

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

KAMILA SANTANA

**MICROORGANISMOS SIMBIOTES, MATÉRIA ORGÂNICA E ADUBAÇÃO
NITROGENADA NO DESENVOLVIMENTO E NUTRIÇÃO DO MIRTILEIRO
CV. CLIMAX EM AMBIENTE PROTEGIDO**

PONTA GROSSA – PR

2016

KAMILA SANTANA

**MICROORGANISMOS SIMBIONTES, MATÉRIA ORGÂNICA E ADUBAÇÃO
NITROGENADA NO DESENVOLVIMENTO E NUTRIÇÃO DO MIRTILEIRO
CV. CLIMAX EM AMBIENTE PROTEGIDO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Ponta Grossa para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Linha de pesquisa: Fisiologia, Melhoramento e Manejo de culturas.

Orientador: Prof. Dr. Renato Vasconcelos Botelho

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Antônio Ayub

PONTA GROSSA – PR

2016

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

Santana, Kamila

S232 Microrganismos simbiotes, matéria orgânica e adubação nitrogenada no desenvolvimento e nutrição do mirtilheiro cv. Climax em ambiente protegido/ Kamila Santana. Ponta Grossa, 2016.
72f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia - Área de Concentração: Agricultura), Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador: Prof. Dr. Renato Vasconcelos Botelho.
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Antônio Ayub.

1.Vaccinium ashei. 2.Azospirillum brasilense. 3.Trichoderma asperellum. 4.Associação simbiótica. 5.Adubação orgânica. I.Botelho, Renato Vasconcelos. II. Ayub, Ricardo Antônio. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Agronomia. IV. 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: “Microorganismos simbiotes e matéria orgânica no desenvolvimento e nutrição de mirtilheiro cv. Climax em ambiente protegido”.

Nome: Kamila Santana

Orientador: Renato Vasconcelos Botelho

Aprovado pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Renato Vasconcelos Botelho



Prof. Dr. Luiz Antonio Biasi



Prof. Dr. Adriel Ferreira da Fonseca

Data da Realização: 24 de junho de 2016.

Aos meus amores, por todo o carinho, preocupação e incentivo.

Vera, Jorge e Marcos.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo dom da vida, por acordar todas as manhãs disposta a viver mais um dia e enfrentar o desafio que ele traz.

Aos meus pais, Jorge e Vera, por todo o apoio, carinho e compreensão.

Ao meu amor, Marcos, por sempre estar ao meu lado e torcer pelo meu sucesso.

Ao prof. Renato Vasconcelos Botelho, por ter me aceitado como orientanda, pela paciência, estímulo, compreensão, por suas valorosas contribuições no decorrer do projeto e sua constante presença durante todo o período do mestrado, mesmo com a distância entre as cidades.

Ao meu coorientador, prof. Ricardo Antônio Ayub, e toda a equipe do LabFruti, àqueles que hoje ainda estão envolvidos e àqueles que não estão mais: sr. Wilson, Jessé, Luane, Keren, Marília, Wesley, Marcela, Calistene e Marina. Em especial, à Marianne, ao Evaldo e a Letícia.

A equipe do Laboratório de Nutrição de Plantas pelo auxílio prestado durante a realização das análises, e, em especial, à Jessica, por não medir esforços em ajudar sempre que possível.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste.

RESUMO

SANTANA, K. **Microrganismos simbiotes, matéria orgânica e adubação nitrogenada no desenvolvimento e nutrição do mirtilheiro cv. Climax em ambiente protegido.** 2016, 69p. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Estadual de Ponta Grossa.

O mirtilheiro é uma cultura recentemente introduzida no Brasil, sendo que várias pesquisas tem-se voltado para seu melhor desenvolvimento e adaptação no país. Por possuir poucos pelos radiculares, forma associações com microrganismos afim de aumentar sua zona de absorção de nutrientes, sendo o nitrogênio o elemento absorvido em maior quantidade. Neste trabalho, observou-se a interação dessa cultura com os inóculos *Azospirillum brasilense* e *Trichoderma asperellum* em diferentes substratos ou doses de adubação nitrogenada. O experimento foi realizado com a cv. Clímax e as plantas acondicionadas em vasos, em casa de vegetação, sob delineamento experimental de blocos casualizados em esquema fatorial 3x3. Os fatores analisados foram inoculação (*A. brasilense*, *T. asperellum* ou sem inoculação) e formulação dos substratos (5; 20 e 35% de matéria orgânica – esterco bovino curtido) ou, no segundo experimento, inoculação (*A. brasilense*, *T. asperellum* ou sem inoculação) e doses de nitrogênio (0, 10 e 15 g de N planta⁻¹ – fornecido como ureia). A maior proporção de matéria orgânica propiciou as maiores médias em relação a variáveis fisiológicas (transpiração, eficiência no uso da água e eficiência de carboxilação) e de crescimento (área de limbo foliar, área foliar total e taxa de crescimento relativo), embora, para outras, não tenha diferido das plantas cultivadas com 20% de matéria orgânica. Com 35% de M.O., a inoculação com *T. asperellum* apresentou médias superiores em assimilação de CO₂ (A), eficiência de carboxilação (A/Ci) e taxa de crescimento relativo (TCR). As doses de nitrogênio influenciaram positivamente A/Ci, teores de clorofila, área foliar (de limbo e total) e concentração foliar de nitrogênio, embora não diferindo entre 10 ou 15g de N planta⁻¹. Para o acúmulo dos nutrientes Ca, Mg, S, Fe e Zn, a adubação nitrogenada não representou maiores teores foliares, embora isto possa estar relacionado a um efeito de diluição.

Palavras-chave: *Vaccinium ashei*, *Azospirillum brasilense*, *Trichoderma asperellum*, associação simbiótica, adubação orgânica, ureia.

ABSTRACT

SANTANA, K. **Symbionts microorganisms, organic matter and nitrogen fertilization in the development and nutrition of blueberry bush cv. Climax in a protective environment.** 2016, 69p. Dissertation of masters degree in Agronomy – State University of Ponta Grossa.

The blueberry is an agricultural crops recently introduced in Brazil and lots of researches are turning to develop and adapt it to the country. Due to its low amount of root hair, it forms associations with microorganisms to expand its zone of nutrient uptake, being the nitrogen the most required element. At this work it was observed the interaction of this cultivation with the inoculum *Azospirillum brasilense* and *Trichoderma asperellum* into different substrates or doses of nitrogen fertilization. The experiment was performed with cv. Climax and the plants conditioned in pots in greenhouse, under trial design of randomized blocks, factorial 3x3. The considered factors were inoculation (*A. brasilense*, *T. asperellum* or without inoculation) and formulation of the substrates (5; 20 e 35% of organic matter – hardened cattle manure) or, at the second experiment, inoculation (*A. brasilense*, *T. asperellum* or without inoculation) and doses of nitrogen (0, 10 and 15 g f N plant⁻¹ – provided as urea). The larger quantity of organic matter provided the highest averages relating to physiological (transpiration, water use efficiency and carboxylation efficiency) and growth variables (foliar limb area, total foliar area and rate of relative growth), although, for some of them, it has not differed from plants grown with 20% of organic matter. With 30% of O.M., the inoculation with *T. asperellum* showed superior averages in CO₂ assimilation (A), carboxylation efficiency (A/Ci) and rate of relative growth (RRG). The nitrogen doses positively affected A/Ci, chlorophyll amounts, foliar area (limb and total) and foliar nitrogen concentration, although it not differing between 10 or 15g of N plant⁻¹. For the accumulation of the nutrients Ca, Mg, S, Fe and Zn, the nitrogen fertilization did not represent higher foliar levels, even though this might be related to a dilution effect.

Keywords: *Vaccinium ashei*, *Azospirillum brasilense*, *Trichoderma asperellum*, symbiotic association, organic fertilization, urea.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Assimilação líquida de CO₂ (A) de plantas de mirtilheiro cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes substratos (S_n) e microrganismos promotores de crescimento, mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, sendo que letras minúsculas comparam os substratos dentro de cada inóculo e, letras maiúsculas, os inóculos em cada substrato. Ponta Grossa, 2014/15..... 30
- Figura 2.** Teores de nitrogênio (g kg⁻¹) em folhas de mirtilheiro cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes substratos (S_n) e microrganismos promotores de crescimento, mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, sendo que letras minúsculas comparam os substratos dentro de cada inóculo e, letras maiúsculas, os inóculos em cada substrato. Ponta Grossa, 2014/15..... 32
- Figura 3.** Taxa de crescimento relativo (TCR), foliar (ALF) e Área foliar total (AFT) de plantas de mirtilheiro cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes substratos (S_n) e microrganismos promotores de crescimento, mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, sendo que letras minúsculas comparam os substratos dentro de cada inóculo e, letras maiúsculas, os inóculos em cada substrato. Ponta Grossa, 2014/15..... 32
- Figura 4.** Número total de folhas de plantas de mirtilheiro cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes substratos (S_n) e mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Ponta Grossa, 2014/15..... 33
- Figura 5.** Volume de copa (cm³) de plantas de mirtilheiro cv. Clímax, no decorrer de seis meses após o transplântio das mudas em vasos com diferentes substratos e microrganismos promotores de crescimento, mantidas em casa de vegetação. Ponta Grossa, 2014/15..... 34
- Figura 6.** Eficiência aparente de carboxilação (A/Ci) de plantas de mirtilheiro cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes substratos (S_n) e microrganismos promotores de crescimento, mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, sendo que letras minúsculas comparam os substratos dentro de cada inóculo e, letras maiúsculas, os inóculos em cada substrato. Ponta Grossa, 2014/15..... 37
- Figura 7.** Leituras no clorofilômetro portátil ClorofiLOG® de teores de Clorofila a, Clorofila b e Clorofila Total de plantas de mirtilheiro cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes substratos e mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Ponta Grossa, 2014/15..... 39
- Figura 8.** Teores de magnésio (g kg⁻¹) em folhas de mirtilheiro cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes substratos (S_n) e microrganismos promotores de crescimento, mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste

Tukey a 5% de probabilidade, sendo que letras minúsculas comparam os substratos dentro de cada inóculo e, letras maiúsculas, os inóculos em cada substrato. Ponta Grossa, 2014/15..... 40

Figura 9. Taxa de transpiração (A), Eficiência instantânea de uso da água (B), Concentração de CO₂ nos espaços intercelulares (C) de plantas de mirtilheiro cv. Clímax após seis meses do transplantio das mudas em vasos com diferentes substratos (S_n) e mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Ponta Grossa, 2014/15..... 41

Figura 10. Teores de potássio (g kg⁻¹) em folhas de mirtilheiro cv. Clímax, após seis meses do transplantio das mudas em vasos com diferentes substratos (S_n) e mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Ponta Grossa, 2014/15..... 41

Figura 11. Teores de Cálcio (g kg⁻¹) em folhas de mirtilheiro cv. Clímax, após seis meses do transplantio das mudas em vasos com diferentes substratos (S_n) e mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Ponta Grossa, 2014/15..... 43

Figura 12. Teores de enxofre (g kg⁻¹) em folhas de mirtilheiro cv. Clímax, após seis meses do transplantio das mudas em vasos com diferentes substratos (S_n) e microrganismos promotores de crescimento, mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, sendo que letras minúsculas comparam os substratos dentro de cada inóculo e, letras maiúsculas, os inóculos em cada substrato. Ponta Grossa, 2014/15..... 43

Figura 13. Taxa de transpiração (E) de plantas de mirtilheiro cv. Clímax, após seis meses do transplantio das mudas em vasos com diferentes doses de nitrogênio e microrganismos promotores de crescimento, mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, sendo que letras minúsculas comparam as doses de N dentro de cada inóculo e, letras maiúsculas, as doses de N em cada substrato. Ponta Grossa, 2014/15.....55

Figura 14. Concentração de CO₂ nos espaços intercelulares (Ci) de mirtilheiro cv. Clímax, após seis meses do transplantio das mudas em vasos com diferentes doses de nitrogênio e mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Ponta Grossa, 2014/15..... 56

Figura 15. Eficiência aparente de carboxilação (A/Ci) de mirtilheiro cv. Clímax, após seis meses do transplantio das mudas em vasos com diferentes doses de nitrogênio e mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Ponta Grossa, 2014/15.....56

Figura 16. Teores de Clorofila a, Clorofila b e Clorofila Total de plantas de mirtilheiro cv. Clímax, após seis meses do transplantio das mudas em vasos com diferentes doses de N e mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Ponta Grossa, 2014/15..... 57

Figura 17. Área foliar total (AFT) e área de limbo foliar (ALF) de mirtilheiro cv. Clímax, após seis meses do transplantio das mudas em vasos com diferentes doses de nitrogênio e mantidas

em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Ponta Grossa, 2014/15..... 58

Figura 18. Volume de copa (cm^3) de plantas de mirtilo cv. Clímax, no decorrer de seis meses após o transplântio das mudas em vasos com diferentes doses de nitrogênio e microrganismos promotores de crescimento, mantidas em casa de vegetação. Ponta Grossa, 2014/15..... 59

Figura 19. Taxa de crescimento relativo ($\text{cm}^3 \text{cm}^{-3} \text{mês}^{-1}$) de mirtilo cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes dose de nitrogênio ou sob ação de inoculantes (microrganismos promotores do crescimento de plantas) e mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Ponta Grossa, 2014/15..... 60

Figura 20. Teores de fósforo (g kg^{-1}) em folhas de mirtilo cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes doses de nitrogênio e microrganismos promotores de crescimento, mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, sendo que letras minúsculas comparam as doses de N dentro de cada inóculo e, letras maiúsculas, os inóculos em cada dose de N. Ponta Grossa, 2014/15..... 62

Figura 21. Teores de magnésio (g kg^{-1}) e zinco (mg kg^{-1}) em folhas de mirtilo cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes doses de nitrogênio e microrganismos promotores de crescimento, mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Ponta Grossa, 2014/2015..... 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de F referentes a taxa assimilatória líquida de CO_2 (A), condutância estomática (gS), taxa transpiratória (E), concentração intercelular de CO_2 (Ci), eficiência aparente de carboxilação (A/Ci), eficiência intrínseca de uso da água (A/gS) e eficiência instantânea de uso água (A/E) de mirtilo cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes substratos e microrganismos promotores de crescimento, mantidas em casa de vegetação. Ponta Grossa, 2014/15..... 30

Tabela 2. Valores de F referentes à taxa de crescimento relativo (TCR), área de limbo foliar (ALF), área foliar total (AFT) e número total de folhas (N° folhas) procedida em plantas de mirtilo cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes substratos e microrganismos promotores de crescimento, mantidas em casa de vegetação. Ponta Grossa, 2014/15..... 33

Tabela 3. Valores de F referentes à análise nutricional procedida com folhas de mirtilo cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes substratos e microrganismos promotores de crescimento, mantidas em casa de vegetação. Ponta Grossa, 2014/15..... 36

Tabela 4. Valores de F referentes a clorofila a (Cl.a), clorofila b (Cl.b) e clorofila total (Cl.total) de mirtilo cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes

substratos e microrganismos promotores de crescimento, mantidas em casa de vegetação. Ponta Grossa, 2014/15.....38

Tabela 5. Teores de micronutrientes (mg kg^{-1}) em folhas de mirtilheiro cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes substratos (Sn) e microrganismos promotores de crescimento, mantidas em casa de vegetação. Ponta Grossa, 2014/15..... 44

Tabela 6. Valores de F referentes a taxa assimilatória líquida de CO_2 (A), condutância estomática (gS), taxa transpiratória (E), concentração intercelular de CO_2 (Ci), eficiência aparente de carboxilação (A/Ci), eficiência intrínseca de uso da água (A/gS) e eficiência instantânea de uso água (A/E) de mirtilheiro, cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos em diferentes doses de nitrogênio, mantidas em casa de vegetação. Ponta Grossa, 2014/15..... 54

Tabela 7. Valores de F referentes a clorofila a (Cl.a), clorofila b (Cl.b) e clorofila total (Cl.total), área de limbo foliar (ALF), área foliar total (AFT) e taxa de crescimento relativo (TCR) de mirtilheiro, cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos em diferentes doses de nitrogênio e microrganismos promotores de crescimento, mantidas em casa de vegetação. Ponta Grossa, 2014/15..... 57

Tabela 8. Valores de F referentes à análise nutricional procedida com folhas de mirtilheiro, cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes doses de nitrogênio e microrganismos promotores de crescimento, mantidas em casa de vegetação. Ponta Grossa, 2014/15.....61

Tabela 9. Teores foliares de macro nutrientes (g kg^{-1}) de mirtilheiro, cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos em diferentes doses de nitrogênio, mantidas em casa de vegetação. Ponta Grossa, 2014/15..... 63

Tabela 10. Teores foliares de micronutrientes (mg kg^{-1}) de mirtilheiro, cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos em diferentes doses de nitrogênio, mantidas em casa de vegetação. Ponta Grossa, 2014/15..... 64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1. Contexto histórico	15
3.2. Produção Mundial	15
3.3. Valor nutritivo e processamento.....	16
3.4. Grupos e variedades	17
3.5. Botânica.....	17
3.6. Associações com microrganismos.....	19
3.7. Adubação nitrogenada.....	20
4. CAPÍTULO I – RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE MIRTILEIRO CV. CLIMAX A MATÉRIA ORGÂNICA E INOCULAÇÃO COM MICRORGANISMOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO.....	22
4.1. Resumo.....	22
4.2. Abstract	23
4.3. Introdução.....	24
4.4. Material e métodos	26
4.5. Resultados e discussão	29
4.6. Conclusões.....	45
5. CAPÍTULO II - RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E NUTRIÇÃO DE MIRTILEIRO CV. CLÍMAX SUBMETIDO À ADUBAÇÃO NITROGENADA E INOCULAÇÃO COM MICRORGANISMOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO	47
5.1. Resumo.....	47
5.2. Abstract... ..	48
5.3. Introdução.....	49
5.4. Material e métodos	50
5.5. Resultados e discussão	54
5.6. Conclusões.....	65
6. REFERÊNCIAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

O mirtilo é muito difundido em todo o mundo, especialmente devido às suas propriedades nutracêuticas. Conhecido como *blueberry* em inglês, o mirtilheiro é uma planta arbustiva que produz frutos pequenos de coloração preta recobertos por uma substância cerosa, chamada pruína.

Estados Unidos e Canadá são os maiores produtores de mirtilo, mas também os maiores consumidores mundiais da fruta. Esta é consumida tanto *in natura* como processada nos mais diversos produtos, como sucos, licores, geleias, caldas, iogurtes, sorvetes, balas, etc. Apesar da sua alta produção, esses países não são autossuficientes para manter o suprimento de seu mercado interno, recorrendo então a importação dessa fruta. A produção e venda de mirtilo para esses países representa uma excelente opção, em especial para os países do hemisfério sul, onde a época de colheita de mirtilo corresponde ao período da entressafra norte-americana.

No Brasil, devido à sua recente introdução, a cultura do mirtilheiro ainda é pouco conhecida. Por ser uma planta de clima temperado, apresenta boa adaptação aos Estados do Sul, especialmente para cultivares do grupo rabbiteye que necessitam de menor acúmulo de horas de frio, para superar a dormência fisiológica.

Pertencente à família Ericaceae, o mirtilheiro necessita de solos ácidos para se desenvolver. Por possuir poucos pelos radiculares, forma associações simbióticas com microrganismos. Essas associações ajudam o mirtilheiro a ampliar sua zona radicular de absorção de nutrientes e, em troca, a planta fornece compostos fotoassimilados a esses organismos.

Os microrganismos do gênero *Azospirillum* integram um grupo chamado de bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) e sua utilização em culturas comerciais tem sido cada vez mais ampliado. Sendo um organismo de vida livre, essa bactéria pode colonizar a superfície das raízes e tecidos internos das plantas formando associações mutualísticas. Assim

como as bactérias do gênero *Rhizobium*, o *Azospirillum* tem a capacidade de fixar o nitrogênio do ar, deixando-o disponível no solo na forma mineral. A promoção do crescimento verificado nas culturas agrícolas apresenta-se em função dessa disponibilidade de nitrogênio, mas também através do estímulo à produção de hormônios por parte da própria planta, além da ação antagonista a determinados patógenos.

Fungos do gênero *Trichoderma* são facilmente encontrados em ambientes naturais, apresentando também a capacidade de colonizar raízes de plantas, formando associações. Esses fungos atuam como bioestimulantes para o desenvolvimento vegetativo das plantas, especialmente da rizosfera, onde ampliam a capacidade de absorção de água e nutrientes. São amplamente utilizados contra fitopatógenos por interagir com eles de maneira antagônica, competitiva, sendo predadores e parasitas ou, ainda, induzindo a defesa do hospedeiro.

Solos ricos em matéria orgânica auxiliam no processo de absorção de nutrientes pelas plantas, uma vez que, a presença de matéria orgânica, de modo geral, tende a aumentar a capacidade de retenção de cargas dos solos, além de servir como alimento para a macro e microbiota do solo. Nessa microbiota, formada por seres decompositores, frequentemente pode-se observar o estabelecimento e desenvolvimento de organismos benéficos às culturas agrícolas, como os abordados anteriormente. Também observando questões de sustentabilidade dos sistemas agrícolas, a utilização de compostos orgânicos com o intuito de fornecer nutrientes às plantas é uma maneira de ciclar a matéria já existente na superfície terrestre, reduzindo a constante dependência de produtos não renováveis.

Culturas comerciais, especialmente as anuais, já apresentam estudos sobre suas relações com microrganismos benéficos, embora ainda pouco tenha sido abordado sobre a associação de frutíferas ou demais culturas perenes, de estrutura lenhosa ou semi-lenhosa, com esses indivíduos.

2. OBJETIVOS

Verificar a influência da inoculação com as espécies *Azospirillum brasilense* e *Trichoderma asperellum* no desenvolvimento de mudas de mirtilheiro cv. Climax em casa de vegetação, sob diferentes substratos.

(i) Observar se a utilização dos inóculos *Azospirillum brasilense* e *Trichoderma asperellum* influencia o desenvolvimento vegetativo e a nutrição de mirtilheiros cv. Climax cultivado em vasos.

(ii) Verificar o crescimento de mudas de mirtilheiro, cv. Climax, em função de diferentes proporções de matéria orgânica.

(iii) Verificar o crescimento de mudas de mirtilheiro, cv. Climax, em função de diferentes doses de nitrogênio.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Contexto histórico

A primeira tentativa de produzir mirtilos comercialmente, provavelmente se deu na Flórida há mais de um século atrás, transplantando espécimes *Rabbiteye* selvagens em campos de cultivo. Entretanto, a aceitação no mercado não foi imediata e apenas na década de 1960 é que plantações de mirtilheiro foram criadas para a venda e consumo local. Após isso, houve rápida expansão na Carolina do Norte e outros Estados do norte com as variedades *highbush* (WILLIAMSON *et al.*, 2004).

Ainda pouco conhecido no Brasil, provavelmente devido a sua recente introdução – em 1983, pela Embrapa Clima Temperado (Pelotas, RS) – suas primeiras iniciativas comerciais se deram a partir de 1990 em Vacaria, RS (FACHINELLO, 2008). No entanto, a cultura do mirtilheiro apresenta grande potencial produtivo para os Estados do Sul do país, principalmente no Estado do Rio Grande do Sul (ANTUNES & RASEIRA, 2006).

3.2. Produção Mundial

As maiores produções de mirtilo se encontram nos Estados Unidos e no Canadá, por serem os países de origem dessa espécie frutífera. Segundo dados da FAOSTAT (2016), os Estados Unidos representam mais de 50% da produção mundial, com uma área cultivada de cerca de 32 mil hectares e uma produção de 240 mil toneladas no ano de 2013. Em segundo lugar no ranking de produção mundial está o Canadá que, no mesmo período, participou com cerca de 110 mil toneladas (mais de 25% da produção mundial) em quase 38 mil hectares. Além de maiores produtores, esses dois países também são os maiores consumidores da fruta.

Com exceção dos meses de maio, junho e julho, os Estados Unidos não são autossuficientes em suprir seu mercado interno, necessitando importação. Dentre os países

responsáveis por seu abastecimento, encontram-se Canadá, Chile, Nova Zelândia e Argentina (ANTUNES & MADAIL, 2005).

O maior representante na América do Sul, em produção e exportação dessa fruta, é o Chile com uma área cultivada de 13.000 ha e produção de 113.000 toneladas no ano de 2012, distribuída nos meses de novembro e abril (VILLATA, 2012).

No Brasil, em 2008, a área cultivada era pouco mais de 150 hectares (FACHINELLO, 2008), sendo pouco significativo em relação à área mundial cultivada com cerca de 78 mil hectares nesse mesmo ano (FAOSTAT, 2016). Cantuarias-Avilés *et al.* (2014) estimam que a área cultivada de com mirtilos seja de aproximadamente 400 ha, apesar de não existirem estatísticas oficiais. No país, grande parte da produção é destinada à exportação e parte é consumida pelo mercado interno. Entre os Estados brasileiros, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais concentram as plantações de mirtilero (CANTUARIAS-AVILÉS *et al.*, 2014).

3.3. Valor nutritivo e processamento

Devido à difusão de suas características benéficas à saúde do organismo humano, como o alto teor de antioxidantes, vitaminas (A, B, C, PP) e minerais (magnésio, potássio, cálcio, fósforo, ferro, manganês); o mirtilo se apresenta como uma opção para prevenir doenças degenerativas e é conhecido como “fruto da juventude” ou “fruto da longevidade” (SERRADO *et al.*, 2008). Vrhovsek *et al.* (2012) concluíram que o mirtilo é uma das fontes mais concentradas de flavonoides, compostos benéficos para a dieta humana.

Além do consumo *in natura*, o mirtilo pode ser processado e consumido na forma de geleias, iogurtes e sorvetes. Moraes *et al.* (2007) constataram alto índice de aceitação na análise sensorial ao néctar de mirtilo e barra de cereais adicionadas de passas de mirtilo. Para geleias,

houve aceitação tanto para aquelas preparadas de maneira convencional ou *light* (PELEGRINE *et al.*, 2012).

Para o processamento em *topping* (tipo de cobertura, caracterizada pela presença de frutas inteiras, íntegras ou em pedaços padronizados, imersas em uma fase líquida viscosa), o mirtilo também apresentou boa aceitação pelo consumidor e, ainda, boa retenção de antocianinas (RODRIGUES *et al.*, 2010; REDIES *et al.*, 2006).

3.4. Grupos e variedades

As variedades comercialmente plantadas são divididas em cinco importantes grupos: highbush, half high, southern highbush, rabbiteye e lowbush (SANTOS & RASEIRA, 2002).

No grupo rabbiteye (*V. ashei*), as plantas são mais tolerantes à seca do que as do grupo highbush e podem crescer satisfatoriamente em solos com baixos teores de matéria orgânica. Os frutos são geralmente mais firmes do que os do grupo anterior e, em muitos casos, são capazes de serem colhidos mecanicamente para o consumo *in natura*. Geralmente, os frutos do grupo rabbiteye são mais adequados para vendas locais, enquanto highbush são mais adequados para a exportação (WILLIAMSON *et al.*, 2004). Outras características associadas ao grupo rabbiteye são: vigor, longevidade, produtividade, tolerância ao calor e baixa necessidade em frio. É o grupo que melhor se adaptou às condições climáticas das regiões do Brasil com potencial para produção (SANTOS & RASEIRA, 2002).

3.5. Botânica

O mirtilheiro é uma planta frutífera, de clima temperado, pertencente à família Ericaceae e ao gênero *Vaccinium*. Estão inclusas mais de 400 espécies neste gênero, das quais, cerca de 40% são nativas do sudeste da Ásia, 25% da América do Norte e 10% das Américas Central e Sul (DARNELL, 2006). São espécies lenhosas e perenes, cuja estatura pode variar de

0,15m, nas cultivares do grupo lowbush, para uma altura de até 4m nas plantas do grupo rabbiteye (RETAMALES & HANCOCK, 2012).

As folhas são caducas, simples e dispostas alternadamente nos ramos. A morfologia e o tamanho das folhas podem ser utilizados como auxílio na identificação das espécies ou cultivares (DARNELL, 2006). Além de serem os principais órgãos de produção de foto-assimilados, as folhas são as primeiras a perceber a mudança no comprimento do dia – fator importante para a indução floral e dormência (WILLIAMSON *et al.*, 2004). Quando comparadas duas cultivares de mirtilo do grupo highbush acerca da variável ramos desfolhados ou não, a desfolha resultou em redução e efeito negativo sobre as gemas florais. Botões florais, que se desenvolveram em ramos desfolhados apresentaram diâmetros menores e, também, frutos com menor massa fresca. Estes resultados concordam com a necessidade de poda verde e um programa de pulverização eficaz no verão para controlar doenças foliares que muitas vezes resultam em desfolha no início do outono (WILLIAMSON & MILLER, 2000).

As plantas de mirtilheiro possuem raízes finas, fibrosas, com poucos pelos absorventes (DARNELL, 2006) e necessitam de solos com pH baixo, boa e permanente drenagem, mas umidade moderada (SANTOS & RASEIRA, 2002). Austin e Bondari (1992) verificaram que a utilização de hidrogel – um polímero que absorve e retém água e nutrientes, sendo também chamado de condicionador de solo – misturado com solo foi prejudicial à sobrevivência de plantas de mirtilheiro highbush e rabbiteye, possivelmente por manter as raízes sob alta quantidade de água disponível, mas não influenciou o rendimento ou massa de bagas.

Em função da quantidade reduzida de pelos absorventes, as raízes formam uma relação simbiótica com fungos micorrízicos, os quais recebem açúcares produzidos pela planta em troca do fornecimento de nutrientes (BOWLING, 2005). Cerca de 80% das raízes concentram-se dentro de 60 cm da coroa e 80% chegam ao máximo de 36 cm de profundidade (RETAMALES & HANCOCK, 2012). Abbott e Gouth (1987), citados por Retamales &

Hancock (2012) mostraram que a cobertura do solo (*mulching*) em plantas do grupo highbush concentrou 83% das raízes a uma profundidade máxima de 15 cm. Moura *et al.* (2011), também trabalhando com cobertura do solo, verificaram que só houve influência dos tipos de cobertura na qualidade físico-química dos frutos do mirtilheiro no segundo ano de observação.

As gemas florais do mirtilheiro dão origem a inflorescências do tipo racemo (RETAMALES & HANCOCK, 2012), sendo que cada cacho pode conter de 8 a 16 flores (DARNELL, 2006). Os frutos são bagas de coloração preta que, quando alcançam o amadurecimento total, ficam recobertos por uma substância cerosa chamada pruína; conferindo-lhes uma coloração azulada (SERRADO *et al.*, 2008).

3.6. Associações com microrganismos

Por apresentar uma quantidade reduzida de pelos absorventes, as raízes do mirtilheiro formam simbioses com fungos micorrízicos arbusculares (FMA), que recebem substratos energéticos produzidos pela planta em troca da ampliação na absorção de nutrientes (BORKOWSKA & KRZEWINSKA, 2009). Essa associação ocorre em um grande número de espécies de plantas em habitats naturais (WILCOX, 1996).

Em pomares de mirtilheiro, na região sul do estado do Rio Grande do Sul, foram identificadas espécies dos gêneros *Acaulospora* e *Glomus* como os FMA mais comumente encontrados (FARIAS, 2012). Já na região dos Campos de Cima da Serra da cidade de Vacaria (RS), os fungos miceliais mais frequentes observados nas amostras de solo das culturas de mirtilo, amora e framboesa, foram *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Clonostachys rosea* e *Trichoderma* sp. (PINOTTI *et al.*, 2011).

Esses fungos também são importantes para liberar e proporcionar maior aproveitamento dos nutrientes para plantas associadas (HOBBIE & HORTON, 2007). Em pepino, plantas inoculadas com *Trichoderma harzianum*, além de maior crescimento

vegetativo, apresentaram maiores concentrações de micronutrientes (Cu, Zn, Mn e Fe) nas raízes (YEDIDIA *et al.*, 2001). O aumento na absorção de fósforo também foi verificado em mudas de café, além de maior fitomassa seca total e área foliar, naquelas cultivadas em substrato condicionado com *T. asperellum* (DE JESUS *et al.*, 2011).

Uma alternativa quando não há ocorrência natural de FMA é a inoculação do solo ou do substrato de plantio das mudas. Camargo *et al.* (2010) verificou que a inoculação de agentes biológicos, compostos de determinadas bactérias e fungos, favorece maior massa seca do sistema radicular de plantas micro propagadas do mirtilheiro ‘Bluebelle’.

De Silva *et al.* (2000) verificaram que a inoculação com *Glilocladium virens* ou com *Pseudomonas fluorescens*, em solo estéril aumentou a área foliar de mirtilheiro do grupo highbush, enquanto com *Trichoderma harzianum* houve redução. O número de folhas também se mostrou bastante inferior em mudas tratadas com *T. harzianum*.

Bactérias fixadoras de nitrogênio também desenvolvem associações com raízes de plantas, colaborando no processo de absorção de nutrientes e são representadas por espécies dos gêneros *Rhizobium*, *Azospirillum* e *Frankia*; dos quais o *Azospirillum* se mostrou o mais eficiente no aumento da absorção de nutrientes em plantas de chá (NEPOLEAN *et al.*, 2012).

Em Ipê Roxo (*Handroanthus impetiginosus*), a inoculação com a bactéria *Azospirillum brasilense* promoveu o enraizamento *in vitro* das plântulas diminuindo a exigência de auxinas no meio (LARRABURU & LLORENTE, 2015).

3.7. Adubação nitrogenada

O nitrogênio (N) está presente em diversos compostos como os aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, enzimas e coenzimas, além de alguns pigmentos e produtos secundários. Atua em muitos processos como a fotossíntese, respiração, sínteses em geral e multiplicação e diferenciação celular (MALAVOLTA, 2006).

A maior parte de N existente não está diretamente disponível para os organismos vivos. A atmosfera é considerada fonte primária desse elemento, uma vez que, dos gases atmosféricos aproximadamente 78% é N₂ (TAIZ & ZEIGER, 2006). Bactérias fixadoras de nitrogênio são as principais responsáveis por transformar o N₂ atmosférico em formas assimiláveis para plantas e animais. Elas desenvolvem associações com raízes de plantas, colaborando no processo de absorção de nutrientes e são representadas por espécies dos gêneros *Rhizobium*, *Azospirillum* e *Frankia*; dos quais o *Azospirillum* se mostrou o mais eficiente no aumento da absorção de nutrientes em plantas de chá (NEPOLEAN *et al.*, 2012).

O fornecimento de N via fertilizantes é fundamental para a obtenção de altas produtividades de grande parte das culturas (FAQUIN, 2005). Devido a sua distinta exigência nutricional, muitas práticas de adubação que são comuns à maioria das espécies frutíferas não são indicadas para a cultura do mirtilheiro (FREIRE, 2004). A extração anual de macronutrientes por uma planta adulta de mirtilheiro ocorre na seguinte ordem: nitrogênio > cálcio > potássio > fósforo > magnésio (FREIRE, 2006). Com relação ao teor foliar de nutrientes, da brotação até a colheita, observa-se uma variação decrescente para o nitrogênio, fósforo e potássio e crescente para o cálcio e magnésio (FREIRE, 2004).

4. CAPÍTULO I – RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E NUTRIÇÃO DE MIRTILEIRO CV. CLIMAX A MATÉRIA ORGÂNICA E INOCULAÇÃO COM MICRORGANISMOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO

4.1. Resumo

Em casa de vegetação, plantas de mirtileiro cv. Climax foram cultivadas em vasos com substratos contendo diferentes proporções de matéria orgânica e microrganismos promotores do crescimento de plantas. O delineamento experimental utilizados foi de blocos casualizados em arranjo fatorial 3x3, com seis repetições. Os fatores foram: formulação dos substratos – 5% de matéria orgânica e 35% de serragem (S₁); 20% de M.O. e 20% de serragem (S₂), e 35% de M.O. + 5% de serragem (S₃) – e a inoculação dos substratos com o fungo *Trichoderma asperellum* (50g vaso⁻¹), a bactéria *Azospirillum brasilense* (5mL vaso⁻¹) ou a ausência de inoculação (testemunha). Ao longo de seis meses foram realizadas avaliações de crescimento com as quais se calculou o volume de copa e a taxa de crescimento relativo (TCR). Após seis meses do transplântio, se avaliou área de limbo foliar (ALF) e área foliar total (AFT), teores de clorofila (Cl.a, Cl.b e Cl.total), fotossíntese (A), transpiração (E), carbono intercelular (Ci), eficiência aparente de carboxilação (A/Ci) e eficiência instantânea de uso da água (A/E), além de macro e micronutrientes nas folhas. Os efeitos mais evidentes ficaram condicionados à formulação dos substratos. O substrato com 35% de M. O. propiciou as maiores médias em relação à maioria das variáveis fisiológicas (E, A/E e A/Ci) e de crescimento (ALF, AFT e TCR), embora, para algumas, não tenha diferido das plantas cultivadas com 20% de matéria orgânica. A combinação de 35% de M. O. com inoculação do fungo *T. asperellum* apresentou-se superior para assimilação de CO₂, eficiência de carboxilação e taxa de crescimento relativo; representando uma possibilidade viável para otimização dos resultados obtidos com maiores quantidades de matéria orgânica.

Palavras-chave: *Vaccinium ashei*, *Azospirillum brasilense*, *Trichoderma asperellum*, adubação orgânica.

CHAPTER I - PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF BLUEBERRY BUSH CV. CLIMAX TO ORGANIC MATTER AND INOCULATION WITH MICROORGANISMS GROWTH PROMOTERS

4.2. Abstract

In greenhouse, blueberry bushes cv. Climax were cultivated into pots with different quantity of organic matter substrates and microorganisms promoters of plant growth. The parcels were disposed in trial designed randomized blocks, factorial arrangement 3x3, with six recurrences. The factors were: formulation of the substrates- 5% organic matter, 35% sawdust (S₁); 20% organic matter, 20% sawdust (S₂); 35% organic matter, 5% sawdust (S₃)- and inoculation of fungus *Trichoderma asperellum* (50g. vase⁻¹) and bacteria *Azospirillum brasilense* (5mL.vase⁻¹), or the absence of inoculation. Over a six-month period, assessments of growth have been carried, with which the size of the crown and the TCR (rate of relative growth) were calculated. After six months of transplanting, the ALF (foliar limb area), AFT (total foliar area), chlorophyll content (Cl.a, Cl.b and total Cl), photosynthesis (A), transpiration (E), intercellular carbon (Ci), carboxylation apparent efficiency (A/Ci) and instant efficiency in the use of water (A/E), in addition to macro and micronutrients on the leaves were evaluated. The most evident results remained conditioned to the elaboration of the substrates. The substrate with 35% O. M. returned the highest rates, relating to most of the physiological (E, A/E e A/Ci) and growth (ALF, AFT and TCR), although it has not differed from 20% O. M. for some of them. The combination of 35% O. M. with the inoculation of *T. asperellum* showed superior on assimilation, carboxylation efficiency e RRG, representing a viable possibility of optimization of the obtained result with bigger quantity of organic matter.

Keywords: *Vaccinium ashei*, *Azospirillum brasilense*, *Trichoderma asperellum*, organic fertilization.

4.3. Introdução

Apesar da grande importância econômica em países da América do Norte e Europa, a cultura do mirtilo ainda é pouco explorada no Brasil (RASEIRA & ANTUNES, 2004). Sua recente introdução – na década de 80 – remonta aos primeiros cultivos comerciais a partir de 1990 (FACHINELLO, 2008), sendo que até hoje esses ocorrem principalmente em pequenas propriedades na região sul do país (CANTUARIAS-AVILES *et al.*, 2014).

Pertencente à família Ericaceae e ao gênero *Vaccinium*, o mirtilheiro é uma espécie arbustiva, lenhosa e perene, cuja estatura pode variar de 0,15 m, nas cultivares do grupo lowbush, para uma altura de até 4 m nas plantas do grupo rabbiteye (RETAMALES & HANCOCK, 2012). Por possuir raízes finas, fibrosas e com poucos pelos absorventes (DARNELL, 2006), é uma cultura que se desenvolve em solos com pH baixo, boa drenagem, mas que necessita de umidade moderada (SANTOS & RASEIRA, 2002).

Em função dessa quantidade reduzida de pelos absorventes, as raízes do mirtilheiro formam simbioses com fungos micorrízicos arbusculares (FMA), que recebem substratos energéticos produzidos pela planta em troca da ampliação na absorção de nutrientes (BORKOWSKA & KRZEWINSKA, 2009). Essa associação ocorre em um grande número de espécies de plantas em habitats naturais (WILCOX, 1996).

Em pomares de mirtilheiro, na região sul do estado do Rio Grande do Sul, foram identificadas espécies dos gêneros *Acaulospora* e *Glomus* como os FMA mais comumente encontrados (FARIAS, 2012). Já na região dos Campos de Cima da Serra da cidade de Vacaria (RS), os fungos miceliais mais frequentes observados nas amostras de solo das culturas de mirtilo, amora e framboesa, foram *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Clonostachys rosea* e *Trichoderma* sp. (PINOTTI, 2011).

Uma alternativa quando não há ocorrência natural de FMA é a inoculação do solo ou do substrato de plantio das mudas com microrganismos simbiotes. Camargo (2010) verificou

que a inoculação de agentes biológicos compostos de determinadas bactérias e fungos favorece maior massa seca do sistema radicular de plantas micropropagadas do mirtilheiro ‘Bluebelle’.

De Silva *et al.* (2000) verificaram que a inoculação com *Gliocladium virens* ou com *Pseudomonas fluorescens*, em solo estéril aumentou a área foliar de mirtilheiro do grupo *highbush*, enquanto com *Trichoderma harzianum* houve redução. O número de folhas também se mostrou bastante inferior em mudas tratadas com *T. harzianum*. Em plantas de milho, a colonização das raízes com a espécie *Trichoderma virens* resultou em maior taxa de assimilação fotossintética de CO₂ (VARGAS *et al.*, 2009).

Esses microrganismos benéficos também são importantes para liberar e proporcionar maior aproveitamento dos nutrientes para plantas associadas (HOBBIE & HORTON, 2007). Bactérias fixadoras de nitrogênio também desenvolvem associações com raízes de plantas, colaborando no processo de absorção de nutrientes e são representadas por espécies dos gêneros *Rhizobium*, *Azospirillum* e *Frankia*; dos quais o *Azospirillum* se mostrou o mais eficiente no aumento da absorção de nutrientes em plantas de chá (NEPOLEAN *et al.*, 2012).

Em Ipê Roxo (*Handroanthus impetiginosus*), a inoculação com a bactéria *Azospirillum brasilense* promoveu o enraizamento *in vitro* das plântulas diminuindo a exigência de auxinas no meio (LARRABURU & LLORENTE, 2015).

Como opção, também, a essa baixa capacidade de absorção de nutrientes pelas raízes do mirtilheiro pode-se buscar métodos para aumentar a capacidade de retenção de cargas no solo e auxiliar no natural estabelecimento e desenvolvimento de microrganismos benéficos. A presença de matéria orgânica é responsável por propriedades físicas do solo como macroagregação, porosidade e melhor infiltração de água, além de aumentar a capacidade de troca catiônica (BALESDENT *et al.*, 2000). A espécie *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn., da família Ericaceae assim como o mirtilheiro, foram encontrados em florestas paludosas no sudeste do Brasil em organossolos com taxas de matéria orgânica de 76,23 ±

11,60 dag kg⁻¹ (LOURES *et al.*, 2007). Entretanto, a utilização de matéria orgânica proveniente de resíduos industriais (casca esgotada de acácia negra, polpa e sucos de frutas, resíduo de abatedouros, indústria de óleo de soja, cervejaria), como substrato para mudas de mirtilheiro não apresentou bons resultados (RISTOW *et al.*, 2011).

O objetivo deste trabalho foi verificar o desenvolvimento de mudas de mirtilheiro cv. Climax, após a inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Trichoderma asperellum* em substratos com diferentes proporções de matéria orgânica.

4.4. Material e métodos

O experimento foi conduzido em Ponta Grossa-PR (25° 05' 23,2" S; 50°06'09,2"O, 975 metros de altitude) de julho de 2014 a janeiro de 2015. As mudas de mirtilheiro da cv. Climax foram adquiridas de um viveiro comercial (Vacaria-RS) e transplantadas em vasos plásticos com as dimensões de 36 cm de diâmetro e 26 cm de altura. Os vasos foram organizados em fileiras duplas, com 40 cm de espaçamento entre as fileiras, e mantidos em casa de vegetação. Essa estrutura era totalmente fechada com plástico transparente duplo (para proporcionar isolamento térmico) e equipada com sistema de ventilação, resfriamento e irrigação por aspersão. A temperatura máxima dentro da casa de vegetação foi de 25°C e a frequência de rega foi uma vez ao dia, por cerca de quatro minutos, às 9h da manhã. Após o plantio, as mudas foram podadas a cerca de 20 cm do substrato de modo a uniformizar todas as parcelas.

Foram utilizados três diferentes substratos para o plantio das mudas, os quais consistiram em uma mistura de terra de barranco, areia, serragem e matéria orgânica.

A terra de barranco correspondeu à camada profunda (2 m) de um Latossolo Vermelho distroférico (EMBRAPA, 2006) que foi peneirado em malha de 4 mm. Optou-se por utilizar essa camada profunda para minimizar a ação de outros organismos que poderiam atuar antagonicamente aos tratamentos aplicados. Os atributos deste solo foram: 188,4 g kg⁻¹ de

areia; 91,6 g kg⁻¹ de silte e 720 g kg⁻¹ de argila; pH (CaCl₂) = 4,7; H + Al = 4,28 mmol_c dm⁻³; Al_{trocável} = 0,2 mmol_c dm⁻³; Ca = 1,0 mmol_c dm⁻³; Mg = 1,1 mmol_c dm⁻³; K = 0,14 mmol_c dm⁻³; P = 0,3 mg dm⁻³, C_{orgânico} = 12 g dm⁻³, CTC_{pH 7,0} = 6,52 cmol_c dm⁻³ e saturação por bases = 34,4 %.

As proporções de solo e areia foram de 40 e 20%, respectivamente, da capacidade em volume de cada vaso. Os 40% restantes foram preenchidos com matéria orgânica (esterco bovino curtido) e serragem, nas proporções de 5% de matéria orgânica e 35% de serragem (S₁), 20% de MO e 20% de serragem (S₂) e 35% de MO + 5% de serragem (S₃).

O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados, distribuindo-se os tratamentos em arranjo fatorial 3 x 3, com seis repetições. O primeiro fator foram as diferentes formulações de substratos. O segundo, a inoculação dos substratos com o fungo *Trichoderma asperellum* (50 g vaso⁻¹), com a bactéria *Azospirillum brasilense* (5 mL vaso⁻¹) ou com a ausência de inoculação (controle). A inoculação se deu após o transplântio das mudas, com a diluição dos inóculos em 200 mL da mesma água utilizada para a irrigação e seu despejo em cada um dos vasos. A bactéria *Azospirillum brasilense* foi obtida a partir do produto comercial Nitro1000 Gramíneas®, na concentração de 2,0 10⁸ células viáveis mL⁻¹ (fabricante: Nitro1000, Cascavel - PR); enquanto que o *Trichoderma asperellum* foi proveniente do produto comercial Quality WG® (10 bilhões de esporos g⁻¹), cujo fabricante é o Grupo Farroupilha, de Patos de Minas- MG.

Mensalmente foram realizadas avaliações de crescimento das mudas (de agosto/14 a janeiro/15). A altura (cm) foi mensurada do substrato até o ápice da planta com o auxílio de fita métrica comum; assim como as medições de distância entre os ramos principais e diâmetro da copa. Para aferir a espessura dos ramos principais utilizou-se de paquímetro digital. Calculou-se, então, o volume da copa das plantas através da fórmula $V = [(L/2) \times (E/2) \times A \times \pi]/3$, onde V é o volume de copa, L é a distância entre os ramos principais, E é a espessura ou diâmetro

médio dos ramos principais e A é a altura da copa (ROSSI, 2004). A distância L foi mensurada esticando a fita métrica de um extremo a outro dos ramos principais mais distantes entre si em uma linha perpendicular à planta. Com os dados de volume de copa, estipulou-se a taxa de crescimento relativo (TCR), conforme metodologia proposta por Romano (2001), através da fórmula: $TCR = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t_2 - t_1)$, onde Ln é logaritmo neperiano, W o volume de copa, t o tempo em dias, 1 e 2 a amostragem inicial e final (ago/14 e jan/15).

Após seis meses do transplântio das mudas (janeiro/15) aferiu-se os valores de área foliar, teor de clorofila e taxas de fotossíntese, transpiração, condutância estomática, carbono intercelular, eficiência no uso da água, macro e micronutrientes.

A área de limbo foliar (ALF) foi estimada a partir da média de dez folhas coletadas aleatoriamente e auferidas com o auxílio do medidor de área, modelo LI 3000 (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EUA). Esse valor foi multiplicado pela quantidade total de folhas contadas em cada planta por ocasião da coleta para obtenção da área foliar total (AFT).

A determinação dos valores de clorofila a (Cl.a), clorofila b (Cl.b) e clorofila total (Cl.total) foram realizada pelo método indireto, com o uso do clorofilômetro, marca ClorofiLOG®, modelo CFL 1030, da empresa Falker (Porto Alegre, RS). A leitura com o clorofilômetro foi realizada em três folhas, uma em cada terço da planta e contabilizada a média, sendo uma folha mais antiga, uma mediana, e uma mais nova. (FALKER, 2008).

Com o analisador portátil de CO₂ por infravermelho modelo LI-6400XT (LI-COR, Inc., Lincoln, NE, EUA) foram verificadas as trocas gasosas. As medidas foram realizadas entre às 11 e 14 h, sendo três folhas por parcela, uma mais antiga (mais rígida), uma mediana (em plena atividade fotossintética) e uma mais nova (ápices foliares com área superior a 4 cm²). Utilizou-se como padrão para todas as medidas a concentração de 400 mol mol⁻¹ de CO₂ no interior da câmara e densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de 1.000 μmol m² s⁻¹, empregando-se a fonte luminosa LI-COR 6400-02 acoplada a câmara de

medida. A temperatura do interior dessa câmara também foi fixada em 20° C. As variáveis estimadas foram: taxa assimilatória líquida de CO₂ / fotossíntese (A), condutância estomática (gS), taxa transpiratória (E), concentração intercelular de CO₂ (C_i), relação entre a concentração de C_i e CO₂ atmosférico (C_i/C_a). A partir das medidas de A, C_i, gS e E, calculou-se a eficiência aparente de carboxilação (A/C_i), a eficiência intrínseca de uso da água (A/gS) e a eficiência instantânea de uso água (A/E).

A análise nutricional de macro e micronutrientes foi realizada com as folhas retiradas na poda de verão (ramos principais abaixo de 5 mm de diâmetro) em 25/02/2015. Após a separação das folhas e ramos, as folhas foram secadas em estufa com ventilação forçada a 70°C (até atingirem massa constante); sendo processadas em moinho tipo Willey com peneiras de 0,85 mm. Os teores de N foram determinados mediante digestão sulfúrica e leitura pelo método semi-micro-Kjeldahl. As concentrações de P, K, Ca, Mg, S, Cu, Zn, Mn e Fe foram verificadas por meio de digestão nítrico-perclórica e leitura por espectrometria de absorção molecular (EAM) para P, espectrofotometria de emissão em chama (EEC) para K, espectrometria de absorção atômica com atomização em chama (EAA-chama) para Ca, Mg, Cu, Mn, Zn e Fe; e turbidimetria para S; conforme sugerido por Malavolta *et al*, 1997.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e, para comparação entre médias, o teste de Tukey a 5% de probabilidade com o auxílio do software R, versão 3.0.2 (R CORE TEAM, 2013).

4.5. Resultados e discussão

Das avaliações realizadas com o analisador portátil de CO₂ por infravermelho, os valores de taxa assimilatória líquida de CO₂ / fotossíntese (A) e eficiência aparente de carboxilação (A/C_i) apresentaram interação significativa entre os fatores substratos e inóculos. Para as variáveis taxa transpiratória (E), concentração intercelular de CO₂ (C_i) e eficiência

instantânea de uso água (A/E) houve efeito significativo apenas para o fator substratos. Para os resultados de condutância estomática (gS) e eficiência intrínseca de uso da água (A/gS) não existiram diferenças estatísticas (Tabela 1).

Para o efeito comparativo dos substratos em cada inoculante, o substrato com 20% de M. O. apresentou a maior taxa de fotossíntese tanto para as plantas não inoculadas como para a inoculação com *Azospirillum brasilense*, diferindo-se dos substratos com 5 e 35% de M. O. (Figura 1). Em mirtilheiros inoculados com *Trichoderma asperellum* não houve diferenças entre os substratos.

Tabela 1. Valores de F referentes a taxa assimilatória líquida de CO₂ (A), condutância estomática (gS), taxa transpiratória (E), concentração intercelular de CO₂ (Ci), eficiência aparente de carboxilação (A/Ci), eficiência intrínseca de uso da água (A/gS) e eficiência instantânea de uso água (A/E) de mirtilheiro cv. Climax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes substratos e microrganismos promotores de crescimento, mantidas em casa de vegetação. Ponta Grossa, 2014/15.

Fator de variação	A	gS	E	Ci	A/Ci	A/gS	A/E
Substratos ¹	13,51 ^{**3}	3,59 ^{NS}	42,65 ^{**}	23,05 ^{**}	15,25 ^{**}	1,30 ^{NS}	37,78 ^{**}
Inóculos ²	0,60 ^{NS}	2,90 ^{NS}	1,38 ^{NS}	1,85 ^{NS}	2,09 ^{NS}	3,96 ^{NS}	0,16 ^{NS}
Substr. x Inóculos	17,28 ^{**}	4,67 ^{NS}	5,45 ^{NS}	0,98 ^{NS}	11,00 ^{**}	2,88 ^{NS}	2,02 ^{NS}
C.V. ⁴ (%)	7,93	23,56	12,80	6,28	10,83	24,10	13,46

(¹) Substratos: diferentes proporções de matéria orgânica/estercos bovinos (S1-5% MO, S2-20% MO e S3-35% MO).

(²) Inóculos: ausência de inóculo (O), *Azospirillum brasilense* (A) e *Trichoderma asperellum* (T).

(³) *: P ≤ 0,05. **: P ≤ 0,01. NS: Não significativo.

(⁴) Coeficiente de Variação.

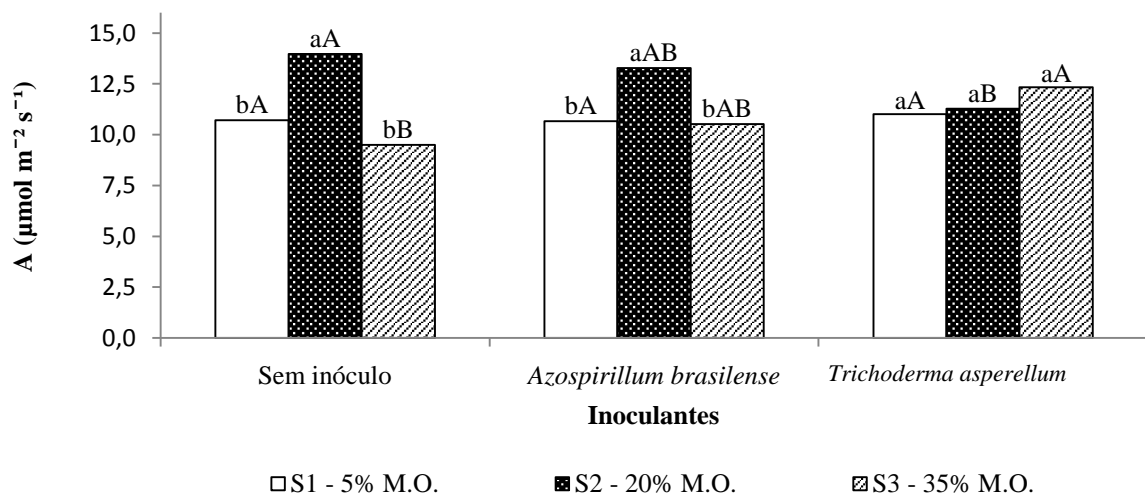


Figura 1. Assimilação líquida de CO₂ (A) de plantas de mirtilheiro cv. Climax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes substratos (Sn) e mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, sendo que letras minúsculas comparam os substratos dentro de cada inóculo e, letras maiúsculas, os inóculos em cada substrato. Ponta Grossa, 2014/15.

Observando o efeito dos inoculantes em cada substrato não se verificaram diferenças para o substrato com 5% de M. O., enquanto que para os substratos com 20 ou 35% houve efeitos opostos. No substrato com 20% de M. O., a presença do fungo *Trichoderma asperellum* reduziu significativamente a taxa assimilatória de carbono em relação às plantas não inoculadas, não diferindo, contudo, da inoculação com *A. brasilense*. Para o substrato com 35% de M. O., a presença do fungo *T. asperellum* proporcionou maior taxa assimilatória de carbono em relação às plantas não inoculadas, mas não diferindo da inoculação com *A. brasilense*.

Baseado nestes resultados, constatou-se que as maiores taxas de assimilação estiveram associadas ao tratamento com 20% de matéria orgânica, possivelmente relacionada à disponibilidade de nutrientes, em especial o nitrogênio, que este substrato proporcionou, uma vez que, os demais fatores que poderiam estar influenciando a fotossíntese (incidência luminosa, concentração de CO₂, temperatura foliar) estavam fixados para todas as medidas.

O nitrogênio garante a integridade estrutural e funcional da fotossíntese por fazer parte das proteínas e clorofilas (KERBAUY, 2004). A quantidade mais elevada de matéria orgânica do substrato com 35% de M. O., assim como se verificou para a taxa de assimilação de carbono, não foi benéfica em termos de teores de N nas folhas para plantas sem inóculo ou inoculadas com *A. brasiliense* (Figura 2), podendo estar associado a um efeito de diluição, pois estes tratamentos conferiram maior crescimento das plantas, constatado pela maior taxa de crescimento relativo, maior área de limbo foliar e área foliar total (Figura 3).

Para os valores de TCR verificou-se que para o efeito dos substratos em cada inóculo, 35% de M. O. foi superior independente do inóculo, sendo que na sua ausência, não diferiu de com 20%. O efeito dos inóculos em cada substrato só se mostrou diferente com 35% de M. O., onde as maiores médias foram verificadas na presença dos inoculantes, embora para a bactéria *A. brasilense* não tenha ocorrido diferença em relação à testemunha.

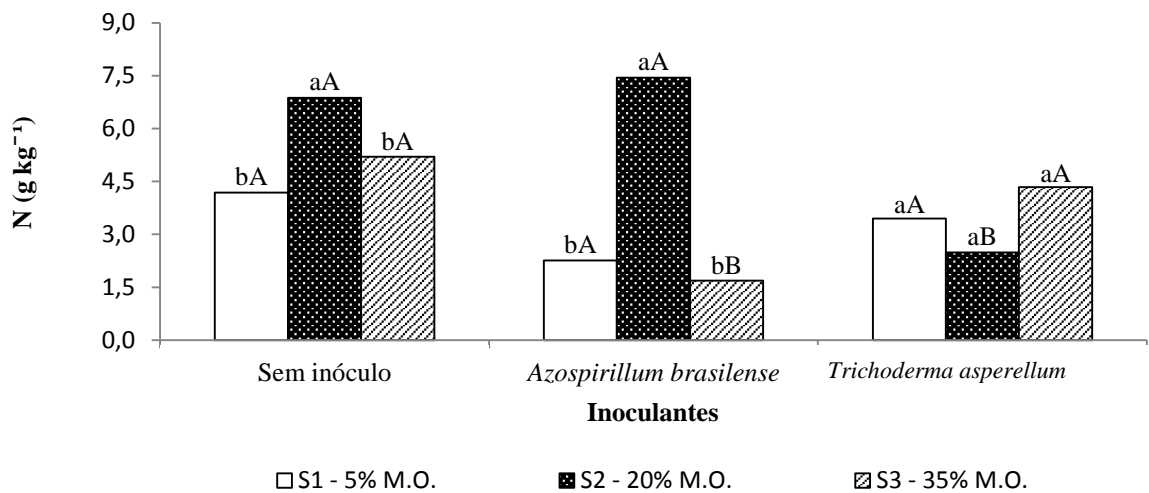


Figura 2. Teores de nitrogênio (g kg^{-1}) em folhas de mirtilleiro cv. Climax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes substratos (S_n) e mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, sendo que letras minúsculas comparam os substratos dentro de cada inóculo e, letras maiúsculas, os inóculos em cada substrato. Ponta Grossa, 2014/15.

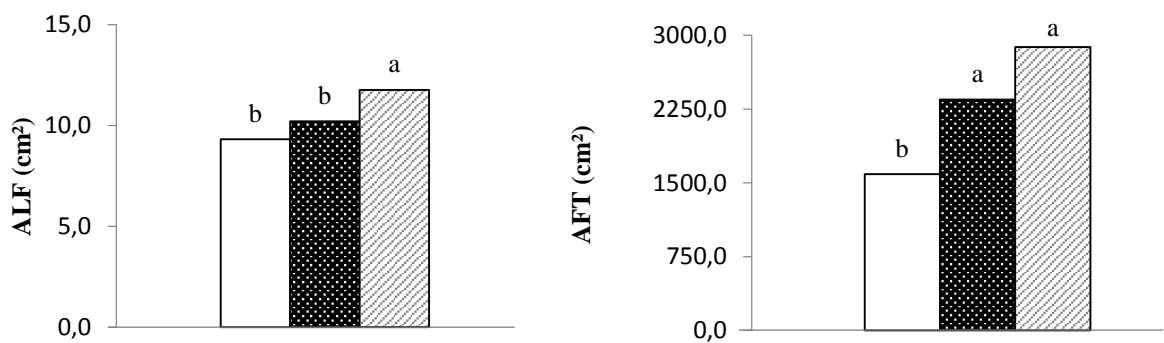
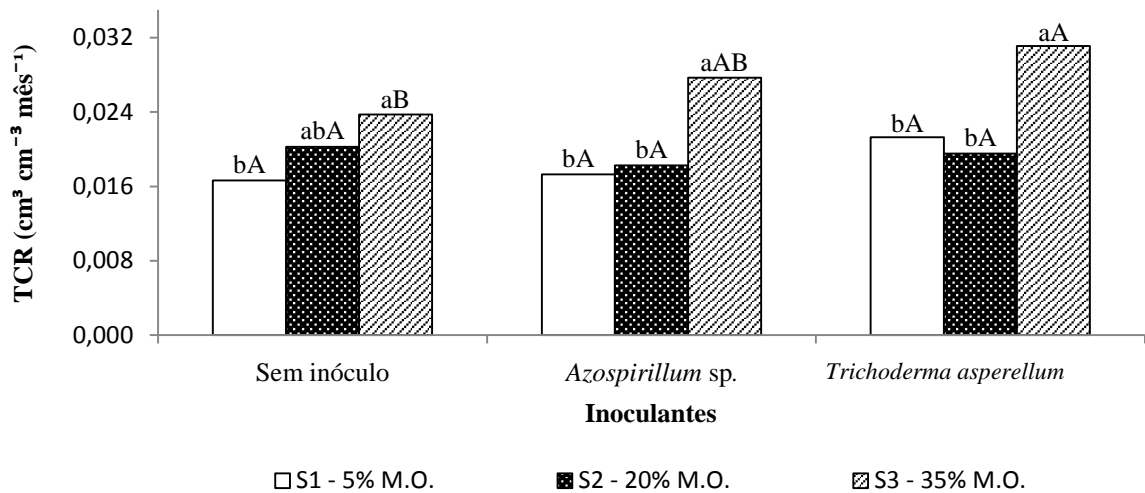


Figura 3. Taxa de crescimento relativo (TCR), Área de limbo foliar (ALF) e Área foliar total (AFT) de plantas de mirtilleiro cv. Climax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes substratos (S_n) e mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, sendo que letras minúsculas comparam os substratos dentro de cada inóculo e, letras maiúsculas, os inóculos em cada substrato. Ponta Grossa, 2014/15.

Tanto os resultados de área de limbo foliar como a área foliar total por planta, não tiveram influência da ação dos inóculos, apenas dos substratos (Tabela 2). Mirtilheiros cultivados no substrato com 35% de M. O. tiveram maior desenvolvimento foliar, sendo que, para o total de área, não houve diferença em relação a 20% de M. O. (Figura 3). Percebe-se que, nesse substrato, apesar das folhas não apresentarem o maior tamanho, a quantidade total de folhas que a planta apresentou (Figura 4) acabou por compensar a área foliar, já que a área total não diferiu de 35% de matéria orgânica. Isso também se observou para as avaliações de TCR na ausência de inóculo, onde não houve diferença entre 20 e 35%. Desta forma, a proporção de 20% de matéria orgânica, foi suficiente para promover incremento no desenvolvimento do mirtilheiro; entretanto quando somado ao efeito dos inóculos, o crescimento foi potencializado com 35%.

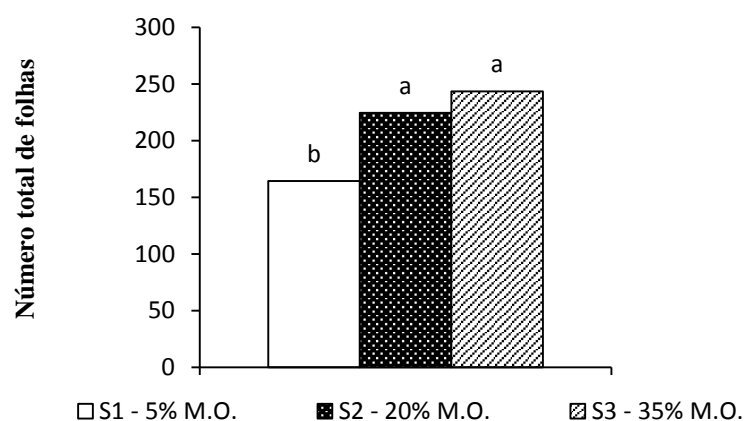


Figura 4. Número total de folhas de plantas de mirtilheiro cv. Climax, após seis meses do transplante das mudas em vasos com diferentes substratos (S_n) e mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Ponta Grossa, 2014/15.

Tabela 2. Valores de F referentes à taxa de crescimento relativo (TCR), área de limbo foliar (ALF), área foliar total (AFT) e número total de folhas (N° folhas) procedida em plantas de mirtilheiro cv. Climax, após seis meses do transplante das mudas em vasos com diferentes substratos e mantidas em casa de vegetação. Ponta Grossa, 2014/15.

Fator de variação	TCR	ALF	AFT	N° folhas
Substratos ¹	31,00** ³	37,30**	45,23**	10,81**
Inóculos ²	5,08**	2,44 ^{NS}	2,27 ^{NS}	0,81 ^{NS}
Substratos x Inóculos	6,23**	2,03 ^{NS}	2,94 ^{NS}	0,65 ^{NS}
C.V. (%) ⁴	14,29	13,04	21,11	25,30

(¹) Substratos: diferentes proporções de matéria orgânica/estercos bovinos (S1-5% MO, S2-20% MO e S3-35% MO).

(²) Inóculos: ausência de inóculo (O), *Azospirillum brasilense* (A) e *Trichoderma asperellum* (T).

(³) *: $P \leq 0,05$. **: $P \leq 0,01$. NS: Não significativo.

(⁴) Coeficiente de Variação.

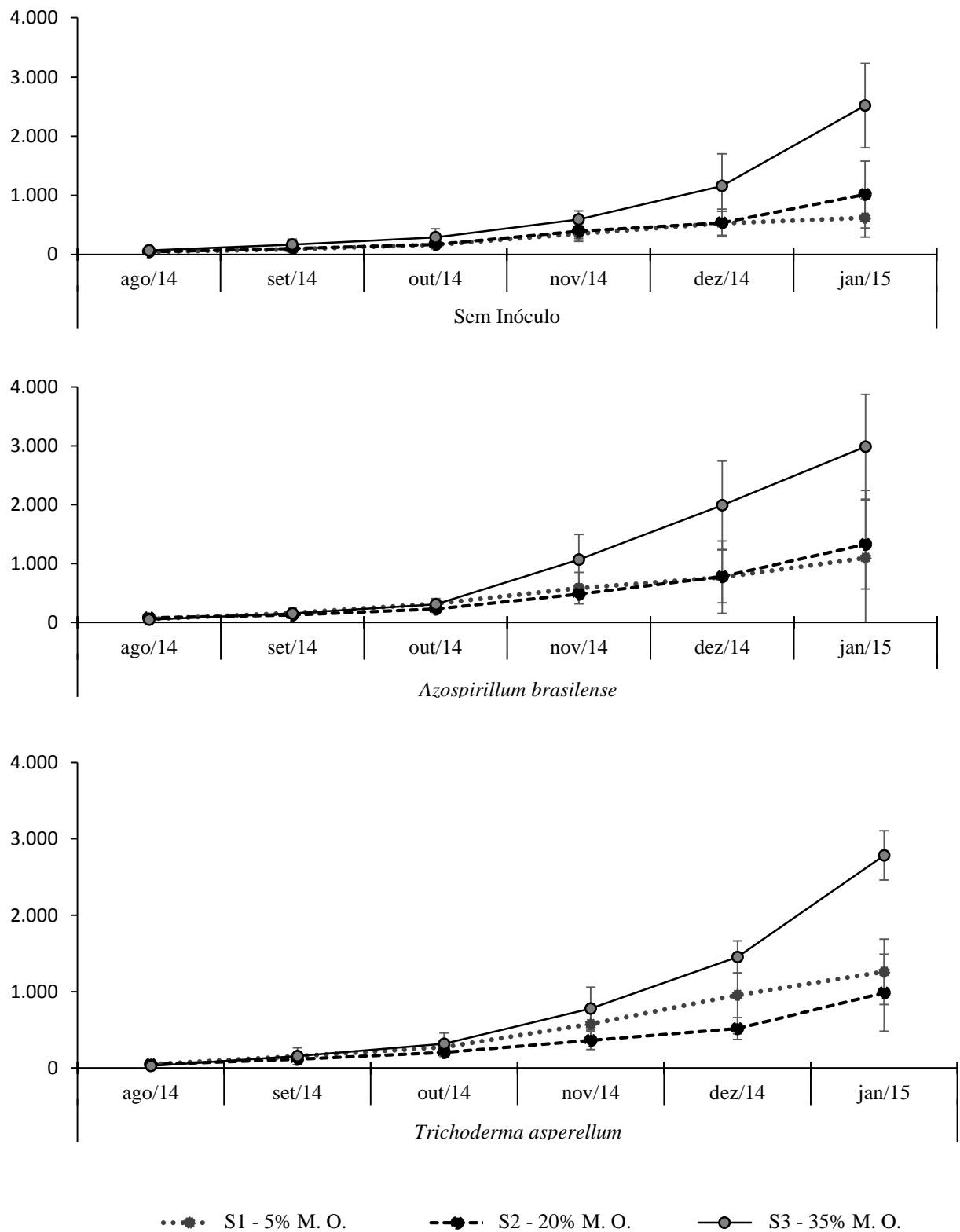


Figura 5. Volume de copa (cm³) de plantas de mirtilleiro cv. Climax, no decorrer de seis meses após o transplântio das mudas em vasos com diferentes substratos e microrganismos promotores de crescimento, mantidas em casa de vegetação. Ponta Grossa, 2014/15.

Na figura 5 são apresentados os valores de volume de copa, nos diferentes substratos, ao logo do período de condução do experimento, mostrando um maior desenvolvimento das plantas no substrato com 35% de M. O. Os valores verificados, independente do tratamento, foram muito superiores aos observados por Spinardi & Ayub (2013) para a mesma cultivar, mas em condições de campo aberto. Isso demonstra a fácil adaptação do mirtilheiro a condições de cultivo protegido e aponta para a possibilidade desse ambiente potencializar a utilização de insumos fornecidos, uma vez que as plantas demonstraram um excelente desenvolvimento vegetativo. No entanto, os teores foliares de N verificados em análise se encontravam em níveis insuficientes, segundo a interpretação dos resultados de análise foliar do mirtilo de Antunes & Raseira (2006), onde os teores precisariam estar entre 18 e 21g kg⁻¹ para níveis normais.

Contrariamente ao ocorrido para *A. brasilense*, é possível notar para a variável TCR a mesma tendência observada para assimilação de carbono e quantidade de N foliar (Figuras 1 e 2), na presença de *T. asperellum*, onde somente com 35% de M. O., houve um efeito da inoculação do fungo com um incremento.

A promoção do crescimento por ação do *T. asperellum* também foi verificado em mudas de café (*Coffea arabica*) com incremento para as variáveis fitomassa seca total, de caule e de folhas (DE JESUS *et al.*, 2011), embora não aliadas a quantidade de matéria orgânica fornecida. Nesse mesmo experimento, os autores também verificaram maior área foliar e absorção de fósforo pela ação desse inoculante, contrariando o verificado no presente experimento, onde a presença de fósforo nas folhas não foi influenciada por nenhum dos fatores empregados (Tabela 3). Carvalho *et al.* (2011) observaram que plantas de feijoeiro, oriundas de sementes inoculadas com o fungo da espécie *Trichoderma harzianum*, tiveram o crescimento da parte aérea superior.

Tabela 3. Valores de F referentes à análise nutricional procedida com folhas de mirtilheiro cv. Climax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes substratos e microrganismos promotores de crescimento, mantidas em casa de vegetação. Ponta Grossa, 2014/15.

F. V. ¹	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Zn	Mn	Fe
Substratos²	23,38** ⁴	1,65 ^{NS}	5,95**	65,76**	1,66 ^{NS}	53,41**	6,37**	52,17**	64,45**	6,70**
Inóculos³	18,78**	0,07 ^{NS}	1,93 ^{NS}	2,74 ^{NS}	2,02 ^{NS}	11,03**	4,11*	8,34**	1,01 ^{NS}	11,18**
S. x I.	20,12**	1,57 ^{NS}	1,37 ^{NS}	4,21 ^{NS}	7,04**	12,46**	8,08**	26,00**	12,26**	5,53**
C.V.⁵ (%)	28,67	22,38	26,16	15,54	18,11	11,24	21,44	9,88	28,04	15,56

(¹) Fator de Variação.

(²) Substratos: diferentes proporções de matéria orgânica/esterco bovino (S1-5% MO, S2-20% MO e S3-35% MO).

(³) Inóculos: ausência de inóculo (O), *Azospirillum brasilense* (A) e *Trichoderma asperellum* (T).

(⁴) *: $P \leq 0,05$. **: $P \leq 0,01$. NS: Não significativo.

(⁵) Coeficiente de Variação.

Em plantas de mirtilheiro cv. Bluecrop, a inoculação com *T. harzianum* não representou aumento na massa seca de caules e raízes, tendo número de folhas e área foliar total muito inferiores ao controle sem inoculação (SILVA *et al.*, 2000). Esse experimento também foi realizado em casa de vegetação e o levantamento desses dados realizados após 4 meses de desenvolvimento das mudas. Pode-se deduzir que o mirtilheiro tem uma maior afinidade com a espécie *T. asperellum* e que a maior proporção de matéria orgânica no substrato foi essencial para proporcionar maiores valores de área foliar (Figura 3).

O fato de TCR, ALF e AFT terem se apresentado maiores com 35% de M. O., embora não diferindo de 20% de M. O. em alguns casos, pode ter sido o fator preponderante para a redução da taxa de assimilação de carbono, por um efeito de sombreamento com o maior crescimento vegetativo.

A eficiência aparente de carboxilação (Figura 6) relaciona a assimilação de carbono (quantidade de carbono inorgânico que está passando a incorporar a moléculas orgânicas) com a quantidade de CO₂ disponível nos espaços intercelulares do mesófilo. Considerando o efeito dos substratos dentro de cada inoculante, no tratamento controle, plantas cultivadas no substrato com 20% de M. O. apresentaram médias superiores, enquanto que aquelas inoculadas com *T. asperellum* os valores foram maiores tanto em 20 como em 35% de matéria orgânica. Para o

efeito dos inóculos em cada substrato, a maior média obtida com 20% de M. O. foi na ausência de inóculo, enquanto que em 35% de M. O. na inoculação com *T. asperellum*.

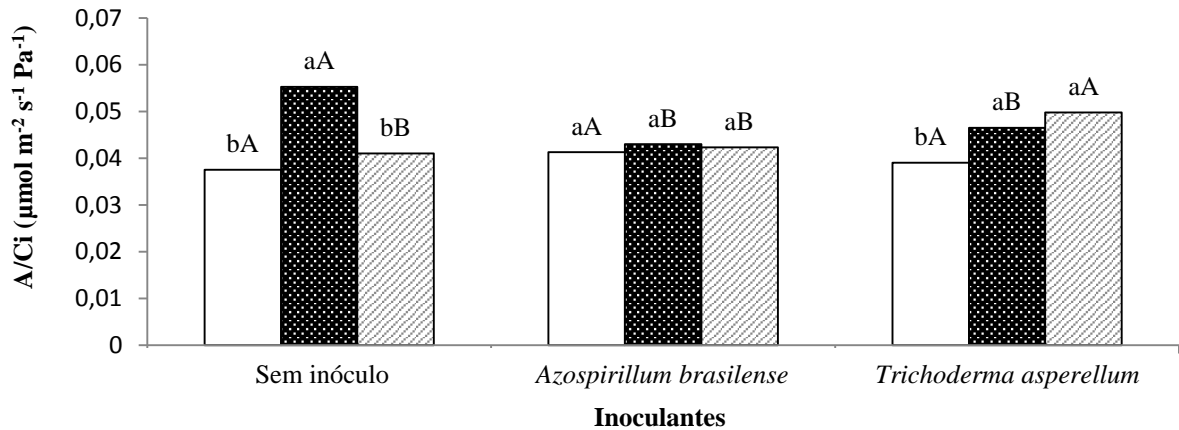


Figura 6. Eficiência aparente de carboxilação (A/C_i) de plantas de mirtilheiro cv. Climax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes substratos (S_n) e microrganismos promotores de crescimento, mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, sendo que letras minúsculas comparam os substratos dentro de cada inóculo e, letras maiúsculas, os inóculos em cada substrato. Ponta Grossa, 2014/15.

Tanto para essa variável como para assimilação de CO_2 (Figura 1), o inóculo *T. asperellum* proporcionou incremento na maior quantidade de matéria orgânica. Esse fungo é conhecido por formar associações simbióticas com algumas plantas, afetando positivamente a absorção de nutrientes pelas raízes e afetando a taxa fotossintética nas folhas (VARGAS *et al.*, 2009), mas ainda não se relatou essa dependência de matéria orgânica; fato que pode ser específico da sua relação com o mirtilheiro.

Estas diferenças encontradas podem ser devidas não somente à grande quantidade de matéria orgânica, mas também à menor quantidade de serragem. Vohník *et al.* (2012) relataram que alguns fungos micorrízicos que se associam com plantas da família Ericaceae não conseguem degradar a lignina e, a presença de lignina nos resíduos orgânicos, acaba por formar uma barreira que impede a absorção de nutrientes, influenciando, por exemplo, a taxa de fotossíntese ou de carboxilação aparente.

Sendo assim, os substratos com 5 e 20% de M. O., por conterem maiores quantidade de serragem podem ter reduzido a ação do *T. asperellum* na assimilação de carbono e eficiência dessa assimilação em 5% de M. O.; assim como a taxa de crescimento, em resposta à essas variáveis. Esses resultados apontam para um efeito sinérgico de *T. asperellum* na presença da alta quantidade de M.O. ou da pequena proporção de serragem.

Para os teores de clorofila nas folhas não houve influência dos inóculos, somente efeito significativo da composição dos substratos (Tabela 4). Em plantas de feijão, a inoculação com *T. asperellum* em sementes também não proporcionou aumento nos teores de clorofila (AGUIAR *et al.*, 2014). No entanto em sementes de trigo inoculadas com *A. brasilense* foi possível observar aumento dos valores de clorofilas a e b das plantas em relação àquelas não inoculadas (BASHAN *et al.*, 2006).

Tabela 4. Valores de F referentes a clorofila a (Cl.a), clorofila b (Cl.b) e clorofila total (Cl.total) de mirtilheiro cv. Climax, após seis meses do transplantio das mudas em vasos com diferentes substratos e mantidas em casa de vegetação. Ponta Grossa, 2014/15.

Fator de variação	Cl.a	Cl.b	Cl.total
Substratos ¹	15,42 ^{**3}	5,37 ^{**}	10,66 ^{**}
Inóculos ²	2,87 ^{NS}	0,80 ^{NS}	1,84 ^{NS}
Substratos x Inóculos	0,60 ^{NS}	0,28 ^{NS}	0,43 ^{NS}
Coefficiente de Variação (%)	14,67	11,30	12,68

⁽¹⁾ Substratos: diferentes proporções de matéria orgânica/esterco bovino (S1 - 5% MO, S2 - 20% MO e S3 - 35% MO).

⁽²⁾ Inóculos: ausência de inóculo (O), *Azospirillum brasilense* (A) e *Trichoderma asperellum* (T).

⁽³⁾ *: P ≤ 0,05. **: P ≤ 0,01. NS: Não significativo.

O fato dos substratos com maiores quantidades de M.O. apresentarem maiores teores de clorofilas (Figura 7) pode estar relacionado com uma maior disponibilidade de nutrientes essenciais às plantas, os quais representam os fatores externos que influenciam a síntese ou destruição dos pigmentos fotossintéticos (TAIZ & ZEIGER, 2006). Entre os elementos estruturantes desses pigmentos se encontra, além do nitrogênio, também o magnésio. Na análise de nutrição foliar verifica-se que os teores de magnésio foram influenciados pela interação dos tratamentos, sendo o efeito isolado de substratos ou inóculo não significativo (Tabela 3).

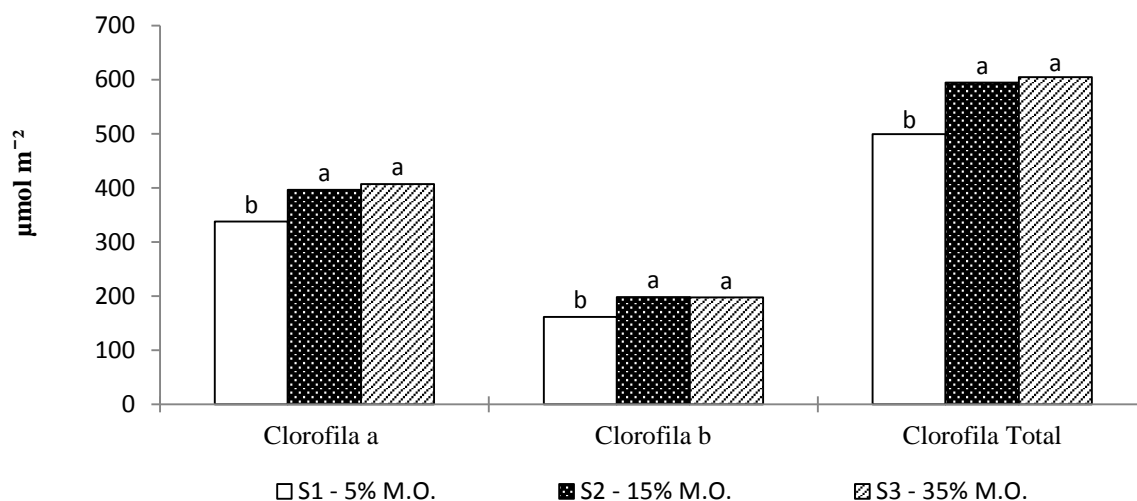


Figura 7. Teores de Clorofila a, Clorofila b e Clorofila Total de plantas de mirtilheiro cv. Climax, após seis meses do transplante das mudas em vasos com diferentes substratos e mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Ponta Grossa, 2014/15.

Para o efeito dos inóculos dentro de cada substrato, observa-se diferença pelo teste de médias somente com 5% de M. O., onde a presença dos inoculantes proporcionou menor quantidade de Mg nas folhas (Figura 8). O efeito dos substratos dentro de cada inóculo mostrou diferenças na quantidade de magnésio nas folhas, mas não houve um padrão de resposta claro. Na inoculação com *A. brasilense*, o Mg encontrado em maior quantidade correspondeu ao substrato com 35% de M.O., não diferindo daquele com 20%. Com o fungo inoculante, o substrato com 20% de M. O. proporcionou maiores concentrações nas folhas dos mirtilheiros. Os teores foliares de Mg se mostraram na faixa normal – de 1,20 a 2,50 g kg⁻¹ (ANTUNES & RASEIRA, 2006).

Nas condições deste experimento, estando fixadas a temperatura da câmara de medida, a incidência luminosa e a quantidade de água fornecida a cada parcela, se verificou que a taxa de transpiração foi menor e a eficiência instantânea do uso de água foi maior no substrato com 35% de M. O. (Figuras 9A e 9B). De forma semelhante, os níveis de potássio nas folhas foram influenciados somente pela ação dos substratos (Tabela 3), sendo que a maior quantidade também foi observada no substrato com 35% de M. O. (Figura 10). Essa maior concentração

de potássio nas folhas pode ter se dado pela maior disponibilidade desse elemento devido à maior quantidade de matéria orgânica.

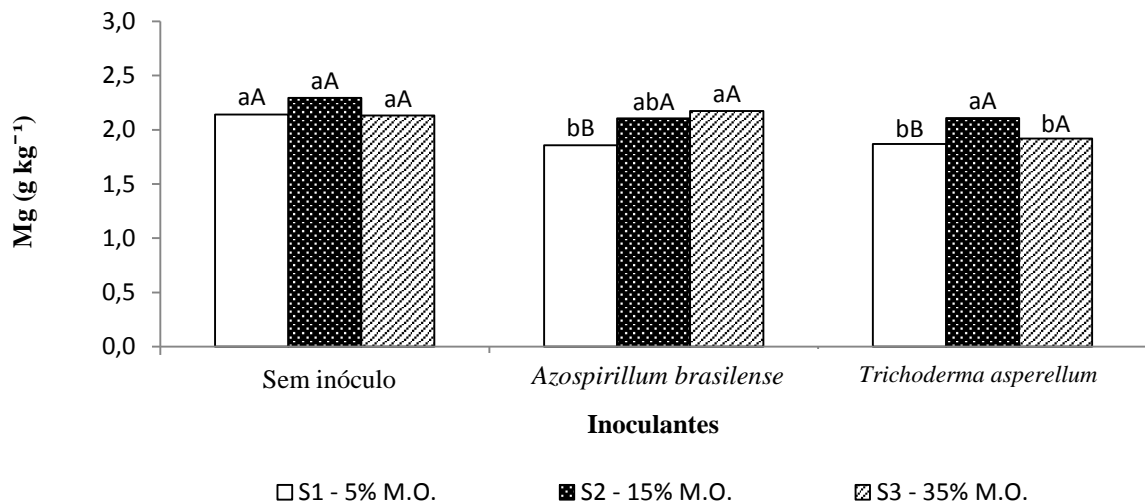


Figura 8. Teores de magnésio (g kg^{-1}) em folhas de mirtilheiro cv. Climax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes substratos (S_n) e mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, sendo que letras minúsculas comparam os substratos dentro de cada inóculo e, letras maiúsculas, os inóculos em cada substrato. Ponta Grossa, 2014/15.

A capacidade da planta em reduzir a perda de água e, ao mesmo tempo, absorver suficientemente CO_2 , é chamada de eficiência no uso da água (KERBAUY, 2004). O potássio desempenha um importante papel na regulação do potencial osmótico das células vegetais, além de ativar muitas enzimas envolvidas nos processos de respiração e fotossíntese (TAIZ & ZEIGER, 2006). A abertura e o fechamento estomático são resultados da variação do turgor nas células-guarda, cujo potencial hídrico é regulado pelo acúmulo de íons K^+ (RAVEN *et al.*, 2001). A abertura estomática é o que permite que a planta realize trocas gasosas com o ambiente, dentre as quais se encontram a perda de vapor d'água (transpiração) e a difusão de CO_2 para o interior dos espaços foliares (KERBAUY, 2004), por isso, plantas bem nutridas com esse elemento apresentam uma menor perda de água (FAQUIN, 2005).

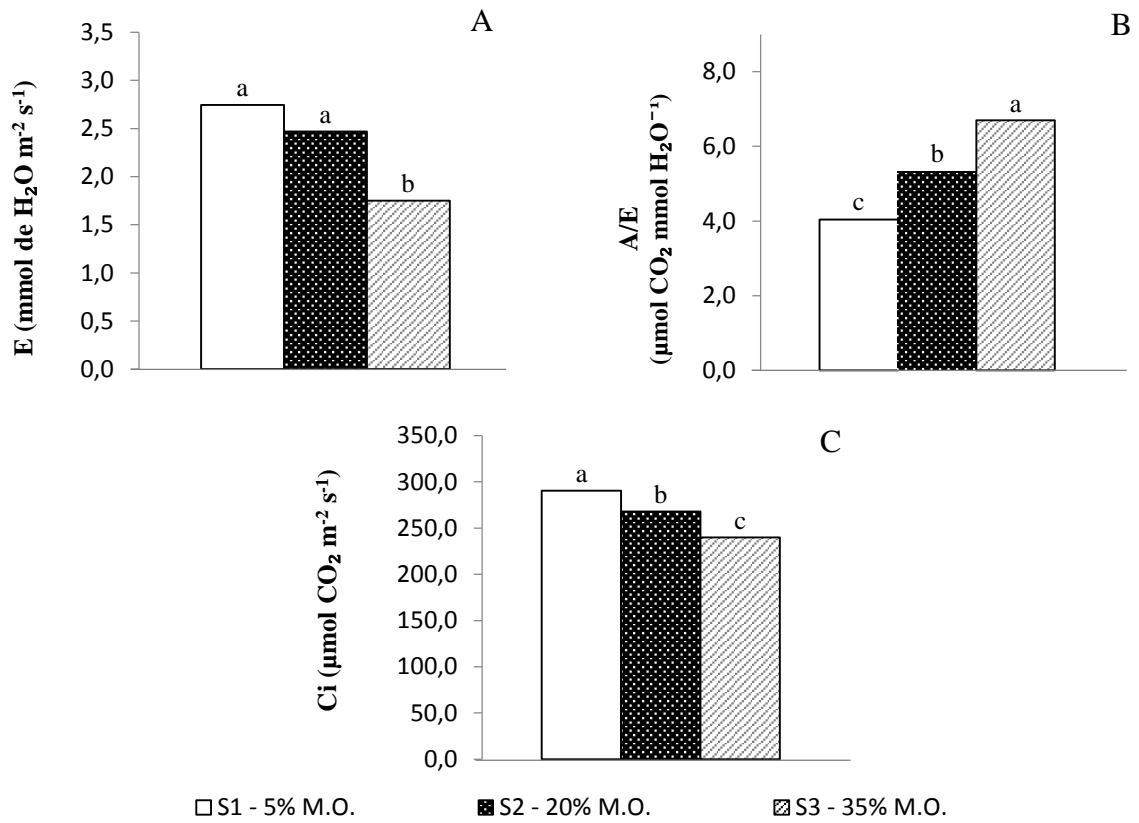


Figura 9. Taxa de transpiração (A), Eficiência instantânea de uso da água (B), Concentração de CO₂ nos espaços intercelulares (C) de plantas de mirtillo cv. Climax após seis meses do transplantio das mudas em vasos com diferentes substratos (S_n) e mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Ponta Grossa, 2014/15.

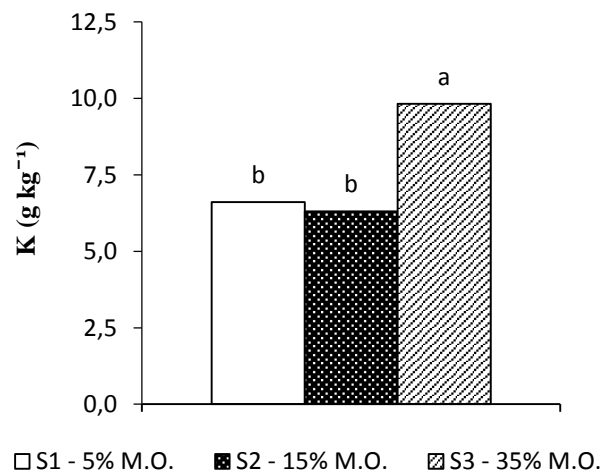


Figura 10. Teores de potássio (g kg⁻¹) em folhas de mirtillo cv. Climax, após seis meses do transplantio das mudas em vasos com diferentes substratos (S_n) e mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Ponta Grossa, 2014/15.

A ação do potássio também poderia estar conferindo maior difusão do CO₂ no mesófilo, devido à manutenção de um pH ótimo para a atividade da enzima ribulose bifosfato carboxilase (FAQUIN, 2005). Entretanto, a maior quantidade de CO₂ intercelular não foi verificado para o substrato com 35% de M. O. com maior teor de potássio nas folhas, mas sim para o substrato com 5% de M. O. (Figura 8C). Estes resultados foram contrastantes àqueles encontrados por Li *et al.* (2013) em morangueiro, em que a taxa de fotossíntese e a concentração intercelular de carbono se apresentaram maiores com a presença de adubação potássica em relação à testemunha.

Os teores de potássio foliar encontraram-se acima do normal (6,60 – 9,50 g kg⁻¹), mas ainda fora da faixa considerada como “excesso” – acima de 9,50 g kg⁻¹(ANTUNES & RASEIRA, 2006).

Assim como para potássio, o teor de cálcio nas folhas não foi influenciado pelo inóculo, somente pela ação dos substratos (Tabela 3), sendo que houve redução da quantidade verificada com o aumento do teor de matéria orgânica, apresentando diferença significativa entre 5 e 35% de M. O. (Figura 11). Isso pode estar associado à maior disponibilidade de outros cátions como K⁺, Mg²⁺ e NH₄⁺ no substrato com maior quantidade de M.O., pois altas concentrações desses cátions diminuem competitivamente a absorção de Ca²⁺, embora seus níveis foliares estejam na faixa normal (4,0 a 8,0 g kg⁻¹), com exceção do substrato com 35% de M. O. estando abaixo do normal (ANTUNES & RASEIRA, 2006).

Para o teor foliar de enxofre houve interação dos dois fatores estudados (Tabela 3). Independente do inóculo, observando o efeito dos substratos em cada um deles, 35% de M. O. apresentou-se com as menores médias (Figura 12). Com a maior concentração de matéria orgânica, o que se esperava era uma maior disponibilidade desse elemento para a planta, e, conseqüentemente, maiores teores nas folhas, no entanto, ocorreu um acúmulo menor em

relação às demais proporções. Para o efeito dos inóculos em cada substrato, só se observou diferença em 20% de M. O., onde a presença dos inóculos reduziu a quantidade de S nas folhas.

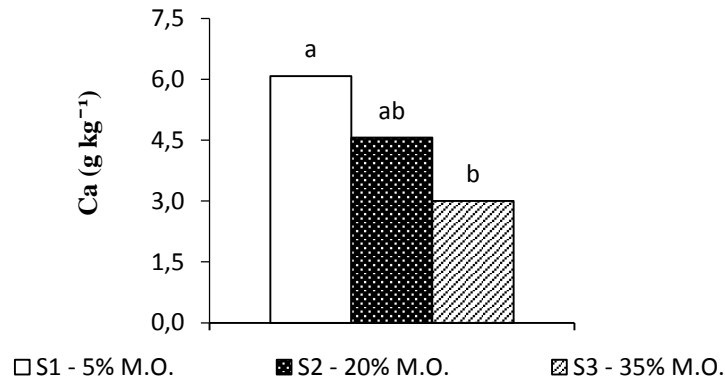


Figura 11. Teores de Cálcio (g kg⁻¹) em folhas de mirtilleiro cv. Climax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes substratos (S_n) e mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Ponta Grossa, 2014/15.

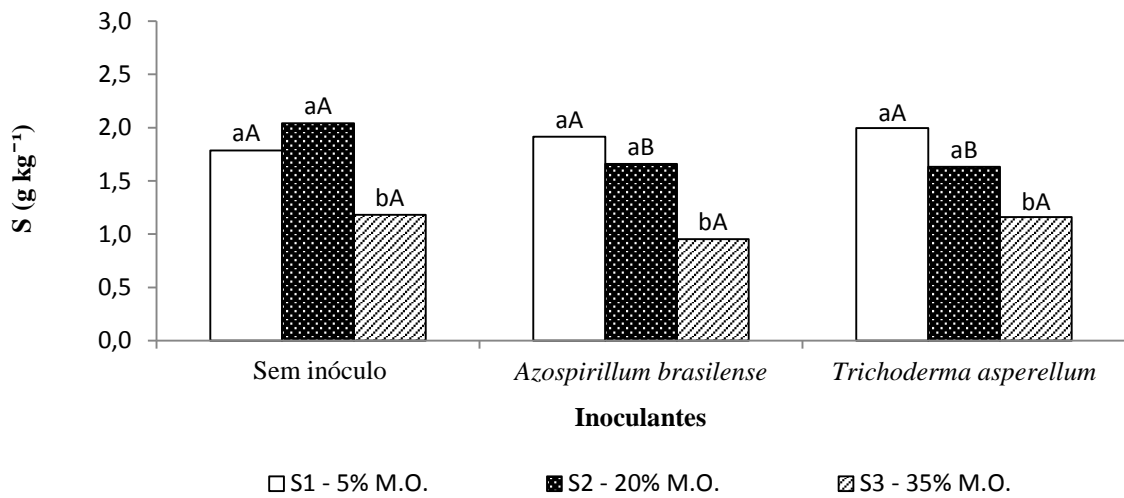


Figura 12. Teores de enxofre (g kg⁻¹) em folhas de mirtilleiro cv. Climax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes substratos (S_n) e mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, sendo que letras minúsculas comparam os substratos dentro de cada inóculo e, letras maiúsculas, os inóculos em cada substrato. Ponta Grossa, 2014/15.

Para os teores de micronutrientes houve interação entre os fatores (Tabela 3) e suas médias, comparadas pelo teste de Tukey, são apresentadas na tabela 5.

Tabela 5. Teores de micronutrientes (mg kg^{-1}) em folhas de mirtilheiro cv. Climax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes substratos (S_n) e mantidas em casa de vegetação. Ponta Grossa, 2014/15.

Nutrientes (mg kg^{-1})	Substratos	Inoculantes		
		Sem Inóculo	<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>Trichoderma asperellum</i>
Fe	S ₁ - 5% MO	100.39 bA*	91.02 aA	91.70 bA
	S ₂ - 20% MO	131.33 aA	110.42 aA	106.86 abA
	S ₃ - 35% MO	85.85 bB	102.74 aAB	123.94 aA
Zn	S ₁ - 5% MO	21.36 aA	14.90 abB	20.02 aA
	S ₂ - 20% MO	15.20 bA	16.00 aA	14.21 bA
	S ₃ - 35% MO	12.43 bB	12.44 bB	17.24 abA
Cu	S ₁ - 5% MO	2.00 aA	1.82 abA	2.33 aA
	S ₂ - 20% MO	1.87 aAB	2.26 aA	1.24 bB
	S ₃ - 35% MO	1.49 aA	1.43 bA	1.10 bA
Mn	S ₁ - 5% MO	461.49 aA	377.79 aB	442.22 aA
	S ₂ - 20% MO	199.83 bB	225.32 bA	175.48 bB
	S ₃ - 35% MO	104.57 bA	147.72 bA	128.71 bA

*Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, sendo que letras minúsculas comparam os substratos dentro de cada inóculo e, letras maiúsculas, os inóculos em cada substrato.

**Coeficientes de Variação (%): Cu = 21,44; Fe = 15,56; Zn = 9,88; Mn = 28,04.

Para o efeito de substratos dentro de cada inóculo, o maior teor foliar de Fe foi verificado no substrato com 20% de M. O. em plantas não inoculadas e no substrato com 35% de M. O., não diferindo de 20%, quando inoculadas com *T. asperellum*. Para o efeito dos inóculos em cada substrato, *T. asperellum* apresentou a maior média com 35% de M. O., não diferindo da inoculação com *A. brasilense*.

A presença de Zn nas folhas, dentro do mesmo inóculo, foi favorecida no substrato com 5% de M. O. quando da ausência de inoculante. Quando na presença de *A. brasilense*, o substrato com 20% de M. O. foi superior, não diferindo de 5%, enquanto que, com *T. asperellum*, 5% de M. O. foi maior, não diferindo de 35%. Comparando os inóculos dentro de cada substrato, a inoculação com *A. brasilense* foi deletério em 5 e em 35% de M. O.; sendo *T. asperellum* superior à testemunha em 35%.

Quando observado o efeito dos substratos em cada inóculo, para a presença de cobre nas folhas, em *A. brasilense*, o substrato com 20% de M. O. apresentou maior média não diferindo de 5%; sendo que o substrato com 5% de M. O. apresentou maior média também com *T. asperellum*. Para os inóculos em cada substrato, só se verificou diferença com 20% de M. O. entre *A. brasilense* e *T. asperellum*, com a bactéria apresentando maior média que o fungo, embora ambos não diferindo da testemunha.

A inoculação com a espécie *T. harzianum* em mirtilheiro highbush, cv. Bluecrop, não diferiu da testemunha sem inoculação para a quantidade acumulada de Cu e Zn em ramos, sendo inferior à inoculação com o fungo *Gliocladium virens* bactérias do gênero *Pseudomonas* (SILVA *et al.*, 2000).

Independente do inóculo, o substrato com 5% de M. O. apresentou maiores teores de manganês nas folhas sendo que este substrato não foi favorecido pela presença de *A. brasilense*. Em 20% de M. O., a maior média foi nas plantas inoculadas com *A. brasilense*.

Dentre os micronutrientes, segundo a faixa de interpretação de teores foliares em mirtilheiro (ANTUNES & RASEIRA, 2006), Fe, Mn e Zn se encontravam normais (Fe: 81 – 199 mg kg⁻¹; Mn: 51 – 349 mg kg⁻¹ e Zn: 15 – 30 mg kg⁻¹), embora as médias de S₁ de Mn estivessem acima do normal (350 – 450 mg kg⁻¹) e algumas médias de Zn abaixo do normal (8 – 14 mg kg⁻¹). Os teores foliares de Cu se encontram insuficientes (abaixo de 5 mg kg⁻¹).

De maneira geral, pode-se afirmar que as combinações 5% de M. O. + *T. asperellum* e 20% de M. O. + *A. brasilense* foram superiores para os teores da maioria dos micronutrientes nas folhas.

4.6. Conclusões

De maneira geral, os substratos representaram efeitos mais evidentes no desenvolvimento e nutrição do mirtilheiro, sendo que o substrato com 35% de M. O. apresentou

as melhores médias em relação às variáveis fisiológicas (transpiração, eficiência no uso da água e eficiência de carboxilação) e de crescimento (área de limbo foliar, área foliar total e taxa de crescimento relativo), embora, para algumas, não tenha diferido do substrato com 20% de matéria orgânica. Essa proximidade de 20% de M. O. pode estar associada a um efeito de diluição em função do maior crescimento vegetativo.

A combinação de 35% de M. O. com o fungo *T. asperellum* apresentou-se superior para assimilação de CO₂, eficiência de carboxilação e taxa de crescimento relativo; representando uma possibilidade viável para otimização dos resultados obtidos com maiores proporções de matéria orgânica.

5. CAPÍTULO II - RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E NUTRIÇÃO DE MIRTILEIRO CV. CLÍMAX SUBMETIDO À ADUBAÇÃO NITROGENADA E INOCULAÇÃO COM MICRORGANISMOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO

5.1. Resumo

Mudas de mirtilheiro cv. Clímax cultivadas em vasos foram adubadas com doses de nitrogênio e inoculadas com microrganismos promotores do crescimento de plantas. As parcelas, formadas por um única planta, foram dispostas em delineamento experimental de blocos casualizados e em arranjo fatorial 3x3, com seis repetições. O primeiro fator foi a adubação nitrogenada nas doses de 0, 10 e 15 g N planta⁻¹ (0, 22 e 33g de ureia planta⁻¹) parceladas em três etapas (29/ago, 26/set e 24/out/14). O segundo fator representou a inoculação dos substratos com o fungo *Trichoderma asperellum* (50g vaso⁻¹), com a bactéria *Azospirillum brasilense* (5mL vaso⁻¹) ou com a ausência de inoculação (testemunha). Ao longo de seis meses foram realizadas avaliações de crescimento com as quais se calculou o volume de copa, e, posteriormente, a taxa de crescimento relativo (TCR). Após seis meses do transplântio, se avaliou área de limbo foliar (ALF) e área foliar total (AFT), teores de clorofila (Cl.a, Cl.b e Cl.total), fotossíntese (A), transpiração (E), carbono intercelular (Ci), relação Ci/carbono atmosférico, eficiência aparente de carboxilação (A/Ci) e eficiência instantânea de uso da água (A/E) e, teores de macro e micronutrientes nas folhas. De modo geral, os teores de nutrientes nas folhas não foram influenciados pela adubação nitrogenada, embora para as variáveis TCR, ALF, AFT, A/Ci e teores de clorofila tenham sido superiores na maior quantidade de N aplicada. Em relação ao efeito isolado dos inóculos, a TCR foi aumentada pela ação do *T. asperellum*.

Palavras-chave: *Vaccinium ashei*, *Azospirillum brasilense*, *Trichoderma asperellum*, ureia

CHAPTER II - PHYSIOLOGICAL RESPONSES AND NUTRITION OF BLUEBERRY BUSH CV. CLIMAX TO NITROGEN FERTILIZING AND INOCULATION WITH MICROORGANISMS GROWTH PROMOTERS

5.2. Abstract

Blueberry seedlings cv. Climax were cultivated into pots and submitted to different doses of nitrogen and microorganisms, promoters of plant growth. The parcels, formed by an only plant, were disposed in trial designed randomized blocks, factorial arrangement 3x3, with six recurrences. The first factor was the nitrogen fertilization on doses from 0, 10 to 15 g N plant⁻¹ (0, 22 and 33g of urea g N planta⁻¹) divided and applied in three steps (29 August, 26 September and 24 October 2014). The second factor represented the inoculation of the substrates with *Trichoderma asperellum* (50g.vase⁻¹) and *Azospirillum brasilense* (5mL.vase⁻¹), or the absence of inoculation. Over a six-month period, assessments of growth have been carried, with which the size of the crown and the TCR (rate of relative growth) were calculated. After six months of transplanting, the ALF (foliar limb area), AFT (total foliar area), chlorophyll content (Cl.a, Cl.b and total Cl), photosynthesis (A), transpiration (E), intercellular carbon (Ci), carboxylation apparent efficiency (A/Ci) and instant efficiency in the use of water (A/E), in addition to macro and micronutrients on the leaves were evaluated. In a general way, the inoculation had no significant effects. The nitrogen doses applied up the numbers of A/Ci, chlorophyll, ALF, AFT and foliar N, although there was no difference between 10 and 15 g of N plant⁻¹. The TCR was higher with 15 g of N plant⁻¹. Some foliar nutrients concentration had no positive influence of nitrogen fertilization, while this could be associate with a dilution effect.

Keywords: *Vaccinium ashei*, *Azospirillum brasilense*, *Trichoderma asperellum*, urea.

5.3. Introdução

O nitrogênio (N) está presente em diversos compostos como os aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, enzimas e coenzimas, além de alguns pigmentos e produtos secundários. Atua em muitos processos como a fotossíntese, respiração, sínteses em geral e multiplicação e diferenciação celular (MALAVOLTA, 2006). Entre todos os nutrientes fornecidos via adubação, o N foi o primeiro a ter sua essencialidade estabelecida (MALAVOLTA, 1980). É o nutriente requerido em maior quantidade pelas plantas, sendo um dos mais importantes para a obtenção de altas produtividades (FAQUIN, 2005).

A maior parte de N existente não está diretamente disponível para os organismos vivos. A atmosfera é considerada fonte primária desse elemento, uma vez que, dos gases atmosféricos aproximadamente 78% é N_2 (TAIZ & ZEIGER, 2006). Bactérias fixadoras de nitrogênio são as principais responsáveis por transformar o N_2 atmosférico em formas assimiláveis para plantas e animais. Elas desenvolvem associações com raízes de plantas, colaborando no processo de absorção de nutrientes e são representadas por espécies dos gêneros *Rhizobium*, *Azospirillum* e *Frankia*; dos quais o *Azospirillum* se mostrou o mais eficiente no aumento da absorção de nutrientes em plantas de chá (NEPOLEAN *et al.*, 2012).

No solo, somente 5% do N está na forma mineral (iônica), diretamente disponível para as plantas, na forma de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) e em torno de 95% do N está na forma orgânica, sendo parte mineralizada anualmente através da atividade microbiana (FAQUIN, 2005). Para miratileiro cv Sharpblue, Merhaut & Darnell (1996) verificaram maior crescimento com o fornecimento de N como NO_3^- , embora a absorção de NO_3^- tenha sido mais limitada em relação à NH_4^+ .

O N é absorvido por fluxo de massa e difusão radicular, sendo que aproximadamente 99% ocorrem pela primeira rota (BARBER, 1966). A absorção de N varia consideravelmente durante o ciclo da cultura. Na maioria das vezes, o incremento na quantidade de N absorvido

ocorre de forma gradual durante a fase vegetativa, alcança o máximo durante o florescimento e cai durante a fase de enchimento dos frutos (CREGAN & BERKUM, 1984).

O fornecimento de N via fertilizantes é fundamental para a obtenção de altas produtividades de grande parte das culturas (FAQUIN, 2005). Devido a sua distinta exigência nutricional, muitas práticas de adubação que são comuns à maioria das espécies frutíferas não são indicadas para a cultura do mirtilheiro (FREIRE, 2004). A extração anual de macronutrientes por uma planta adulta de mirtilheiro ocorre na seguinte ordem: nitrogênio > cálcio > potássio > fósforo > magnésio (FREIRE, 2006). Com relação ao teor foliar de nutrientes, da brotação até a colheita, observa-se uma variação decrescente para o nitrogênio, fósforo e potássio e crescente para o cálcio e magnésio (FREIRE, 2004).

Para as cultivares de Misty e O'Neal de mirtilheiro, o aumento da quantidade de N até certo ponto promoveu maior altura das plantas e comprimento de ramos, além de maiores teores foliares de nitrogênio, fósforo, magnésio e ferro (LEITZKE *et al.*, 2015). Esses autores estimam que a maior produção de mirtilos por planta, independente da cultivar, foi obtida com a dose 7,37 g de N planta⁻¹. Bañados *et al.* (2012) verificaram que a aplicação de 50 kg de N ha⁻¹, cerca de 18g planta⁻¹, corroborou com maior crescimento e produção para a cv. Bluecrop.

O objetivo deste trabalho foi verificar o desenvolvimento de mudas de mirtilheiro, cv. Clímax, adubadas com N e inoculadas com *Azospirillum brasilense* e *Trichoderma asperellum*.

5.4. Material e métodos

O experimento foi conduzido em Ponta Grossa-PR (25° 05' 23,2" S; 50°06'09,2"O, 975 metros de altitude) de julho de 2014 a janeiro de 2015. As mudas de mirtilheiro da cv. Climax foram adquiridas de um viveiro comercial (Vacaria-RS) e transplantadas em vasos plásticos com as dimensões de 36 cm de diâmetro e 26 cm de altura. Os vasos foram organizados em fileiras duplas, com 40 cm de espaçamento entre as fileiras, e mantidos em casa de vegetação.

Essa estrutura era totalmente fechada com plástico transparente duplo (para proporcionar isolamento térmico) e equipada com sistema de ventilação, resfriamento e irrigação por aspersão. A temperatura máxima dentro da casa de vegetação foi de 25°C e a frequência de rega foi uma vez ao dia, por cerca de quatro minutos, às 9h da manhã. Após o plantio, as mudas foram podadas a cerca de 20 cm do substrato de modo a uniformizar todas as parcelas.

O substrato utilizado para o plantio das mudas consistiu em uma mistura de terra de barranco (40%), areia (20%), serragem (35%) e matéria orgânica – esterco bovino curtido (5%). A terra de barranco correspondeu à camada profunda (2 m) de um Latossolo Vermelho distroférico (EMBRAPA, 2006) que foi peneirado em malha de 4 mm. Optou-se por utilizar essa camada profunda para minimizar a ação de outros organismos que poderiam atuar antagonicamente aos tratamentos aplicados. Os atributos deste solo foram: 188,4 g kg⁻¹ de areia; 91,6 g kg⁻¹ de silte e 720 g kg⁻¹ de argila; pH (CaCl₂) = 4,7; H + Al = 4,28 mmol_c dm⁻³; Al_{trocável} = 0,2 mmol_c dm⁻³; Ca = 1,0 mmol_c dm⁻³; Mg = 1,1 mmol_c dm⁻³; K = 0,14 mmol_c dm⁻³; P = 0,3 mg dm⁻³, C_{orgânico} = 12 g dm⁻³, CTC_{pH 7,0} = 6,52 cmol_c dm⁻³ e saturação por bases = 34,4%.

O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados, distribuindo-se os tratamentos em arranjo fatorial 3 x 3, com 6 repetições. O primeiro fator representou a adubação nitrogenada com 0, 10 e 15 g N planta⁻¹ (0, 22 e 33g de ureia planta⁻¹) parcelada em três etapas (29/ago, 26/set e 24/out/14, respectivamente 35, 63 e 91 dias após o transplantio). O segundo fator representou a inoculação dos substratos com o fungo *Trichoderma asperellum* (50g vaso⁻¹), com a bactéria *Azospirillum brasilense* (5mL vaso⁻¹) ou com a ausência de inoculação (controle).

A bactéria *Azospirillum brasilense* foi obtida a partir do produto comercial Nitro1000 Gramíneas®, na concentração de 2,010⁸ células viáveis mL⁻¹ (fabricante: Nitro1000, Cascavel - PR); enquanto que o *Trichoderma asperellum* corresponde ao produto comercial Quality WG® (10 bilhões de esporos g⁻¹), cujo fabricante é o Grupo Farroupilha, de Patos de Minas-MG.

Mensalmente foram realizadas avaliações de crescimento das mudas (de agosto/14 a janeiro/15). A altura (cm) foi mensurada do substrato até o ápice da planta com o auxílio de fita métrica comum; assim como as medições de distância entre os ramos principais e diâmetro da copa. Para aferir a espessura dos ramos principais utilizou-se de paquímetro digital. Calculou-se, então, o volume da copa das plantas através da fórmula $V = [(L/2) \times (E/2) \times A \times \pi]/3$, onde V é o volume de copa, L é a distância entre os ramos principais, E é a espessura ou diâmetro médio dos ramos principais e A é a altura da copa (ROSSI, 2004). A distância L foi mensurada esticando a fita métrica de um extremo a outro dos ramos principais mais distantes entre si em uma linha perpendicular à planta. Com os dados de volume de copa, estipulou-se a taxa de crescimento relativo (TCR), conforme metodologia proposta por Romano (2001), através da fórmula: $TCR = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t_2 - t_1)$, onde Ln é logaritmo neperiano, W o volume de copa, t o tempo em dias, 1 e 2 a amostragem inicial e final (ago/14 e jan/15).

Após seis meses do transplantio das mudas (janeiro/15) aferiu-se os valores de área foliar, teor de clorofila e taxas de fotossíntese, transpiração, condutância estomática, carbono intercelular, eficiência no uso da água, macro e micronutrientes.

A área de limbo foliar (ALF) foi estimada a partir da média de dez folhas coletadas aleatoriamente e auferidas com o auxílio do medidor de área, modelo LI 3000 (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EUA). Esse valor foi multiplicado pela quantidade total de folhas contadas em cada planta por ocasião da coleta para obtenção da área foliar total (AFT).

A determinação dos teores de clorofila a (Cl.a), clorofila b (Cl.b) e clorofila total (Cl.total) foram realizada pelo método indireto, com o uso do clorofilômetro, marca ClorofiLOG®, modelo CFL 1030, da empresa Falker (Porto Alegre-RS). A leitura com o clorofirômetro foi realizada em três folhas, uma em cada terço da planta e contabilizada a média, sendo uma folha mais antiga, uma mediana, e uma mais nova (FALKER, 2008).

Com o analisador portátil de CO₂ por infravermelho modelo LI-6400XT (LI-COR, Inc., Lincoln, NE, EUA) foram verificadas as trocas gasosas. As medidas foram realizadas entre às 11 e 14h, sendo três folhas por parcela, uma mais antiga (mais rígida), uma mediana (em plena atividade fotossintética) e uma mais nova (ápices foliares com área superior a 4cm²). Utilizou-se como padrão para todas as medidas a concentração de 400 mol.mol⁻¹ de CO₂ no interior da câmara e densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de 1.000 μmol.m².s⁻¹, empregando-se a fonte luminosa LI-COR 6400-02 acoplada a câmara de medida. A temperatura do interior dessa câmara também foi fixada em 20°C. As variáveis estimadas foram: taxa assimilatória líquida de CO₂ / fotossíntese (A), condutância estomática (gS), taxa transpiratória (E) e concentração intercelular de CO₂ (Ci). A partir dessas medidas, calculou-se a eficiência aparente de carboxilação (A/Ci), a eficiência intrínseca de uso da água (A/gS) e a eficiência instantânea de uso água (A/E).

A análise nutricional de macro e micronutrientes foi realizada com as folhas retiradas na poda de verão (ramos principais abaixo de 5 mm de diâmetro) em 25/02/2015. Após a separação das folhas e ramos, as folhas foram secadas em estufa com ventilação forçada a 70°C (até atingirem massa constante); sendo processadas em moinho tipo Willey com peneiras de 0,85 mm. Os teores de N foram determinados mediante digestão sulfúrica e leitura pelo método semi-micro-Kjeldahl. As concentrações de P, K, Ca, Mg, S, Cu, Zn, Mn e Fe foram verificadas por meio de digestão nítrico-perclórica e leitura por espectrometria de absorção molecular (EAM) para P, espectrofotometria de emissão em chama (EEC) para K, espectrometria de absorção atômica com atomização em chama (EAA-chama) para Ca, Mg, Cu, Mn, Zn e Fe; e turbidimetria para S; conforme sugerido por Malavolta *et al*, 1997.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e, para comparação entre médias, o teste de Tukey a 5% de probabilidade com o auxílio do software R, versão 3.0.2 (R CORE TEAM, 2013).

5.5. Resultados e discussão

Das avaliações realizadas com o analisador portátil de CO₂ por infravermelho, houve interação entre os fatores apenas para os resultados da taxa de transpiração. Além disso, as variáveis concentração intercelular de CO₂ e eficiência aparente de carboxilação apresentaram efeito apenas para adubação com N (Tabela 6).

Tabela 6. Valores de F referentes a taxa assimilatória líquida de CO₂ (A), condutância estomática (gS), taxa transpiratória (E), concentração intercelular de CO₂ (Ci), eficiência aparente de carboxilação (A/Ci), eficiência intrínseca de uso da água (A/gS) e eficiência instantânea de uso água (A/E) de mirtilheiro, cv. Clímax, após seis meses do transplantio das mudas em vasos adubadas com nitrogênio e inoculadas com microrganismos promotores de crescimento, mantidas em casa de vegetação. Ponta Grossa, 2014/15.

Fator de variação	A	gS	E	Ci	A/Ci	A/gS	A/E
Doses de N ¹	1.38 ^{NS 3}	2.70 ^{NS}	0.86 ^{NS}	3.84*	4.06*	1.68 ^{NS}	0.56 ^{NS}
Inóculos ²	0.36 ^{NS}	0.47 ^{NS}	1.67 ^{NS}	1.73 ^{NS}	1.40 ^{NS}	0.22 ^{NS}	2.26 ^{NS}
N x Inóculos	0.59 ^{NS}	1.20 ^{NS}	2.70**	2.00 ^{NS}	0.47 ^{NS}	0.60 ^{NS}	1.40 ^{NS}
C. V. (%) ⁴	15.12	37.85	17.89	9.56	18.23	3.38	20.85

⁽¹⁾Doses de N: adubação nitrogenada 0, 10 e 15g N planta⁻¹ (0, 22 e 33g de ureia).

⁽²⁾Inóculos: ausência de inóculo (O), *Azospirillum brasilense* (A) e *Trichoderma asperellum* (T).

⁽³⁾ *: $P \leq 0,05$. **: $P \leq 0,01$. NS: Não significativo.

⁽⁴⁾ Coeficiente de Variação.

Em relação à taxa de transpiração, para o efeito da adubação nitrogenada dentro de cada inóculo, percebe-se diferença apenas para as plantas inoculadas com *Azospirillum brasilense* as quais apresentaram maiores médias com 10g de N planta⁻¹, não diferindo da não aplicação de N (Figura 13).

Para o efeito dos inóculos em cada nível de N, a diferença se deu quando aplicada a maior quantidade (15 g N planta⁻¹), sendo que a presença de *A. brasilense* proporcionou redução da perda de água. Dimkpa *et al.* (2009) relataram que a presença de bactérias que colonizam raízes, entre as quais as do gênero *Azospirillum*, podem levar a planta a produzir substâncias que regulam o potencial osmótico das células e assim proporcionar uma maior tolerância a stress salino e à seca. Isso pode ter relação com a redução da transpiração observada nesse experimento.

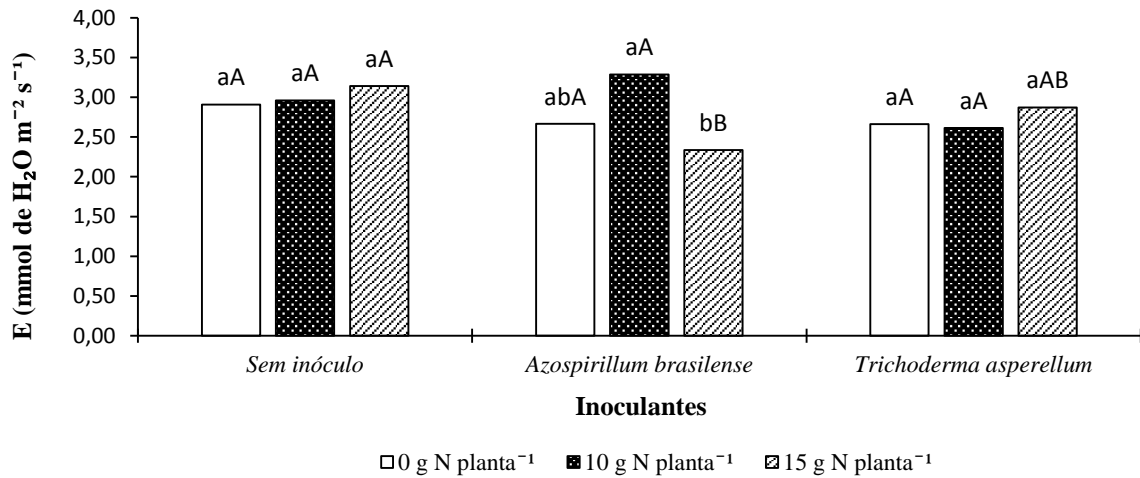


Figura 13. Taxa de transpiração (E) de plantas de mirtilheiro cv. Clímax, após seis meses do transplantio das mudas em vasos com diferentes doses de nitrogênio e microrganismos promotores de crescimento, mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, sendo que letras minúsculas comparam as doses de N dentro de cada inóculo e, letras maiúsculas, as doses de N em cada substrato. Ponta Grossa, 2014/15.

Trabalhando também com microrganismos simbiotes, Yang *et al.* (2002) não verificaram diferença em transpiração e eficiência no uso da água em plantas de mirtilheiro cv. Elliott inoculadas com a micorriza *Oidiodendron maius* sob diferentes níveis de N. Essa micorriza, chamada de micorriza ericoide, se encontra amplamente associada a plantas da família Ericaceae, como é o caso do mirtilheiro.

Para os resultados de carbono intercelular (Ci), independentemente da presença de inóculo, as maiores médias foram verificadas na ausência de adubação nitrogenada (Figura 14). A quantidade de CO₂ que se propaga pelo mesófilo tem relação com a abertura estomática (associada a gS), a quantidade de carbono que é assimilado pela planta (A) e, ainda, a manutenção de um pH ótimo para a atividade da enzima ribulose bifosfato caboxilase, dada pela ação do nutriente potássio (FAQUIN, 2005). Entretanto, nenhuma dessas variáveis apresentou diferença significativa em relação aos tratamentos aplicados.

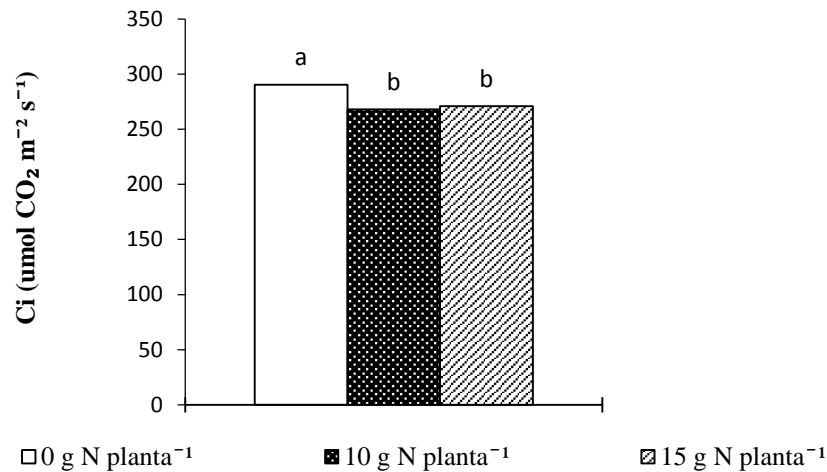


Figura 14. Concentração de CO₂ nos espaços intercelulares(Ci) de mirtilleiro cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes doses de nitrogênio e mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Ponta Grossa, 2014/15.

A partir do Ci, pode-se calcular a eficiência aparente de carboxilação (A/Ci) que é a quantidade de carbono que realmente está sendo assimilada em função da quantidade de C disponível no mesófilo. Verificou-se que a adubação nitrogenada influenciou essa variável positivamente (Figura 15).

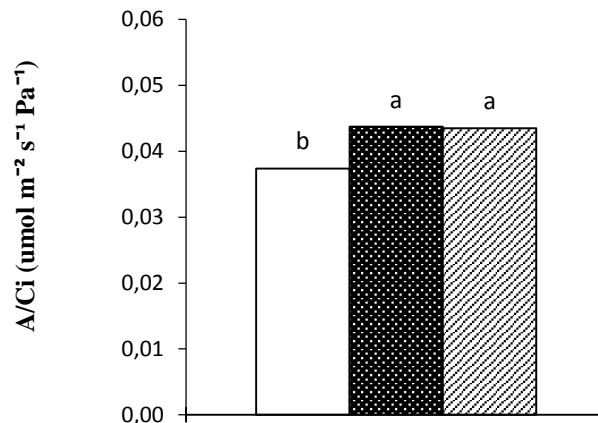


Figura 15. Eficiência aparente de carboxilação (A/Ci) de mirtilleiro cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes doses de nitrogênio e mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Ponta Grossa, 2014/15.

Para os teores de clorofila a, b e total houve diferença apenas em relação às doses de N (Tabela 7), sendo que a dose de 15 g de N planta⁻¹, apresentou valores superiores diferindo do tratamento sem aplicação de nitrogênio (Figura 16). Leitzke *et al.* (2015) também

verificaram aumento do teor de clorofilas até a dose de 10 g de N planta⁻¹ em mirtilheiro cv. Clímax.

Tabela 7. Valores de F referentes a clorofila a (Cl.a), clorofila b (Cl.b) e clorofila total (Cl.total), área de limbo foliar (ALF), área foliar total (AFT) e taxa de crescimento relativo (TCR) de mirtilheiro, cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos em diferentes doses de nitrogênio, mantidas em casa de vegetação. Ponta Grossa, 2014/15.

Fator de variação	Cl.a	Cl.b	Cl.total	ALF	AFT	TCR
Doses de N ¹	3.48*	4.35*	4.28*	4.10*	11.02**	23.10**
Inóculos ²	0.61 ^{NS}	0.72 ^{NS}	0.58 ^{NS}	2.58 ^{NS}	0.57 ^{NS}	7.85*
N x Inóculos	2.41 ^{NS}	1.63 ^{NS}	2.17 ^{NS}	1.10 ^{NS}	0.31 ^{NS}	1.08 ^{NS}
C. V. (%) ⁴	11.41	22.53	14.44	21.46	8.36	17.29

⁽¹⁾ Doses de N: adubação nitrogenada 0, 10 e 15g N planta⁻¹ (0, 22 e 33g de ureia).

⁽²⁾ Inóculos: ausência de inóculo (O), *Azospirillum brasilense* (A) e *Trichoderma asperellum* (T).

⁽³⁾ *: $P \leq 0,05$. **: $P \leq 0,01$. ^{NS}: Não significativo.

⁽⁴⁾ Coeficiente de Variação.

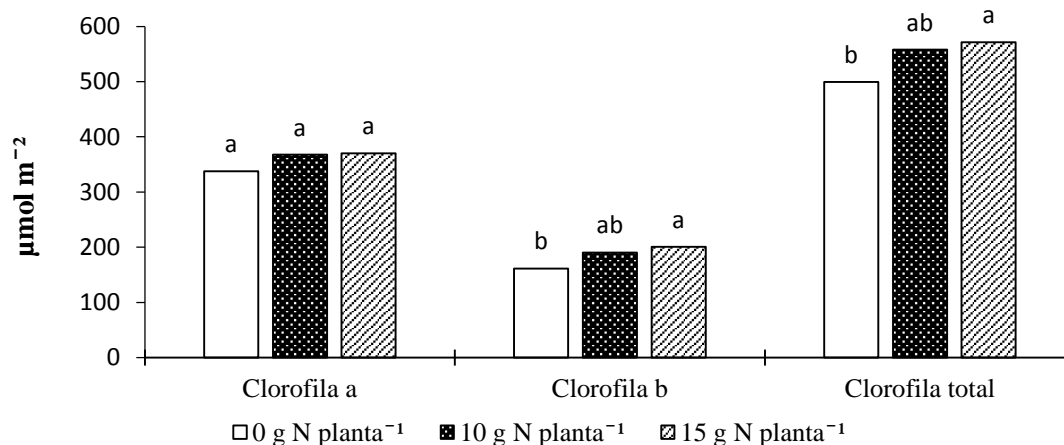


Figura 16. Teores de Clorofila a, Clorofila b e Clorofila Total de plantas de mirtilheiro cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes doses de N e mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Ponta Grossa, 2014/15.

Em trabalho com o mirtilheiro cv. Blueshower em que se estudou o uso de fertirrigação com N e P, o maior conteúdo de clorofila foi observado na maior dose de N empregado (400 mg L⁻¹) independente da dose de P associada (HUANG & LI, 2015).

Estes resultados sugerem que a menor presença de carbono nos espaços intercelulares (Figura 14) pode não representar um efeito negativo da adubação nitrogenada, uma vez que

ocorrendo as trocas gasosas necessárias, associadas a esses maiores teores de clorofila, pode ter ocorrido um maior índice de assimilação de carbono. Apesar de não ter sido verificado efeito significativo para assimilação de carbono, a eficiência de carboxilação (A/C_i), com maiores médias na presença de adubação nitrogenada, corroboram com esta afirmação.

Para as avaliações de área foliar total e área de limbo foliar, independentemente da presença de inóculos, também houve aumento nas plantas adubadas com N, sendo que para ambas as variáveis não houve diferença entre as doses 10 ou 15 g de N planta⁻¹ (Figura 17).

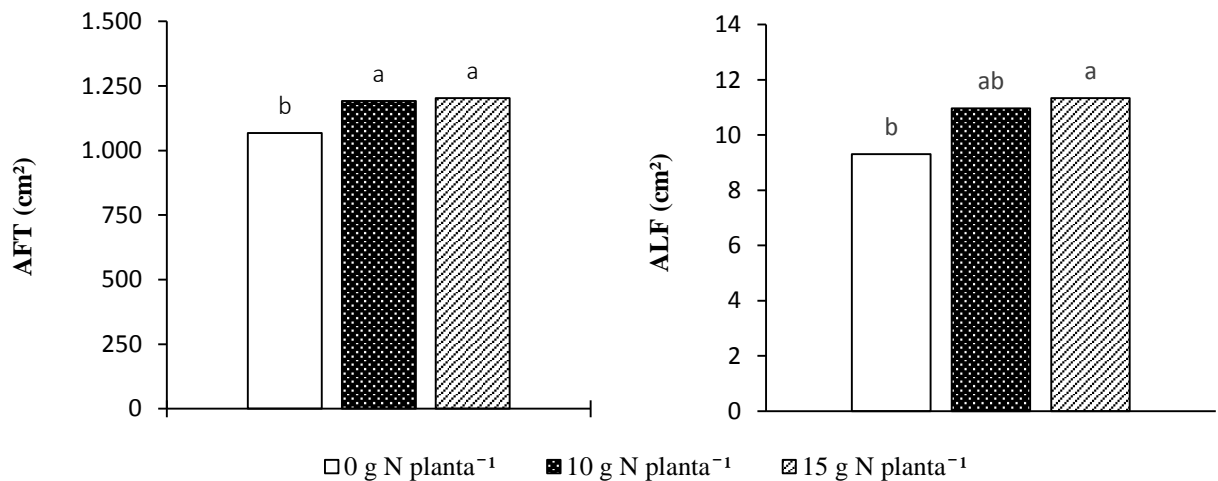


Figura 17. Área foliar total (AFT) e área de limbo foliar (ALF) de mirtilheiro cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes doses de nitrogênio e mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Ponta Grossa, 2014/15.

As aferições mensais de volume de copa (ago/14 a jan/15) sugerem a dose de 15 g de N planta⁻¹ como a de maior crescimento vegetativo, assim como sugerem que a presença dos inóculos também colabora para o maior volume de copa (Figura 18).

Para a taxa de crescimento vegetativo (TCR) não houve interação entre os fatores, mas teve efeito significativo dos fatores isolados (Tabela 7).

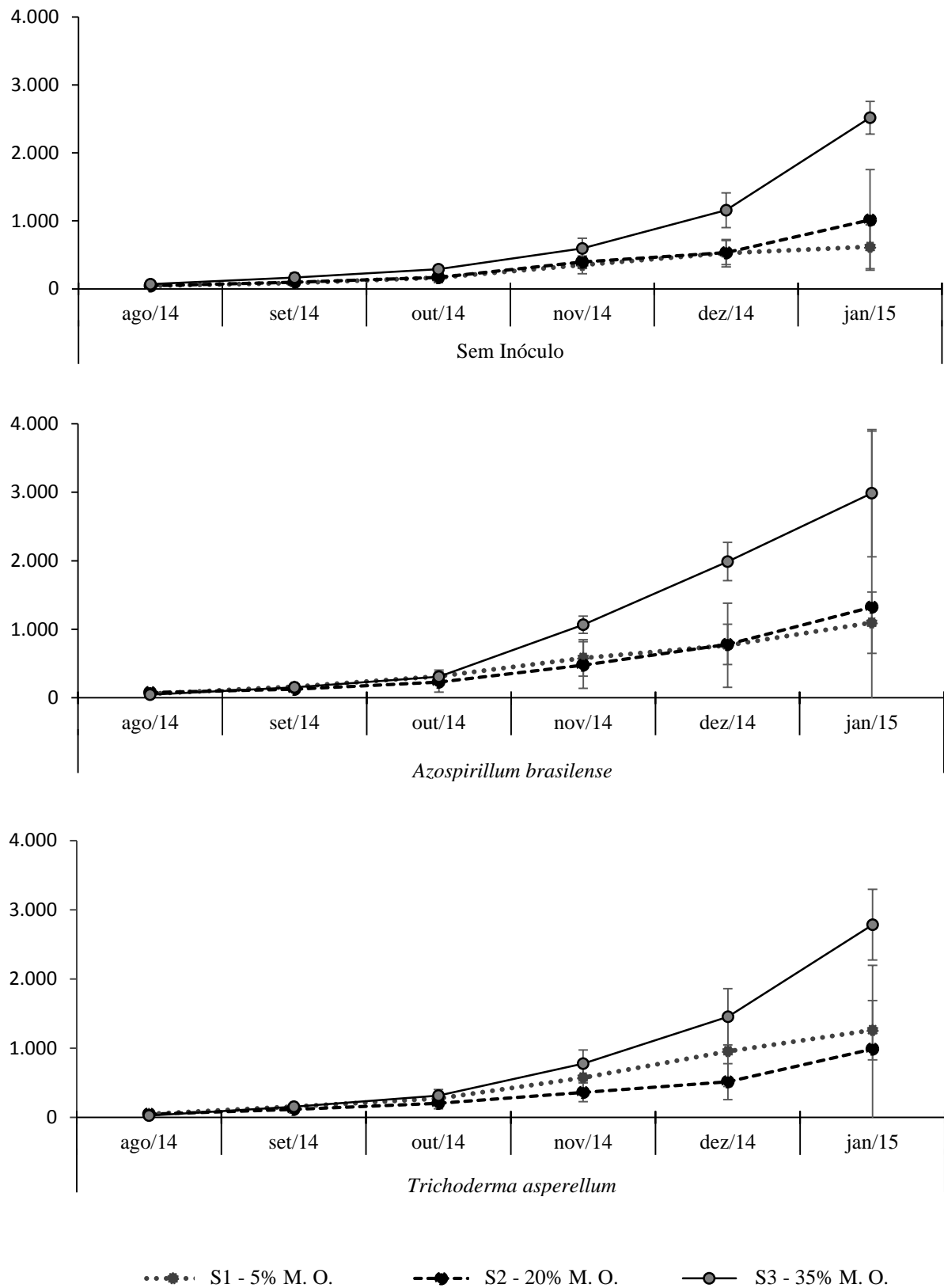


Figura 18. Volume de copa (cm^3) de plantas de mirtilo cv. Climax, no decorrer de seis meses após o transplântio das mudas em vasos com adubação nitrogenada e microrganismos promotores de crescimento, mantidas em casa de vegetação. Ponta Grossa, 2014/15.

Para a influência das doses na taxa de crescimento relativo, observou-se maior crescimento na maior dose de N (Figura 19). Diferentemente, Leitzke *et al.* (2015) verificaram para a cv. Misty que a altura das plantas e o comprimento dos ramos de mirtilheiro aumentou até aproximadamente a dose 10 g de N planta⁻¹, acima da qual houve redução. Por outro lado, Bañados *et al.* (2012) verificaram que a dose de 18,6 g de N planta⁻¹ (50 kg N ha⁻¹) foi a mais eficiente para matéria seca total e conteúdo total de N nas plantas, em todos os estádios de desenvolvimento da cultura.

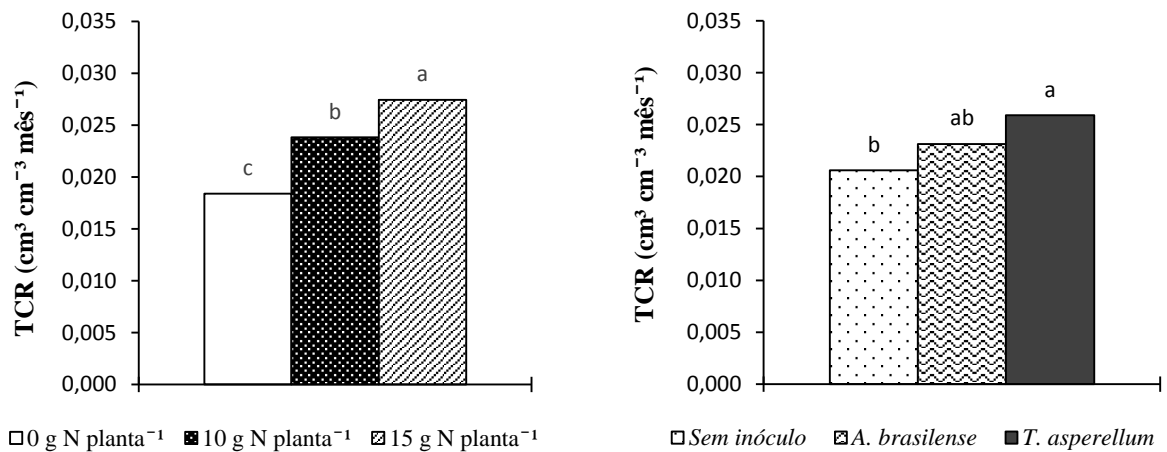


Figura 19. Taxa de crescimento relativo (cm³ cm⁻³ mês⁻¹) de mirtilheiro cv. Clímax, após seis meses do transplante das mudas em vasos com diferentes doses de nitrogênio ou sob ação de inoculantes (microrganismos promotores do crescimento de plantas) e mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Ponta Grossa, 2014/15.

Plantas inoculadas com *T. asperellum* apresentaram maior TCR em relação às plantas não inoculadas, não diferindo-se significativamente daquelas inoculadas com *A. brasilense* (Figura 19). De forma contrastante, Silva *et al.* (2000) não verificaram diferença para variáveis de crescimento de plantas de mirtilheiro cv. O'Neal (diâmetro de ramos principais, massa seca de ramos e raízes, área foliar e número de folhas) na presença de *T. harzianum* ou bactérias promotoras de crescimento de plantas. Já para a espécie micorrízica *Hymenosyphus ericae* houve aumento na matéria seca das plantas (VEGA *et al.*, 2009).

Para as análises dos teores foliares de macro e micronutrientes, houve interação entre os fatores somente para o fósforo. Efeitos significativo das doses de N foram verificados para os elementos N, P, Ca, Mg, S, Zn e Fe, enquanto que diferenças significativas para o fator inóculo foram observadas para P, Mg e Zn (Tabela 8).

Para o efeito das doses em cada inoculante, observa-se uma maior quantidade de P nas folhas de mirtilheiro com a aplicação de N, na ausência de inóculo (Figura 20), sendo que não houve diferença entre as doses 10 ou 15 g planta⁻¹. Para as plantas inoculadas com *T. asperellum*, o tratamento em que não se aplicou N apresentou a maior quantidade de fósforo, enquanto que para o inóculo *A. brasilense*, em 10g de N planta⁻¹ se verificou o maior teor de P.

Tabela 8. Valores de F referentes à análise nutricional procedida com folhas de mirtilheiro, cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos com diferentes doses de nitrogênio e microrganismos promotores de crescimento, mantidas em casa de vegetação. Ponta Grossa, 2014/15.

F. V.	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Zn	Mn	Fe
Doses de N ¹	6.39** ³	8.73**	1.81 ^{NS}	4.08*	58.98**	11.30**	2.70 ^{NS}	5.78**	2.01 ^{NS}	27.23**
Inóculos ²	0.30 ^{NS}	13.81**	1.24 ^{NS}	1.38 ^{NS}	4.27*	0.07 ^{NS}	2.49 ^{NS}	4.73*	0.43 ^{NS}	0.40 ^{NS}
N x Inóculos	1.96 ^{NS}	10.29**	1.44 ^{NS}	1.16 ^{NS}	0.42 ^{NS}	0.49 ^{NS}	1.73 ^{NS}	1.18 ^{NS}	0.60 ^{NS}	0.77 ^{NS}
C. V. (%) ⁴	31.36	17.89	24.34	21.53	16.84	22.57	29.04	14.64	0.96	37.29

⁽¹⁾Doses de N: adubação nitrogenada 0, 10 e 15g N planta⁻¹ (0, 22 e 33g de ureia).

⁽²⁾Inóculos: ausência de inóculo (O), *Azospirillum brasilense* (A) e *Trichoderma asperellum* (T).

⁽³⁾*, $P \leq 0,05$. **, $P \leq 0,01$. ^{NS}: Não significativo.

⁽⁴⁾Coefficiente de Variação.

Reis Junior *et al.* (2008) não verificaram diferença no acúmulo de P na parte aérea de plantas de milho inoculadas com *Azospirillum amazonense*; mas também observaram que a maior eficiência no uso de P foi obtido com a maior dose de N fornecida às plantas, como o constatado neste trabalho para mirtilheiro.

Para os elementos magnésio e zinco, a presença de *A. brasilense* representou uma redução no teor foliar; enquanto *T. asperellum*, houve redução apenas somente de Mg (Figura 21). Nestes casos pode ter havido efeito diluição, considerando o maior TCR para as plantas inoculadas (Figura 19).

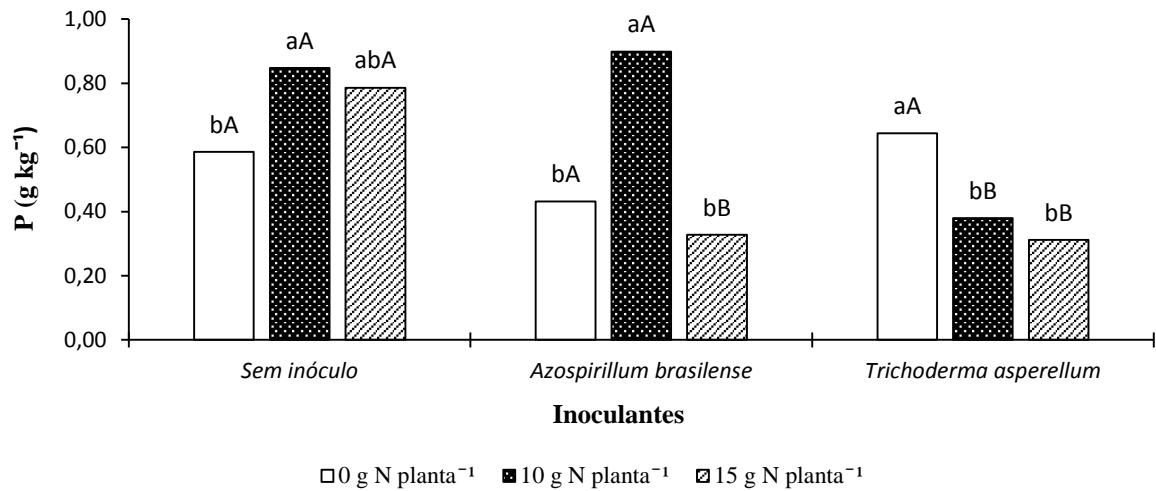


Figura 20. Teores de fósforo (g kg^{-1}) em folhas de mirtillo cv. Clímax, após seis meses do transplantio das mudas em vasos com diferentes doses de nitrogênio e microrganismos promotores de crescimento mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, sendo que letras minúsculas comparam as doses de N dentro de cada inóculo e, letras maiúsculas, os inóculos em cada dose de N. Ponta Grossa, 2014/15.

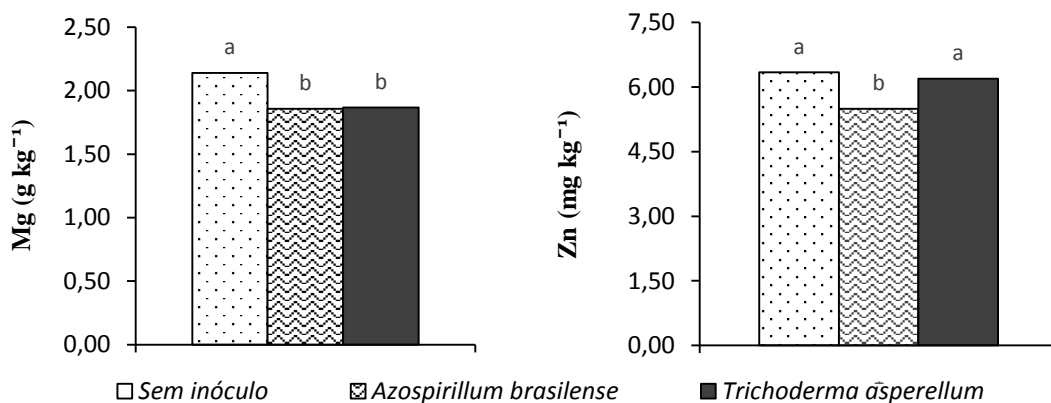


Figura 21. Teores de magnésio (g kg^{-1}) e zinco (mg kg^{-1}) em folhas de mirtillo cv. Clímax, após seis meses do transplantio das mudas em vasos com diferentes microrganismos promotores de crescimento e mantidas em casa de vegetação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Ponta Grossa, 2014/15.

Em mirtillo highbush, cv. Bluecrop, algumas estirpes de bactérias do gênero *Pseudomonas*, promoveram maior acúmulo de P e Zn nos ramos em relação às plantas não inoculadas (SILVA *et al.*, 2000). Esses mesmos autores também não observaram diferença de acúmulo de Zn e P em ramos com a presença de *Trichoderma harzianum*.

Considerando somente o efeito das doses de N aplicadas, independentemente dos inóculos, verificou-se que para os nutrientes N e P, os teores foram maiores para a dose 10 g de N planta⁻¹, embora, para N, não tenha diferido da dose de 15g de N planta⁻¹ (Tabela 9). Para potássio não houve diferenças significativas. Para os macronutrientes Ca, Mg e S; os teores foliares foram superiores na ausência de adubação nitrogenada, embora para o Ca este tratamento não se diferiu da dose de 10 g de N planta⁻¹.

Tabela 9. Teores foliares de macronutrientes (g kg⁻¹) de mirtilheiro, cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos em diferentes doses de nitrogênio, mantidas em casa de vegetação. Ponta Grossa, 2014/15.

Nutrientes (g kg ⁻¹)		N	P	K	Ca	Mg	S
Doses de N	0 g planta ⁻¹	3.06 b*	0.55 b	6.61	5.42 a	2.64 a	1.90 a
	10 g planta ⁻¹	4.39 a	0.71 a	7.46	4.74 ab	1.64 b	1.51 b
	15 g planta ⁻¹	4.24 a	0.48 b	7.67	4.45 b	1.58 b	1.35 b

*Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

A ausência de efeito dos inóculos simbiotes em relação aos teores de N foliar concordam com o verificado por Yang *et al.* (2002). Esses autores verificaram em mirtilo cv. Elliot, cultivado sob diferentes substratos orgânicos, que a inoculação com a micorriza *O. maius* não representou aumento na concentração de N foliar e, ainda, que a infecção pela micorriza foi menor no substrato com serragem. Eles atribuíram isto, à deficiência de N causado à planta pela decomposição da serragem. Este fato pode estar associado à falta de efeitos dos inóculos para a maioria das variáveis analisadas, uma vez que 35% do volume do substrato de cada vaso foi composto por serragem.

Em mirtilheiro highbush, cv. Bluecrop, o aumento dos níveis de N, propiciou maiores teores foliares de nitrogênio, fósforo, cálcio, enxofre e manganês (BRYLA *et al.*, 2012), como o observado neste experimento para N, mas diferente dos resultados de P, Ca, Mg e S.

A liberação de N-amoniaco da ureia, pode ter representado a competição pelo centro de absorção de Mg, e também outros cátions, colaborando para a sua baixa concentração nas

folhas. Embora Merhaut & Darnell (1996) tenham observado maiores concentrações de Mg, S, K, P e N em folhas de mirtilheiro, cv. Sharpblue, quando a disponibilidade de N às plantas era como NH_4^+ .

Além disso, considerando os valores de crescimento vegetativo (TCR, ALF e AFT), a redução do teor destes nutrientes nas folhas pode estar associado a um efeito de diluição. Maia *et al.* (2005) observaram esse efeito para N e K em meloeiro irrigado com águas de diferentes salinidades. Em plantas de eucalipto também verificaram esse efeito de maior concentração foliar de K no tratamento com menor biomassa (VAZ & GONÇALVES, 2002).

Em relação aos micronutrientes, apenas Zn e Fe foram influenciados pelas doses de N, sendo que a presença de adubação nitrogenada reduziu a quantidade desses nutrientes nas folhas (Tabela 10).

Tabela 10. Teores foliares de micronutrientes (mg kg^{-1}) de mirtilheiro, cv. Clímax, após seis meses do transplântio das mudas em vasos em diferentes doses de nitrogênio, mantidas em casa de vegetação. Ponta Grossa, 2014/15.

Nutrientes (mg kg^{-1})		Cu	Fe	Zn	Mn
Doses de N	0	2.05	144.34 a	6.59 a	1.90
	10	1.66	70.09 b	5.74 b	1.91
	15	1.74	68.68 b	5.71 b	1.90

*Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

A utilização de ureia, como adubo nitrogenado amoniacal, pode também ter colaborado com a redução ou acidificação do pH do substrato (FANQUIN, 2005). Leitzke *et al.* (2015), verificaram que com a redução do pH em substratos para o crescimento de mirtilheiro cv. Misty e O'Neal em função do aumento das doses de N, reduziu-se a concentração de Ca e Mg no substrato. Em consequência disso, os teores foliares de Ca, B, Mn e Zn foram menores, assim como ocorreu no presente experimento para Ca e Zn. Para esses mesmos autores, as concentrações de N, P e Fe nas folhas do mirtilheiro aumentaram em função das doses de N, assim como o verificado neste experimento para N e P.

5.6. Conclusões

De maneira geral, os inóculos não representaram efeitos significativos, estando associados apenas à taxa de transpiração, teor foliar de fósforo e taxa de crescimento relativo; onde o *Azospirillum brasilense* apresentou maiores médias na interação com a dose 10 g de N planta⁻¹ ou no efeito isolado.

A adubação nitrogenada colaborou com a eficiência aparente de carboxilação, teores de clorofila b e total, área foliar (de limbo e total) e teor de nitrogênio nas folhas; embora entre as doses aplicadas (10 e 15 g de N planta⁻¹) não tenha ocorrido diferença estatística. A taxa de crescimento relativo foi superior na dose 15 g de N planta⁻¹.

A ocorrência foliar de Ca, Mg, S, Fe e Zn foi superior na ausência de adubação nitrogenada, a qual pode estar associada a um efeito de diluição, pois as maiores doses apresentaram maior crescimento vegetativo.

6. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, P. E. V.; BONALDO, S. M.; MORAES, S. R. G. Evaluation of *Trichoderma* spp. on bean culture, in anthracnose, web blight and root-knot nematode. **Scientific Electronic Archives**, v.7, p.17-25, 2014.
- ANTUNES, L. E. C.; MADAIL, J. C. M. Mirtilo: que negócio é esse? **Jornal da Fruta**, n.159, p.8, 2005.
- ANTUNES, L.E.C.; RASEIRA, M. C. B. Cultivo do mirtilo (*Vaccinium* spp). Pelotas, Embrapa Clima Temperado, 2006. 99 p. (Embrapa Clima Temperado, Sistema de Produção, 8)
- AUSTIN, M. E.; BONDARI, K. Hydrogel as a field medium amendment for blueberry plants. **Horticultural Science**, v.27, p.973-974. 1992.
- BALESDENT, J.; CHENU, C.; BALABANE, M. Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. **Soil and Tillage Research**, v.53, p.215-230, 2000.
- BAÑADOS, M. P.; STRIK, B. C.; BRYLA, D. R.; RIGHETTI, T. TL. Response of highbush blueberry to nitrogen fertilizer during field establishment, I: Accumulation and allocation of fertilizer nitrogen and biomass. **HortScience**, v.45, n.5, p.648-655. 2012.
- BARBER, S. A. The role of root interception, mass flow and diffusion in regulating the uptake of ions by plants from soil. In: International Atomic Energy Agency. Limiting steps in ion uptake by plants from soil. Vien FAO/IAEA, 1966. P. 39-45.
- BASHAN, Y., BUSTILLOS, J. J., LEYVA, L. A., HERNANDEZ, J. P., BACILIO, M. Increase in auxiliary photoprotective photosynthetic pigments in wheat seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 42, p.279–285, 2006.
- BORKOWSKA, B.; KRZEWINSKA, D. Inoculation of young cranberry and blueberry plants with fungi isolated from polish ecosystems. **Acta Horticulturae**, Corvallis, v. 810, p. 689-696, 2009.
- BOWLING, B. L. **The berry grower's companion**. Timber Press, Inc. Portland, U.S.A. 2005.
- BRYLA, D. R.; STRIK, B. C.; BAÑADOS, M. P.; RIGHETTI, T. L. Response of highbush blueberry to nitrogen fertilizer during field establishment—II. Plant nutrient requirements in relation to nitrogen fertilizer supply. **HortScience**, v.47, n.7, p.917-926. 2012.
- CAMARGO, S. S; PELIZZA, T. R; SOUZA, A. L. K.; AFFONSO, L. B.; SCHUCH, M. W. Agentes biológicos inseridos durante etapa de aclimatização de plantas micro propagadas de mirtilo bluebelle. In: XII ENPOS, II MOSTRA CIENTÍFICA, 2010, Pelotas, **Anais...** Disponível em: http://www2.ufpel.edu.br/cic/2010/cd/pdf/CA/CA_00577.pdf.

CANTUARIAS-AVILÉS, T., DA SILVA, S. R., MEDINA, R. B., MORAES, A. F. G., ALBERTI, M. F. Cultivo do mirtilo: atualizações e desempenho inicial de variedades de baixa exigência em frio no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.36, n.1, p.139-147, mar. 2014.

CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JÚNIOR, M., SILVA, M. C. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* in vitro e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v.36, n.1. jan.-fev. 2011.

CORRÊA, R. M.; PINTO, J. E. B. P.; OLIVEIRA, C.; REIS, E. S.; CASTRO, E. M.; BRANT, R. S. Características anatômicas foliares de plantas de orégano (*Origanum vulgare* L.) submetidas a diferentes fontes e níveis de adubação orgânica orgânica. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.31, n.3, p.439-444. 2009.

CREGAN, P.B., BERKUM, P. Genetics of nitrogen metabolism and physiological/biochemical selection for increased grain crop productivity. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.67, p.97-111, 1984.

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

DE JESUS, E. P., SOUZA, C. H. E., POMELLA, A. W. V.; COSTA, R. L.; SEIXAS, L.; SILVA, R. B. Avaliação do potencial de *Trichoderma asperellum* como condicionador de substrato para a produção de mudas de café. **Cerrado Agrociências**, v.2, p.7-19. 2011.

DE SILVA, A. PATTERSON, K., ROTHROCK, C., MOORE, J. Growth Promotion of Highbush Blueberry by Fungal and Bacterial Inoculants. **Hortscience**, v.35, n.7, p.1228–1230. 2000.

DIDONET, A. D., LIMA, O. S.; CANDATEN, A. A.; RODRIGUES, O. Realocação de nitrogênio e de biomassa para os grãos, em trigo submetido a inoculação de *Azospirillum*. **Revista Agropecuária Brasileira**, v.35, n.2, p.401-411. 2000.

DIMKPA, C.; WEINAND, T.; ASCH, F. Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. **Plant, Cell & Environment**, v.32, n.12, p.1682-1694. 2009.

DOURADO, D. P., LIMA, F. S. O., DA SILVA FILHO, J. E. M., MURAISHI, C. T., REINA, E., DA LUZ, F. N. Desenvolvimento do sistema radicular de espécies nativas do cerrado utilizando o *Trichoderma* sp. **Revista Integralização Universitária – RIU**, v.6, n.8, out. – fev. 2013.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2.ed. Rio de Janeiro, 2006. 306p.

FACHINELLO, J. C. Mirtilo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.30, p.285-288, 2008.

FALKER AUTOMAÇÃO AGRÍCOLA Ltda. Manual do medidor eletrônico de teor clorofila (ClorofiLOG / CFL 1030). Falker Automação Agrícola.2008. 33p.

FAOSTAT - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS DIVISION. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/home/E>. Acesso: 17/05/2016.

FAQUIN, V. **Nutrição Mineral de Plantas**. Curso de Pós-Graduação “Lato Sensu” (Especialização) a Distância: Solos e Meio Ambiente. Lavras: Universitária/UFLA, 2005.

FARIAS, D. H. Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em pomares e crescimento de mudas micropropagadas de mirtilheiro. 2012. 74 p. **Dissertação (Mestrado)** - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

FREIRE, C. J. da S. Nutrição e adubação para mirtilo. In: RASEIRA, M. do C.; ANTUNES, L.E.C. (Ed.). A cultura do mirtilo. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. p.60-74. (Embrapa Clima Temperado, Sistemas de produção n.8).

FREIRE, C. J. da S. Solos, nutrição e adubação para mirtilos. In: RASEIRA, M. do C. B; ANTUNES, L. E. C. A cultura do mirtilo. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. p.43-54. (Documento,121).

HOBBIE, E. A., HORTON, T. R. Evidence that saprotrophic fungimobilise carbon and mycorrhizal fungi mobilize nitrogen during litter decomposition. **New Phytologist**, v.173, p.447–449. 2007.

HUANG, S. H.; LI, K. T. Dormant season fertigation promotes photosynthesis, growth, and flowering of ‘Blueshower’ rabbiteye blueberry in warm climates. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v.56, n.6, p.756-761. 2015.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2004

LARRABURU, E. E., LLORENTE, B. E. *Azospirillum brasilense* enhances in vitro rhizogenesis of *Handroanthus impetiginosus* (pink lapacho) in different culture media. **Annals of Forest Science**, v.72, p.219–229. 2015.

LEITZKE, L. N.; PICOLOTTO, L.; PEREIRA, I. S; VIGNOLO, G. K.; SCHMITZ, J. D; VIZZOTTO, M.; ANTUNES, L. E. C. Nitrogen fertilizer affects the chemical composition of the substrate, the foliar nutrient content, the vegetative growth, the production and fruit quality of blueberry. **Científica**, Jaboticabal, v.43, n.4, p.316-324, 2015

LI, H.; LI, T.; FU, G.; KATULANDA, P. Induced leaf intercellular CO₂ photosynthesis, potassium and nitrate retention and strawberry early fruit formation under macronutrient limitation. **Photosynthesis Research**, v.115, p.101-114. 2013.

LOURES, L., CARVALHO, D. A., MACHADO, E. L. M., MARQUES, M. Florística, estrutura e características do solo de um fragmento de floresta paludosa no sudeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.21, n.4, p.885-896. 2007.

MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A. T.; REIS JUNIOR, F. B.; VILELA, A. L. Acumulação de nitrogênio, fósforo e zinco e índices de eficiência de utilização e translocação de nutrientes de milho submetidos a dois níveis de adubação nitrogenada. In: FertBIO 2004. XXVI Reunião brasileira de fertilidade do solo e nutrição de plantas. 10^a. Reunião brasileira sobre micorrizas. 7^o Simpósio brasileiro de microbiologia do solo. 5^a. Reunião brasileira de biologia do solo. Lages, 2004. CD-ROM

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2006. 638p

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.

MEDEIROS, L. T.; PINTO, J. C.; CASTRO, E. M.; REZENDE, A. V.; LIMA, C. A. Nitrogênio e as características anatômicas, bromatológicas e agronômicas de cultivares de *Brachiaria brizantha*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.3, mai-jun. 2011.

MERHAUT, D. J.; DARNELL, R. L. Vegetative growth and nitrogen/carbon partitioning in blueberry as influenced by nitrogen fertilization. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.121, n.5, p.875-879. 1996.

MORAES, J. O.; PERTUZATTI, P. B.; CORRÊA, F. V.; SALAS-MELLADO, M. L. M. Estudo do mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) ao processamento de produtos alimentícios. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, p.18-22. 2007.

MOURA, G. C. de; FINKENAUER, D.; CARPENEDO, S.; VIZZOTTO, M.; ANTUNES, L. E. C. **Caracterização físico-química de mirtilos submetidos a diferentes coberturas de solo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2011. (Comunicado Técnico 266).

NEPOLEAN, P., JAYANTHI, R., PALLAVI, R. V., BALAMURUGAN, A., KUBERAN, T., BEULAH, T., PREMKUMAR, R. Role of biofertilizers in increasing tea productivity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. S1443-S1445. 2012.

PAIVA, P. J. R., NICODEMO, M. L. F. **Enxofre no sistema solo-planta-animal**. Campo Grande: Embrapa CNPGC, 1994.

PELEGRINE, D. H. G.; ALVES, G. L.; QUERIDO, A. F.; CARVALHO, J. G. Geleia de mirtilo elaborada com frutas da variedade Climax: desenvolvimento e análise dos parâmetros sensoriais. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.14, n.3, p.225-231, 2012

PINOTTI, M. M. Z., SANTOS, J. C. P.; KLAUBERG FILHO, O., MICHELLUTI, D. J., CASTRO, D. R. L. Isolamento de Fungos de Solo Associados a culturas de Amora, Framboesa e Mirtilo no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.6, n.1, p.67- 80. 2011

RAVEN, P.H., EVERT, R.F., EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**, 6ed. Rio de Janeiro Guanabara, 2006.

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

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2013.

REDIES, C. R.; RODRIGUES, S. Á.; BORGES, C. D.; PEREIRA, E. R. B.; VENDRUSCOLO, C. T. Influência de diferentes espessante e acidulantes na viscosidade de topping de mirtilo In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - CIC, 14.; ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO - ENPOS, 5., 2006, Pelotas. **Anais...**, 2006.

REIS JUNIOR, F. B.; MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A. T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.1139-1146. 2008.

RETAMALES, J. B.; HANCOCK, J.F. **Blueberries**. Oxfordshire: CABI, 336 p. 2012. (Crop Production Science in Horticulture Series)

RISTOW, N. C., ANTUNES, L. E. C., CARPENEDO, S., SCHUCH, M. W. Diferentes substratos na produção de mudas de mirtilheiro. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7, p. 1154-1159. 2011.

RODRIGUES, S. A.; RODRIGUES, A. A.; VENDRUSCOLO, C. T. Effect of acids and thickeners on the physico-chemical and structural properties of blueberry topping. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.3. 2010

ROMANO, M. R. Análise de crescimento, produção de biomassa, fotossíntese e biossíntese de aminoácidos em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) que expressam o gene *Lhcb1**2 de ervilha. **Dissertação (mestrado)**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001.

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

SERRADO, F.; PEREIRA, M.; FREITAS, S.; MARTINS, S.; DIAS, T. **Mirtilos**: guia de boas práticas para produção, promoção e comercialização. Portugal: Greca Artes Gráficas, 80p. 2008.

SILVA, A., PATTERSON, K., ROTHROCK, C., MOORE, J. Growth Promotion of Highbush Blueberry by Fungal and Bacterial Inoculants. **HortScience**, v.35, n.7, p.1228-1230. 2000.

SPINARDI, B.; AYUB, R. A. Desenvolvimento inicial de cultivares de mirtilheiro na região de Ponta Grossa (PR). **Ambiência**. Guarapuava, v.9, n.1, p. 199-205. 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

VARGAS, W. A., MANDAWA, J. C., KENERLEY, C. M. Plant-Derived Sucrose Is a Key Element in the Symbiotic Association between *Trichoderma virens* and Maize Plants. **Plant Physiology**, v.151, p.792–808, 2009.

VAZ, L.M.S. & GONÇALVES, J.L.M. Uso de biossólidos em povoamento de *Eucalyptus grandis*: Efeito em atributos químicos do solo, no crescimento e na absorção de nutrientes. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 26:747-758, 2002.

VEGA, A. R.; GARCIGA, M.; RODRIGUEZ, A.; PRAT, L.; MELLA, J. Blueberries mycorrhizal symbiosis outside of the boundaries of natural dispersion for ericaceous plants in Chile. **Acta Horticulture**, v.810, p.665-671. 2009.

VILLATA, M. Trends in world blueberry production. 2012. Disponível em: <<http://www.growingproduce.com/article/26272/2/trends-inworld-blueberry-production>>

VOHNÍK, M., SADOWSKY, J. J., LUKEŠOVÁ, T., ALBRECHTOVÁ, J., VOSÁTKA, M. Inoculation with a ligninolytic basidiomycete, but not root symbiotic ascomycetes, positively affects growth of highbush blueberry (Ericaceae) grown in a pine litter substrate. **Plant Soil**, v.355, p.341–352. 2012.

VRHOVSEK, U.; MASUERO, D.; PALMIERI, L.; MATTIVI, F. Identification and quantification of flavonol glycosides in cultivated blueberry cultivars. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.25, n.1, p.9–16. 2012.

YANG, W. Q.; GOULART, B. L.; DEMCHAK, K.; LI, Y. Interactive effects of mycorrhizal inoculation and organic soil amendments on nitrogen acquisition and growth of highbush blueberry. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.127, n.5, p.742-748. 2002.

YEDIDIA, I. S., KAPULNIK, Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant and Soil**, v.235, p.235–242. 2001

WILCOX, H. E. Mycorrhizae. In: WAISEL, Y.; ESHEL, A.; KAFKAFI, U. **Plants roots**. New York: Marcel Dekker, 1002p. 1996.

WILLIAMSON, J. G.; OLMSTEAD, J. W.; LYRENE, P. M. **Florida's Commercial Blueberry Industry**. Gainesville: University of Florida, IFAS, 4p. 2004.

WILLIAMSON, J. G.; MILLER, E. P.; Early fall defoliation of southern highbush blueberry inhibits flower bud initiation and retards flower bud development. **HortScience**, v.35, 2000.