. Nesse contexto, visando favorecer o estabelecimento da cultura na região dos Campos Gerais, buscou-se neste trabalho estudar a propagação seminífera e a micropropagação do mirtilheiro, sendo seus objetivos determinar o comportamento germinativo e níveis de viabilidade de sementes de *Vaccinium ashei* Reade cultivares Briteblue e Climax por meio dos testes de germinação e de tetrazólio; elaborar protocolo para estabelecimento *in vitro* de mirtilheiro (*Vaccinium ashei* Reade) cv. Brightwell, em meio WPM, na presença de 2iP e avaliar a influência do tiosulfato de prata nesta fase inicial da cultura de tecidos. Em relação à propagação seminífera, observou-se através do teste de germinação que sementes de mirtilo das cultivares Briteblue e Climax submetidas a tratamentos oriundos da combinação das variáveis - exposição ou não ao KOH, substratos (SP e MS/2) e temperaturas (10°C e 25°C) - demandam acima de 46 dias para a emissão da primeira plântula normal e, após 6 meses do início do teste, a porcentagem de germinação não ultrapassa 40%. Já o teste de tetrazólio, baseado na coloração dos tecidos, permite o estabelecimento de diferentes níveis de viabilidade para sementes das cvs Briteblue e Climax. Na micropropagação do mirtilheiro cv. Brightwell, o uso do meio de cultura WPM, acrescido de 5 mg.L⁻¹ de 2iP, no estágio de estabelecimento *in vitro* a partir de segmentos nodais, permite a obtenção de primórdios foliares e brotações após 30 dias de cultivo, sendo que o uso de 45 µM de STS nesta fase favorece o desenvolvimento das gemas vegetativas e folhas.

Palavras-chave: *Vaccinium ashei* Reade, teste tetrazólio, regulador vegetal, etileno.

ABSTRACT

In recent years, the cultivation of blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) has attracted the attention of producers, traders and consumers. However, its expansion is limited by unavailability of appropriate varieties to the different Brazilian regions, difficulties in their propagation and shortage of seedlings of quality. Understanding the processes involved in seed germination is important when seeking to obtain genetic variability and new cultivars adapted to different edaphoclimatic conditions. Yet, the micropropagation is an alternative for obtaining a large number of healthy plants, in a short time, through clonal propagation. In this context, aiming to support the crop establishment in the Campos Gerais region, it was sought in this paper to study the seminiferous propagation and micropropagation of the blueberry, being its objectives to evaluate the germination behavior and viability levels of *Vaccinium ashei* Reade seeds, Briteblue and Climax cultivars, by means of germination and tetrazolium tests; elaboration of protocol for establishing blueberry *in vitro* (*Vaccinium ashei* Reade) cv. Brightwell, in WPM medium, in the presence of 2iP and evaluate the influence of silver thiosulfate in this initial phase of tissue culture. In relation to the seminiferous propagation, it was observed through the germination test that blueberry seeds of cultivars Briteblue and Climax submitted to treatments derived from the combination of variables - exposure or not to KOH, substrates (SP and MS/2) and temperatures (10°C and 25°C) - requires over 46 days for the issuing of the first normal seedling, and after 6 months from the beginning of the test the germination percentage does not exceed 40%. Otherwise, the tetrazolium test, based on staining of tissues, allows the establishment of different levels of viability for seeds of cvs Briteblue and Climax. In the micropropagation of blueberry cv. Brightwell, the use of medium culture WPM, added of 5 mg.L⁻¹ 2iP, in the *in vitro* establishment stage from nodal segments allows to obtain primordial leaves and shoots after 30 days of cultivation, whereas the use of 45 mM of STS at this stage supports the development of vegetative buds and leaves.

Keywords: *Vaccinium ashei* Reade, tetrazolium test, plant growth regulator, ethylene

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 - Representação da semente de *Vaccinium angustifolium*.20
- FIGURA 2 - Coloração do embrião (a) morta (b) 0% (c) 25% (d) 50% (e) 75% e (f) 100% de sementes de mirtilo cv. Briteblue tratadas com solução de 2,3,5 trifenil brometo de tetrazólio. Ponta Grossa, PR, 2013.....40
- FIGURA 3 - Coloração do embrião (a) morta (b) 0% (c) 25% (d) 50% (e) 75% e (f) 100% de sementes de mirtilo cv. Climax tratadas com solução de 2,3,5 trifenil brometo de tetrazólio. Ponta Grossa, PR, 2013.....41
- FIGURA 4 - Estabelecimento *in vitro* de mirtilheiro (*Vaccinium ashei* Reade) cv. Brightwell. a) Brotação aos 30 dias de cultivo. b) Brotação senescente aos 60 dias de cultivo.50
- FIGURA 5 - Efeito do tiosulfato de prata no estabelecimento *in vitro* de mirtilheiro (*Vaccinium ashei* Reade) cv. Brightwell após 60 dias de cultivo. Ponta Grossa, 201360
- FIGURA 6 - Necrose foliar de mirtilheiro *Vaccinium ashei* Reade cv. Brightwell, tratados com tiosulfato de prata, após 60 dias de cultivo *in vitro*. Ponta Grossa, 2013.61

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

GRÁFICO 1 - Germinação de sementes mirtilo cv. Briteblue em diferentes tratamentos germinativos. Ponta Grossa, PR, 2012.	37
GRÁFICO 2 - Germinação de sementes mirtilo cv. Climax em diferentes tratamentos germinativos. Ponta Grossa, PR, 2012.	38
GRÁFICO 3 - Porcentagem de coloração do embrião de sementes mirtilo (a) cv. Briteblue e (b) cv. Climax, tratadas com 2,3,5 trifenil brometo de tetrazólio.....	42
GRÁFICO 4 - Porcentagem de sobrevivência, emissão de primórdios foliares e brotações, no estabelecimento <i>in vitro</i> de mirtileiro (<i>Vaccinium ashei</i> Reade) cv. Brightwell, através de segmentos nodais.	50
GRÁFICO 5 - Curva de tendência e respectiva equação entre a concentração de STS (μM) e o número de gemas com brotações em explantes de mirtileiro <i>Vaccinium ashei</i> Reade cv. Brightwell, após 60 dias de cultivo <i>in vitro</i>	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Resultados da análise de variância dos dados de porcentagem de germinação de sementes de *Vaccinium ashei* Reade cultivares Briteblue e Climax. **36**

TABELA 2 - Porcentagem de explantes sobreviventes e que desenvolveram de primórdios foliares, após 60 dias de cultivo *in vitro*, de mirtilheiro *Vaccinium ashei* Reade cv. Brightwell, em meio de cultura contendo diferentes concentrações de STS. Ponta Grossa, 2013**57**

TABELA 3 - Resultados da análise de variância dos dados de número de gemas com brotações, número de folhas, comprimento maior brotação no cultivo *in vitro* de mirtilheiro *Vaccinium ashei* Reade cv. Brightwell em meio de cultura contendo diferentes concentrações de STS**58**

TABELA 4 - Médias do número de gemas com brotações, número de folhas, comprimento maior brotação no cultivo *in vitro* de mirtilheiro *Vaccinium ashei* Reade cv. Brightwell em meio de cultura contendo diferentes concentrações de STS**59**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 TAXONOMIA E DISTRIBUIÇÃO.....	16
2.2 MORFOLOGIA	17
2.3 MÉTODOS DE PROPAGAÇÃO	18
2.3.1 Propagação seminífera	20
2.3.2 Estaquia	24
2.3.3 Micropropagação.....	27
3 DETERMINAÇÃO DO COMPORTAMENTO GERMINATIVO E DE NÍVEIS DE VIABILIDADE DE SEMENTES DE MIRTILO POR MEIO DE TESTE DE GERMINAÇÃO E DE TETRAZÓLIO	30
3.1 INTRODUÇÃO	32
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
3.4 CONCLUSÃO.....	42
4 ESTABELECIMENTO DE MIRTILEIRO <i>IN VITRO</i>, CULTIVAR BRIGHTWELL	44
4.1 INTRODUÇÃO	46
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.4 CONCLUSÃO.....	51
5 ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE MIRTILEIRO (<i>Vaccinium ashei</i> Reade) CV. BRIGHTWELL CULTIVADO COM TIOSSULFATO DE PRATA	52
5.1 INTRODUÇÃO	54
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	55
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.4 CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXO	73

1 INTRODUÇÃO

O mirtilo, popularmente denominado *blueberry*, em inglês, ou *arándano*, em espanhol, é uma espécie frutífera nativa dos Estados Unidos e Canadá que tem despertado o interesse dos consumidores brasileiros, principalmente devido à busca da população por uma alimentação que ofereça maiores benefícios para a saúde. No caso do mirtilo estes benefícios estão associados aos elevados níveis de pigmentos antocianinos, alto poder antioxidante e propriedades nutracêuticas presentes no fruto.

As expectativas promissoras ligadas ao cultivo do mirtilo estão relacionadas às propriedades funcionais do fruto, destacando-se entre outras vantagens, a alternativa de renda para pequenas propriedades rurais, produção agroecológica, não incidência de problemas fitossanitários expressivos, elevada remuneração com a comercialização, ampla possibilidade de transformação através de processos industriais e oportunidades de exportação.

Os maiores produtores de mirtilo na América do Sul são Chile, Argentina e Uruguai, respectivamente. Já no Brasil, em 2012, a área de mirtilheiro plantada nas regiões Sul e Sudeste foi de aproximadamente 270 hectares. Apesar da pequena produção, a cultura tem aguçado o interesse de produtores nacionais em consequência de suas potencialidades econômicas.

Para as regiões frias do sul do Brasil, as cultivares dos grupos rabbiteye e highbush têm sido as mais recomendadas, porém ainda são poucos os estudos sobre as variedades adaptadas aos diferentes climas e microclimas locais. Em busca de cultivares adaptadas às distintas condições edafoclimáticas, pode-se testar materiais genéticos existentes ou desenvolver novas variedades através de programas de melhoramento.

A variabilidade genética é a base para os programas de melhoramento e ocorre por meio da propagação por sementes, onde novos genótipos podem ser selecionados. Neste caso, conhecer o comportamento fisiológico e a qualidade das sementes é essencial para a obtenção de novas variedades adaptadas às diferentes regiões.

A propagação clonal de espécies lenhosas pode ser realizada por meio de estaquia e micropropagação, sendo as estaquias herbácea e semilenhosa utilizadas na produção de mudas de mirtilheiro em escala comercial. Algumas dificuldades entretanto têm sido observadas no uso destes métodos, como a escassez de ramos para a produção de estacas e a baixa porcentagem de enraizamento de algumas cultivares.

Já a micropropagação tem sido uma alternativa para disponibilizar mudas de mirtilheiro, pois oferece vantagens como rápida multiplicação clonal, obtenção de plantas livres de doenças e independência de fatores sazonais, além de permitir a propagação de espécies difíceis de serem multiplicadas por outros métodos. Outra característica positiva da micropropagação é o rejuvenescimento do material vegetal obtido pelos repiques sucessivos e consequente restauração da competência de enraizamento.

Mesmo com os avanços na micropropagação do mirtilheiro, alguns problemas ainda não foram resolvidos, como a formação de calo na base dos explantes, a ocorrência de brotações adventícias espontâneas e diferentes respostas entre os genótipos durante a micropropagação. Além disso, plantas micropropagadas emitem gás etileno no interior do recipiente, sendo que o acúmulo deste hormônio pode ser desfavorável para o desenvolvimento da cultura. Definir as melhores condições de cultivo *in vitro* e desenvolver protocolos específicos para as diferentes cultivares são ações importantes para viabilizar a micropropagação em escala comercial.

No Brasil, o cultivo do mirtilheiro revela-se como uma nova alternativa na área da fruticultura, no entanto a carência de variedades adequadas às diferentes condições de clima e solo, a dificuldade de encontrar mudas com identidade varietal, parte aérea vigorosa e com bom sistema radicular e a falta de protocolos comercialmente viáveis de micropropagação são alguns fatores dificultadores da expansão do mirtilheiro.

Sendo assim, objetivou-se neste estudo determinar o comportamento germinativo e níveis de viabilidade de sementes de *Vaccinium ashei* Reade cultivares Briteblue e Climax por meio dos testes de germinação e de tetrazólio; elaborar protocolo para estabelecimento *in vitro* de mirtilheiro (*Vaccinium ashei* Reade) cv. Brightwell, em meio WPM, na presença de 2iP e avaliar a influência do tiossulfato de prata nesta fase inicial da cultura de tecidos.

Deste modo, espera-se colaborar para o desenvolvimento da cultura do mirtilheiro, buscando elucidar o comportamento fisiológico de suas sementes, contribuir para os programas de melhoramento através do desenvolvimento de novas cultivares e expandir os conhecimentos sobre a micropropagação desta espécie favorecendo a produção de mudas de qualidade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nos últimos anos, o cultivo de pequenas frutas tem despertado a atenção de produtores, comerciantes e consumidores no Brasil, entre elas o mirtilo (SILVA et al., 2007).

O mirtilo apresenta grande importância comercial nos países da Europa e Estados Unidos, sendo muito apreciado pelo seu sabor exótico e principalmente por suas propriedades nutraceuticas, ou seja, pelo seu importante conteúdo nutricional e terapêutico (SILVA et al., 2006). Considerado uma das mais ricas fontes de antioxidantes entre frutas e legumes (WANG et al., 2012), assim como de muitos nutrientes essenciais como flavonóides, exibe uma ampla gama de efeitos biológicos, incluindo propriedades anticarcinogênicas (KAHKONEN; HOPIA; HEINONEN, 2001). O elevado consumo da fruta pode reduzir significativamente as taxas de mortalidade por câncer, desordens cardiovasculares e outras doenças degenerativas causadas por estresses oxidativos (ZHENG; WANG, 2003).

Na casca do mirtilo estão presentes grandes quantidades de antocianinas, compostos fenólicos com atividade antioxidante (SEVERO et al., 2009), que oferecem vantagens para a saúde como a proteção contra danos celulares ocasionados pelos radicais livres que são formados durante o metabolismo (WU et al., 2005), atuando no retardamento dos processos oxidativos da membrana lipoproteica (FARIA et al., 2005). As antocianidinas, contidas nos pigmentos de cor azul-púrpura do mirtilo, favorecem a visão, oferecem enormes benefícios à pele, aos vasos sanguíneos, combatem problemas circulatórios, transtornos cardíacos, feridas externas e internas, edema, artrites e artroses (ANTUNES; RASEIRA, 2006).

Dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) indicam que os Estados Unidos detêm 50% da produção mundial da fruta, seguidos pelo Canadá, com 33% e pelo continente europeu com 16%, cabendo ao restante do mundo apenas 1% de participação no volume produzido; embora os EUA sejam o maior produtor mundial, não são autossuficientes e importam 82% da produção do restante do mundo (MADAIL; SANTOS, 2007).

As perspectivas de cultivo do mirtilo nos países do hemisfério Sul são animadoras, principalmente porque sua época de colheita coincide com a entressafra dos países maiores produtores e, ao mesmo tempo, maiores consumidores

(SANTOS, 2004). Além disso, existe um mercado capaz de absorver 250.000 toneladas anuais de mirtilo, como é o caso dos Estados Unidos, país que possui fortemente em seus costumes o consumo desta fruta (MONTEIRO, 2004). Na América do Sul, destacam-se como maiores produtores o Chile e a Argentina, com 2.500 ha e 1.300 ha, respectivamente (MONTEIRO, 2004). Já a participação brasileira no mercado de pequenas frutas ainda é tímida (POLL et al., 2013).

Alguns fatores dificultam a expansão do mirtilheiro em terras brasileiras, tais como as condições de clima e solo, o crescimento lento da planta, as dificuldades no manejo da colheita, a escassez de mudas, devido a dificuldades de propagação em algumas cultivares (PEÑA et al., 2012), e a falta de indicação de variedades adaptadas às diferentes condições edafoclimáticas (FISCHER et al., 2014).

A cultura do mirtilheiro, porém, encontra-se em fase de desenvolvimento no sul do Brasil e muitos esforços têm sido realizados para auxiliar técnicos e produtores em busca de um sistema de produção eficiente e competitivo (RASEIRA; ANTUNES, 2004), justificando a necessidade de novas pesquisas que venham contribuir para o desenvolvimento da cultura.

2.1 TAXONOMIA E DISTRIBUIÇÃO

O mirtilheiro é uma espécie frutífera de clima temperado, pertencente à família Ericaceae, subfamília Vaccinioideae, gênero *Vaccinium* (SHARPE, 1980), seção *Cyanococcus*. O gênero inclui cerca de 400 espécies, sendo 40% nativas do sudoeste da Ásia, 25% da América do Norte e 10% das Américas Central e do Sul, com o restante espalhadas pelo mundo (DARNELL, 2006). A maior parte da produção de mirtilos origina-se de cultivares derivadas principalmente de quatro grupos: highbush, lowbush, rabbiteye e de seus híbridos (ROWLAND et al., 2012), sendo as principais espécies destes grupos o *Vaccinium corymbosum* L., *Vaccinium angustifolium* Ait. e o *Vaccinium ashei* Reade, respectivamente (RETAMALES; HANCOCK, 2012). Cultivares do grupo highbush dividem-se em northern highbush ou southern highbush dependendo do requerimento e resistência ao frio (RETAMALES; HANCOCK, 2012). As cultivares dos grupos highbush e rabbiteye

apresentam baixo requerimento em frio quando comparadas ao grupo lowbush (LOHACHOOMPOL et al, 2008).

O grupo highbush (mirtilo gigante), originário da costa oeste da América do Norte, é tetraplóide e apresenta produção de melhor qualidade dentre os outros grupos, tanto em tamanho quanto em sabor dos frutos; o grupo rabbiteye, originário do sul da América do Norte, é hexaplóide, apresenta maior produção por planta, significativa importância comercial em regiões com menor disponibilidade de frio e seus frutos têm maior conservação em pós-colheita; já o grupo lowbush, originário do nordeste dos Estados Unidos e partes do Canadá, é diplóide (DARNELL, 2006; FACHINELLO, 2008), tem hábito de crescimento rasteiro e produz frutos de pequeno tamanho, cujo destino é a indústria processadora (FACHINELLO, 2008).

No Brasil, os mirtilheiros originam-se predominantemente do grupo rabbiteye, do qual as variedades mais plantadas são Aliceblue, Bluebelle, Bluegem, Briteblue, Climax, Delite, Powderblue e Woodard, e do grupo southern highbush, do qual as variedades mais plantadas são Misty, O'Neal e Georgiagem (CANTUARIAS-AVILÉS, 2010).

2.2 MORFOLOGIA

O mirtilheiro é um arbusto, de hábito ereto (highbush e rabbiteye) ou rasteiro (lowbush) (RODRIGUES et al., 2007). As espécies de mirtilheiros comerciais alcançam alturas de 0,20 m para o grupo lowbush, de 4 m para o grupo highbush e 6 m para o grupo rabbiteye (DARNELL, 2006).

Apresentam folhas decíduas, dispostas de forma alternada ao longo dos galhos e variam amplamente o aspecto do limbo de acordo com a espécie, podendo apresentar-se de forma elíptica, espatulada, oblanceolada ou ovada (RETAMALES; HANCOCK, 2012).

Mirtilheiros dos grupos highbush e rabbiteye apresentam raízes finas, fibrosas, com ausência de pelos radiculares, geralmente, não apresentam raiz principal (DARNELL, 2006) e fazem simbiose com fungos micorrízicos para superar a carência nutricional (BOWLING, 2005). Devem ser cultivados em solos ácidos, com

pH em água entre 4 e 5,5, arenosos, franco-arenosos ou argilosos, não muito profundos e de baixa fertilidade (FREIRE, 2007).

As flores individuais são perfeitas, com uma corola simpétala com quatro ou cinco lóbulos que podem ter forma campanulada, de sino ou de urna (SILVEIRA et al., 2009). Os estames são em número de oito ou dez, geralmente o dobro do número de lóbulos da corola e as anteras têm a forma de tubos ocos, alongados, com um poro na extremidade, por onde sai o pólen (SILVEIRA et al., 2009).

Na produção comercial, é fundamental a presença de abelhas para a realização da polinização, pois algumas cultivares não são autoférteis e necessitam de polinização cruzada (FACHINELLO, 2008), como é o caso de mirtilheiros do grupo rabbiteye, que geralmente apresentam algum grau de incompatibilidade, sendo aconselhável o plantio de mais uma cultivar (SILVEIRA et al., 2009). Já mudas obtidas por sementes descartam a necessidade do plantio de uma segunda cultivar de polinização cruzada (JAMIESON, 2008).

Os frutos são do tipo baga, azul-escuro quando maduros, de formato achatado, com muitas sementes, envolvidas em uma polpa de coloração esbranquiçada, de sabor doce-ácido (RODRIGUES et al., 2007), com aproximadamente 1 a 2,5 cm de diâmetro e 1,5 a 4 g de peso (FACHINELLO, 2008).

2.3 MÉTODOS DE PROPAGAÇÃO

As principais técnicas utilizadas para a propagação do mirtilheiro incluem propagação por sementes, estaquia (herbácea, lenhosa e semilenhosa) e a micropropagação (MAINLAND, 2006).

A propagação de mirtilheiro por sementes não é utilizada em nível comercial, em razão da segregação genética, que origina descendentes com caracteres distintos aos da planta-mãe (HOFFMANN; FACHINELLO; SANTOS, 1995). A maioria das características, tal como tamanho, cor e sabor dos frutos, juntamente com o arbusto e a produção são inferiores à planta mãe (MAINLAND, 2006), entretanto esta técnica é muito utilizada para o desenvolvimento de novas cultivares (MAINLAND, 2006).

Programas de melhoramento têm focado a melhoria de espécies de *Vaccinium* desde o início do século XX (HUXLEY, 1992). Como resultado, existem atualmente numerosos híbridos e cultivares, adequados a condições específicas de crescimento.

No Brasil, as cultivares de mirtilheiro, exploradas economicamente, foram introduzidas de outros países, sendo selecionadas em diferentes condições edafoclimáticas, podendo assim apresentar limitações para seu cultivo (FISCHER et al., 2014). Com o objetivo de obtenção de plantas superiores mais adaptadas para as condições brasileiras, Fischer et al., (2014) selecionaram 10 genótipos com bom desenvolvimento vegetativo, frutos de boa qualidade e de tamanho adequado ao mercado consumidor, a partir de 3.554 plantas, provenientes de sementes das cultivares Bluegem (1.212 plantas), Bluebelle (1.439 plantas) e Powderblue (903 plantas).

A estaquia é o principal método de propagação do mirtilheiro, sendo uma de suas vantagens a manutenção da estrutura genética da planta (FACHINELLO et al., 1995). A viabilidade de seu uso depende da capacidade de formação de raízes adventícias de cada espécie e/ou cultivar, estado nutricional da planta matriz, da qualidade do sistema radicular formado e do desenvolvimento posterior da planta propagada na área de produção (ANTUNES; RASEIRA, 2006; PEÑA et al., 2012).

Já micropropagação tem sido difundida como um método eficiente na propagação de variedades de mirtilheiro em escala comercial no Uruguai (CASTILLO et al., 2004). O uso da técnica, além da produção de grande quantidade de plantas em curto período de tempo, permite a obtenção de plantas livres de doenças e a propagação de espécies difíceis de serem multiplicadas por outros métodos (DAMIANI; SCHUCH, 2009). Adicionalmente, as técnicas de cultivo *in vitro* são pré-requisito para a maioria dos métodos de transformação, os quais podem complementar os programas de melhoramento convencionais (MEINERS; SCHWAB; SZANKOWSKI, 2007).

2.3.1 Propagação seminífera

O sucesso nas iniciativas de melhoramento genético exige o conhecimento da ecofisiologia das sementes, principalmente da germinação em condições naturais e artificiais (LABOURIAU, 1990; ARAÚJO NETO et al., 2005). O entendimento dos fatores que afetam a germinação das sementes de mirtilheiro é importante a fim de determinar as condições ótimas para realização dos testes de germinação que irão servir de apoio aos programas de melhoramento na busca pela obtenção de novas cultivares.

A semente é o resultado do desenvolvimento de um óvulo fertilizado, sendo nas angiospermas basicamente constituídas por três estruturas: (1) o embrião, que se desenvolve a partir do zigoto diplóide, formado pela fusão de um núcleo gamético com a oosfera; (2) o endosperma, proveniente da fusão dos núcleos polares com o segundo núcleo gamético; e (3) o tegumento, formado a partir dos integumentos que envolvem o óvulo, sendo, portanto, de origem materna (KERBAUY, 2004).

Sementes de *Vaccinium angustifolium* apresentam coloração marrom-vermelho, superfície reticulada, semicurva, massa em torno de 4,3 g, comprimento de 1,5 mm, largura de 1 mm e embrião branco em um endosperma granuloso (BELCHER, 1985).

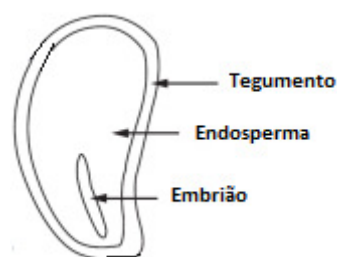


FIGURA 1 - Representação da semente de *Vaccinium angustifolium*.

Fonte: BELCHER, 1985.

Quanto ao comportamento em relação ao armazenamento, as sementes podem ser classificadas como ortodoxas, recalcitrantes e intermediárias. Este aspecto fisiológico está relacionado com o grau de tolerância das sementes à desidratação, fato que irá classificá-las como tolerantes à dessecação ou ortodoxas;

não tolerantes à dessecação ou recalcitrantes e ainda intermediárias, cujo comportamento durante a secagem e armazenamento apresenta ora características semelhantes às ortodoxas ora às recalcitrantes (MEDEIROS; EIRA, 2006).

Estudos sugerem que sementes de *Vaccinium* apresentam comportamento ortodoxo em relação ao armazenamento, porém, sementes armazenadas secas à temperatura ambiente exibiram pobre germinação, ao passo que, quando extraídas de frutos frescos e semeadas imediatamente, germinaram com 80% de sucesso (GRIFFIN; BLAZICH, 2008).

A germinação é o reinício do crescimento do embrião paralisado nas fases finais da maturação da semente; para que este processo ocorra, é preciso que determinadas condições sejam satisfeitas, tais como: a semente deve ser viável, suas condições internas devem ser favoráveis à germinação (livre de dormência), as condições ambientais devem ser propícias (água, temperatura, oxigênio, luz) e as condições de sanidade devem ser satisfatórias (POPINIGIS, 1985).

Segundo Brasil (2009), sementes viáveis são aquelas capazes de produzir plântulas normais em um teste de germinação sob condições favoráveis, depois de superada a dormência, ou após a desinfecção das mesmas, quando necessária.

Sementes dormentes não germinam em condições ambientais normalmente consideradas favoráveis ou adequadas, ou seja, apresentam algum bloqueio interno à germinação, o qual deve ser superado por intermédio de um processo conhecido como pós-maturação ou quebra de dormência, para que então a semente fique apta a germinar (CARDOSO, 2009).

A baixa, lenta e assíncrona germinação são indícios de dormência em sementes (MENDES-RODRIGUES et al., 2010). Embora haja relatos sobre quebra de dormência e requisitos para germinação de sementes de várias espécies de *Vaccinium*, é difícil determinar a partir dos dados publicados se as sementes maduras frescas deste gênero são dormentes ou não dormentes (BASKIN; BASKIN, 1998; BASKIN et al., 2000).

A dormência em sementes pode ser classificada em: fisiológica, morfológica, morfofisiológica, física, combinada (fisiológica e física) e química (BASKIN; BASKIN, 2004). A dormência fisiológica ocorre quando o embrião apresenta algum mecanismo fisiológico específico que impeça a protusão da raiz primária; a dormência morfológica ocorre em espécies que apresentam embrião rudimentar ou imaturo, ou seja, sementes em que o embrião não completou o seu crescimento ou

desenvolvimento final; a dormência morfofisiológica se diferencia pelo subdesenvolvimento do embrião durante a maturação, condicionado a um mecanismo fisiológico; a dormência física está associada à impermeabilidade das sementes à água, com proteção de camadas de células simples ou duplas lignificadas; no caso da dormência combinada o revestimento da semente é impermeável à água e, além disso, o embrião é fisiologicamente dormente. Já a dormência química refere-se à dormência imposta pela presença de inibidores no pericarpo dos frutos (VIVIAN et al., 2008).

Para a superação de dormência fisiológica, pode-se utilizar algumas técnicas como o pré-esfriamento, pré-aquecimento, armazenamento em local seco por um curto período de tempo, umedecimento inicial do substrato com uma solução de Nitrato de Potássio — KNO_3 ou ácido giberélico — GA_3 e germinação à baixa temperatura (BRASIL, 2009).

O pré-resfriamento (estratificação) é um método de superação de dormência fisiológica utilizado para sementes que requerem tempo para a germinação, a fim de que ocorram as alterações de natureza física ou bioquímica que possibilitem a germinação. Para *Vaccinium angustifolium*, o pré-resfriamento, a 3-5°C, por 60 dias, seguido de germinação em temperatura de 20-30°C, proporciona 50-60% de germinação, sendo a primeira contagem aos 7 dias e a última aos 35 dias (BELCHER, 1985). Para *Vaccinium membranaceum*, a estratificação de 1 a 3°C por 14 ou 28 dias aumenta ligeiramente as porcentagens máximas de germinação (BARNEY; SHAFII; PRICE, 2001). Já sementes de *Vaccinium myrtillus* não estratificadas e germinadas à temperatura de 20:10 ou 25:15°C apresentam porcentagem de germinação superior às estratificadas (1°C por 12 semanas) (BASKIN et al., 2000). A literatura a respeito de pré-tratamentos para sementes de mirtilheiros, não é conclusiva e o requerimento de frio parece ser específico para cada espécie (GRIFFIN; BLAZICH, 2008).

Tratamentos com ácido giberélico (GA) têm mostrado promover a germinação em *Vaccinium* (GRIFFIN; BLAZICH, 2008). Em *Vaccinium ashei* Reade, o uso de GA (cv. Bluebelle) e GA seguido 60 dias de estratificação a frio (cv. Bluegem) proporcionou um aumento na porcentagem de germinação (FISCHER et al., 2010).

Para a superação de dormência física em sementes, Brasil (2009) sugere o uso de embebição em água por um período de 24 a 48 horas, a escarificação mecânica através de cuidadosa perfuração, a remoção de uma lasca, a superaração

da dureza no tegumento da semente com o uso de lima ou lixa de papel e a escarificação química feita geralmente com ácidos (sulfúrico, clorídrico etc.). Já o uso do KOH também tem sido citado para escarificação química. Em *Zoysia japonica* Steud., a escarificação com KOH 5,4 M durante 15 minutos aumentou a germinação pela quebra de polímeros do tegumento (XU et al., 2005).

Entre os fatores ambientais que interferem na germinação de sementes está a luz e a temperatura. As sementes da maioria das plantas cultivadas germinam tanto na presença como na ausência de luz; sendo que a exigência de luz para germinar, por parte de determinadas espécies, está relacionada a um tipo de dormência (POPINIGIS, 1985). A resposta à luz, assim como para os demais fatores, apresenta-se de forma distinta entre as espécies, estando relacionada principalmente aos fitocromos, cujo o na superação da dormência é um dos poucos mecanismos totalmente conhecidos que atuam na germinação (VIVIAN et al., 2008). Em relação à temperatura, embora a germinação possa ocorrer dentro de limites amplos, existem temperaturas em que a eficiência do processo germinativo é total, possibilitando a máxima velocidade, uniformidade e a porcentagem de germinação (MARTINS et al., 2000).

Vários regimes de temperatura podem afetar a germinação de *Vaccinium spp.* (LOPEZ et al., 2008). Baskin et al., (2000) observaram a porcentagem de germinação em sementes maduras frescas de *Vaccinium myrtillus* L., *Vaccinium vitis-idaea* L. e *Vaccinium uliginosum* L. na presença de luz, nas temperaturas alternadas de 20:10°C (62 a 100%), 25:15°C (1 a 12%) e 15:5°C, sendo que nesta última as sementes não germinaram. Já a iluminação contínua e a temperatura de $18 \pm 2^\circ\text{C}$ auxiliaram na promoção da germinação de sementes de *Vaccinium meridionale* Swartz (CASTRO et al., 2012).

A realização de testes de germinação de sementes em condições de campo geralmente não é satisfatória, pois, dada a variação das condições ambientais, os resultados nem sempre podem ser fielmente reproduzidos. Em contrapartida o uso de métodos de análise em laboratório, efetuada em condições controladas (ótimas), permite uma germinação mais regular, rápida e completa, propiciando repetitividade e reprodutibilidade das amostras de sementes de uma determinada espécie (BRASIL, 2009).

Em condições laboratoriais, o substrato influencia diretamente na germinação, em função de sua estrutura, aeração, capacidade de retenção de água, grau de

infestação de patógenos, entre outros, podendo favorecer ou prejudicar a germinação das sementes (MARTINS; MACHADO; CAVASINI, 2008). De acordo com Brasil (2009), os tipos de substratos mais utilizados são: areia e os papéis mata-borrão, toalha e de filtro.

Porcentagens de germinação superiores a 80% foram obtidas para sementes *Vaccinium ashei* Reade, cv. Bluebelle e Bluegem, semeadas em bandejas plásticas, utilizando como substrato areia de granulação média, cobertas com vermiculita e mantidas em estufa (FISCHER et al., 2010). Para *Vaccinium angustifolium* Ait., o teste de germinação foi conduzido em placas de Petri, utilizando como substrato papel filtro (GAO; ZHENG; LAWRENCE, 1998), assim como para *Vaccinium meridionale* Swartz (HERNÁNDEZ et al., 2009).

Ao final de um teste de germinação pode ocorrer a presença de sementes não germinadas. Para distinguir sementes mortas de sementes viáveis, porém que não germinam, mesmo quando colocadas nas condições ótimas para a espécie ou que germinam lentamente em testes de rotina, é recomendada a realização do Teste de Tetrazólio (BRASIL, 2010). Neste teste, sementes de *Vaccinium* devem ser embebidas em água por 24 horas e mergulhadas em solução tetrazólio 1%, sendo a avaliação através de corte longitudinal (BELCHER, 1985).

2.3.2 Estaquia

A estaquia é o termo utilizado para a propagação vegetativa por meio de estacas; neste método pode-se utilizar qualquer segmento da planta (ramo, raiz ou folha) que, quando colocado em meio adequado, é capaz de formar raízes adventícias e de originar uma nova planta (FRAZON; CARPENEDO; SILVA, 2010).

O método de propagação por estaquia pode ser influenciado por diversos fatores, dentre os quais, as características inerentes à própria planta e às condições do meio ambiente; entre os fatores que podem melhorar os resultados, destacam-se o estágio de desenvolvimento da planta-matriz e do próprio ramo, a época do ano em que as estacas são coletadas, a presença de folhas na estaca, o uso reguladores de crescimento e a acomodação das estacas em câmara com nebulização intermitente (SCALOPPI JÚNIOR; MARTINS, 2014).

A estaquia é o principal método de propagação do mirtilheiro, no qual se pode utilizar estacas lenhosas, semilenhosas e herbáceas (ANTUNES; RASEIRA, 2006; SOUZA et al., 2011). Para a estaquia lenhosa de mirtilheiro, cultivares Powderblue, Delite, Climax, Bluebelle e Woodward, Fischer et al. (2008) utilizaram estacas de 15 a 20 cm de comprimento, diâmetro aproximado de 6 mm, com duas ou três folhas, livres da parte apical, colhidas no mês de agosto, enterradas quase totalmente em substrato facilmente drenado e irrigadas com água pH 5,0, ajustado com o redutor de pH Quimifol P30® (N total (1%); P₂O₅ solúvel em (CNA + água) (30%)) e obtivera porcentagem média de enraizamento superior a 65%, nos cinco cultivares, após 8 meses do início do experimento. A permanência das folhas superiores nas estacas auxiliam na regulação de auxinas, que são facilitadores da formação de raízes adventícias (ANTUNES; RASEIRA, 2006).

O uso do leito aquecido (temperatura do substrato 18 a 21°C) tem sido indicado na estaquia lenhosa de variedades do grupo highbush, retiradas durante o período de repouso hibernar (ANTUNES; RASEIRA, 2006). Do mesmo modo, o aquecimento do substrato tem melhorado o enraizamento das estacas coletadas no outono e no inverno, nas cultivares Bluegem, Bluebelle e Powderblue (rabbiteye) (MARANGON; BIASI, 2013).

Já o uso de estacas herbáceas, retiradas no ciclo vegetativo e colocadas em casa de vegetação, com sistema de nebulização intermitente e controle de temperatura e umidade relativa, tem sido o mais indicado para cultivares do grupo rabbiteye (SANTOS & RASEIRA, 2002; ANTUNES; RASEIRA, 2006). Marangon e Biasi (2013) avaliaram estaquia de mirtilheiro *Vaccinium ashei* (cv. Bluegem e Powderblue) nas diferentes estações do ano e observaram que, após 90 dias da instalação do experimento, as maiores porcentagens de enraizamento foram obtidas de estacas coletadas no verão, pois, no período do inverno, as plantas já se encontram em dormência, com baixa atividade fisiológica e apresentam maior lignificação dos ramos.

Fischer et al. (2008) detectaram que estacas lenhosas de *Vaccinium ashei* emitiram brotações, mas não enraizaram após quatro meses da instalação do experimento. Situação também observada por Marangon e Biasi (2013) onde estacas de mirtilheiros, cultivares Bluebelle, Bluegem e Powderblue, após três meses em casa de vegetação, apresentavam-se vivas, mas sem raízes, o que indica que o ambiente da estaquia apresenta condições adequadas para a manutenção

prolongada das estacas e que estas ainda tinham reservas suficientes para sua sobrevivência. Sendo assim, recomenda-se que a estaquia seja avaliada mais tardiamente.

O substrato e o uso de reguladores de crescimento são fatores externos que podem influenciar no sucesso da estaquia (FRAZON; CARPENEDO; SILVA, 2010). Para a estaquia de mirtilheiro, Hoffmann et al. (1995) recomendam o uso de areia acrescida de composto orgânico estabilizado e autoclavado (2:1 v/v) e areia pura, como substratos para enraizamento de estacas, sendo que a primeira mistura proporciona um maior crescimento das raízes adventícias.

Já o tratamento com reguladores do crescimento é um método eficiente para obtenção de raízes em estacas, principalmente em plantas de difícil enraizamento, aumentando a velocidade de formação de raízes, o número e a qualidade das raízes formadas, bem como a uniformidade de enraizamento (WENDLING; DUTRA; GROSSI, 2006).

O uso de reguladores do crescimento em estacas de mirtilheiro pode proporcionar enraizamento mais rápido e com percentuais mais elevados, sendo indicados o ácido indolacético, ácido indolpropiónico e o ácido indolbutírico (WAGNER JUNIOR et al., 2005). A imersão das estacas em solução de ácido indolbutírico (AIB) (2000 mg.L^{-1}) não influenciou o enraizamento e o desenvolvimento do sistema radicular de estacas herbáceas de cultivares de mirtilheiro Delite, Bluegem, Woodward e Climax (WAGNER JUNIOR et al., 2005). Já o aumento da concentração de AIB até 8.000 mg.L^{-1} elevou a porcentagem de estacas semilenhosas enraizadas nas cvs. Climax e Flórida (PEÑA et al., 2012).

Os fatores que influenciam o enraizamento de estacas são bastante variáveis e sua atuação pode se dar de maneira isolada ou por interação com os demais (TREVISAN et al., 2008). Para o mirtilheiro, a dificuldade de enraizamento de algumas cultivares tem limitado o uso da estaquia (PEÑA et al., 2012) o que motiva a busca por alternativas de propagação como a cultura de tecidos *in vitro*.

2.3.3 Micropropagação

A cultura de tecidos é a ciência de cultivar células vegetais, tecidos ou órgãos isolados da planta-mãe, em meios artificiais (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). Suas vantagens são: não requer um grande número de plantas-matrizes, uma vez que o processo pode ser iniciado com poucas gemas vegetativas; as plantas se desenvolvem em ambiente asséptico, livre de doenças; a propagação pode ocorrer o ano todo, independente da estação do ano; um grande número de plantas uniformes são produzidas em um período relativamente curto de tempo (SMAGULA, 2006).

Fator importante para iniciar a cultura de tecidos de plantas é a escolha do explante ideal. Para a micropropagação do mirtilheiro *Vaccinium corymbosum* cv. Berkeley podem ser utilizadas como fonte de explantes, estacas lenhosas, coletadas no inverno, e herbáceas coletadas na primavera (GONZALEZ et al., 2000). Para as cultivares Delite, Flórida e Powderblue, Silva et al. (2008) observaram que o uso de segmentos nodais de ramos herbáceos e lenhosos de plantas-matrizes com 1,5 ano, cultivadas em casa de vegetação não diferiram para o tipo de ramo doador dos explantes.

Alguns pré-tratamentos aplicados aos explantes poderão favorecer seu estabelecimento *in vitro*, como por exemplo, o frio; fator que pode ser benéfico na brotação dos segmentos nodais, permitindo assim uma maior porcentagem de estabelecimento de mirtilheiro (SILVA et al., 2006). Para a cultivar Delite, Silva et al. (2006) submeteram os ramos doadores dos explantes a um período de 15 dias na geladeira à temperatura de 5°C.

Explantes obtidos de brotações laterais novas de aproximadamente 15 cm, originados de ramos lenhosos dentro da sala de crescimento também são adequados para o estabelecimento *in vitro* de *Vaccinium ashei* Reade (SILVA et al., 2008).

O primeiro estágio da micropropagação vegetal é o estabelecimento do material *in vitro* (SMAGULA, 2006) que pode ser realizado a partir de segmentos nodais, com uma gema, tratados com álcool 70% e 1% de Tween-20 por 30 segundos, 0,1% (w/v) de benomil por 15 minutos e 0,5% (v/v) de hipoclorito de sódio por 20 minutos, em seguida é feita a lavagem por quatro vezes em água destilada autoclavada (GONZALEZ et al., 2000). Após a assepsia dos explantes, a próxima

etapa do estabelecimento é a introdução do material vegetal no meio de cultivo. Segundo Tetsumura et al. (2008), o meio de cultura mais usual na propagação *in vitro* do mirtilheiro tem sido o WPM (Wood Plant Media). Os meios basais Anderson, Zimmermann & Broome, Economou & Readna, MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e MW (mistura de MS e WPM em partes iguais) também são citados (TETSUMURA et al., 2008; CLAPA; FIRA; VESCAN, 2012). Na cultura de tecidos de mirtilheiro cv. Berkeley, o uso do meio MS levou à maior porcentagem de plantas com hiperidricidade (TETSUMURA et al., 2008).

Nesta fase inicial da micropropagação, as brotações laterais utilizadas como fonte dos explantes são cortadas em segmentos nodais, possuindo uma ou duas gemas vegetativas. A cisão da brotação gera um dano ao tecido vegetal, estimulando a produção de etileno.

O etileno (C_2H_4) é um gás em condição ambiente, produzido por todos os tecidos vegetais vivos, está envolvido na regulação de muitos aspectos do ciclo de vida da planta, incluindo germinação de sementes, iniciação de raízes, crescimento, desenvolvimento de flores, maturação dos frutos, senescência, abscisão de folhas e respostas a estresse biótico ou abiótico (LIN; ZHONG; GRIERSON, 2009). Durante a cultura de células de plantas, tecidos e órgãos, a produção de etileno é aumentada temporariamente quando ocorre um dano ao tecido, tornando-se importante durante o isolamento explante (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008).

Íons prata (Ag^+), geralmente ministrados *in vitro* como nitrato de prata ($AgNO_3$) ou sob a forma do complexo tiosulfato de prata (STS), é um inibidor eficaz da ação do etileno (STEINITZ et al., 2010).

Na micropropagação, a indução de brotações ocorre frequentemente após a adição de uma citocinina ao meio (GEORGE; HALL; DE KLERK, 2008). O uso de citocininas nesta fase tem como principal objetivo suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes, que se encontram isolados das regiões produtoras da planta-matriz (SILVA et al., 2006). Entre as citocininas utilizadas na micropropagação de *Vaccinium* estão a zeatina e o 2iP (SCHUCH et al., 2008). O uso de 25 μM de 2iP ou 18 μM de zeatina se mostrou eficiente no estabelecimento *in vitro* de *Vaccinium ashei* Reade, cv. Delite e *Vaccinium corymbosum*, cv. Berkeley (SILVA et al., 2006; GONZALEZ et al., 2000), sendo que a zeatina se mostrou mais efetiva na iniciação de segmentos nodais *in vitro* (REED; ABDELNOUR-ESQUIVEL, 1991; SILVA et al., 2006).

Para a multiplicação do material vegetal *in vitro*, geralmente, a concentração de citocinina utilizada na fase de indução é suficiente para permitir o crescimento contínuo das brotações (KRUL; MOWBRAY, 1984). Em busca de reduzir os custos da micropropagação nesta fase, estudos sobre o uso de biorreatores de imersão temporária têm sido realizados e mostrados eficientes para *Vaccinium corymbosum* e *Vaccinium angustifolium* Ait. (ROSS; CASTILLO, 2009; DEBNATH, 2011).

Uma das etapas que pode dificultar o estabelecimento de um protocolo de micropropagação é o enraizamento, pois o desenvolvimento do sistema radicular, a partir da formação de raízes adventícias em plantas propagadas vegetativamente sob condição *in vitro* ou *in vivo*, é um processo de grande complexidade, envolvendo fatores endógenos e exógenos que ainda não estão completamente elucidados (SOUZA; PEREIRA, 2007).

O enraizamento do mirtilheiro *in vitro* foi obtido por Damiani e Schuch (2009), através de explantes cultivados em meio WPM, ácido indolbutírico - AIB [$9 \mu\text{M.L}^{-1}$] e ágar [6 g.L^{-1}], em condições fotoautotróficas. O uso de substratos alternativos ao ágar também tem sido testado, entre eles a perlita que promove o desenvolvimento do sistema radicular e aumenta a porcentagem de enraizamento *in vitro* (DAMIANI; SCHUCH, 2009).

De acordo com Griffin e Blazich (2008), a multiplicação do material vegetal *in vitro* seguido de enraizamento *ex vitro* é uma técnica que pode ser utilizada na micropropagação de *Vaccinium*. Neste caso, para o enraizamento *ex vitro*, Pelizza et al. (2012) sugerem que sejam utilizadas brotações obtidas por micropropagação, com sete gemas, sete folhas e ápice caulinar e imersão da base por 10 minutos em solução de AIB [250 mg.L^{-1}]. Entre os substratos são aconselhados: vermiculita expandida de granulometria média, serragem curtida de pínus, Plantmax® acrescido de vermiculita expandida de granulometria média e mistura de solo, turfa e perlita (01:01:01) (ROSS; CASTILLO, 2009; PELIZZA et al., 2012).

Durante a fase de aclimação, a escolha do substrato que é limitante pela alta incidência de perdas, irá afetar a sobrevivência, crescimento e desenvolvimento das plântulas (ROGALSKI et al., 2003; WENDLING et al., 2006; PELIZZA et al., 2011). Tetsumura et al. (2008), na aclimação de mirtilheiros do grupo highbush, plantaram as mudas em vasos com vermiculita fina e cobriram com plástico transparente. Sugere-se que os substratos utilizados no enraizamento *ex vitro* também podem ser utilizados para aclimação de mudas micropropagadas.

3 DETERMINAÇÃO DO COMPORTAMENTO GERMINATIVO E DE NÍVEIS DE VIABILIDADE DE SEMENTES DE MIRTILO POR MEIO DE TESTE DE GERMINAÇÃO E DE TETRAZÓLIO

RESUMO

O conhecimento da fisiologia das sementes e dos elementos que influenciam sua germinação são aspectos fundamentais na propagação seminífera; importante técnica utilizada na obtenção de variabilidade genética e no desenvolvimento de novas cultivares de mirtilheiro. Objetivou-se neste trabalho determinar o comportamento germinativo e níveis de viabilidade, por meio dos testes de germinação e de tetrazólio, de sementes de *Vaccinium ashei* Reade cultivares Briteblue e Climax, obtidas do beneficiamento de frutos colhidos na Fazenda Escola Capão da Onça – Ponta Grossa/PR. Sementes tratadas ou não de 5M de hidróxido de potássio (KOH) foram submetidas ao teste de germinação, sobre os substratos, papel filtro (SP) ou meio de cultura sólido com a metade das concentrações de sais (MS/2), nas temperaturas de $10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (câmara tipo BOD) ou $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (sala climatizada com ar condicionado). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e as médias dos resultados comparadas pelo teste Duncan a 5% de probabilidade. Os dados obtidos indicaram porcentagem máxima de germinação de 40%. Ambas as temperaturas e substratos promoveram a germinação de sementes para as cultivares testadas e o tratamento prévio com KOH 5 M por 5 minutos inibiu a germinação. Já o teste de tetrazólio, baseado na coloração dos tecidos, permitiu o estabelecimento de diferentes níveis de viabilidade.

Palavras-chave: *Vaccinium ashei* Reade, temperaturas, substrato, teste de tetrazólio.

DETERMINATION OF GERMINATION BEHAVIOR AND VIABILITY LEVELS OF BLUEBERRY SEEDS IN GERMINATION TEST AND TETRAZOLIUM

ABSTRACT

Knowing the physiology of seeds and the elements that influence their germination are fundamental aspects in seminiferous propagation; important technique used to obtain genetic variability and development of new cultivars of blueberry. The aim of this study has been to evaluate the germination behavior, as well as viability levels, through germination tests and tetrazolium, of *Vaccinium ashei* Reade seed cultivars Briteblue and Climax, obtained from harvested fruit processing on Fazenda Escola Capão da Onça – Ponta Grossa/PR. Seeds treated or not with 5M potassium hydroxide (KOH) were submitted to the germination test, on substrates, filter paper (SP) or solid culture medium with half of the salt concentration (MS/2), at temperatures of $10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (BOD) or $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (climatized room with air conditioning). The experimental design was completely randomized and the average values compared by Duncan test at 5% probability. The data obtained indicated maximum germination percentage around 40%. Both temperatures and substrates caused seed germination in the tested cultivars, and pretreatment with 5 M KOH for 5 minutes inhibited germination. Yet, the tetrazolium test, based on coloration of tissue, allowed the establishment of different levels of viability.

Keywords: *Vaccinium ashei* Reade, temperature, substrate, tetrazolium test.

3.1 INTRODUÇÃO

O Brasil produziu 927 kg de mirtilo em 2012, em uma área de 270 hectares plantados nas regiões Sul e Sudeste (POLL et al., 2013), sendo a espécie *Vaccinium ashei* Reade a mais promissora para as regiões de clima frio; as cultivares desta espécie melhores adaptadas às condições brasileiras são: Aliceblue, Bluebelle, Bluegem, Briteblue, Climax, Delite, Powderblue, Woodhard (FACHINELLO, 2008). Estas cultivares foram selecionadas em outros países com diferentes condições edafoclimáticas, podendo apresentar limitações para seu cultivo, o que motiva a busca por plantas superiores que melhor se adaptem as especificidades do Brasil (FISCHER et al., 2014). Quando se busca variabilidade genética e o desenvolvimento de novas cultivares, a propagação do mirtilheiro por sementes se torna importante (FACHINELLO, 2008).

Para se conseguir bons resultados na propagação seminífera, é imprescindível conhecer o comportamento germinativo da semente e qualidade fisiológica, que pode ser avaliada através de testes de germinação e de vigor, como o teste de tetrazólio (CARVALHO et al., 2002).

A germinação da semente constitui uma sequência de eventos físicos, bioquímicos e fisiológicos, influenciados por vários fatores, que podem atuar isolados ou em interação (AMARO et al., 2006). Esses fatores podem ser extrínsecos, tais como: luz, temperatura e umidade, e intrínsecos, como: morfologia, viabilidade e dormência (BIONDI; LEAL, 2008).

Em relação aos fatores extrínsecos, as sementes de *Vaccinium* tem sua germinação afetada pela temperatura (LOPEZ et al., 2008) e apresentam comportamento fotoblástico positivo e ortodoxo (HERNÁNDEZ et al., 2009), ou seja, germinam na presença de luz e conseguem manter a viabilidade mesmo com um baixo teor de umidade (WALCK et al., 2011).

Em um teste de germinação, o substrato é mais um fator externo que influencia a germinação das sementes, em função de sua estrutura, aeração, capacidade de retenção de água e grau de infestação de patógenos (GUEDES et al., 2010). O papel filtro é o suporte mais utilizado na germinação de sementes devido à sua capacidade de tornar o teste simples, rápido e econômico (DI SALVATORE;

CARAFÁ; CARRATÙ, 2008). No entanto, o uso do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) é citado como substrato para a germinação de sementes de *Vaccinium meridionale* Swartz, sendo que a redução da concentração de sais no meio de cultura permitiu maiores porcentagens de germinação (CASTRO et al., 2012).

Ao final de um teste de germinação, pode ocorrer a presença de sementes não germinadas porque se apresentam mortas, duras ou dormentes (BRASIL, 2009). A dormência em sementes pode ser classificada em: fisiológica, morfológica, morfofisiológica, física e combinada (fisiológica e física) (BASKIN; BASKIN, 2004). A impermeabilidade do tegumento é uma dormência física, que impede a entrada de água (D'HONDT; BRYE; HOFFMANN, 2010) e pode ser causada pela presença de substâncias como suberina, lignina, cutina, taninos, pectinas, além de derivados de quinina (COSTA et al., 2011). Estudos químicos indicam que a cutícula e as cadeias de pigmentos, presentes no tegumento, são compostas de materiais poliméricos insolúveis que podem ser despolimerizados por hidrólise alcalina (KOLATTUKUDY, 1981) tais como KOH ou NaOH (HOU; SIMPSON, 1994).

São consideradas dormentes as sementes viáveis, que apresentam bloqueio temporário para completar a germinação (DEBSKA et al., 2013). O teste de tetrazólio é um método rápido de determinar a viabilidade das sementes, baseado na atividade de enzimas do grupo das desidrogenases, presentes nos tecidos vivos (COSTA; SANTOS, 2010).

Objetivou-se neste trabalho determinar o comportamento germinativo e níveis de viabilidade de sementes de *Vaccinium ashei* Reade cultivares Briteblue e Climax, por meio dos testes de germinação e de tetrazólio.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Localização e material biológico

Mudas de mirtilheiro das cvs. Climax e Briteblue plantadas experimentalmente em espaçamento 4,0 m x 1,5 m, em 2010, no município de Ponta Grossa – PR (25°05'35" S e 50°03'50" W e 950 m de altitude), com clima cfb (KÖPPEN, 1948), apresentando estações secas bem definidas, geadas frequentes durante o inverno e solo classificado como Cambissolo háplico distrófico de textura argilosa produziram os frutos utilizados nos experimentos.

Experimento 1 - Qualidade fisiológica e comportamento germinativo de sementes de *Vaccinium ashei* Reade cultivares Briteblue e Climax, tratadas ou não de 5 M de hidróxido de potássio (KOH) e submetidas a teste de germinação em diferentes substratos e temperaturas

Frutos maduros, coletados em fevereiro de 2012, foram levados ao laboratório, selecionados, macerados e despulpados para a obtenção de sementes. As sementes foram lavadas em água corrente, espalhadas sobre papel toalha e secas à sombra em temperatura ambiente por 24 horas. Dois experimentos foram conduzidos, um utilizando sementes da cv. Briteblue, acondicionadas em geladeira por dois meses, e outro, sementes frescas da cv. Climax. Em seguida, sementes de ambas as cultivares foram embebidas em H₂O (controle) ou solução de hidróxido de potássio ou 5 M (KOH) por 5 minutos e submetidas ao teste de germinação instalado em placas de Petri, contendo os substratos autoclavados: papel filtro (SP) umedecido periodicamente com água destilada esterilizada (2,5 vezes o peso do substrato em água) ou meio de cultura MS sólido (6 g.L⁻¹ de ágar) com a metade das concentrações de sais (MS/2). A seguir as placas foram vedadas com plástico filme e mantidas nas temperaturas constantes de 10°C ± 2°C (câmara tipo BOD) ou 25°C

$\pm 2^{\circ}\text{C}$ (sala climatizada com ar condicionado), com fotoperíodo de 16 horas de luz, perfazendo os seguintes tratamentos: T1) Controle + SP + 10°C , T2) Controle + SP + 25°C , T3) Controle + MS/2 + 10°C , T4) Controle + MS/2 + 25°C , T5) KOH + SP + 10°C , T6) KOH + SP + 25°C , T7) KOH + MS/2 + 10°C , T8) KOH + MS/2 + 25°C . O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito tratamentos, quatro repetições e parcela experimental constituída por uma placa de Petri, contendo 10 sementes. O efeito do uso do KOH, dos substratos e das temperaturas sobre o desempenho germinativo das sementes foi avaliado pela porcentagem de germinação e primeira contagem de plântulas normais (apresentavam todas as suas estruturas essenciais completas). Após a obtenção da primeira plântula normal, foram realizadas contagens sucessivas a cada 7 dias. O teste foi finalizado quando a ausência de germinação foi superior a 30 dias. Os dados de porcentagens de germinação foram transformados para $\arcsen \sqrt{P\%/100}$, submetidos ao teste de Bartlett, seguido de análise de variância e, quando significativos comparados pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$), utilizando o pacote estatístico do SAS.

Experimento 2 – Níveis de viabilidade de sementes *Vaccinium ashei* Reade cultivares Briteblue e Climax através de teste de tetrazólio

Frutos dos cultivares Briteblue e Climax coletados em janeiro de 2013 foram levados ao laboratório e armazenados sob refrigeração. Para separar a polpa das sementes, os frutos foram colocados juntamente com água em um mixer. Em seguida, as sementes foram lavadas em água corrente, espalhadas sobre papel toalha e secas à sombra em temperatura ambiente por 3 dias. Para realização do teste de tetrazólio, utilizou-se três repetições de 50 sementes, totalizando 150 sementes, que foram pré-umedecidas através de embebição em água 24 horas, e a exposição dos tecidos para coloração deu-se com a perfuração da semente com uma agulha no lado oposto à localização do embrião. Em seguida as sementes foram mergulhadas em solução incolor de 2,3,5 trifetil brometo de tetrazólio 1% por 3 horas a 30°C e depois permaneceram 21 horas em temperatura ambiente, em condição de escuro completo (HERNÁNDEZ et al., 2009). Após a embebição, as sementes foram lavadas em água corrente e cortadas transversalmente com lâmina

para visualização do embrião (BRASIL, 2009) em microscópio óptico (aumento 50X). A viabilidade foi classificada em porcentagem de coloração do embrião (0, 25, 50, 75 e 100%) e sementes com embrião corado acima de 50% foram consideradas viáveis.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1 - Qualidade fisiológica e comportamento germinativo de sementes de *Vaccinium ashei* Reade cultivares Briteblue e Climax, tratadas ou não com 5 M de hidróxido de potássio (KOH) e submetidas a teste de germinação em diferentes substratos e temperaturas

O descarte dos tratamentos T3 e T4 (cultivar Briteblue) e T2, T5 e T6 (cultivar Climax) devido à contaminação dos substratos por fungos impediu a avaliação conjunta dos fatores: exposição ou não ao hidróxido de potássio (KOH), substratos (SP e MS/2) e temperaturas (10^oC e 25^oC) em arranjo fatorial 2x2x2.

Na Tabela 1 são apresentados os resultados da análise de variância dos dados de porcentagem de germinação transformados para $\sqrt{P\%/100}$ e o valor de Qui-Quadrado (χ^2) referente ao teste de Bartlett, que demonstrou homogeneidade das variâncias dos tratamentos.

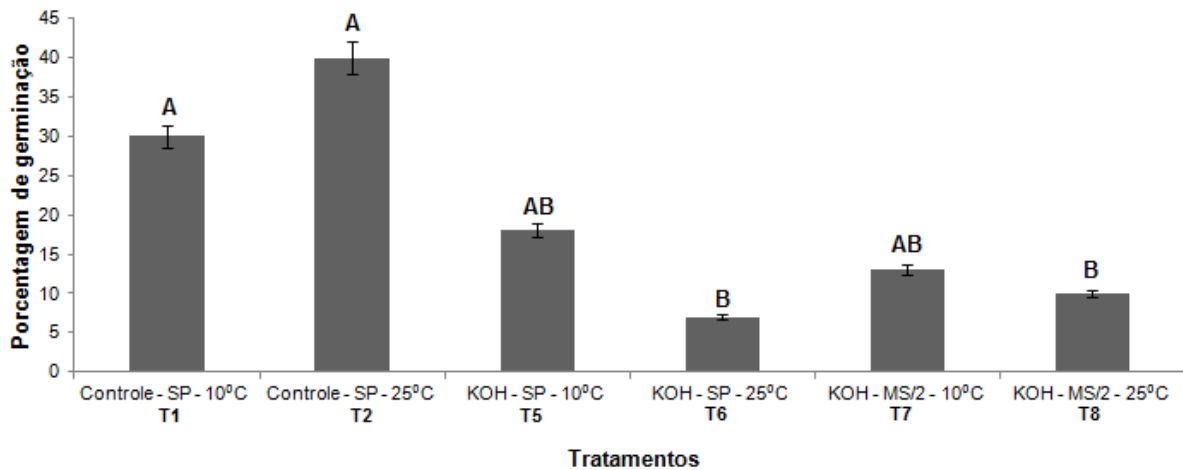
TABELA 1 - Resultados da análise de variância dos dados de porcentagem de germinação de sementes de *Vaccinium ashei* Reade cultivares Briteblue e Climax

<i>Vaccinium ashei</i> Reade cultivar Briteblue		
Fontes de Variação	G.L.	Quadrado médio
Tratamentos	5	0.00131635*
Erro	18	0.00037102
Qui-quadrado (χ^2)		8.42603*
<i>Vaccinium ashei</i> Reade cultivar Climax		
Fontes de Variação	G.L.	Quadrado médio
Tratamentos	4	0.00164518*
Erro	15	0.00015064
Qui-quadrado (χ^2)		7.08139*

* significativo a 5% de probabilidade

O teste de germinação utilizado para avaliar a qualidade e o comportamento germinativo de sementes de ambas as cultivares tratadas com KOH e submetidas a diferentes substratos e temperaturas mostrou, através da porcentagem de germinação, diferenças estatísticas entre os tratamentos testados (Gráfico 1 e 2).

Verificou-se ao analisar os resultados mostrados no Gráfico 1 que, para a cultivar Briteblue, nos tratamentos T1 e T2, os quais continham sementes mergulhadas em água por 5 minutos e germinadas sobre papel, a porcentagem de germinação foi de 30 e 40% respectivamente, sendo que não diferiram significativamente em função da temperatura (10°C e 25°C). Para os tratamentos T6 e T8, que continham sementes tratadas com 5 M de KOH e germinadas à temperatura de 25°C, a porcentagem de germinação foi de 7 e 10% respectivamente, não diferiram significativamente em relação ao substrato (SP e MS/2). O tratamento T2 se revelou superior estatisticamente ao tratamento T6, mostrando que a exposição das sementes a 5 M de KOH inibiu a germinação em relação às sementes apenas mergulhadas em água e germinadas sobre papel na mesma temperatura (25°C).

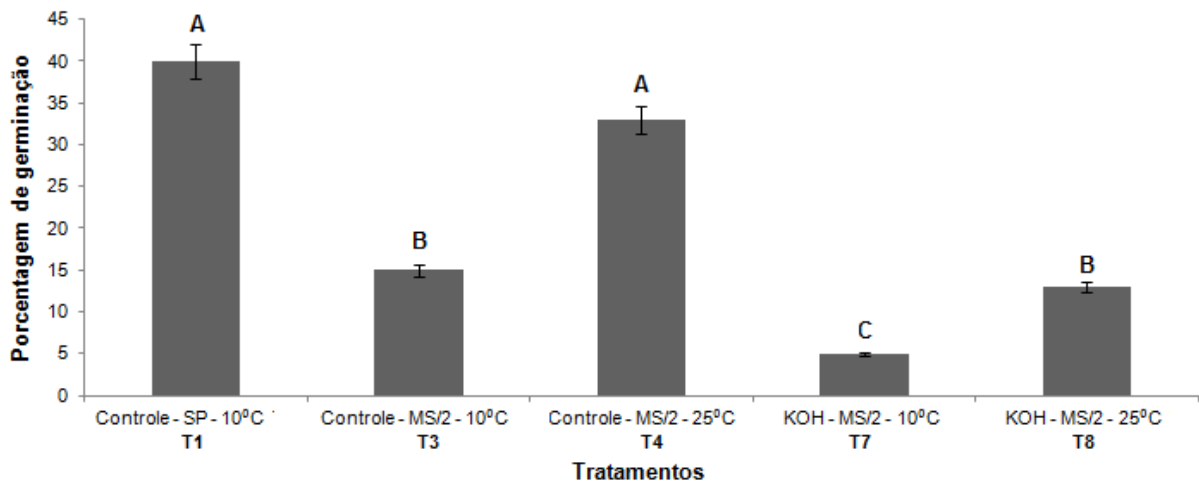


* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Duncan $P < 0,05$.

GRÁFICO 1 - Germinação de sementes mirtilo cv. Briteblue em diferentes tratamentos germinativos. Ponta Grossa, PR, 2012

Constatou-se ao analisar os resultados mostrados na Gráfico 2 que, para a cultivar Climax, os tratamentos T1 e T4, os quais continham sementes mergulhadas em água por 5 minutos e submetidas a diferentes substratos (SP e MS/2) e temperaturas (10°C e 25°C), apresentaram o melhor desempenho estatístico e

porcentagens de germinação 40 e 33% respectivamente. O tratamento T7, que continha sementes tratadas com 5M de KOH e germinadas sobre o substrato MS/2 e temperatura de 25°C, apresentou-se estatisticamente inferior aos demais tratamentos e porcentagem de germinação de 5%.



* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Duncan $P < 0,05$.

GRÁFICO 2 - Germinação de sementes mirtilo cv. Climax em diferentes tratamentos germinativos. Ponta Grossa, PR, 2012

No presente trabalho, a primeira plântula normal germinada foi obtida aos 46 dias para cv. Climax no tratamento T8 (KOH + MS/2 + 25°C) e aos 52 dias para cv. Briteblue no tratamento T5 (KOH + SP + 10°C). Sementes de *Vaccinium meridionale* Swartz, armazenadas por uma semana em condições ambiente e germinadas sob temperatura de $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$, utilizando como substrato o meio de cultura MS com 1/3, 1/8 e 1/16 da concentração de sais, iniciaram a germinação após 42 dias da instalação do teste (CASTRO et al., 2012).

O teste de germinação das sementes de *Vaccinium ashei* Reade cultivares Briteblue e Climax foi finalizado após 6 meses de sua instalação quando a ausência de germinação foi superior a 30 dias. Evidências de dormência em sementes de *Vaccinium spp.* são muitas vezes manifestadas pela baixa, lenta e irregular germinação como observado em *V. angustifolium*, *V. ashei*, *V. canadense*, *V. corymbosum*, *V. macrocarpon* e *V. oxycoccus* (ELLIS, HONG; ROBERTS, 1985).

Hou e Simpson (1994) obtiveram melhoria significativa na germinação de sementes dormentes de aveia selvagem com o uso de KOH. Da mesma forma sementes de *Vaccinium angustifolium* Ait. obtiveram germinação máxima (aproximadamente 80%) quando tratadas com KOH 5,3 M por cinco minutos (GAO; ZHENG; LAWRENCE, 1998). Resultados que não se repetiram para as cultivares testadas no presente estudo, mostrando que dentro do mesmo gênero, as espécies apresentam comportamentos diferentes em relação ao uso do KOH.

O uso do papel filtro como substrato tem sido observado na germinação de sementes de *Vaccinium membranaceum* (BARNEY; SHAFII; PRICE, 2001), *Vaccinium arctostaphylos* L. (SHAHRAM, 2007) e *Vaccinium parvifolium* Smith (LOPEZ et al., 2008). Já o uso do meio de cultura MS com 1/3, 1/8 e 1/16 da concentração original de sais foi testado como substrato por Castro et al., (2012) na germinação de sementes de *Vaccinium meridionale*, proporcionando germinação de 48, 63 e 63,5% respectivamente. Neste experimento ambos os substratos SP e MS/2 permitiram a germinação das sementes de *Vaccinium ashei* Reade para as cultivares testadas.

Vários regimes de temperatura podem afetar a germinação de *Vaccinium sp* (LOPEZ et al., 2008), fato que pode ser observado pelas diferentes temperaturas utilizadas para a germinação de sementes deste gênero. Para simular condições ambientais típicas da primavera no Canadá, sementes de *Vaccinium angustifolium* Ait. foram germinadas a 10⁰C (GAO; ZHENG; LAWRENCE, 1998). Já Baskin et al. (2000), ao trabalharem com *Vaccinium myrtillus* L. e *Vaccinium vitis-idaea*, obtiveram 62 - 100% de germinação na presença de luz e temperaturas alternadas de 20:10⁰C. No presente estudo ambas as temperaturas constantes de 10⁰C ± 2⁰C (BOD) e 25⁰C ± 2⁰C (SC) possibilitaram a germinação das sementes de *Vaccinium ashei* Reade, porém para a cultivar Climax, quando mantidas constantes as variáveis, uso ou não de KOH e substrato, a temperatura de 25⁰C apresentou porcentagem de germinação estatisticamente superior a 10⁰C.

Experimento 2 – Viabilidade de sementes *Vaccinium ashei* Reade cultivares Briteblue e Climax através de teste de tetrazólio

Para resultados satisfatórios do teste tetrazólio é necessário que a solução 2,3,5 trifenil brometo de tetrazólio seja absorvida pelas sementes. Em razão disso, algumas espécies necessitam de etapas preparatórias, como punção, corte e/ou remoção do tegumento (COSTA; SANTOS, 2010). A perfuração do tegumento com agulha foi essencial para que a solução de tetrazólio pudesse atingir o interior da semente, demonstrando impermeabilidade para as cultivares testadas. Os níveis de classes estabelecidos no teste de tetrazólio para sementes dos cvs. Briteblue e Climax estão representados em porcentagem de coloração vermelho-laranja do embrião (Figuras 2 e 3). Embriões *Vaccinium meridionale* Swartz, tratados com solução de tetrazólio 1%, exibiram coloração de rosa-claro ao rosa-forte, com presença de tons laranja (HERNÁNDEZ et al., 2009). Embriões com menos de 50% de coloração vermelho-laranja foram considerados inviáveis. O número de classes depende da coloração das sementes, das características morfológicas da espécie e dos tratamentos aplicados, sendo que, para diferentes espécies, distintos níveis de classes podem ser propostos (SARMENTO et al., 2013).

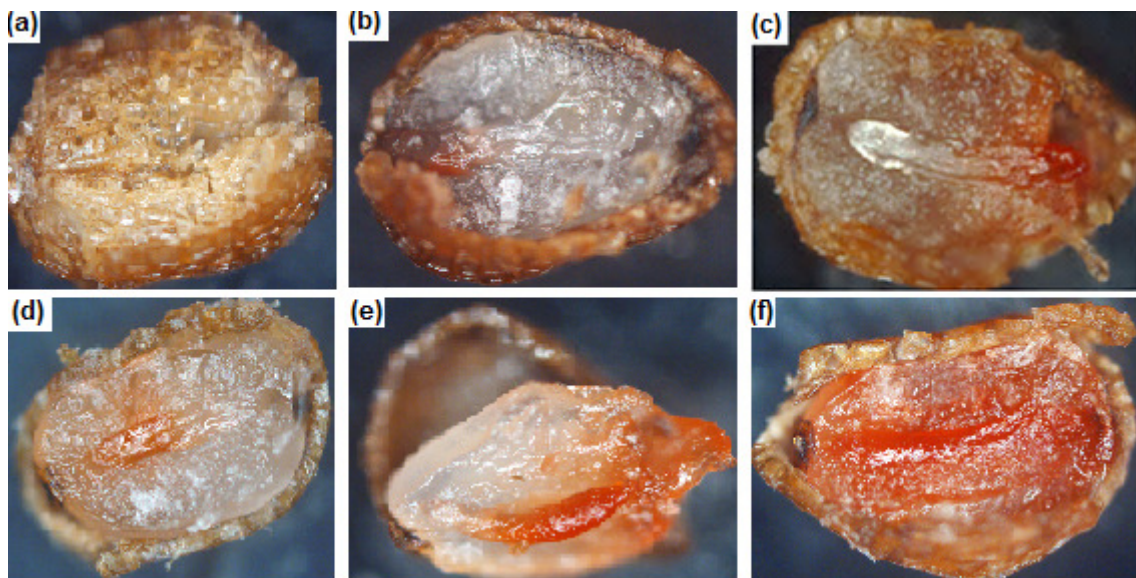


FIGURA 2 - Coloração do embrião (a) morta (b) 0% (c) 25% (d) 50% (e) 75% e (f) 100% de sementes de mirtilo cv. Briteblue tratadas com solução de 2,3,5 trifenil brometo de tetrazólio. Ponta Grossa, PR, 2013

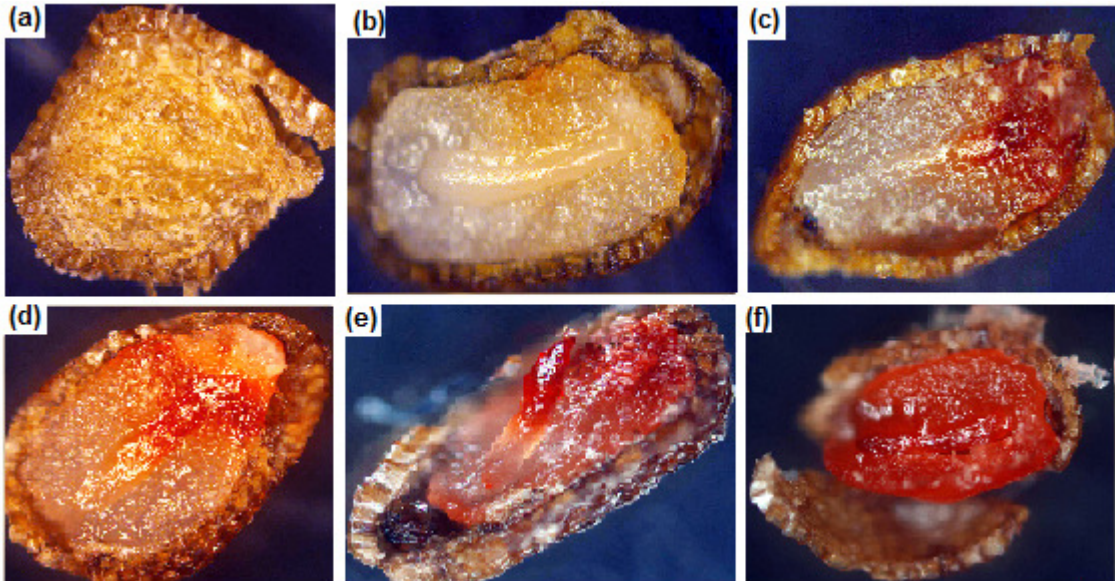


FIGURA 3 - Coloração do embrião (a) morta (b) 0% (c) 25% (d) 50% (e) 75% e (f) 100% de sementes de mirtilo cv. Climax tratadas com solução de 2,3,5 trifenil brometo de tetrazólio. Ponta Grossa, PR, 2013

De acordo com os níveis de classes propostos, para a cv. Briteblue, foram consideradas viáveis as sementes que apresentaram 50, 75 e 100% de coloração vermelho-laranja do embrião (Figura 2 (d), (e) e (f)), as quais representaram respectivamente 13, 7 e 9% das sementes avaliadas (Gráfico 3 (a)). Sementes que apresentaram coloração do embrião vermelho-laranja em torno de 25% (Figura 2 (c)) corresponderam a 20% da amostra e foram consideradas inviáveis, assim como as não coradas (mortas ou 0% de coloração vermelho-laranja – Figuras 2 (a) e (b)), as quais representaram 51% da amostra (Gráfico 3 (a)), sendo que deste percentual as sementes mortas corresponderam a 46%.

Os mesmos padrões de viabilidade utilizados para a cv. Briteblue foram adotados para a cv. Climax. Sementes consideradas viáveis que apresentaram 50, 75 e 100% de coloração vermelho-laranja do embrião (Figuras 3 (d), (e) e (f)) representaram respectivamente 8, 13,5 e 28,5% da amostra (Gráfico 3 (b)). Sementes que apresentaram coloração do embrião vermelho-laranja em torno de 25% (Figura 3 (c)) foram consideradas inviáveis e corresponderam a 19% da amostra (Gráfico 3(b)). Sementes não coradas (0% de coloração vermelho-laranja ou mortas) corresponderam a 31% (Gráfico 3 (b)).

Somando as porcentagens das sementes que apresentaram coloração vermelho-laranja do embrião acima de 50% no teste de tetrazólio, são consideradas

viáveis 29% das sementes da cv. Briteblue e 50% da cv. Climax. Sementes de *Vaccinium meridionale* Swartz submetidas ao teste de tetrazólio exibiram 84,2% de viabilidade, sendo que destas, 63% germinaram e 21,2% não germinaram (permaneceram latentes) (HERNÁNDEZ et al., 2009). O alto número de sementes inviáveis no teste de tetrazólio, ou viáveis que estejam em estado de latência, pode estar relacionado à baixa porcentagem de germinação.

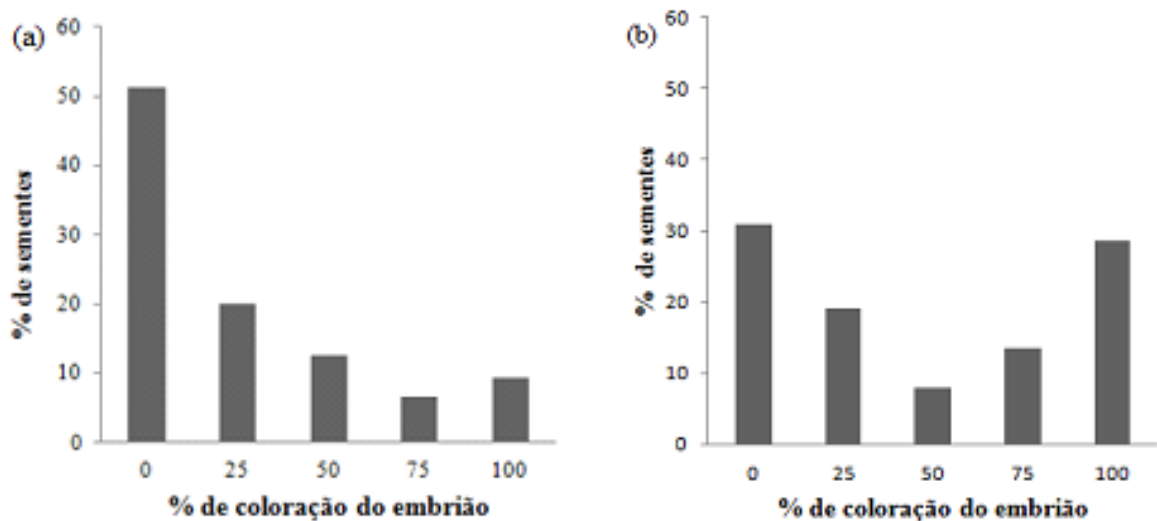


GRÁFICO 3 - Porcentagem de coloração do embrião de sementes de mirtilo (a) cv. Briteblue e (b) cv. Climax, tratadas com 2,3,5 trifênil brometo de tetrazólio

3.4 CONCLUSÃO

Sementes de mirtilo cvs. Briteblue e Climax tratadas previamente com 5 M de KOH por 5 minutos e germinadas sobre o mesmo substrato e submetidas à igual temperatura reduzem a porcentagem de germinação em relação às não tratadas.

Sementes de mirtilo de ambas as cultivares testadas alteram seu comportamento germinativo conforme a combinação das variáveis temperatura (10°C e 25°C) e substrato (SP e MS/2).

Sementes de mirtilo *Vaccinium ashei* Reade submetidas a tratamentos oriundos da combinação das variáveis: exposição ou não ao KOH, substratos (SP e

MS/2) e temperaturas (10°C e 25°C) demandam acima de 46 dias para a emissão da primeira plântula normal e apresentam germinação lenta, sendo que, após 6 meses do início do teste de germinação, a porcentagem de germinação não ultrapassa 40%.

O corte transversal possibilita avaliar de forma eficiente a viabilidade das sementes de mirtilo cv. Briteblue e Climax, pré-umedecidas em água por 24 horas, seguidas da perfuração com uma agulha no lado oposto à localização do embrião e expostas para coloração dos tecidos à solução de 2,3,5 trifenil brometo de tetrazólio 1%, a 30°C por 3 horas e em temperatura ambiente por 21 horas, em condição de escuro completo.

Para sementes de mirtilo o teste de tetrazólio, baseado na coloração dos tecidos, permite o estabelecimento de diferentes níveis de viabilidade.

4 ESTABELECIMENTO DE MIRTILEIRO *IN VITRO* CV. BRIGHTWELL

RESUMO

Objetivou-se neste trabalho o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de mirtilheiro cv. Brightwell, em meio de cultivo WPM, acrescido de 5 mg.L⁻¹ de 2iP. As avaliações foram realizadas aos 7, 30 e 60 dias. Explantes verdes foram considerados sobreviventes. Aos 60 dias sobreviveram 87% dos explantes, todos apresentavam primórdios foliares e apenas 53% apresentaram brotações. Algumas brotações apresentavam sinais de senescência, como amarelecimento e perda de folhas. Conclui-se que o uso do meio de cultura WPM, acrescido de 5 mg.L⁻¹ de 2iP, no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de mirtilheiro cv. Brightwell permite a obtenção de primórdios foliares e brotações após 30 dias de cultivo.

Palavras-chave: Micropropagação, segmentos nodais, *Vaccinium ashei* Reade.

ESTABLISHMENT *IN VITRO* OF BLUEBERRY CV. BRIGHTWELL

ABSTRACT

The objective of this study was the establishment *in vitro* of nodal segments of blueberry, variety Brightwell, in WPM culture medium, plus 5 mg.L⁻¹ of 2iP. Evaluations were performed at 7, 30 and 60 days. Green explants were considered survivors. At 60 days 87% of the explants survived, all of them had leaf primordial and 53% developed shoots. Some shoots showed senescence signs, such as yellowing and loss of leaves. It was concluded that the use of WPM culture medium, plus 5 mg.L⁻¹ 2iP, *in vitro* establishment of nodal segments of blueberry cv. Brightwell allows obtaining primordial leaves and shoots after 30 days of culture.

Keywords: Micropropagation, nodal segments, *Vaccinium ashei* Reade.

4.1 INTRODUÇÃO

Mirtileiros cultivados comercialmente derivam principalmente de quatro grupos highbush, lowbush, rabbiteye e de seus híbridos (ROWLAND et al., 2012). O grupo rabbiteye compreende a espécie *Vaccinium ashei* Reade (FACHINELLO, 2008) considerada a mais promissora para a maior parte das regiões de clima frio do sul do Brasil, onde o mirtileiro tem maior possibilidade de adaptação (PEÑA, et al., 2012). Entre os mirtileiros do grupo rabbiteye podemos citar as cultivares Brightwell, Climax, Delite, Powderblue e Woodard (LYRENE; BALLINGTON, 2006).

O principal entrave desta cultura, no entanto, reside na produção de mudas tradicionalmente propagadas por estacas, processo que resulta em baixo rendimento, além de não apresentar garantia de sanidade (SILVA et al., 2006). Entre os métodos assexuados de propagação de plantas, a micropropagação ou propagação *in vitro* tem sido muito estudada e utilizada porque permite o controle de variáveis responsáveis pelo desenvolvimento da planta (GRIMALD et al., 2008). Não há, porém, definição de um protocolo de micropropagação único para todas as espécies, fato este devido às diferentes necessidades de cada planta, com relação a nutrientes, fotoperíodo, fisiologia, etc. (TORRES; CALDAS; BUSO, 1998).

A micropropagação é uma técnica que permite o rejuvenescimento do material vegetal (TITON et al., 2003), como forma de reverter as plantas do estágio maduro para o juvenil (WENDLING; XAVIER, 2001). O rejuvenescimento pode aumentar o vigor e auxiliar no desenvolvimento vegetativo das plantas (SOUZA et al., 2011). No caso do mirtileiro do grupo rabbiteye, cv. Climax, Schuch et al. (2008) observaram que o material vegetal adulto cultivado *in vitro* tem elevada habilidade de rejuvenescimento após repiques sucessivos na presença de citocinina, podendo ser comparado às plantas obtidas de semente, tanto na capacidade de emitir novas brotações, quanto ao número de gemas e taxa de multiplicação.

O primeiro estágio da micropropagação é o estabelecimento do material *in vitro* (CARDENAL; MALDONADO, 2010) que pode ser realizada através de segmentos nodais, internodais, cotiledonares e ápices caulinares (PAIVA; ALOUFA, 2009). Para o estabelecimento *in vitro* de mirtileiros cvs Delite, Flórida, Powderblue, Bluebelle, Bluegem, Briteblue e Woodard, os explantes constituíram-se de

segmentos nodais isolados de brotações laterais novas de aproximadamente 15 cm, originadas de ramos lenhosos obtidos dentro da sala de crescimento (SILVA et al., 2008).

Nesta fase inicial, a desinfestação dos explantes pode ser realizada através da imersão em álcool 70% (10 segundos), seguida de imersão em hipoclorito de sódio com 2,5% de cloro ativo, acrescido de 2 gotas de Tween 20 (10 minutos) e, após, tríplice lavagem com água destilada e autoclavada (SILVA et al., 2006). Pós-desinfestação, os explantes são inoculados em meio de cultura, onde podem permanecer por 20-30 dias, entretanto a ocorrência de oxidações e/ou contaminações pode ser perceptível já na primeira semana de cultivo (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009). Rosa et al. (2009) demonstraram que um período de escuro diminui a oxidação dos explantes de mirtilheiros cultivares Georgia e O'neal *in vitro*.

Alguns fatores são considerados limitantes para o sucesso da micropropagação de plantas tais como: a composição do meio de cultivo, o uso de reguladores vegetais e o pH. O meio basal WPM (LLOYD & McCOWN, 1980) tem sido usado na micropropagação do mirtilheiro *Vaccinium highbush* cv. Bluecrop desde que resultados satisfatórios foram obtidos (TETSUMURA et al., 2008). Já a zeatina, o 2iP (SILVA et al., 2006; SCHUCH et al., 2008; JIANG et al., 2009) e o AIA (SILVA et al., 2008) são utilizados como reguladores vegetais para plantas deste gênero. Segundo Erig e Schuch (2005), a adição de 24,6 µM de 2iP ao meio de cultura WPM favorece o estabelecimento *in vitro* de mirtilheiro cv. Flórida. Em relação ao pH, mirtilheiros se desenvolvem normalmente em solos ácidos (PAAL et al., 2011), sendo assim o meio de cultura para *Vaccinium* também tem sido acidificado (pH 5,0) (MEINERS; SCHWAB; SZANKOWSKI, 2007; JIANG et al., 2009).

Objetivou-se neste trabalho definir protocolo para estabelecimento *in vitro* de *Vaccinium ashei* Reade cv. Brightwell, em meio WPM, na presença de 2iP, com base em indicações da literatura para diferentes espécies de mirtilheiros.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Ramos semilenhosos de mirtilheiros cv. Brightwell, coletados em agosto de 2013, no pomar experimental do departamento de Agronomia – *Campus* CEDETEG/UNICENTRO, localizado no município de Guarapuava – PR (25°23'36" de latitude, 51°27'19" de longitude e 1.120 m de altitude) foram cortados em segmentos de 20 cm, colocados em frascos com água e levados à sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e densidade de fluxo de fótons do período de luz de $27 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ para emissão de brotações novas (SILVA et al., 2008) de aproximadamente 2 cm.

Os brotos obtidos foram destacados dos segmentos de ramos e as folhas, descartadas. Em seguida procedeu-se a desinfestação em câmara de fluxo laminar, onde o material foi colocado em álcool 70% por 30 segundos, depois imerso em hipoclorito de sódio comercial (teor de cloro ativo de 2,0 a 2,5%) acrescido de 2 gotas de Tween 20, durante 15 minutos e a seguir, lavado por três vezes em água destilada e autoclavada (SILVA et al., 2006).

Utilizou-se o meio de cultura WPM acrescido de vitaminas de Gamborg; Miller e Ojima (1968), $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose, $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de mio-inositol e 50 mL de 2iP [$100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$] (SCHUCH et al., 2008). O pH foi ajustado para 5,0 e logo após adicionou-se $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ágar na solução. Cada tubo de ensaio recebeu 10 mL do meio de cultura e foi autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos.

Os explantes foram introduzidos nos tubos contendo o meio de cultura solidificado e levados à sala de crescimento, no escuro, por 7 dias a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (SILVA et al., 2006). Posteriormente, avaliou-se a porcentagem de explantes oxidados, contaminação fúngica e bacteriana. Explantes verdes foram considerados sobreviventes. Os tubos foram transferidos para a luz com fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons do período de luz de $27 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Aos 30 e 60 dias foram avaliados a porcentagem de sobrevivência, o desenvolvimento de primórdios foliares e a emissão de brotações.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho a segmentação dos ramos do mirtilheiro cv. Brightwell e seu acondicionamento em sala de crescimento permitiram o desenvolvimento de novas brotações. Explantes obtidos a partir de segmentos nodais destas brotações, desinfestados e acondicionados no escuro por 7 dias, exibiram tanto porcentagem de contaminação por fungos/ bactérias quanto oxidação nula (100% dos explantes sobreviveram) (Gráfico 4). Na primeira semana de cultivo *in vitro* é possível observar a ocorrência de contaminações e/ou oxidação (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009). O conteúdo de compostos fenólicos nos tecidos vegetais, que podem levar a oxidação, depende da cultivar e de suas características genéticas (SILVA et al., 2008). Alternativamente a acomodação dos explantes na ausência de luz nos sete primeiros dias de estabelecimento *in vitro* ajuda a evitar a oxidação fenólica (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

Depois de 30 dias de cultivo, 100% dos explantes continuavam verdes, porém apenas 93% desenvolveram primórdios foliares e destes, 40% apresentaram brotações (Gráfico 4 e Figura 4a). Segundo Erig e Schuch (2005), casos em que os explantes continuam vivos (de coloração verde), mas não emitem folhas, podem ser justificados pelo grau de desenvolvimento da gema do explante.

Aos 60 dias, sobreviveram 87% dos explantes. Todos apresentavam primórdios foliares e destes, 53% apresentavam brotações (Gráfico 4). Ao final do teste, algumas brotações apresentavam folhas com bordas amareladas, pigmentação vermelha no centro e também queda de folhas, sinalizando senescência (Figura 4b).

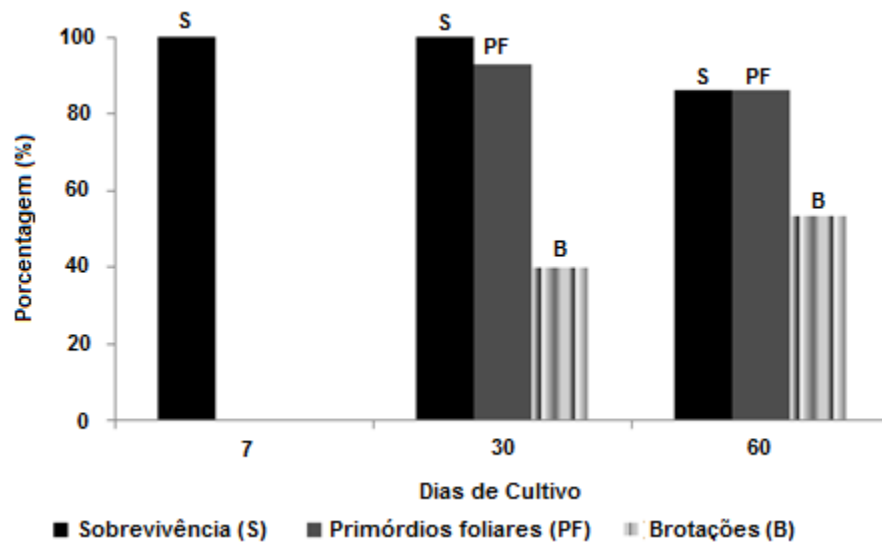


GRÁFICO 4 - Porcentagem de sobrevivência, emissão de primórdios foliares e brotações, no estabelecimento *in vitro* de mirtilheiro (*Vaccinium ashei* Reade) cv. Brightwell, através de segmentos nodais

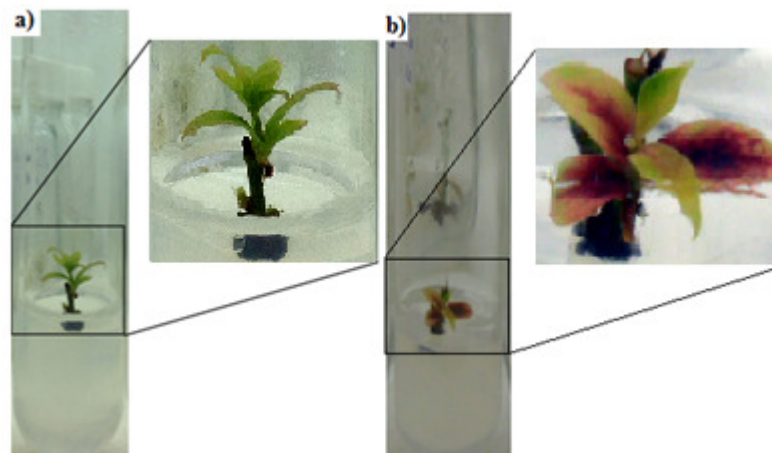


FIGURA 4 - Estabelecimento *in vitro* de mirtilheiro (*Vaccinium ashei* Reade) cv. Brightwell. a) Brotação aos 30 dias de cultivo. b) Brotação senescente aos 60 dias de cultivo

O meio de cultura WPM e suas variações têm sido utilizado com sucesso no estabelecimento *in vitro* de *Vaccinium ashei* Reade, cvs. Delite (SILVA et al., 2006), Flórida, Powderblue, Bluebelle, Bluegem, Briteblue e Woodard (SILVA et al., 2008); Brightwell e Choice (JIANG et al., 2009), devido à sua menor concentração de sais quando comparado a outros meios utilizados no cultivo *in vitro*. A menor salinidade

do WPM auxilia na diminuição do potencial osmótico e, conseqüentemente, na disponibilidade de água para o material vegetal (NOGUEIRA et al., 2004).

Jiang et al. (2009) utilizaram zeatina para introduzir o cv. Brightwell *in vitro*, porém os altos custos, demandados pelo uso deste regulador do crescimento no meio de cultura, dificultam a elaboração de protocolos comerciais. Neste estudo mostramos que o uso do 2iP é uma alternativa ao uso da zeatina para obtenção de gemas axilares em explantes desta cultivar.

As brotações obtidas neste estudo apresentavam em média 5 folhas e tamanho médio 0,5 cm (Figura 4a), inferior ao obtido por Schuch et al. (2008), com explantes de *Vaccinium ashei* Reade, cv. Climax cultivadas em meio de cultura contendo 2iP (1,5 cm). No estabelecimento do mirtilheiro *in vitro*, é comum o desenvolvimento de explantes com crescimento ativo, que emitem brotos alongados e com várias gemas, enquanto outros emitem brotos sem alongamento, com folhas grandes que paralisam o desenvolvimento (ERIG & SCHUCH, 2006). Jiang et al. (2009) também detectaram esse fenômeno na micropropagação de mirtilheiro cv. Choice e sugere que, após um ou dois subcultivos, a juvenilidade de alguns brotos pode ser recuperada. A micropropagação do mirtilheiro depende da obtenção de brotações alongadas e com características de juvenilidade na etapa de estabelecimento *in vitro*.

4.4 CONCLUSÃO

O uso do meio de cultura WPM, acrescido de 5 mg.L⁻¹ de 2iP, no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de mirtilheiro cv. Brightwell, permite a obtenção de primórdios foliares e brotações após 30 dias de cultivo.

5 ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE MIRTILEIRO (*Vaccinium ashei* Reade) CV. BRIGHTWELL CULTIVADO COM TIOSSULFATO DE PRATA

RESUMO

Durante o cultivo *in vitro* o acúmulo de etileno no interior do recipiente de cultivo pode ser prejudicial à cultura. Uma alternativa para evitar a formação de etileno e que tem trazido bons resultados no desenvolvimento das plântulas encontra-se na adição de tiosulfato de prata (STS), um inibidor da síntese deste hormônio. Baseando-se neste conhecimento, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência STS no estabelecimento *in vitro* de mirtilheiro (*Vaccinium ashei* Reade) cv. Brightwell. Foram utilizados segmentos nodais, em meio de cultura WPM, suplementado com 50 mL de 2iP [100 mg.L^{-1}] e STS nas concentrações de 0, 15, 30, 45 e 60 μM . Após 60 dias foi avaliada a porcentagem de explantes sobreviventes e que desenvolveram primórdios foliares, número de gemas com brotações, comprimento da maior brotação e número de folhas. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e quando significativos comparados pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$) e mostrados por regressão polinomial. O efeito da concentração de STS utilizada foi significativo ao nível de 5% de probabilidade para os parâmetros número de gemas com brotações e de folhas e favorecidos pelo uso de 45 μM de STS.

Palavras-chave: etileno, STS, micropropagação.

ESTABLISHMENT *IN VITRO* OF BLUEBERRY (*Vaccinium ashei* Reade) CV. BRIGHTWELL CULTIVATED WITH SILVER THIOSULFATE

ABSTRACT

During the culture *in vitro* the ethylene accumulation inside the culture recipient can be detrimental to culture. An alternative to avoid the formation of ethylene and that has brought good results in seedling development is the addition of silver thiosulfate (STS), an inhibitor of the synthesis of this hormone. Based on this knowledge, the present study aimed to evaluate the influence STS the *in vitro* establishment of blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) cv. Brightwell. Nodal segments were used, in WPM culture medium, supplemented with 50 mL of 2iP [100 mg.L⁻¹] and STS at concentrations of 0, 15, 30, 45 e 60 µM. After 60 days was assessed the percentage of surviving explants and that developed leaf primordia, number of buds with shoots, length of longer budding and number of leaves. The data obtained were submitted to analysis of variance and, when significant, compared by Duncan test ($p \leq 0.05$) and shown by polynomial regression. The effect of STS concentration used was significant at 5% probability for the parameters number of buds with shoots and leaves and favored by the use of 45 µM of STS.

Keywords: ethylene, STS, micropropagation.

5.1 INTRODUÇÃO

A micropropagação é baseada na proliferação de gemas axilares e na capacidade de células de plantas maduras diferenciadas em rediferenciarem-se buscando desenvolver novos centros meristemáticos capazes de regenerar plantas normais (DEBNATH, 2011). Numerosos estudos sobre a cultura *in vitro* de *Vaccinium spp.* têm sido publicados há mais de 20 anos (LITWIŃCZUK; WADASBORÓN, 2009; ROSS; CASTILLO, 2009) e envolvem a cultura de meristemas e o uso de segmentos contendo tanto gemas apicais quanto laterais como explantes (DEBNATH, 2011).

Plantas cultivadas *in vitro* sintetizam etileno (STEINITZ et al., 2010), que regula muitos aspectos do ciclo de vida das plantas (LIN; ZHONG; GRIERSON, 2009) desde a germinação das sementes até a senescência de órgãos (BLEECKER; KENDE, 2000). Na cultura de tecidos, o gás etileno produzido pelo material vegetal volatiliza e permanece preso nos frascos de cultivo, em torno dos explantes. O acúmulo deste hormônio no interior do recipiente durante a micropropagação pode ser desfavorável para o desenvolvimento da cultura (STEINITZ et al., 2010), acelerando o processo de senescência.

Compostos como o nitrato de prata (AgNO_3) e o tiosulfato de prata (STS) são utilizados para inibir a ação do etileno na cultura de tecido *in vitro* (MARUTANIHERT et al., 2011). Steinitz et al. (2010) observaram que o uso de AgNO_3 no meio de cultura sólido reage com algumas marcas comerciais de ágar, corando os géis em diferentes tonalidades e levando à formação do precipitado de cloreto de prata (AgCl). Os íons de prata adicionados no meio de cultura na forma de STS regulam significativamente a atividade do etileno na maioria das plantas (SRIDHAR; PREETHI; NAIDU, 2011) e seu mecanismo de inibição do etileno se deve à substituição do cofator Cu pelo íon Ag^+ , impedindo as alterações necessárias para a transmissão do sinal aos receptores de etileno (BINDER, 2008).

Em *Prunus americana* L. o uso do STS aumentou a regeneração a partir de folhas adventícias (BURGOS; ALBURQUERQUE, 2002). Em *Stevia rebaudiana* houve efeito positivo sobre a formação de brotações (PREETHI; SRIDHAR; NAIDU, 2011), assim como em *P. serotina* (LIU; PIJUT, 2008). Já em segmentos nodais de

diferentes espécies de citros o STS reduziu a queda de folhas (MARUTANI-HERT et al., 2011).

Desta forma, objetivou-se neste trabalho foi avaliar a influência do tiosulfato de prata no estabelecimento *in vitro* de mirtilheiro (*Vaccinium ashei* Reade) cv. Brightwell a partir de segmentos nodais.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Ramos semilenhosos de mirtilheiros cv. Brightwell, coletados em agosto de 2013, no pomar experimental do departamento de Agronomia – *Campus* CEDETEG/UNICENTRO, localizado no município de Guarapuava, PR (25°23'36" de latitude, 51°27'19" de longitude e 1.120m de altitude) foram cortados em segmentos de 20 cm, colocados em frascos com água e levados à sala climatizada com ar condicionado (temperatura de 25°C ± 2°C), com fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons do período de luz de 27 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Os segmentos permaneceram nestas condições até a emissão de brotações (SILVA et al., 2008) com aproximadamente 2 cm, as quais foram destacadas dos ramos. Após a retirada das folhas procedeu-se a desinfestação dos brotos em câmara de fluxo laminar. Inicialmente o material foi mergulhado em álcool 70% por 30 segundos, seguido da imersão em hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) adicionado de 2 gotas de Tween 20, durante 10 minutos (SILVA et al., 2006). Após a desinfestação, os ramos foram lavados por três vezes em água estéril. Em seguida foram preparados os explantes mantendo-se duas gemas e aproximadamente 1 cm de comprimento.

O meio de cultura utilizado para inoculação do material *in vitro* foi o WPM (LLOYD; McCOWN, 1980) suplementado de 50 mL de 2iP [100 mg.L^{-1}], 30 g.L^{-1} de sacarose, 100 mg.L^{-1} de mio-inositol (SCHUCH et al., 2008). O pH foi ajustado para 5,0 antes da inclusão de 6 g.L^{-1} de ágar. O meio de cultura foi previamente autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos. O tiosulfato de prata 0,02 M foi preparado no momento do uso, em seguida esterilizado em filtro Millipore® com membrana de 0,22 μ de diâmetro do poro e acrescido ao meio de cultura basal numa temperatura de 50-60°C.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco concentrações de STS (0, 15, 30, 45 e 60 μM), quatro repetições e parcela experimental com 5 tubos de ensaio com um explante cada. Após a inoculação dos explantes, os tubos foram vedados com tampa plástica e mantidos em sala climatizada com ar condicionado (temperatura constante $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), no escuro por sete dias (SILVA et al., 2006) e posteriormente foram analisadas as variáveis porcentagens de explantes oxidados, contaminação fúngica e bacteriana.

A seguir os tubos foram transferidos para a luz com fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons do período de luz de $27 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Após 60 dias da instalação do experimento, foi avaliada a influência do STS no estabelecimento *in vitro* de mirtilheiro cv. Brightwell através da porcentagem de explantes sobreviventes (verdes) e de explantes que desenvolveram primórdios foliares, número de gemas com brotações, comprimento da maior brotação e número de folhas. Os dados de número de gemas com brotações, comprimento da maior brotação e número de folhas foram transformados para $\sqrt{y+1}$. A seguir todos os dados foram submetidos ao teste de Bartlett, seguido de análise de variância e, quando significativos, comparadas pelo teste Duncan ($p \leq 0,05$) e regressão polinomial pelo programa estatístico SAS.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos sete primeiros dias da instalação do experimento, os tubos de ensaio foram acomodados no escuro. Após este período, a contaminação fúngica foi de 7% para o tratamento com 60 μM de STS. Para os demais tratamentos tanto a contaminação bacteriana quanto a fúngica foi nula. Também não ocorreu a oxidação dos explantes. A oxidação fenólica pode ser observada na cultura de tecidos *in vitro*, durante o rompimento celular, após a excisão do explante (DAS; PAL, 2005). O acondicionamento dos explantes no escuro na primeira semana do estabelecimento *in vitro* contribui para evitar esse fenômeno (DUTRA; WENDLING; BRONDANI, 2009).

Os dados de porcentagem de explantes sobreviventes (verdes) e de explantes que desenvolveram primórdios foliares, após 60 dias do estabelecimento *in vitro*, em meio de cultura contendo diferentes concentrações de STS, são apresentados na Tabela 2. Na avaliação final do experimento não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação à porcentagem de explantes sobreviventes (verdes). Entre os explantes sobreviventes que desenvolveram primórdios foliares, os melhores resultados foram observados nos tratamentos que continham STS na composição do meio de cultura. Para todos os tratamentos, a porcentagem média de explantes sobreviventes foi superior à porcentagem média de explantes que desenvolveram primórdios foliares, o que mostra que nem todos os explantes que sobreviveram, desenvolveram primórdios.

TABELA 2 - Porcentagem de explantes sobreviventes e que desenvolveram primórdios foliares, após 60 dias de cultivo *in vitro*, de mirtilheiro *Vaccinium ashei* Reade cv. Brightwell, em meio de cultura contendo diferentes concentrações de STS. Ponta Grossa, 2013

STS (μM)	Porcentagem Média de Explantes Sobreviventes	Porcentagem Média de Explantes com Primórdios Foliares
0	86,67 ns	53,33 B
15	73,33 ns	60,00 Ab
30	86,67 ns	80,00 Ab
45	93,33 ns	86,67 A
60	93,33 ns	86,67 A
Regressão Quadrática*		ns
CV(%)	18,40	24,39

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade. ns= não significativo. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

Na Tabela 3 são apresentados os resultados da análise de variância dos dados transformados do número de gemas com brotações, número de folhas, comprimento da maior brotação e o valor de Qui-Quadrado (χ^2) referente ao teste de Bartlett, que mostrou homogeneidade das variâncias dos tratamentos. Para as variáveis número de gemas com brotações e de folhas, os tratamentos se mostraram diferentes estatisticamente ($\alpha = 0,05$). Já para o comprimento da maior brotação (cm), os tratamentos não apresentaram diferença estatística significativa ($\alpha = 0,0584$).

TABELA 3 - Resultados da análise de variância dos dados de número de gemas com brotações, número de folhas, comprimento da maior brotação no cultivo *in vitro* de mirtilheiro *Vaccinium ashei* Reade cv. Brightwell em meio de cultura contendo diferentes concentrações de STS

Número de gemas com brotações				
Fontes de Variação	G.L.	Quadrado médio	F	A
Tratamentos	4	0.27539		
Erro	95	0.05524	4.99*	0.0011
Coeficiente de Variação (%)			16.46	
Qui-quadrado (χ^2)			3.79670*	
Número de folhas				
Fontes de Variação	G.L.	Quadrado médio	F	A
Tratamentos	4	3.65979		
Erro	95	0.60750	6.02*	0.0002
Coeficiente de Variação (%)			31.46	
Qui-quadrado (χ^2)			1.19549*	
Comprimento da maior brotação				
Fontes de Variação	G.L.	Quadrado médio	F	A
Tratamentos	4	0.02644		
Erro	95	0.01118	2.36 ^{NS}	0.0584
Coeficiente de Variação (%)			9.11	
Qui-quadrado (χ^2)			1.21137*	

^{NS} não significativo

* significativo a 5% de probabilidade

Na Tabela 4 é apresentado o efeito das concentrações de STS sob as médias dos parâmetros número de gemas com brotações, de folhas e comprimento da maior brotação, que se mostraram diferentes significativamente, ao nível de 5% de probabilidade. A variável comprimento da maior brotação, porém não mostrou diferença significativa entre os tratamentos na análise da variância (Tabela 3). O parâmetro número de gemas com brotações foi mostrado por regressão quadrática (Gráfico 5).

Com o uso do STS houve um maior número de folhas e de gemas com brotações nas concentrações superiores a 30 μM (Tabela 4). O número máximo de gemas com brotações (1,5561) foi obtido com 45 μM de STS e a derivada de primeira ordem da função quadrática no ponto de inflexão da curva correspondente a 42 μM (Gráfico 5). Um aumento significativo de gemas e área foliar também foi observado em *Solanum nigrum* L., quando a ação e a biossíntese do etileno foram inibidas (SRIDHAR; PREETHI; NAIDU, 2011). Já em citros o STS alterou o

crescimento da parte aérea em concentração de 200 mM (MARUTANI-HERT et al., 2011).

TABELA 4 - Médias do número de gemas com brotações, número de folhas, comprimento da maior brotação no cultivo *in vitro* de mirtilheiro *Vaccinium ashei* Reade cv. Brightwell em meio de cultura contendo diferentes concentrações de STS

STS (μM)	Número de gemas com brotações	Número de folhas	Comprimento da maior brotação (cm)
0	1,2845 c	1,95 b	1,1299 b
15	1,3333 bc	2,12 b	1,1199 b
30	1,5221 a	2,65 a	1,1618 ab
45	1,5561 a	2,99 a	1,2082 a
60	1,4437 ab	2,66 a	1,1813 ab

Regressão
Quadrática *

$$y = 1,25151228 + 0,01269657x + 0,00015146x^2$$

$$R^2 = 0,83$$

ns

ns

Dados transformados $\sqrt{(x+1)}$. * Significativo ao nível de 5% de probabilidade. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

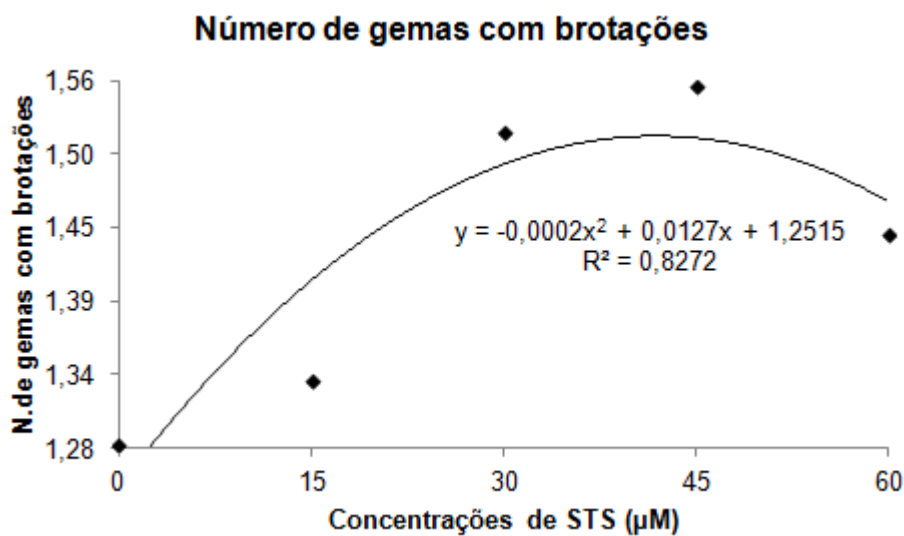


GRÁFICO 5 - Curva de tendência e respectiva equação entre a concentração de STS (μM) e o número de gemas com brotações em explantes de mirtilheiro *Vaccinium ashei* Reade cv. Brightwell, após 60 dias de cultivo *in vitro*

Íons Ag^+ presentes no STS bloqueiam a produção de etileno, inibindo o envelhecimento precoce das plantas (SRIDHAR; PREETHI; NAIDU, 2011). Neste trabalho, após 60 dias da instalação do experimento, o tiosulfato de prata inibiu a

síntese de etileno, mantendo as folhas verdes, com características de tecido jovem, enquanto explantes do tratamento sem adição de STS apresentavam sinais visuais de senescência, com a presença de antocianinas internerval, amarelecimento e queda das folhas (Figura 5).

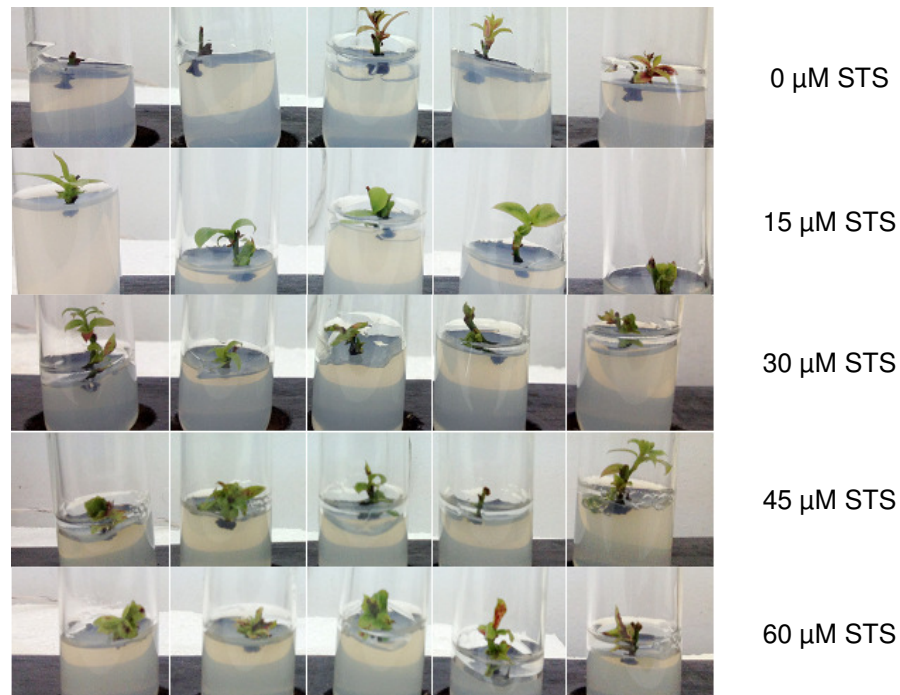


FIGURA 5 - Efeito do tiossulfato de prata no estabelecimento *in vitro* de mirtilheiro (*Vaccinium ashei* Reade) cv. Brightwell após 60 dias de cultivo. Ponta Grossa, 2013

Explantes tratados com STS apresentaram folhas envelhadas e pontos necróticos (Figura 6). Folhas de damasco apresentaram necrose foliar leve após a adição de STS, sugerindo ligeira toxidez do composto (BURGOS; ALBURQUERQUE, 2002). Propõe-se o uso STS nos primeiros 30 dias do estabelecimento *in vitro*, para estimular o surgimento de brotações e folhas, seguido de meio livre de STS para evitar a toxidade.

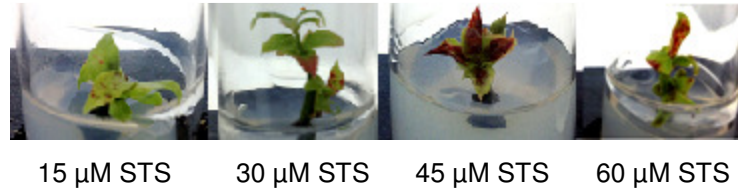


FIGURA 6 - Necrose foliar de mirtilheiro *Vaccinium ashei* Reade cv. Brightwell, tratados com tiosulfato de prata, após 60 dias de cultivo *in vitro*. Ponta Grossa, 2013

5.4 CONCLUSÃO

O uso de 45 μ M de STS favorece o desenvolvimento das gemas vegetativas e de folhas em *Vaccinium ashei* Reade cv. Brightwell.

REFERÊNCIAS

- AMARO, M. S.; MEDEIROS FILHO, S.; GUIMARÃES, R. M.; TEÓFILO, E. M. Influência da temperatura e regime de luz na germinação de sementes de janaguba (*Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 3, p. 450-457, mai-jun, 2006.
- ANTUNES, L. E. C.; RASEIRA, M. do C. B. **Cultivo do mirtilo (*Vaccinium spp*)**. Sistema de Produção, v. 8. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. 99 p.
- ARAUJO NETO, J. C. de; AGUIAR, I. B. de A.; FERREIRA, V. M.; RODRIGUES, T. de J. D. Armazenamento e requerimento fotoblástico de sementes de *Acacia polyphylla* DC. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 27, n.1, p. 115-124, 2005.
- BARNEY, D. L.; SHAFII, B.; PRICE, W. J. Cold stratification delays germination of black huckleberry seeds. **Hortscience**, v. 36, n.4, p. 813-813, 2001.
- BASKIN, C. C.; MILBERG, P. ANDERSSON, L.; BASKIN, J. M. Germination studies of three dwarf shrubs (*Vaccinium*, Ericaceae) of northern hemisphere coniferous forests. **Canadian Journal of Botany**, v.78, p. 1552-1560, 2000.
- BASKIN, C.C.; BASKIN, J.M. **Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. San Diego: Academic Press, San Diego. 1998. 666 p.
- BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**, v. 14, p. 1-16, mar. 2004.
- BELCHER E. C. **Handbook on seeds of browse-shrubs and forbs**. Atlanta: U.S.D.A Forest Service, Southern Region, 1985. 246 p.
- BINDER, B. M. The ethylene receptors: complex perception for a simple gas. **Plant Science**, vol. 175, p. 8-17, 2008.
- BIONDI, D.; LEAL, L. Tratamentos pré-germinativos em sementes de *Mimosa strobiliflora* BURKART. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 245-248, 2008.
- BLEECKER, B. A.; KENDE, H. Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 16, p. 1-18, 2000.
- BOWLING, B.L. **The Berry Grower's Companion**. Portland: Timber Press, 2005. 284 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 395 p.

BURGOS, L.; ALBURQUERQUE, N. Ethylene inhibitors and low kanamycin concentrations improve adventitious regeneration from apricot leaves. **Plant Cell Reports**, vol. 21, p.1167-1174, 2003.

CANTUARIAS-AVILÉS, T. **Cultivo do mirtilheiro**. Série Produtor Rural, n. 48. Piracicaba: ESALQ, 2010. 38 p.

CARDENAL, L. Y. R. & MALDONADO, J. C. P. Propagación *in vitro* de plantas adultas de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae). **Acta Botanica Brasilica**, vol. 24, n. 4, p. 1086-1095, 2010.

CARDOSO, V. J. M. Conceito e classificação da dormência em sementes. **Oecologia Brasiliensis**, v.13, n.4, p. 619-630, 2009.

CARVALHO, J. A.; PINHO, É. V. R. V.; OLIVEIRA, J. A.; GUIMARÃES, R. M.; BONOME, L. T. Testes rápidos para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Citromelo swingle*. **Revista Brasileira de Sementes [online]**, Londrina, v.24, n.1, p. 263-270, 2002.

CASTILLO, A.; CARRAU, J. S. F.; LEONI, C.; PEREIRA, G. Investigación en arandanos en Aruguay: propagación *in vitro* y evaluación de variedades por NA. In: II SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO E I ENCONTRO DE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 2004, Pelotas. **Palestras**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004, p. 226-229.

CASTRO, C.; OLARTE, Y.; RACHE, L.; PACHECO, J. Development of a germination protocol for blueberry seeds (*Vaccinium meridionale* Swartz). **Agronomía Colombiana**, v. 30, n. 2, p.196-203, 2012.

CLAPA, D.; FIRA, A.; VESCAN, L. A. Influence of various types of culture vessels upon the *in vitro* multiplication of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*). **Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies**, v. 69, p.1-2, 2012.

COSTA, C. J.; SANTOS, C. P. dos. Teste de tetrazólio em sementes de leucena. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 66-72, 2010.

COSTA, T. G.; DIAS, A. H. de S.; ELIAS, T de. F.; BREIER, T. B.; ABREU, H. dos S. Lignina e a dormência em sementes de três espécies de leguminosas florestais da Mata Atlântica. **Floresta e Ambiente**, v. 18, n. 2, p. 204-209, 2011.

PREETHI, D.; SRIDHAR, T. M.; NAIDU, C. V. Effect of Bavistin and silver thiosulphate on *in vitro* plant regeneration of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Phytology*, vol.3, n.5, p.74-77, 2011.

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

DARNELL, R. L. Blueberry botany/environmental physiology. In: CHILDERS, N. F.; LYRENE, P. M. **Blueberries for growers, gardeners, promoters**. Flórida: E.O.Painter Printing Company, 2006. p. 5-13.

DAS, M.; PAL, A. *In vitro* regeneration of *Bambusa balcooa* Roxb.: Factors affecting changes of morphogenetic competence in the axillary buds. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, vol. 81, p. 109-112, 2005.

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

DEBNATH, S. C. Bioreactors and molecular analysis in berry crop micropropagation. A review. **Canadian Journal of Plant Science**, vol. 91, p.147-157, 2011.

DEBSKA, K.; KRASUSKA, U.; BUDNICKA, K.; BOGATEK, R.; GNIAZDOWSKA, A. Dormancy removal of apple seeds by cold stratification is associated with fluctuation in H₂O₂, NO production and protein carbonylation level. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, p. 480 - 488, 2013.

D'HONDT, B.; BRYNS, R.; HOFFMANN, M. The incidence, field performance and heritability of non-dormant seeds in white clover (*Trifolium repens* L.). **Seed Science Research**, v. 20, n. 3, p. 169–177, set. 2010.

DI SALVATORE, M.; CARAFA, A. M.; CARRATÙ, G. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates. **Chemosphere**, v. 73, p. 1461–1464, 2008.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A micropropagação de Eucalipto. *Pesquisa Florestal Brasileira*, Colombo, n. 58, p. 49-59, jan-jun, 2009.

ELLIS, R. H., HONG, T. D., ROBERTS, E. H. Ericaceae. Handbook of Seed Technology for Genebanks. In: ELLIS, R. H., HONG, T. D., ROBERTS, E. H. **Compendium of Specific Germination Information and Test Recommendations**. Chapter 36, v. 2. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1985.

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

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Fatores que afetam a multiplicação *in vitro* de mirtilo. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 7, n. 1-2, p. 83-88, 2006.

FACHINELLO, J. C. Mirtilo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 285-576, 2008.

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

FARIA, A.; OLIVEIRA, J.; NEVES, P.; GAMEIRO, P.; SANTOS-BUELGA, C.; FREITAS, V.; MATEUS, N. Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts. **Journal of Agriculture and Food and Chemistry**, v. 53, n.17, p. 6896-6902, jul, 2005.

FISCHER, D. L. de O.; FACHINELLO, J. C.; ANTUNES, L. E. C.; TOMAZ, Z. F. P.; GIACOBBO, C. L. Efeito do ácido indolbutírico e da cultivar no enraizamento de estacas lenhosas de mirtilo. **Revista Brasileira de Fruticultura [online]**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 285-289, jun. 2008.

FISCHER, D. L. de O.; FACHINELLO, J. C.; GIACOBBO, C. L.; TIMM, C. R. F. The effect of hormone, stratification period and cultivar on seeds germination of blueberry. **Acta Horticulture (ISHS)**, v.872, 2010.

FISCHER, D. L. de O.; FACHINELLO, J. C.; PIANA, C. F de B.; BIANCHI, V. J.; MACHADO, N. P. Seleção de genótipos de mirtilheiro obtidos a partir de polinização aberta. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 1, p. 221-231, mar, 2014.

FRANZON, R. C.; CARPENEDO, S.; SILVA, J. C. S. **Produção de Mudanças: principais técnicas utilizadas na propagação de fruteiras**. Documentos, 283. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2010. 56 p.

FREIRE, C. J. S. **Sistema de produção do mirtilo: nutrição e adubação para o mirtilo**. Sistemas de produção, v. 8, versão eletrônica, nov, 2007. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mirtilo/SistemaProducaoMirtilo/nutricao.htm>

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 50, n.1, p. 151-158, abr. 1968.

GAO, Y. P.; ZHENG, G. H. LAWRENCE, V. G. Potassium hydroxide improves seed germination and emergence in five native plant species. **Hortscience**, v. 33, n. 2, p. 274-276, 1998.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3 ed. v.1. Dordrecht: Springer, 2008. 501 p.

GONZALEZ, M. V.; LOPEZ, M.; VALDES, A. E.; ORDAS, R. J. Micropropagation of berry fruit species using nodal segments from field-grown plants. **Annals of Applied Biology**, n.137, p.73-78, ago. 2000.

GRIFFIN, J. J.; BLAZICH, F. A. *Vaccinium* L. In: **The woody plant seed manual**, Washington, D.C.: U.S.D.A Forest Service, 2008. p. 1154-1159.

GRIMALDI, F.; GROHSKOPF, M. A.; MUNIZ, A. W.; GUIDOLIN, A. F. Enraizamento *in vitro* de frutíferas da família *Rosaceae*. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. Lages, v.7, n.2, p.160-168, 2008.

GUEDES, R. S.; ALVES, E. U.; GONÇALVES, E. P.; BRAGA JÚNIOR. J. M.; VIANA, J. S.; COLARES, P. N. Q. Substratos e temperaturas para testes de germinação e vigor de sementes de *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 34, n. 1, p. 57-64, 2010.

HERNÁNDEZ, M. I. P.; LOBO, M. A.; MEDINA, C. I. C.; CARTAGENA, J. R. V.; DELGADO, O. A. P. Comportamiento de la germinación y categorización de la latencia en semillas de mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz). **Agronomía Colombiana**, v. 27, n. 1, p. 15-23, 2009.

HOFFMANN, A. FACHINELLO, J. C.; SANTOS, A. M. Enraizamento de estacas de duas cultivares de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.1, n.1, 1995.

HOU, J. Q.; SIMPSON, G. M. Effects of immersing dry seeds in alkaline solutions on seed dormancy and water uptake in wild oat (*Avena fatua*). **Canadian Journal of Plant Science**, v. 74, p. 19-24, 1994.

HUXLEY, A.; GRIFFITHS, M.; LEVY, M. **The new royal horticultural society dictionary of gardening**. V.1. New York: The Stockton Press, 1992. 815 p.

JAMIESON, A. R. 'Novablue', a seed-propagated lowbush blueberry family. **Hortscience**. V. 43, n.6, p.1902–1903, out, 2008.

JIANG, Y.; HONG, Y.; ZHANG, D.; HE, S.; WANG, C. Influences of media and cytokinins on shoot proliferation of 'Brightwell' and 'Choice' blueberries *in vitro*. **Acta Horticulturae (ISHS)**, Leuven, v. 810, 2009.

KAHKONEN, M.P., HOPIA, A.I., HEINONEN, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 4076-4082, 2001.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 472 p.

KOLATTUKUDY, P. E. Structure, biosynthesis, and biodegradation of cutin and suberin. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 32, p. 539-567, jun. 1981.

KÖPPEN, W. 1948. **Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra**. Fondo de Cultura Económica. México. 479p.

KRUL, W.R.; MOWBRAY, G.H. Grapes. In: SHARP, W. R.; EVANS, D. A.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. **Handbook of Plant Cell Culture**. 2 ed. New York: Macmillan, 1984. p.396-434.

LABOURIAU, L. F. G. O interesse do estudo das sementes. **Estudos Avançados [online]**, São Paulo, v. 4, n.9, p. 228-242, mai-ago. 1990.

LIN, Z.; ZHONG, S.; GRIERSON, D. Recent advances in ethylene research. **Journal of Experimental Botany**, vol. 60, n. 12, p. 3311–3336, jun. 2009.

LITWIŃCZUK, W.; WADAS-BOROŃ, M. Development of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* hort. non L.) *in vitro* shoot cultures under the influence of melatonin. **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus**, vol. 8, n.3, p.3-12, 2009.

LIU, X.; PIJUT, P. M. Plant regeneration from *in vitro* leaves of mature black cherry (*Prunus serotina*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 94, p. 113-123, ago. 2008.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, Seattle, 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 Chemistry**, v. 111, p. 249–254. 2008.

LOPEZ, O. A.; BARNEY, D. L.; SHAFII, B.; PRICE, W. J. Modeling the effects of temperature and gibberellic acid concentration on red huckleberry seed germination. **Hortscience**, v. 43, n.1, p. 223-228, 2008.

LYRENE, P. M.; BALLINGTON, J. R. Varieties and their characteristics. In: CHILDERS, N. F.; LYRENE, P. M. **Blueberries for growers, gardeners, promoters**. Flórida: E.O.Painter Printing Company, 2006. p. 26-37.

MADAIL, J. C. M.; SANTOS, A. M. **Sistema de produção do mirtilo: aspectos econômicos do mirtilo**. Sistemas de produção, v. 8, versão eletrônica, nov, 2007. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mirtilo/SistemaProducaoMirtilo/aspectos.htm>. Acesso em 11/11/2013.

MAINLAND, C.M. Propagation of Blueberries. In: CHILDERS, N.F.; LYRENE, P.M. **Blueberries for growers, gardeners, promoters**. Flórida: E.O.Painter Printing Company, 2006. p. 49-58.

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

MARTINS, C. C.; MACHADO, C. G.; CAVASINI, R. Temperatura e substrato para o teste de germinação de sementes de pinhão-manso. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n.3, p. 863-868, mai-jun. 2008.

MARTINS, C. C.; MARTINS, D.; NEGRISOLI, E.; STANGUERLIM, H. Comportamento germinativo de sementes de leiteiro (*Peschiera fuchsiaefolia*): efeito da temperatura e luz. **Planta Daninha**, v. 18, n. 1, 2000.

MARUTANI-HERT, M.; EVENS, T. J.; McCOLLUM, G. T.; NIEDZ, R. P. Bud emergence and shoot growth from mature citrus nodal stem segments. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 106, p. 81-91, 2011.

MEDEIROS, A. C. de S.; EIRA, M. T. S. da. **Comportamento Fisiológico, Secagem e Armazenamento de Sementes Florestais Nativas**. Circular Técnica, n. 127. Colombo: Embrapa Florestas, 2006. 13 p.

- MEINERS, J.; SCHWAB, M.; SZANKOWSKI, I. Efficient *in vitro* regeneration systems for *Vaccinium species*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 89, p.169–176. 2007.
- MENDES-RODRIGUES, C.; ARAÚJO, F. P. de.; BARBOSA-SOUZA, C.; BARBOSA-SOUZA, V. RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. de; OLIVEIRA, P. E. Multiple dormancy and maternal effect on *Miconia ferruginata* (Melastomataceae) seed germination, Serra de Caldas Novas, Goiás, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.33, n.1, p. 93-105, jan-mar, 2010.
- MONTEIRO, C. La expansion de la produccion de arandanos em Uruguay y su relacion com el Hemisfério sur. In: II SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO E I ENCONTRO DE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 2004, Pelotas. **Palestras**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004, p. 234-242.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 6, p. 473-479, 1962.
- NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; CASTRO, A. H. de.; VIEIRA, C. V.; ABBADE, L. C.; ALVARENGA, A. A. Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1053-1059, set-out, 2004.
- PAAL, T.; STARAST, M.; NOORMETS-SANSKI, M.; VOOL, E.; TASA, T.; KARP, K. Influence of liming and fertilization on lowbush blueberry in harvested peat field condition. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 130, p. 157–163, 2011.
- PAIVA, A. M. S.; ALOUFA, M. A. I. Estabelecimento *in vitro* de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, vol.11, n. 3, p. 300-304, 2009.
- PELIZZA, T. R.; DAMIANI, C. R.; RUFATO, A. DE R. AFFONSO, L. B. HAWERROTH, 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**, Jaboticabal, v. 33, n. 3, p.898-905, set. 2011.
- PELIZZA, T. R.; NASCIMENTO, D. C.; AFFONSO, L. B.; CAMARGO, S. S.; CARRA, B. SCHUCH, M. W. Enraizamento de plântulas de mirtilheiro em condição *ex vitro* com diferentes substratos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 1, p. 255-261, mar. 2012.
- 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 Climax. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 57-64, jan-mar, 2012.
- POLL, H.; KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; REETZ, E. R.; CARVALHO, C.; SILVEIRA, D. N. De bom tamanho: segmento das pequenas frutas constitui boa alternativa de renda para os produtores brasileiros e já cria oportunidades valiosas para o país. In:

Anuário Brasileiro da Fruticultura, Santa Cruz do Sul, Gazeta Santa Cruz, 2013, 136p.

POPIGINIS, F. **Fisiologia da semente**. 2. ed. Brasília: s.ed., 1985. 289 p.

RASEIRA, M.C.B.; ANTUNES, L.E.C. **A cultura do mirtilo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 67 p.

REED, B. M.; ABDELNOUR-ESQUIVEL, A. The use of zeatin to initiate *in vitro* cultures of *Vaccinium* species and cultivars. **Hortscience**, v. 26, n.10, p. 1320-1322, 1991.

RETAMALES, J. B.; HANCOCK, J. F. **Blueberries**. Oxfordshire: CABI, 2012. 336 p.
RODRIGUES, S. A.; GULARTE, M, A.; PEREIRA, E. R. B.; BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T. Influência da cultivar nas características físicas, químicas e sensoriais de *topping* de mirtilo. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v. 01, n. 01: p. 9-29. 2007.

ROGALSKI, M.; MORAES, L. K. A. de.; FELISBINO, C.; CRESTANI, L.; GUERRA, M. P.; SILVA, A. L. da. Aclimatização de porta-enxertos de *Prunus sp.* micropropagados. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 279-281, ago. 2003.

ROSA, L. P. P. da.; ETCHEVERRIA, C.; DÁVILA, E. da S.; MARTINS, C. R. Efeito de antibiótico e do período de escuro no estabelecimento *in vitro* de mirtilo *Vaccinium spp.* Revista da FZVA, Uruguaiana, v.16, n.2, p. 265-277, 2009.

ROSS, S.; CASTILLO, A. Mass propagation of *Vaccinium corymbosum* in bioreactors. *Agrociencia*, vol. 13, n. 2, p 1-8, 2009.

ROWLAND, L. J.; ALKHAROUF, N.; DARWISH, O.; OGDEN, E. L.; POLASHOCK, J. J.; BASSIL, N. V.; MAIN, D. Generation and analysis of blueberry transcriptome sequences from leaves, developing fruit, and flower buds from cold acclimation through deacclimation. **BMC Plant Biology**, v. 12, p. 46, 2012.

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

SANTOS, A. M. Situação e Perspectivas do Mirtilo no Brasil. In: II SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO E I ENCONTRO DE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 2004, Pelotas. **Palestras**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004, p. 282-285.

SARMENTO, M. B.; SILVA, A. C. S. da.; VILLELA, F. A.; SANTOS, K. L. dos; MATTOS, L. C. P. de. Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica em sementes de goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* O. BERG BURRET). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n. 1, p. 270-276, mar. 2013.

SCALOPPI JUNIOR, E, J.; MARTINS, A. B. G. Estaquia em anonas. **Revista Brasileira de Fruticultura [online]**, Jaboticabal, v. 36, n.1, p 147-156, fev. 2014.

SCHUCH, M. W.; DAMIANI, C. R.; SILVA, L.C.; ERIG, A. C. Micropropagação como técnica de rejuvenescimento em mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cultivar Climax. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 814-820, mai-jun, 2008.

SEVERO, J.; GALARÇA, S. P.; AIRES, R. F.; ROMBALDI, C.V. Avaliação de compostos fenólicos, antocianinas, vitamina C e capacidade antioxidante em mirtilo armazenado em atmosfera controlada. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, p. 65 – 70, jan, 2009.

SHAHRAM, S. Seed dormancy and germination of *Vaccinium arctostaphylos* L. **International Journal of Botany**, v. 3, n. 3, p. 307-311, 2007.

SHARPE, R.H. Consultants report. IICA/EMBRAPA – UEPAE, Pelotas, 1980. 11 p.
SILVA, L. C. DA.; SCHUCH, M. W.; SOUZA, J. A. DE. ERIG, A. C.; ANTUNES, L. E. C. Tipo de ramo e efeito do ácido indal acético (AIA) no estabelecimento *in vitro* de três cultivares de mirtilo. **Ciência Rural [online]**, Santa Maria, v. 38, n.2, p. 522-525, mar-abr, 2008.

SILVA, L. C. da.; SCHUCH, M. W.; SOUZA, J. A. de.; ERIG, A. C.; ANTUNES, L. E. C. Tipo de ramo e efeito do ácido indal acético (AIA) no estabelecimento *in vitro* de três cultivares de mirtilo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.2, p. 522-525, mar-abr, 2008.

SILVA, L. C.; SCHUCH, M. W.; SOUZA, J. A.; ERIG, A. C.; ANTUNES, L. E. C. Meio nutritivo, reguladores de crescimento e frio no estabelecimento *in vitro* de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cv. Delite. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 4, p. 405-408, out-dez, 2006.

SILVA, L. C.; SCHUCH, M. W.; SOUZA, J. A.; ERIG, A. C.; ANTUNES, L. E. C. Efeito da iluminação e pré-lavagem das brotações de mirtilo cv. Flórida no estabelecimento *in vitro*. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.13, n.1, p.127-129, jan-mar, 2007.

SILVEIRA, T. M. T. da. Influência do dano da abelha-irapuá em flores de mirtilheiro sobre a frutificação efetiva e as frutas produzidas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 1, p. 303-307, mar, 2010.

SMAGULA, J. M. J. Tissue culture propagation. In: CHILDERS, N.F.; LYRENE, P.M. **Blueberries for growers, gardeners, promoters**. Flórida: E. O. Painter Printing Company, 2006. p. 55-58.

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

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.9, n.4, p.103-117, 2007.

SRIDHAR, T. M.; PREETHI, D.; NAIDU, C. V. Effect of silver thiosulphate on *in vitro* plant regeneration of *Solanum nigrum* (Linn.) – An important antiulcer medicinal plant. **Current Botany**, vol. 2, n.7, p. 14-16, 2011.

STEINITZ, B.; BARR, N.; TABIB, Y.; VAKNIN, Y.; BERNSTEIN, N. Control of *in vitro* rooting and plant development in *Corymbia maculata* by silver nitrate, silver thiosulfate and thiosulfate ion. **Plant Cell Reports**, vol. 29, p.1315-1323, 2010.

TETSUMURA, T.; MATSUMOTO, Y.; SATO, M.; HONSHO, C.; YAMASHITA, K.; KOMATSU, H.; SUGIMOTO, Y.; KUNITAKE, H. Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars. **Scientia Horticulturae**, v. 119, p. 72-74, 2008.

TITON, M.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; REIS, G. G. dos. Efeito do AIB no enraizamento de miniestacas e microestacas de clones de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. **Revista Árvore**, Viçosa, v.27, n.1, p.1-7, 2003.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa/SPI/Embrapa/CNPH, 1998. v. 2. 854 p.

TREVISAN, R.; FRANZON, R. C.; FRITSCH NETO, R.; GONCALVES, R. da S.; GONCALVES, E. M.; ANTUNES, L. E. C. Enraizamento de estacas herbáceas de mirtilo: influência da lesão na base e do ácido indolbutírico. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 402-406, mar-abr, 2008.

VIVIAN, R.; SILVA, A. A.; GIMENES JÚNIOR, M.; FAGAN, E. B.; RUIZ, S. T.; LABONIA, V. Dormência em sementes de plantas daninhas como mecanismo de sobrevivência: breve revisão. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 26, n. 02, p. 695-706, 2008.

WAGNER JÚNIOR, A.; COUTO, M.; RASEIRA, M. do C. B.; FRANZON, R. C. Efeito da lesão basal e do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas herbáceas de quatro cultivares de mirtilo. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.10, n. 2, p.251-253, abr-jun, 2004.

WALCK, J. L.; HIDAYATI, S. N.; DIXON, K. W.; THOMPSON, K.; POSCHLOD, P. Climate change and plant regeneration from seed. **Global Change Biology**, v. 17, p. 2145–2161, jan. 2011.

WANG, S. Y.; HANGJUN, C.; CAMP, M. J.; EHLENFELDT, M. K. Flavonoid constituents and their contribution to antioxidant activity in cultivars and hybrids of “rabbiteye” blueberry (*Vaccinium ashei* Reade). **Food Chemistry**, n. 132, p. 855–864, 2012.

WENDLING, I.; DUTRA, L. F.; GROSSI, F. **Produção de mudas de espécies lenhosas**. Documentos, 130. Colombo: Embrapa Florestas, 2006.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado em espécies florestais. *Floresta e Ambiente*, Rio de Janeiro, v.8, n.1, p.187-194, 2001.

WU, X.; PITTMAN, H.; CADWALLADER, L.; PRIOR, R. Increases in anthocyanin (acn) and antioxidant capacity in the gastrointestinal tract (git) were greater in blueberry (bb) compared to concord grape (cg) fed rats. **The FASEB Journal**, v.19, n.4, 2005.

XU, Q.; BUGHRARA, S.; NELSON, C.J.; COUTTS, J.H. Mechanisms of seed dormancy in zoysia (*Zoysia japonica* Steud.). **Seed Science and Technology**, v.33, n. 3, p. 543-550, out. 2005.

ZHENG, W., WANG, S.Y. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries and lingonberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 502–509, 2003.

ANEXO

TABELA 5 - Composição básica dos meios de cultura MS e WPM

Componente	MS	WPM
		mgL ⁻¹
Macronutrientes		
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	440,0	96,0
Ca(NO ₃) ₂ . 4 H ₂ O		556,0
HKl ₂ PO ₄	170,0	170,0
KNO ₃	1900,0	
K ₂ SO ₄		990,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	370,0	370,0
Na ₂ SO ₄	1650,0	400,0
Micronutrientes		
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,025	
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,025	0,25
Fe(SO ₄) ₃	6,2	6,2
H ₃ BO ₃	0,83	
KI	22,3	22,3
Hl ₂ MoO ₄ . Hl ₂ O	0,25	0,25
Na ₂ MoO ₄ . 2 Hl ₂ O	8,6	8,6
ZnSO ₄ . 7Hl ₂ O	27,8	27,8
Fe(SO ₄) . 7 Hl ₂ O	37,2	37,2
Orgânicos		
Ácido indol acético	0,5	
Biotina	2,0	
Glicina	100	
Mio-inositol	0,5	
Piridoxina.hcl	0,1	1,0

Fonte: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Manual de Procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental. Documento 61. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008. 44 p.