

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

MARINA ANGELICA DE OLIVEIRA

BRASSINOSTEROIDE E AUXINA NO DESENVOLVIMENTO E ENRAIZAMENTO *IN*
VITRO DE MIRTILEIRO (*Vaccinium Ashei*)

PONTA GROSSA

2016

MARINA ANGELICA DE OLIVEIRA

BRASSINOSTEROIDE E AUXINA NO DESENVOLVIMENTO E ENRAIZAMENTO *IN*
VITRO DE MIRTILEIRO (*Vaccinium Ashei*)

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub

PONTA GROSSA

FEVEREIRO/ 2016

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

Oliveira, Marina Angelica de
048 Brassinosteroide e auxina no
desenvolvimento e enraizamento IN VITRO DE
mirtilheiro (*Vaccinium Ashei*)/ Marina
Angelica de Oliveira. Ponta Grossa, 2016.
54f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia -
Área de Concentração: Agricultura),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio
Ayub.

1. *Vaccinium Ashei*. 2. Micropropagação.
3. Brassinosteroide. 4. Ácido indolacético.
I. Ayub, Ricardo Antonio. II. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em
Agronomia. III. T.

CDD: 631.53



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

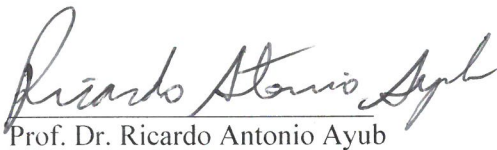
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação: “O uso de brassinosteróide e auxina no enraizamento *in vitro* de mirtilheiro”.

Nome: Marina Angelica de Oliveira

Orientador: Ricardo Antonio Ayub

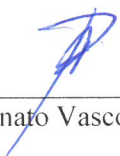
Aprovado pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub



Prof. Dr. Adauto Bellarmino de Pereira Netto



Prof. Dr. Renato Vasconcelos Botelho

Data da Realização: 29 de fevereiro de 2016.

Aos meus pais, dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me conceder saúde para seguir em frente e realizar meus sonhos, pois nele deposito toda a minha fé.

Aos meus pais pelo constante apoio, dedicação, incentivo e proteção para que eu pudesse me dedicar aos estudos.

A minha avó Maria Julcília, por toda paciência e cuidado.

A minha irmã Gabriela, meu bem maior, ombro amigo, sempre disposta a ajudar e aconselhar-me nos momentos difíceis.

Ao Gedharo Keller, meu namorado, pela imensa compreensão, carinho e auxílio em todos os momentos. E a toda minha família, que sempre foi meu alicerce.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub pela orientação e conselhos e principalmente por ter me aceitado como sua orientada.

Aos mestres que sempre colaboraram para minha formação, sem eles, nada seria possível.

Aos meus amigos, que mesmo longe sempre foram auxílio e suporte.

A todo pessoal do Laboratório de Biotecnologia e Fruticultura pelo convívio e aprendizado, principalmente ao Jessé Neves, que nunca mediu esforços para auxiliar, fazer e comprometer-se com a pesquisa, sua ajuda foi fundamental.

A CAPES pela concessão de bolsa.

A todos que de uma forma ou outra contribuíram para a realização desse trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota.”

Theodore Roosevelt

RESUMO

A expansão da área cultivada de mirtilheiro no Brasil está diretamente vinculada a oferta de mudas de qualidade ao mercado, que poderá resultar em aumento da produção. A técnica da micropropagação de plantas viabiliza a produção e fornece plantas de elevada qualidade, fisiologicamente viáveis, sadias e isentas de vírus em curto espaço de tempo. Plantas lenhosas apresentam dificuldade de enraizamento *in vitro*, nesse contexto o desenvolvimento de um sistema de enraizamento mais eficiente resulta em mudas com maior qualidade fisiológica e diminuição de perdas durante a fase de aclimatização. No primeiro experimento os tratamentos consistiram em 8 doses de BIOBRAS 16[®] (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 mg L⁻¹) adicionados no meio de cultura no momento do preparo. As seguintes características foram avaliadas: número de calos, diâmetro do calo, número de raízes, comprimento total de raízes, comprimento total, número de brotações, comprimento de brotações, número de folhas e massa fresca. A menor concentração de BIOBRAS 16[®] utilizada (0,1 mg L⁻¹) apresentou maior percentual de enraizamento (%), comprimento de raízes (cm) e número de folhas, porém também estimulou o desenvolvimento de calos. A dose de 0,4 mg L⁻¹ estimulou a formação de brotações e o comprimento das mesmas. Não houve diferença significativa para os demais parâmetros avaliados. No segundo experimento os tratamentos consistiram em diferentes doses de BIOBRAS 16[®] (0,1; 0,3; 0,5 mg L⁻¹) associadas a diferentes doses de ácido indolacético (1; 3; 5 µM L⁻¹) adicionados ao meio de cultura no momento do preparo. As características avaliadas foram número de calos, diâmetro do calo, número de raízes, comprimento total de raízes, comprimento total, número de brotações, comprimento de brotações, número de folhas e massa fresca. A utilização de BIOBRAS 16[®] associado a ácido indolacético mostrou efeito positivo para características de desenvolvimento *in vitro* de mirtilheiro. Para enraizamento, as concentrações de 0,3 mg L⁻¹ de BIOBRAS 16[®] + 5 µM de AIA apresentaram maior percentual. As concentrações de 0,5 mg L⁻¹ de BIOBRAS 16[®] + 5 µM de AIA induziram a formação e diâmetro de calos, característica indesejável quando o objetivo é o enraizamento. Para as características número de brotações e número de folhas, o melhor resultado foi da concentração de 0,1 mg L⁻¹ de BIOBRAS 16[®] + 5 µM de AIA.

Palavras-chave: Vaccinium Ashei, micropropagação, brassinosteróide, ácido indolacético

ABSTRACT

The expansion of cultivated blueberry fields in Brazil is directly linked to the provision of quality seedlings to the market, which may result in the increase of production. The plant micropropagation technique enables the production and provides high quality plants, physiologically viable and healthy and free from viruses in a short space of time. Woody plants present difficulty in the *in vitro* rooting, in this context the development of a more efficient system of rooting results in plants with higher physiological quality and reduction of losses during the acclimatization phase. In the first experiment the treatments consisted in 8 doses of BIOBRAS 16[®] (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 mg L⁻¹) added to the culture medium at the time of preparation. The following characteristics were evaluated: number of nodes, callus diameter, number of roots, the total root length, total length, number of shoots, length of shoots, number of leaves and fresh mass. The lowest concentration of BIOBRAS 16[®] used (0,1 mg L⁻¹) presented a higher percentage of rooting, root length and number of leaves, but also stimulated the development of calluses. The dose of 0,4 mg L⁻¹ stimulated the formation of shoots and length thereof. There was no significant difference for other parameters evaluated. In the second experiment the treatments consisted in different doses of BIOBRAS 16[®] (0,1; 0,3; 0,5 mg L⁻¹) associated to different doses of indole acetic acid (1; 3; 5 L⁻¹ μM) added to the culture medium during preparation. The parameters evaluated were the same as the experiment 1. The use of BIOBRAS 16[®] associated with indolacetic acid showed a positive effect for the development of *in vitro* characteristics of blueberry. For rooting, the concentration of 0,3 mg L⁻¹ BIOBRAS 16[®] + 5 μM AIA showed a higher percentage. Concentrations of 0,5 mg L⁻¹ BIOBRAS 16[®] + 5 μM of AIA induced the formation and callus diameter, undesirable feature when the goal is rooting. For the parameters number of shoots and number of leaves, the best result was the concentration of 0,1 mg L⁻¹ BIOBRAS 16[®] + 5 μM of AIA.

Keywords: *Vaccinium Ashei*, micropropagation, brassinosteroid, indolacetic acid

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número de brotações de mirtilheiro micropropagado aos 60 dias. Ponta Grossa, 2015.....	29
Figura 2. Comprimento das brotações de mirtilheiro micropropagado aos 60 dias. Ponta Grossa, 2015.....	29
Figura 3. Porcentagem de enraizamento de mirtilheiro micropropagado aos 60 dias. Ponta Grossa, 2015.....	31
Figura 4. Comprimento de raízes de mirtilheiro micropropagado aos 60 dias. Ponta Grossa, 2015.....	31
Figura 5. Porcentagem de formação de calos em mirtilheiro micropropagado aos 60 dias. Ponta Grossa, 2015.....	32
Figura 6. Número de folhas de mirtilheiro micropropagado aos 60 dias. Ponta Grossa, 2015.....	33
Figura 7. Porcentagem de formação de calos em mirtilheiro micropropagado aos 60 dias. Ponta Grossa, 2015.....	41
Figura 8. Diâmetro de calo de mirtilheiro micropropagado aos 60 dias. Ponta Grossa, 2015.....	41
Figura 9. Número de brotações de mirtilheiro micropropagado aos 60 dias. Ponta Grossa, 2015.....	42
Figura 10. Número de folhas de mirtilheiro micropropagado aos 60 dias. Ponta Grossa, 2015.....	43
Figura 11. Porcentagem de enraizamento de mirtilheiro micropropagado aos 60 dias. Ponta Grossa, 2015.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tratamentos contendo diferentes doses de BIOBRAS 16[®]27

Tabela 2. Dados médios da formação de calos (FC); diâmetro de calos (DC); número de raízes (NR); comprimento de raízes (CR), comprimento total (CT); número de brotações (NB); comprimento das brotações (CB), número de folhas (NF) e massa fresca (MS) de plantas de mirtilo micropropagadas aos 60 dias. Ponta Grossa, 2015.....34

Tabela 3. Diferentes doses de BIOBRAS 16[®] e ácido 3-indolacético (AIA), 2015.....39

Tabela 4. Dados médios da formação de calos (FC); diâmetro de calos (DC); número de raízes (NR); comprimento de raízes (CR), comprimento total (CT); número de brotações (NB); comprimento das brotações (CB), número de folhas (NF) e massa fresca (MS) de plantas de mirtilo micropropagadas aos 60 dias. Ponta Grossa, 2015.....44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 MIRTILO	13
2.2 MICROPROPAGAÇÃO DE PLANTAS	14
2.3 MICROPROPAGAÇÃO DE MIRTILO	16
2.4 FORMAÇÃO DE RAÍZES <i>IN VITRO</i>	17
2.5 ENRAIZAMENTO DE PLANTAS LENHOSAS	18
2.5.1 Enraizamento de mirtilo	19
2.6 BRASSINOSTEROIDES	20
2.7 AUXINAS	22
3 CAPÍTULO I: Utilização de Brassinosteroide no desenvolvimento <i>in vitro</i> de mirtileiro	24
Introdução	25
Material e métodos	27
Resultados e discussão	28
Conclusão	34
4 CAPÍTULO II: Utilização de Brassinosteroide associado a Auxina no desenvolvimento <i>in vitro</i> de mirtileiro	35
Introdução	36
Material e métodos	38
Resultados e discussão	40
Conclusão	45
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas em nível mundial (5,7%), com uma produção equivalente a 41,5 milhões de toneladas, perdendo apenas para China (26,1%) e Índia (11,8%). Juntos os três maiores produtores contabilizam 43,6% da produção, sendo que o principal destino é o consumo interno. Nesse contexto a produção vem atendendo a demanda nacional (SEAB, 2015), de maneira que a importação seja apenas em pequena quantidade de frutas de clima temperado (CARVALHO, 2010).

A produção nacional de frutas apresenta grande diversidade de espécies e oferta durante o ano, podendo coincidir com o período de entressafra do Hemisfério Norte. Todavia, quando se trata de exportação, o Instituto Brasileiro de Fruticultura (IBRAF) compila que o Brasil exporta somente 9% da produção total (IBRAF, 2011), que quando comparado ao ano de 2007 que exportou apenas 3%, teve um excelente aumento. Esse percentual mostra uma boa perspectiva de mercado e aumento no setor de exportação de frutas, já que o país possui diversidade climática que possibilita a produção de diferentes espécies, e algumas delas até duas safras por ano.

No ano de 2013, as frutas mais produzidas no Brasil foram laranja, banana e abacaxi totalizando 24,8 milhões de toneladas, sendo que a laranja e a banana compõe mais de 60% (14,8 milhões de toneladas) do volume nacional de frutas frescas (SANTOS, 2013). A produção nacional de frutas de clima temperado como maçã, pêra, nectarina, ameixa, pêssigo e pequenos frutos como amora e mirtilo é insuficiente para suprir a demanda interna, acarretando na necessidade de importação de frutos que poderiam estar sendo produzidos no país, atendendo as necessidades de mercado interno, e ainda aspirando a exportação (FACHINELLO et al., 2011).

Apesar de estar em um momento de expansão, com produção em menores índices quando comparada a laranja e banana, o grupo das frutas vermelhas, que inclui morango (*Fragaria ananassa*), amora-preta (*Morus nigra*), framboesa (*Rubus idaeus*) e o mirtilo (*Vaccinium spp.*) nos últimos anos vem evoluindo e ocupando áreas agrícolas consideráveis. Essa evolução resulta em aumento na produção e diversificação do cultivo de frutas vermelhas e boas perspectivas de mercado para

essas espécies, já que a demanda está aumentando. Sendo assim, o produtor necessita de mudas de qualidade para instalar e/ou aumentar a área comercial do pomar e atender as necessidades dos consumidores, que estão cada vez mais exigentes quanto a qualidade dos frutos (EPAMIG, 2012). A

propagação comercial de frutíferas lenhosas, na maioria das vezes é realizada através de estaquia, porém também pode ser utilizado o método de micropropagação, que traz vantagens como plantas com elevada qualidade fitossanitária e fisiológica, isentas de vírus, geneticamente uniformes e produzidas em um curto espaço de tempo, porém o custo ainda é elevado. A técnica da micropropagação mostra-se uma alternativa ao produtor que necessita de mudas saudáveis e fisiologicamente viáveis para implantação de seu pomar.

A qualidade sanitária e genética das mudas são características consideradas altamente importantes para o sucesso da implantação do pomar, já que a fruticultura está fundamentada em pomares produtivos e o sucesso do empreendimento depende do uso de mudas de alta qualidade (FACHINELLO et al., 2011).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MIRTILO

Dentro do grupo das frutas vermelhas encontra-se o mirtilo, que vêm despertando interesse e atingindo o mercado consumidor, principalmente por suas características nutricionais qualitativas como elevado poder antioxidante, alta concentração de bioflavonóides, atividade neuroprotetora e combate a ação de radicais livres no organismo (PATEL, 2014; SOUZA et al., 2014; JACOB, 2012; ROA, 2005). O mirtilo é um fruto apreciado devido ao seu sabor exótico e característico, valor econômico e propriedades medicinais. Vem ganhando espaço não somente em países da Europa também como no Brasil, decorrente da busca cada vez maior dos consumidores por frutos com qualidades nutricionais. No ano de 2011, diferentes espécies de mirtilo foram cultivadas comercialmente em 27 países (EVANS e BALLEEN, 2014).

O mirtilo (*blueberry*) pertence a família *Ericaceae* e ao gênero *Vaccinium*, originário da América do Norte é caracterizado por ser um arbusto caducifólio baixo, de 1 a 2 metros de altura e o fruto constitui-se de uma pequena baga que apresenta coloração azulada. Possui sabor levemente agridoce e quando maduro o fruto é envolto por uma camada de cera esbranquiçada denominada pruína (AVILÉS et al., 2014). É cultivado em solos ligeiramente ácidos, com pH ideal variando de 4,8 a 5,2 (EMBRAPA, 2007).

É muito valorizado devido aos benefícios que promove a saúde humana (HOWELL, 2009) por apresentar alto teor de antocianinas, substâncias características por seu alto poder antioxidante, devido a presença de compostos fenólicos, previne doenças degenerativas, doenças crônicas não transmissíveis, proteção ao cérebro contra danos isquêmicos, retarda o declínio cognitivo associado ao envelhecimento e reduz os níveis de hipertensão (KALT et al., 2007).

Além das propriedades nutricionais e medicinais, o mirtilo apresenta uma possibilidade de diversificação de renda ao produtor, devido ao seu alto valor agregado, tanto para frutos *in natura* como para a indústria e processamento, e também devido as perspectivas de aumento no consumo (STRIK, 2007).

Foi introduzido no Brasil em 1983 através da Embrapa Clima Temperado,

localizada em Pelotas (RS), porém a comercialização iniciou-se a partir da década de 90 na cidade de Vacaria (RS) (EMBRAPA, 2007).

As perspectivas para a expansão da produção de mirtilo no Brasil são promissoras, já que a época da colheita coincide com a entre safra no Hemisfério Norte, que são os maiores consumidores do fruto. O cultivo do mirtilo no Brasil tem crescido significativamente, e a perspectiva é que o crescimento prossiga (BRAZELTON; STRICK, 2007). A área cultivada no país é de 150 hectares, e está crescendo, preponderantemente na região Sul. Dos fatores que dificultam essa expansão estão os diferentes climas e solos, dificuldade do manejo da planta, crescimento lento e falta de oferta de mudas no mercado. Essa falta de oferta é consequência de escassez de conhecimento técnico da cultura (PEÑA et al., 2012).

A espécie *Vaccinium ashei* Reade é a mais promissora e com maior potencial para o Sul do Brasil, já que as condições edafoclimáticas são favoráveis e atendem as necessidades das cultivares. Estudos estão sendo realizados com essa espécie principalmente na região Sul, visando aperfeiçoar o desenvolvimento da cultivar.

As dificuldades do setor comercial como a pequena oferta mesmo em vista de demanda mais alta, a fragilidade dos frutos e as características da pós colheita, mesmo com um aumento no consumo e no interesse dos produtores dificultam a ascensão e fixação da cultura no país.

2.2 MICROPROPAGAÇÃO DE PLANTAS

A técnica de cultivo *in vitro*, fundamenta-se na inoculação de sementes ou fragmentos de tecidos da planta matriz previamente desinfestados, designados explantes em meio de cultura ajustado e em condições assépticas, de maneira que esses tenham condições ideais para crescer e desenvolver-se, produzindo uma planta com as mesmas características genéticas da planta matriz (MINAMO et al., 2010).

O meio de cultivo mais difundido na micropropagação vegetativa foi estabelecido por Murashige e Skoog em 1962, tornando-se um meio de propagação *in vitro* universal também conhecido como meio MS. Existem também outros meios utilizados na micropropagação, como WPM – Wood Plant Medium (LLOYD e MC COWN, 1981) utilizado na propagação de plantas lenhosas em laboratórios

comerciais (QUISEN e ANGELO, 2008). Deve-se utilizar o meio a cultura ideal para cada planta levando em consideração os protocolos pré-existentes e as necessidades da cultura a ser utilizada.

A micropropagação proporciona o suprimento contínuo e uniforme de plantas, e também viabiliza a obtenção de mudas sadias e homogêneas. É baseada na totipotencialidade das células, ou seja, na capacidade das células responderem a estímulos, traduzi-los, induzindo a formação dos órgãos vegetais, que constituem o corpo de um organismo completo (BROWN e THORPE, 1986).

A organogênese somática consiste na obtenção de eixos caulinares monopolares originados de gemas preexistentes. Estes eixos caulinares são induzidos ao enraizamento *in vitro*, resultando em plântulas completas, que podem ser então aclimatizadas (BROWN e THORPE, 1986). A organogênese direta sucede-se sem a passagem por formação calosa. Assim, em meio de cultivo e reguladores vegetais, os explantes de células ou tecidos meristemáticos são induzidos a formar diretamente órgãos de plantas (PERES, 2002).

Os explantes comumente utilizados na organogênese direta são os meristemas apicais, segmentos nodais e apicais e, por possuírem tecidos indiferenciados e células meristemáticas em constante divisão celular (TORRES et al., 1998).

A organogênese somática indireta é designada pela passagem de calo, que somente ao ser recultivado promoverá a formação dos órgãos da plântula. Calo é um tecido formado de células desorganizadas em resposta à injúria causada em função da excisão do tecido da planta matriz. Na organogênese somática direta, a passagem por calo é indesejável, devido ao fato de algumas plantas regeneradas apresentarem variação genética, comumente denominada, variação somaclonal, podendo obter plantas não idênticas à planta matriz (LARKINS E VASIL, 2000).

Diferentes fatores estão relacionados ao sucesso da micropropagação, entre eles o tipo e tamanho dos explantes, tipos e tamanhos dos frascos utilizados, meio de cultivo adequado, utilização de reguladores de crescimento e fatores abióticos.

A utilização da micropropagação em âmbito comercial já é realidade em diversos países do mundo, com destaque para os da Europa Ocidental e os Estados Unidos (ARAÚJO; CARVALHO, 2005).

2.3 MICROPROPAGAÇÃO DE MIRTILO

A consolidação do sistema de produção e expansão de mirtilo no país limita-se devido a alguns fatores, e entre eles está à dificuldade de propagação, que restringe a disponibilidade de mudas viáveis para comercialização. O mirtilo é propagado principalmente através de enraizamento de estacas, que é um processo mais demorado, e vem apresentando problemas devido a dificuldade de enraizamento de algumas cultivares (HOFFMANN, 1995), e, além disso, demanda de maior tempo quando comparado a micropropagação.

A técnica de micropropagação visa a produção de mudas em menor tempo, de ótima qualidade sanitária e garantindo a manutenção das características agronomicamente desejáveis (TREVISAN, 2004). Essas características impulsionam o setor de micropropagação e tornam essa técnica mais um aliado para o fruticultor, que busca tecnologias mais avançadas para aumentar cada vez mais a área de produção, suprimindo suas necessidades e tornando-a mais eficiente.

Para otimizar a técnica de micropropagação, diversos reguladores vegetais são utilizados com o intuito de melhorar as condições de desenvolvimento das plântulas *in vitro*. A dificuldade de enraizamento do mirtilo *in vitro* é apontada como um dos entraves para produção de mudas, pois o desenvolvimento do sistema radicular a partir da formação de raízes adventícias em plantas propagadas vegetativamente *in vitro* ou *in vivo* é um processo altamente complexo, envolvendo fatores endógenos e exógenos, ainda não elucidados totalmente (SOUZA e PEREIRA, 2007).

Souza et al., (2011) verificaram que plantas de mirtilo micropropagadas obtiveram maior crescimento vegetativo inicial, motivo do rejuvenescimento provocado pela micropropagação. Quando adicionado Ácido Indol Acético (AIA) no meio de cultivo de diferentes cultivares de mirtilo oriundas de diferentes fontes de explantes, o estabelecimento *in vitro* foi favorecido através da utilização de reguladores vegetais (SILVA et al., 2008). Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho é testar a ação de um análogo de Brassinosteroide isolado e associado a uma Auxina, no enraizamento de mirtilo propagado *in vitro*.

2.4 FORMAÇÃO DE RAÍZES *IN VITRO*

O enraizamento dos explantes multiplicados *in vitro* é pré-requisito para qualquer protocolo de micropropagação, pois influencia diretamente no estabelecimento da muda no solo (PATI et al., 2006). Diversos fatores influenciam na resposta do enraizamento, fatores exógenos (relações hídricas, luminosidade, temperatura, meio de cultura, nutrientes e carboidratos) e endógenos (características do explante, efeito de gemas, efeito de folhas) que vêm sendo estudados ao longo dos anos, principalmente para induzir a formação de raízes em espécies com dificuldade de enraizamento (HARTMANN et al., 2002; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; ASSIS e TEIXEIRA, 1998; COUVILLON, 1988).

Os obstáculos encontrados no enraizamento se devem principalmente a interação dos fatores citados acima, que dificultam o isolamento e a caracterização das variáveis envolvidas na formação radicular. Cada espécie, ou cultivar de uma mesma espécie, apresenta resposta diferente ao enraizamento *in vitro*, devido às características genéticas. Portanto, não é possível estabelecer um protocolo geral de enraizamento *in vitro* para todas as espécies.

No decorrer do enraizamento sucede-se a formação de raízes adventícias nas partes aéreas formadas anteriormente na fase de multiplicação. A formação de raízes adventícias origina-se de grupos de células maduras de diferentes tecidos, como folha, caule, caule subterrâneo e regiões das próprias raízes. Esses grupos de células adentram no ciclo celular e retomam a capacidade de divisão, originando um meristema radicular de maneira análoga a formação de raízes laterais, com origem endógena (VANNESTE et al., 2007; SMET et al., 2006; MERCIER, 2004).

O tempo da rizogênese varia de uma a três semanas em meio de cultura adequado para enraizamento. Existem diversos fenômenos envolvidos na etapa de enraizamento, porém são difíceis de isolar e caracterizar, devido a sua complexidade, sendo assim são apontados como obstáculos no conhecimento específico de cada etapa (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; ASSIS e TEIXEIRA, 1998).

O processo de formação de raízes adventícias inclui vários estágios, que

podem ser divididos em quatro fases. A primeira fase é definida como indução, onde ocorrem processos moleculares e bioquímicos, sem alterações visíveis e envolve a diferenciação de células específicas, acarretando na formação de um novo meristema. A segunda fase é a formação, nesse momento ocorrem as divisões celulares e crescimento de novas raízes. A terceira fase é o desenvolvimento das raízes iniciais em primórdios radiculares e posteriormente a fase definida como crescimento e emergência dos primórdios radiculares, com formação de vasos condutores entre os primórdios e o tecido vascular do explante (FEET-NETO et al., 2001).

A iniciação radicular é diretamente influenciada pelo estado nutricional da planta, através da quantidade de carboidratos, reguladores de crescimento e outros compostos metabólicos, que também alteram a velocidade de enraizamento no processo de rizogênese adventícia (HIGASHI et al., 2004). De maneira geral, qualquer nutriente envolvido nos processos metabólicos associados à diferenciação e formação do meristema radicular é essencial para a iniciação do processo de formação de raízes (BLAZICH, 1987; MALAVASI, 1994). Outro fator que influencia é a idade da planta, quanto mais velha, maior a redução nas taxas de divisão celular e capacidade regenerativa, conseqüentemente um enraizamento insuficiente (WANG e ANDERSEN, 1989).

2.5 ENRAIZAMENTO DE PLANTAS LENHOSAS

O processo de enraizamento de partes aéreas de plantas herbáceas é mais simples quando comparado a plantas lenhosas, sendo que para as herbáceas é uma etapa que se sucede sem agravamentos, já que as raízes adventícias emergem de células parenquimáticas do floema, de células da epiderme ou do periciclo, variando de acordo com a espécie (HARTMANN et al., 2002; ASSIS e TEIXEIRA, 1998). Em plantas lenhosas existem mais camadas de floema e xilema secundário e as raízes adventícias formam-se a partir de células vivas do parênquima, primeiramente do floema secundário mais jovem.

As plantas lenhosas apresentam dificuldade na adaptação à cultura de tecidos *in vitro* e poucas espécies apresentam sucesso quando utilizada essa técnica (ROUT et al., 1999). O enraizamento se depara com obstáculos nos

fenômenos envolvidos com a formação de raízes adventícias, motivo dos fatores relacionados a este processo apresentarem interação entre si (ASSIS e TEIXEIRA, 1998).

Outra característica de plantas lenhosas é o tempo de desenvolvimento das raízes iniciais, que varia entre espécies. Vieira et al (2007) descreve que para *Mallus pumilla*, uma espécie de macieira, as raízes levam aproximadamente 20 dias para desenvolverem-se completamente. Para *Continus coggygria*, árvore ornamental, as raízes apresentaram desenvolvimentos completo aos 10 dias (METIVIER et al., 2007).

2.5.1 Enraizamento de mirtilo

A micropropagação *in vitro* é caracterizado por apresentar regime heterotrófico, com troca gasosa restringida e baixa intensidade luminosa, o que pode acarretar em plantas com alta quantidade de água, correndo risco de desidratação e morte durante a aclimatação das mesmas (KUBOTA e KOZAI, 1992). O mirtilheiro possui sistema radicular superficial, caracterizado por ter raízes primárias muito finas, fibrosas e com ausência de pelos radiculares (FONSECA e OLIVEIRA, 2007). Sendo assim o substrato utilizado tem grande importância tanto na propagação quanto na micropropagação, proporcionando condições adequadas para o enraizamento, através de fornecimento de nutrientes adequados (WILLIANSO; MILLER, 2009).

A micropropagação é uma técnica de rejuvenescimento utilizada com êxito na propagação de espécies como eucalipto (WENDLING e DUTRA, 2010), o que acarreta em ganhos como maior índice de enraizamento e redução do tempo para formação das mudas, através do uso de propágulos com maior grau de juvenilidade (RISTOW et al., 2009).

O desenvolvimento de um sistema de enraizamento mais eficiente resulta em mudas com maior qualidade fisiológica e diminuição de perdas durante a fase de aclimatização.

Damiani e Schuch (2009) ao estudarem desenvolvimento de mirtilo *in vitro* verificaram aumento no comprimento, número de raízes, matéria fresca total e matéria fresca radicular, além de maior percentual de enraizamento quando

adicionando perlita e vermiculita ao meio de cultura tanto em casa de vegetação quanto em sala de crescimento.

CÜCE et al., (2013) ao utilizarem diferentes concentrações de Ácido indolbutírico (AIB), verificaram que menores doses da auxina ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) induziram enraizamento de mirtilo *in vitro*. Obtiveram também maior desenvolvimento de parte aérea no tratamento contendo 1 mg L^{-1} de zeatina acrescido de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB. O meio de cultura suplementado com 2 mg L^{-1} de zeatina acrescido de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB apresentou maior número de folhas e proliferação de ramos múltiplos.

Müssig et al., (2003) ao testarem diferentes doses dos brassinosteroides 24-epicastasterone e 24-epibrassinolideo em plantas de *Arabidopsis* mutantes com deficiência desse hormônio, verificaram que baixas concentrações promovem alongação radicular das mesmas. O efeito estimulante dos BRs aplicados exogenamente não é reduzido pelo inibidor de transporte de auxina 2,3,5 triidobenzoic acid, mostrando que o efeito do brassinosteroide ao estimular o crescimento de raízes parece ser em grande parte independente da ação de auxinas. Concluíram que os dois hormônios, auxina e brassinosteroide estimulam o crescimento radicular de maneira aditiva.

2.6 BRASSINOSTEROIDES (BRs)

Foram denominados de brassinas os primeiros compostos identificados no pólen de canola (*Brassica napus* L.) com atividade no estímulo do crescimento vegetal, por Mitchell et al (1970). Posteriormente foi isolado o composto de maior atividade, denominado brassinolideo, que teve sua estrutura química elucidada.

Todos os BRs de ocorrência natural são provenientes de 5α -colestanos e fazem parte do grupo de esteróides contendo de 27 a 29 átomos de carbono, como fitoesteróides típicos (GARATE et al., 1998). Na década de 90, através de estudos realizados com *Arabidopsis* sp., BRs foram classificados como uma nova classe de hormônios vegetais (CLOUSE e SASSE, 1998).

Brassinosteroides (BRs) abrangem uma classe de esteróides hidroxilados que ocorrem naturalmente no reino vegetal. Os BRs apresentam efeitos biológicos mesmo em baixas concentrações e são encontrados em gimnospermas, algas,

monocotiledôneas e dicotiledôneas, podendo ser sintetizados em folhas, sementes, frutos, caules, botões florais e raízes, influenciando diversos processos durante o crescimento e desenvolvimento das plantas (GOMES, 2011).

São hormônios vegetais que apresentam diversos efeitos, como o estímulo a divisão e o alongamento celular em caules e raízes, desenvolvimento de raízes laterais, desenvolvimento reprodutivo, senescência foliar, resposta a estresses, germinação de sementes, defesa vegetal, manutenção da dominância apical, diferenciação vascular e esterilidade masculina, sendo que ainda se faz necessário a completa elucidação do papel dos BRs nestes processos (ZULLO e ADAM, 2002).

Os brassinosteroides tem capacidade de estimular enzimas que desempenham papel essencial no crescimento de plantas, tais como ativação da bomba de prótons, a síntese protéica e de ácidos nucleicos. Pode também induzir mudança na composição de alguns aminoácidos em proteínas. Em membranas celulares, ocasionam mudanças na composição de ácidos graxos, acarretando em mudanças em suas propriedades, alterando a plasticidade (TANAKA et al., 2003).

Nesse contexto podem também controlar a atividade das aquaporinas presentes na membrana plasmática, podendo assim aumentar a permeabilidade à água, sem que haja perda da integridade da plasmalema, porém com suficiente afrouxamento da parede (MORILLON et al., 2001). Brassinosteroides ainda apresentam a habilidade de aumentar a transcrição de RNA mensageiro, que codificam para enzimas do tipo xiloglicana endotransglicosilases (CATALÁ, 1997).

Quando aplicados exógenamente, em concentrações da ordem do nano à micromolar, os BRs manifestam efeito marcante na proliferação e alongamento celular (ADAM e MARQUARDT, 1986). Entre suas características, possuem propriedade de atuar com alto efeito biológico em concentrações muito baixas (5×10^{-4} – $5 \times 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$).

Em plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn foi constatada uma proteína rica em leucina, que é considerada como receptor de brassinosteroide, e encontra-se localizada na membrana plasmática, onde sua função é a transdução de sinal na superfície celular (HAUBRICK; ASSMANN, 2006).

A maneira como brassinosteroides são transportados na planta ainda não está totalmente elucidada. Estudos realizados em raízes de tomateiro e alface, mostram que brassinolídeo promoveu mudanças no crescimento do hipocótilo e pecíolos e quando aplicado na base do hipocótilo do feijão, promoveu alongamento

do epicótilo (GREGORY e MANDAVA, 1982). Estudos realizados indicam que podem ser transportados das raízes para a parte aérea via xilema, desse modo podem estar envolvidos na sinalização molecular para induzir a síntese da ACC sintase, estimulando então a síntese de etileno (ARTECA, 1995).

Borcioni e Negrelle (2012) ao aplicarem diferentes concentrações do análogo de brassinosteroide BIOBRAS 16[®] em embriões zigóticos de bocaiuva (*Acrocomia aculeata*) *in vitro* e na fase de aclimação concluíram que a aplicação não promoveu acréscimo no percentual de germinação, entretanto estimulou o desenvolvimento de plantas normais.

Com o objetivo de comparar diferentes espécies de inhame (*Dioscorea* Spp.) onde os brotos foram cultivados *in vitro* com dois diferentes meios, o primeiro contendo 24-epibrassinolideo (0,1 μM) acrescido de ácido giberélico (0,23 μM) e o segundo contendo benzil adenina (0,6 μM), ácido naftalenoacético (1,07 μM) e ácido giberélico (0,23 μM) Engelmann-Silvestre e Engelmann (2013) verificaram que o nível de oxidação foi reduzido no meio contendo brassinosteroide quando comparado ao outro, entretanto não apresentou aumento no tamanho dos brotos. Esse resultado ressalta o efeito de 24-epibrassinolídeo na redução da oxidação, podendo ser utilizado para regeneração *in vitro* da cultura do inhame.

Arora et al., (2008) testaram sementes de milho (*Zea mays* L.) tratadas com 28-homobrassinolídeo, expostas a estresse salino e verificaram aumento na atividade das enzimas antioxidantes, menor teor de peroxidação lipídica e aumento na concentração protéica, em comparação a testemunha. Dessa maneira, sugere-se que 28-homobrassinolídeo pode diminuir o estresse oxidativo de plantas de milho submetidas a estresse salino.

2.7 AUXINAS

As auxinas desempenham funções essenciais na regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal. Foi o primeiro fitormônio descoberto, sendo assim os primeiros estudos foram realizados na ação desse hormônio (KERBAUY, 2008).

São hormônios de vasta ocorrência no reino vegetal, encontrados

principalmente em órgãos que encontram-se em crescimento ativo, como folhas jovens, coleótilos, sementes em desenvolvimento e regiões meristemáticas dos ápices radiculares e caulinares. São sintetizadas em locais de crescimento ativo, como o meristema apical do caule, gemas axilares ou laterais, folhas jovens e meristemas das raízes (TAIZ E ZEIGER, 2009).

A auxina natural em maior abundância é o AIA (Ácido indol-3-acético), que é caracterizado por promover o crescimento das raízes de plantas, através do alongamento celular. Os níveis de AIA nos tecidos vegetais são regulados por variações nas velocidades de síntese, inativação e degradação. Dessa maneira, através de processos ou reações enzimáticas a molécula de AIA pode ligar-se a outras moléculas, produzindo compostos inativos. AIA oxidase é responsável pela catabolização das auxinas, e como resultado um dos produtos finais é o metileno-oxindol. Verifica-se também a fotoxidação da molécula de AIA, onde substâncias como a riboflavina, absorvem a energia utilizada para ativar a oxidação do ácido indol acético, como o AIA-aspartato e o AIA–glutamato (BANDURSK et al., 1995).

São amplamente utilizadas na micropropagação, visando melhores resultados em parâmetro como enraizamento, desenvolvimento de parte aérea e percentual de sobrevivência.

Radmann et al., (2002) ao testarem ácido indolacético, ácido naftalenoacético e ácido indolbutírico, verificaram maior porcentagem de enraizamento, número e comprimento de raiz e maior parte aérea quando utilizaram as maiores concentrações de ácido indolacético. Quando foi utilizado ácido naftalenoacético e ácido indolbutírico essas características foram encontradas nas menores doses.

3 CAPÍTULO I: Utilização de Brassinosteróide no desenvolvimento e enraizamento *in vitro* de mirtilheiro

RESUMO

O cultivo de mirtilo no Brasil é recente e encontra-se em expansão, porém a disponibilidade de mudas de qualidade para o mercado apresenta-se como um entrave do aumento de produção e na área cultivada. A técnica da micropropagação de plantas viabiliza a produção de plantas de elevada qualidade, fisiologicamente viáveis e saudáveis e isentas de vírus em curto espaço de tempo. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de diferentes doses de BIOBRAS 16[®] em plantas de mirtilo micropropagadas, visando o enraizamento *in vitro*. Os tratamentos consistiram em 8 doses de BIOBRAS 16[®] (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 mg L⁻¹) adicionados no meio de cultura no momento do preparo. As seguintes características foram avaliadas: número de calos, diâmetro do calo, número de raízes, comprimento total de raízes, comprimento total, número de brotações, comprimento de brotações, número de folhas e massa fresca. A menor concentração de BIOBRAS 16[®] utilizada (0,1 mg L⁻¹) apresentou maior percentual de enraizamento, comprimento de raízes e número de folhas, porém também estimulou o desenvolvimento de calos. A dose de 0,4 mg L⁻¹ estimulou a formação de brotações e o comprimento das mesmas. Não houve diferença significativa para as variáveis diâmetro do calo, comprimento total e massa fresca.

Palavras-chave: *Vaccinium* sp., micropropagação, brassinosteróide.

3 CHAPTER I: Use of brassinosteroid in the development and rooting of blueberry *in vitro*

ABSTRACT

The blueberry cultivation in Brazil is recent and is expanding, but the availability of quality seedlings to the market presents itself as an obstacle to the increase of production and acreage. The plant micropropagation technique enables the production of high quality plants, physiologically viable and healthy and free from viruses in a short space of time. The objective of this study was to evaluate the effect of different doses of BIOBRAS 16® in micropropagated blueberry plants, targeting the *in vitro* rooting. The treatments consisted in 8 doses of BIOBRAS 16® (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 mg L⁻¹) added in the culture medium during preparation. The following characteristics were evaluated: number of corns, callus diameter, number of roots, the total root length, total length, number of shoots, length of shoots, number of leaves and fresh mass. The lowest concentration of BIOBRAS 16® used (0,1 mg L⁻¹) had a higher percentage of rooting, root length and number of leaves, but also stimulated the development of calluses. The dose of 0,4 mg L⁻¹ stimulated the formation of shoots and length thereof. There was no significant difference for the variables diameter of callus, total length and fresh mass.

Keywords: *Vaccinium* sp, micropropagation, brassinosteroid.

Introdução

A região Sul do Brasil apresenta condições ideais e alto potencial para produção de pequenas frutas, como o mirtilo (*Vaccinium* sp.) As perspectivas de expansão do mirtilo estão vinculadas a possibilidade de oferta do fruto na entressafra dos maiores produtores e também consumidores como Estados Unidos e alguns países da Europa (CANTUARIAS-AVILÉS, 2010).

Apesar disso, a área cultivada de mirtilo no Brasil ainda é pequena e um dos pontos que dificultam a expansão é a escassez de métodos de propagação eficientes. A propagação de mirtilo pode ser realizada através de estacas, sementes e rebentos. A produção comercial é realizada por estaquia, porém esse método apresenta desvantagens como longo período de produção e contaminações (ERIG; SCHUCH, 2005).

Nesse contexto a prática da micropropagação faz-se um método viável e vantajoso, pois oferece alta quantidade de plantas de qualidade utilizando pouco material vegetal. O estabelecimento da espécie *in vitro*, necessita de estudos com diferentes hormônios vegetais, com o objetivo de favorecer e otimizar o desenvolvimento e desempenho inicial da planta.

A presença de brassinosteroides é ampla no reino vegetal e diferentes compostos análogos têm sido sintetizados para uso comercial (CORTES et al., 2003). Dos diferentes análogos de brassinosteroides que vem sendo testados e avaliados quanto a sua eficácia no crescimento e desenvolvimento vegetal, encontra-se o Biobras 16[®]. O produto constitui-se de uma formulação comercial onde a substância ativa é um análogo de brassinosteroide espirostano polihidroxilado de fórmula $C_{27}H_{42}O_5$, que pode ser aplicado via aspersão ou introduzido ao meio de cultura (COLL et al., 1995).

A utilização de brassinosteroides e seus análogos fornece resultados divergentes em diferentes espécies testadas. Sendo assim, são utilizados de maneira e doses diferenciadas em estudos de germinação, enraizamento de estacas e embriogênese somática (BORCIONI, NEGRELLE, 2012).

O objetivo do presente trabalho foi testar diferentes doses de BIOBRAS 16[®] no desenvolvimento e enraizamento de mirtilo *in vitro*.

Material e métodos

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Fruticultura, Departamento de Agronomia, localizado na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Os explantes utilizados foram segmentos caulinares de mirtilo contendo de 1 a 2 gemas (1,0 a 1,5 cm), previamente cultivados *in vitro*.

O meio utilizado foi WPM (Wood Plant Medium – Lloyd e Mc Cown, 1981) acrescentado de sacarose (3%), mio-inositol (100mg L⁻¹), ágar (6g L⁻¹) e Biobras 16[®] conforme o tratamento. O pH foi regulado em 5,3 anteriormente a adição do ágar. O meio de cultura foi distribuído em frascos contendo 30 mL cada e autoclavados a 120°C durante 20 minutos.

Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, os explantes foram acondicionados no meio. Os tratamentos embasaram-se em diferentes doses do brassinosteroide Biobras 16[®], como mostra a tabela 1. Foram mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas, densidade de fluxo de fótons de 27 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cada tratamento contendo 4 repetições. A repetição constituiu-se de um frasco contendo 5 explantes, totalizando assim 32 unidades amostrais. Os resultados obtidos foram analisados através do programa estatístico Assistat (SILVA e AZEVEDO, 2009).

Tabela 1: Tratamentos contendo diferentes doses de Biobras 16[®].

Tratamentos	Biobras 16 [®] (mg L ⁻¹)
T1	0
T2	0,1
T3	0,2
T4	0,3
T5	0,4
T6	0,5
T7	0,6
T8	0,7

Resultados e discussão

A não-utilização da análise de regressão para o fator concentração, deve-se ao fato de nenhum dos modelos de equações lineares adequarem-se aos dados, demonstrados pelos baixos coeficientes de determinação (R^2). Sendo assim, optou-se por utilizar delineamento inteiramente aleatorizado.

Para o número de brotações laterais, a concentração de 0,4 mg L⁻¹ de BIOBRAS 16[®] apresentou maior média quando comparada aos demais tratamentos, como mostra a figura 1. As concentrações de 0,2; 0,3 e 0,7 mg L⁻¹ não apresentaram diferença significativa quando comparadas a testemunha. As menores médias foram encontradas nas concentrações de 0,1; 0,5 e 0,6 mg L⁻¹ que apresentaram valores baixos e próximo a zero.

Quanto ao comprimento das brotações, a concentração de 0,4 mg L⁻¹ também mostrou-se a mais eficiente com comprimento médio de 1,43 cm, como mostra a figura 2. Os demais tratamentos não apresentaram diferença significativa quando comparados a testemunha, exceto a concentração de 0,3 mg L⁻¹, que apresentou comprimento médio de 0,64 cm.

Quando plantas de mirtilheiro micropropagadas foram comparadas com plantas provenientes de semente, as oriundas de micropropagação obtiveram menor comprimento de brotações de acordo com o aumento na concentração do regulador vegetal 2iP. As plantas provenientes de sementes mantiveram o comprimento das brotações independentemente da concentração de regulador utilizada (SCHUCH et al., 2008).

Ao adicionarem 2iP ao meio de cultura de mirtilo cultivar Climax, Schuch et al. (2008) observaram comprimento médio de brotações de 1,5 cm, resultado esse que corrobora com o encontrado no presente trabalho (1,43 cm).

Schuch e Damiani (2008) ao trabalharem com zeatina e 2iP na micropropagação de mirtilo cultivar Climax, observaram incremento no número de brotações de acordo com o aumento na concentração de ambos reguladores de crescimento.

Erig e Schuch (2006) relatam que no estabelecimento do mirtilo in vitro é habitual o desenvolvimento de explantes que emitem brotos alongados e com

diversas gemas, no entanto, alguns emitem brotos sem alongamento, com folhas grandes que paralisam o desenvolvimento.

Figura 1: Número de brotações em mirtilheiro micropropagado aos 60 dias. Ponta Grossa, 2015.

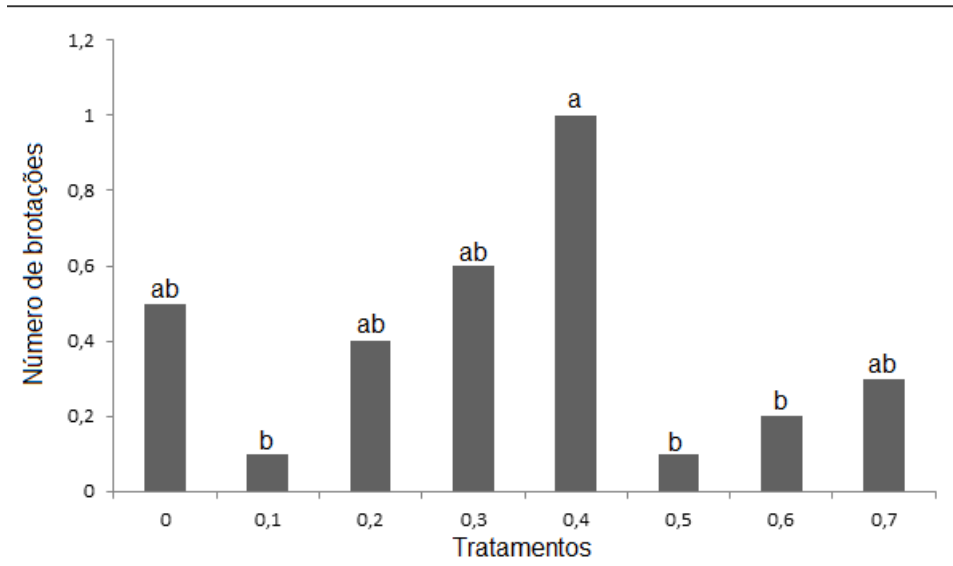
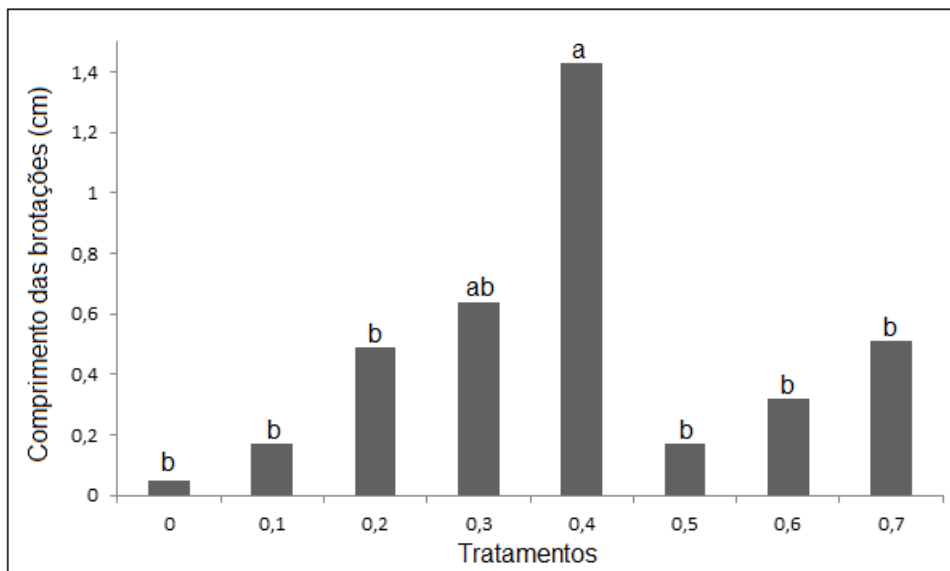


Figura 2: Comprimento das brotações de mirtilheiro micropropagado aos 60 dias. Ponta Grossa, 2015.



Para a porcentagem de enraizamento, a menor concentração utilizada mostrou-se a mais eficiente com 46% de média, sendo que o tratamento testemunha não apresentou enraizamento, como mostra a figura 3. As maiores doses (0,6 e 0,7 mg L⁻¹) apresentaram percentual de 6% e não foram estatisticamente diferentes da testemunha, assim como a concentração de 0,3 mg L⁻¹. Mostrando assim, que a menor dose de brassinosteroide utilizada foi suficiente para estimular o

enraizamento de plantas de mirtilo cultivadas *in vitro*.

No que diz respeito ao comprimento de raízes, verificou-se que as maiores concentrações (0,6 e 0,7 mg L⁻¹) obtiveram os valores mais baixos. A menor concentração utilizada 0,1 mg L⁻¹, apresentou maior média para esse parâmetro, 1,04 cm, concluindo que a menor dose foi suficiente para estimular o aumento no comprimento das raízes, como mostra a figura 4. Estudos realizados com brassinosteroides indicam que, de maneira abrangente, estes podem estimular o desenvolvimento radicular (MÜSSIG et al., 2003; BAO et al., 2004; MALABADI e NATARAJA, 2007; CATUNDA et al., 2008; MAZORRA & NÚÑEZ, 2008).

Ao estudarem diferentes concentrações de 24-epicastasterona e 24-epibrassinolídeo em plantas de *Arabidopsis* sp. Mussig et al., (2003) constataram que as concentrações mais baixas de 24-epibrassinolídeo resultaram em maior crescimento de raízes em plantas selvagens, e as concentrações mais elevadas inibiram o desenvolvimento de raízes. Para 24-epicastasterona, concentrações mais baixas estimularam o crescimento da raiz em plantas mutantes brassinosteroides-deficientes, ou seja, normalizaram o déficit de comprimento radicular. Foi constatado de uma maneira geral que as concentrações mais elevadas inibiram o enraizamento o que concorda com os resultados obtidos no presente estudo.

Damiani e Schuch (2009) obtiveram maior percentual de enraizamento, comprimento de raízes e matéria fresca radicular das cultivares de mirtilo Georgiagem e Delite ao utilizarem meio contendo perlita acrescido de AIB. Nesse estudo a cultivar Georgiagem apresentou maior percentual de enraizamento quando comparada a Delite.

Figura 3: Porcentagem de enraizamento de mirtilheiro micropropagado aos 60 dias. Ponta Grossa, 2015.

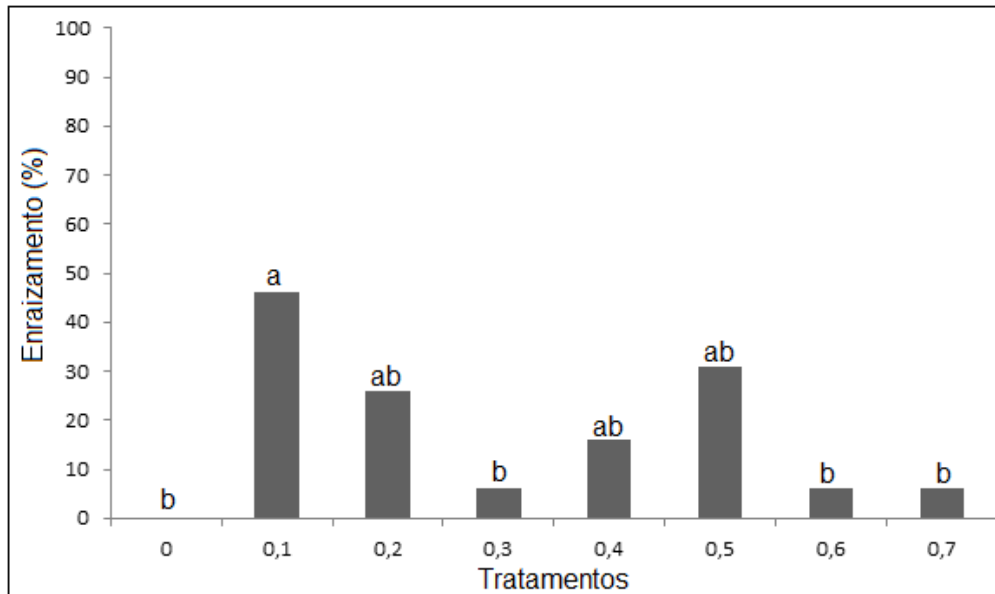
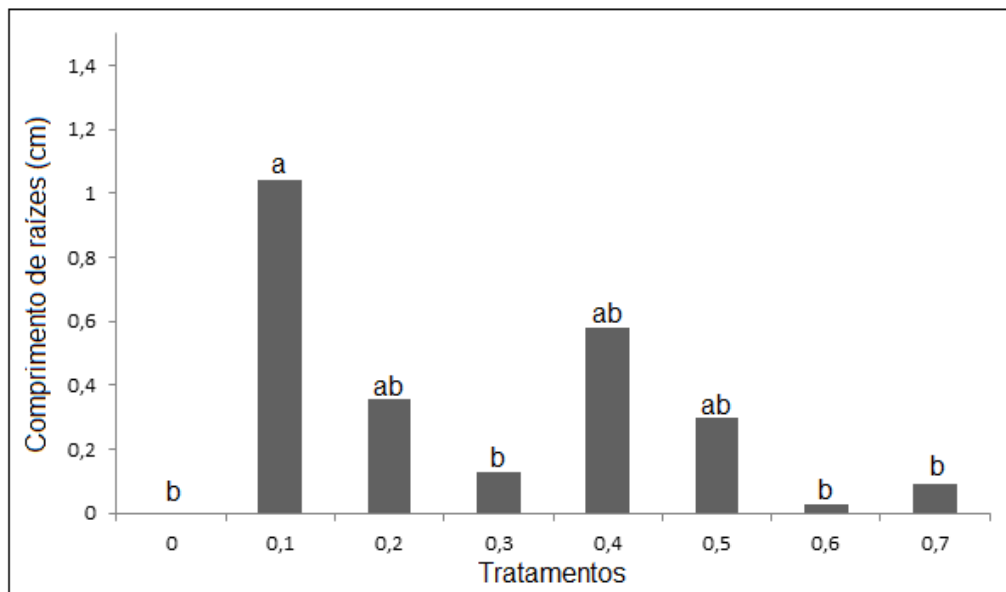


Figura 4: Comprimento de raízes (cm) de plantas de mirtilheiro micropropagado aos 60 dias. Ponta Grossa, 2015.



Apesar de apresentar maior formação e comprimento de raízes, a concentração de 0,1 mg L⁻¹ de BIOBRAS® 16 apresentou também maior formação de calos (95%, figura 5), e o tratamento testemunha apresentou o menor desenvolvimento desse parâmetro. Calo é definido como um aglomerado de células desorganizadas, oriundas de células diferenciadas e não diferenciadas, que se dividem ativamente e que, em geral, se originam em zonas com injúrias químicas ou físicas (BAJAJ, 1989).

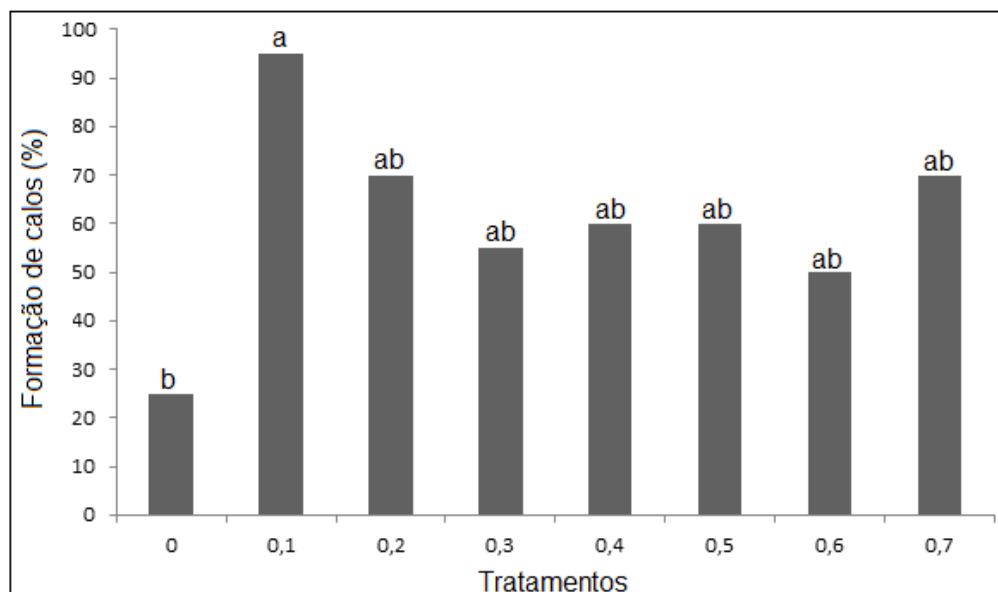
A formação de calo durante a etapa de micropropagação é indesejável, já que pode interferir na funcionalidade do sistema radicular, comprometendo posteriormente a aclimatização das plântulas e seu completo desenvolvimento (SHAHSAVARI, 2010; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

No estabelecimento in vitro de *Vaccinium myrtillus*, verificou-se que a adição de auxina no meio de cultura estimulou a calogênese, e a partir desses calos não houve nenhuma regeneração, apenas quando foram transferidos para meio de cultura isento de reguladores de crescimento (JAAKOLA,2001).

Grattapaglia e Machado (1998) relatam que a adição de reguladores de crescimento imediatamente após o isolamento do explante da planta mãe em alguns casos podem resultar em respostas indesejáveis, como a calogênese por exemplo.

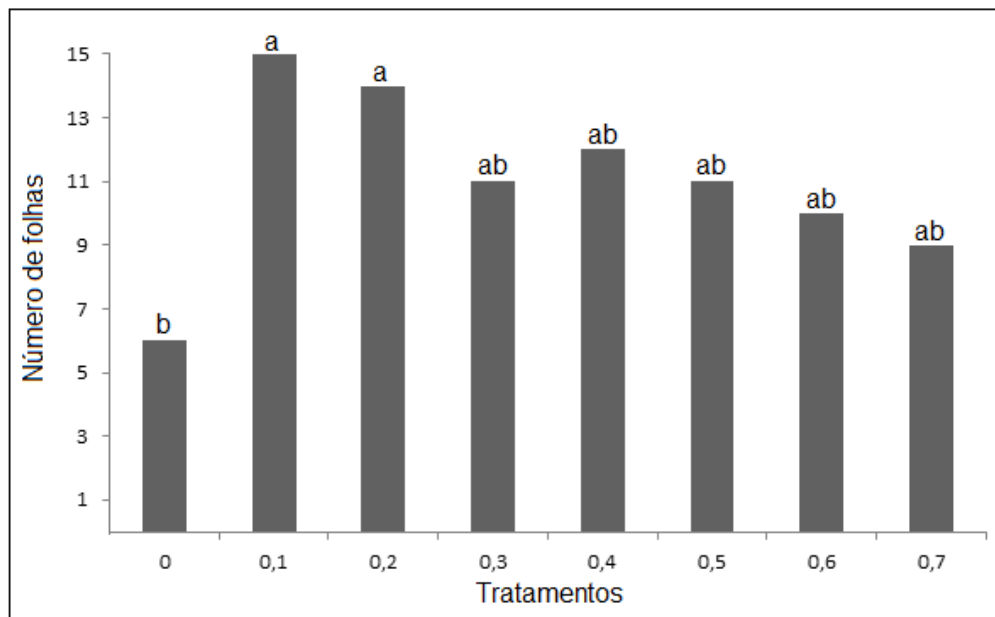
Explantos que desenvolvem-se em meio de cultura contendo ácido naftalenoacético, formam calos na bases das plantas e induzem desenvolvimento de raízes mais grossas (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). *Pistacia vera*, uma espécie lenhosa, quando exposta a diferentes concentrações de ácido indolacético e ácido indolbutírico desenvolve calos na base dos explantes e por consequência a formação de raízes é inibida (ONAY, 2000).

Figura 5: Porcentagem de formação de calos em mirtilheiro micropropagado aos 60 dias. Ponta Grossa, 2015.



Reafirmando os resultados obtidos nos parâmetros anteriores, a menor concentração utilizada ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) mostrou maior número de folhas obtido e não apresentou diferença significativa quando comparada a $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de BIOBRAS 16[®]. O menor número de folhas obtidas foi na testemunha, figura 6.

Figura 6: Número de brotações de mirtilheiro micropropagado aos 60 dias. Ponta Grossa, 2015.



Para as variáveis diâmetro do calo, comprimento total e matéria fresca não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Tabela 2: Dados médios da formação de calos (FC); diâmetro de calos (DC); número de raízes (NR); comprimento de raízes (CR), comprimento total (CT); número de brotações (NB); comprimento das brotações (CB), número de folhas (NF) e massa fresca (MS) de mirtilheiro micropropagado aos 60 dias. Ponta Grossa, 2015.

Tratamentos mg L ⁻¹	FC %	DC ^{ns} Mm	NR %	CR Cm	CT ^{ns} Cm	NB	CB Mm	NF	MF ^{ns} gr
0	25 b	0,9	00 b	00 b	1,4	0,5 ab	0,05 b	06 b	0,02
0,1	95 a	1,8	46 a	1,04 a	1,9	0,1 b	0,17 b	15 a	0,08
0,2	70 ab	1,8	26 ab	0,36 ab	1,7	0,4 ab	0,49 b	14 a	0,06
0,3	55 ab	1,8	6 b	0,13 b	1,7	0,6 ab	0,64 ab	11 ab	0,07
0,4	60 ab	1,6	16 ab	0,58 ab	1,8	1,0 a	1,43 a	12 ab	0,07
0,5	60 ab	0,9	31 ab	0,3 ab	1,6	0,1 b	0,17 b	11 ab	0,03
0,6	50 ab	1,0	6 b	0,03 b	1,7	0,2 b	0,32 b	10 ab	0,05
0,7	70 ab	1,8	6 b	0,09 b	1,7	0,3 ab	0,51 b	09 ab	0,05
Média geral	60	1,5	17,5	2,13	1,74	0,39	0,47	11,41	0,05
CV (%)	39,98	44,46	93,18	89,87	12,61	84,71	80,05	29,52	61,23

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. CV: coeficiente de variação.

Conclusão

A utilização do análogo de brassinosteroide BIOBRAS 16[®] na concentração de 0,1 mg L⁻¹ apresentou resultado satisfatório para porcentagem de enraizamento, comprimento de raízes e número de folhas, porém também apresentou formação de calos. Para os parâmetros número de brotações e comprimento das brotações a concentração de 0,4 mg L⁻¹ foi a mais satisfatória.

4 CAPÍTULO II: Interação entre Brassinosteroides e Auxina no desenvolvimento e enraizamento *in vitro* de mirtilheiro

RESUMO

O cultivo de mirtilheiro no Brasil é recente e encontra-se em expansão, porém a disponibilidade de mudas de qualidade para o mercado apresenta-se como um entrave no aumento de produção e na área cultivada. A técnica da micropropagação de plantas viabiliza a produção de plantas de elevada qualidade, fisiologicamente viáveis e saudáveis e isentas de vírus em curto espaço de tempo. Diversos estudos fisiológicos mostram sinergismos entre brassinosteroides e auxinas, e respostas induzidas pela uso de auxina são aumentadas em tratamentos contendo brassinosteroides. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de BIOBRAS 16[®] associado ao ácido indolacético em plantas de mirtilheiro micropropagado, visando à melhoria de características de crescimento e enraizamento *in vitro*. Os tratamentos consistiram em diferentes doses de BIOBRAS 16[®] (0,1; 0,3; 0,5 mg L⁻¹) associadas a diferentes doses de ácido indolacético (1; 3; 5 µM L⁻¹) adicionados ao meio de cultura no momento do preparo. As seguintes características foram avaliadas: número de calos, diâmetro do calo, número de raízes, comprimento total de raízes, comprimento total, número de brotações, comprimento de brotações, número de folhas e massa fresca. Brassinosteroides e ácido indolacético utilizados associadamente obtiveram maior percentual de enraizamento, porém também houve maior desenvolvimento de calos e maior diâmetro dos calos.

Palavras-chave: *Vaccinium* sp., micropropagação, brassinosteroides, ácido indolacético.

4 CHAPTER II: Interaction between brassinosteroid and auxin in the development and rooting of blueberry *in vitro*

ABSTRACT

The blueberry cultivation in Brazil is recent and is expanding, but the availability of quality seedlings to the market presents itself as an obstacle to the increase of production and acreage. The plant micropropagation technique enables the production of high quality plants, physiologically viable and healthy and free from viruses in a short space of time. Many physiological studies show synergism between BRs and auxin, and responses induced by the use of auxin are increased in treatments containing Brassinosteroids. The objective of this study was to evaluate the effect of different concentrations of BIOBRAS 16[®] associated with indole acetic acid in micropropagated blueberry plants, aiming to improve growth characteristics and *in vitro* rooting. The treatments consisted in different doses of BIOBRAS 16[®] (0,1; 0,3; 0,5 mg L⁻¹) associated with different doses of AIA (1; 3; 5 µM L⁻¹) added to the culture medium during preparation. The following characteristics were evaluated: number of corns, callus diameter, number of roots, the total root length, total length, number of shoots, length of shoots, number of leaves and fresh mass. Brassinosteroid and auxin used in association obtained the highest percentage of rooting, but there was also but there was also further development of corns and calluses of larger diameter.

Keywords: *Vaccinium* spp., Micropropagation, brassinosteroid, indolacetic acid.

Introdução

A região Sul do Brasil apresenta condições ideais e alto potencial para produção de pequenas frutas, como o mirtilo (*Vaccinium* sp.) As perspectivas de expansão do mirtilo estão vinculadas a possibilidade de oferta do fruto na entressafra dos maiores produtores e também consumidores como Estados Unidos e alguns países da Europa (CANTUARIAS-AVILÉS, 2010).

Apesar disso, a área cultivada de mirtilo no Brasil ainda é pequena e um dos pontos que dificultam a expansão é a escassez de métodos de propagação eficientes. A propagação de mirtilo pode ser realizada através de estacas, sementes e rebentos. A produção comercial é realizada por estaquia, porém esse método apresenta desvantagens como longo período de produção e contaminações (ERIG; SCHUCH, 2005).

Nesse contexto a prática da micropropagação faz-se um método viável e vantajoso, pois oferece alta quantidade de plantas de qualidade utilizando pouco material vegetal. O estabelecimento da espécie *in vitro*, necessita de estudos com diferentes hormônios vegetais, com o objetivo de favorecer e otimizar o desenvolvimento e desempenho inicial da planta.

A presença de brassinosteroides é ampla no reino vegetal e diferentes compostos análogos têm sido sintetizados para uso comercial (CORTES et al., 2003). Dos diferentes análogos de brassinosteroides que vem sendo testados e avaliados quanto a sua eficácia no crescimento e desenvolvimento vegetal, encontra-se o Biobras 16[®]. O produto constitui-se de uma formulação comercial onde a substância ativa é um análogo de brassinosteroide espirostano polihidroxilado de fórmula $C_{27}H_{42}O_5$, que pode ser aplicado via aspersão ou introduzido ao meio de cultura (COLL et al., 1995).

A utilização de brassinosteroides e seus análogos fornecem resultados divergentes em diferentes espécies testadas. Sendo assim, são utilizados de maneira e doses diferenciadas em estudos de germinação, enraizamento de estacas e embriogênese somática (BORCIONI, NEGRELLE, 2012).

Os efeitos de brassinosteroide no crescimento e desenvolvimento inicial de plantas apresentam uma tendência de sinergismo com outros fitormônios, principalmente auxinas (HARDTKE et al., 2007).

O ácido 3-indolacético (AIA) é a principal auxina encontrada nas plantas, e

permanece ativo mesmo em concentrações muito baixas. O ácido indolacético sintetizado nas plantas pode sofrer processos de inativação durante o crescimento e diferenciação. Enzimas AIA-oxidase são responsáveis por catalisar processos de reações de oxidação e foto-oxidação causando a oxidação do AIA. Além dos processos de oxidação, quando se liga a outras moléculas da planta o AIA pode formar conjugados que podem reter ou inativar sua atividade (TAIZ e ZEIGER, 2009). Sendo assim, nos meios para enraizamento *in vitro*, diferentes tipos e quantidades de auxina estarão influenciando diretamente o a formação de raízes.

Quando adicionada em quantidades excessivas no meio, a auxina pode acarretar na formação de calo na base do explante, prejudicando tanto o desenvolvimento da rizogênese quanto o da parte aérea. Podem ser utilizadas isoladas ou associadas a outro hormônio, sendo que as concentrações mais utilizadas estão entre 0,5 a 5,0 μM (GATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Estudos relatam que a utilização de auxina não associada a outras auxinas ou reguladores de crescimento favorece o enraizamento de espécies como *Bixa orellana*, *Rudgea viburnoides* e *Salvia fruticosa* (ARITAK et al., 2004; BONILLA, 2002; ALMEIDA et al., 1995). Em contrapartida, outras espécies como *Symonanthus bancroftii*, apresentaram maior taxa de enraizamento quando associada a outras auxinas (PANAIA et al., 2000).

Yopp et al., (1981) verificou forte sinergismo entre brassinosteroide e auxina e relatou aumento no tamanho de células de feijão azuqui (*Vigna angularis*), feijão (*Phaseolus vulgaris*) e ervilha (*Pisum sativum*). Ao estudarem arroz anão, Cao e Chen (1995) relataram relação sinérgica ao utilizarem brassinosteroides e ácido indolacético visando à indução de dobra da lâmina de folha de arroz (*Oryza sativa*).

O objetivo do presente trabalho foi testar a interação entre BIOBRAS 16[®] e ácido indolacético no desenvolvimento e enraizamento de mirtileiro *in vitro*.

Material e métodos

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Fruticultura, Departamento de Agronomia, localizado na Universidade Estadual de

Ponta Grossa (UEPG). Os explantes utilizados foram segmentos caulinares de mirtilo contendo de 1 a 2 gemas (1,0 a 1,5 cm), previamente cultivados in vitro.

O meio utilizado foi WPM (Wood Plant Medium – Lloyd e Mc Cown, 1981) acrescentado de sacarose (3%), mio-inositol (100mg L^{-1}), ágar (6g L^{-1}) e Biobras 16[®] conforme o tratamento. O pH foi regulado em 5,3 anteriormente a adição do ágar. O meio de cultura foi distribuído em frascos contendo 30 mL cada e autoclavados a 120°C durante 20 minutos.

Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, os explantes foram acondicionados no meio. Os tratamentos embasaram-se em diferentes doses de brassinosteróide Biobras 16[®] e ácido indolacético associados, como mostra a tabela 3. Foram mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas, densidade de fluxo de fótons de $27\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, e temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cada tratamento contendo 4 repetições. A repetição constituiu-se de um frasco contendo 5 explantes, totalizando assim 48 unidades amostrais. Os resultados obtidos foram analisados através do programa estatístico Assistat (SILVA e AZEVEDO, 2009).

Tabela 3. Diferentes doses de BIOBRAS 16[®] e ácido 3-indolacético (AIA), 2015.

Tratamentos	BIOBRAS 16[®] (mg L^{-1})	AIA (μM)
T1	0,1	1
T2	0,1	3
T3	0,1	5
T4	0,3	1
T5	0,3	3
T6	0,3	5
T7	0,5	1
T8	0,5	3
T9	0,5	5
T10	0,3	0
T11	0	3
T12	0	0

Resultados e discussão

Não houve interação entre os fatores analisados através do programa estatístico Assistat, por esse motivo foi realizada estatística como delineamento inteiramente casualizado.

O tratamento que continha a maior concentração de BIOBRAS 16[®] associada a maior concentração de AIA (T9: 0,5 ml L⁻¹ BIOBRAS + 5 µM AIA) apresentou maior formação e diâmetro de calos, como mostram as figuras 7 e 8. O maior percentual de formação de calos foi 46,5% maior quando comparado ao menor valor encontrado, que foi de 10% para três tratamentos (T3; T5 e T11). Os dois primeiros tratamentos que apresentaram menor percentual de formação de calos (T3 e T5) continham BIOBRAS 16[®] associado a AIA, porém o último citado (T9) continha apenas BIOBRAS 16[®], sem adição de auxina.

Radmann et al., ao testarem AIA e AIB visando enraizamento *in vitro* do porta enxerto de macieira M-9, verificaram que as maiores concentrações utilizadas (50 e 100µM) para ambos reguladores retardaram o enraizamento e induziram a formação de calos na base dos explantes. Esses resultados corroboram com os encontrados no presente trabalho, onde o tratamento que continha 0,5 BIOBRAS 16[®] + 5µM de AIA (maiores doses) induziram a formação de calos. Barbosa et al., (2008) verificaram decréscimo no percentual de enraizamento *in vitro* de figueira cultivar “Roxo de Valinhos” de acordo com aumento da dose de AIB utilizada e consequentemente indução na formação de calos.

Figura 7: Porcentagem de formação de calos em mirtilheiro micropropagado aos 60 dias. Ponta Grossa, 2015.

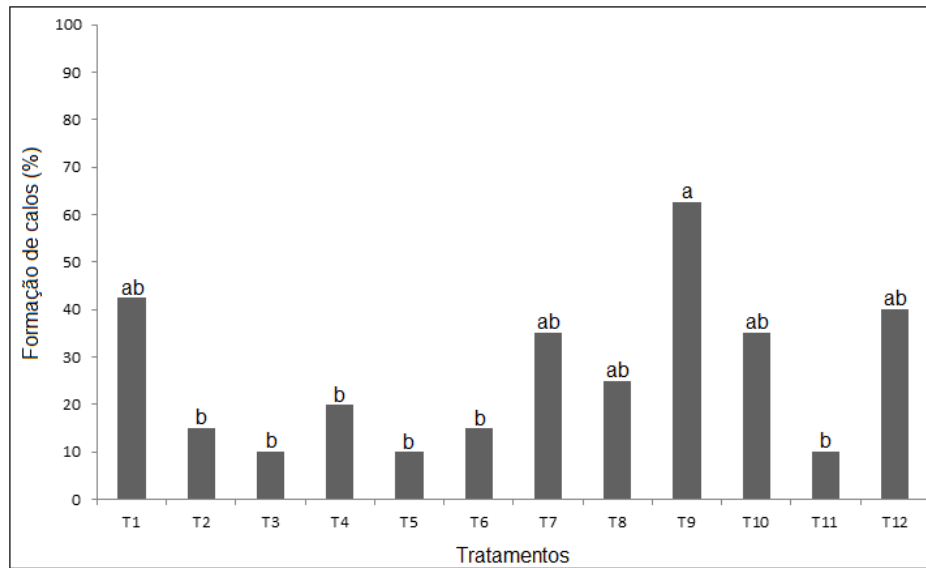
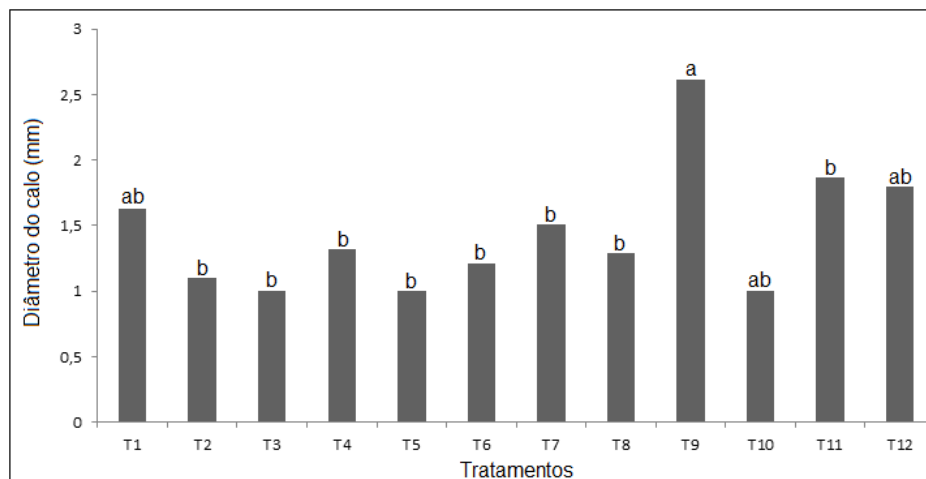


Figura 8: Diâmetro do calo de mirtilheiro micropropagado aos 60 dias. Ponta Grossa, 2015.

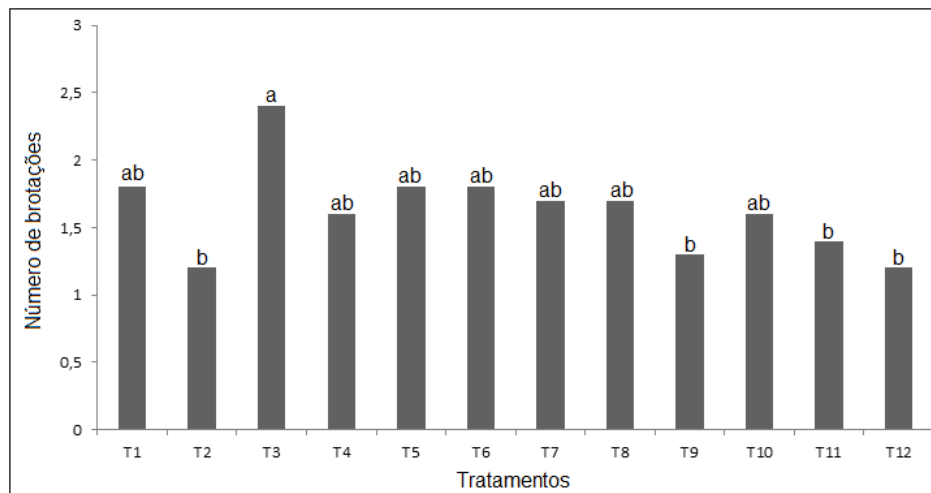


Para o parâmetro número de brotações laterais o tratamento que associou 0,1 mg L⁻¹ de BIOBRAS16[®] + 5 µM de AIA (menor e maior concentração para ambos reguladores) apresentou maior número de brotações. O tratamento que apresentou menor média foi o que continha menor concentração de BIOBRAS (0,1 mg L⁻¹ + 3 µM de AIA), que também não apresentou diferença significativa quando comparado a testemunha. Esse resultado mostra que a maior concentração de auxina utilizada induz a formação de brotações laterais. Frota et al. (2004) ao analisarem a influência de BAP e AIA sobre desenvolvimento de palma forrageira [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill] micropropagada, concluíram que o tratamento suplementado com

BAP $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ + AIA $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ favoreceu o desenvolvimento de brotações para os clones estudados.

Nicoli et al., (2008) obtiveram aumento no número de brotações de acordo com o aumento na concentração de cinetina, onde a melhor média foi de três brotos por explante em plantas micropropagadas de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville], uma espécie lenhosa destinada a utilização medicinal.

Figura 9: Número de brotações de mirtilheiro micropropagado aos 60 dias. Ponta Grossa, 2015.



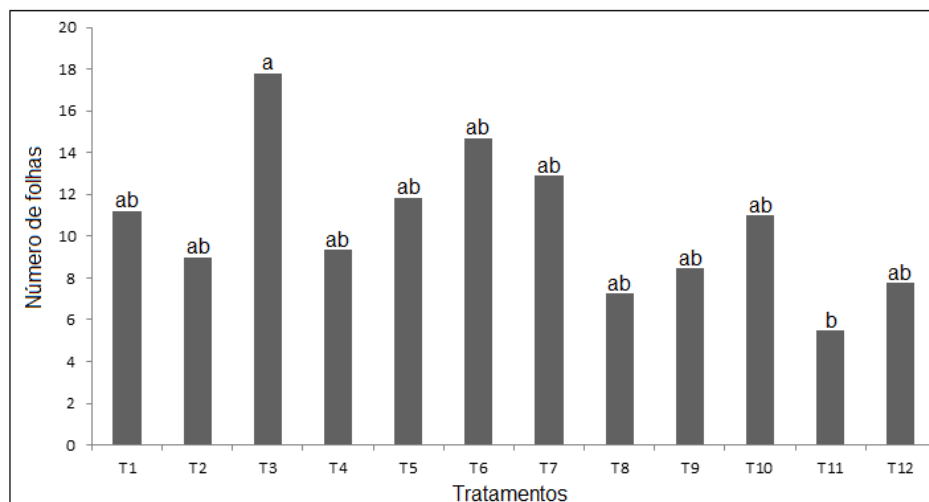
Quanto ao número de folhas, o tratamento que continha a menor concentração de brassinosteróide associada a maior concentração de AIA ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$ + $5 \text{ } \mu\text{M}$), mostrou-se o mais eficiente, sendo estatisticamente significativo quando comparado aos demais. O tratamento com menor número de folhas foi o que continha $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ de BIOBRAS 16[®], e mesmo na maior concentração do brassinosteróide, mostrou menor desenvolvimento de folhas quando utilizado isoladamente, concluindo assim a influência positiva de auxinas no desenvolvimento de folhas.

Resultado contrário a esse foi encontrado por Praxedes et al. (2001) ao estudar desenvolvimento *in vitro* de abacaxizeiro Pérola na presença de AIA. Foi constatado que o tratamento controle foi superior em número de folhas produzidas quando comparado aos tratamentos contendo AIA, onde os valores obtidos mostraram tendência decrescente de acordo com o aumento da dose da auxina citada.

Ao testarem BIOBRAS 16[®] para avaliar a germinação e desenvolvimento *in*

in vitro de embriões zigóticos de plântulas de bocaiuva [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex. Martius], Borcioni e Negrelle (2012) observaram maior comprimento de folhas foi obtido nos tratamentos que continham 0,05 e 1,0 mg L⁻¹, porém estes não foram estatisticamente diferentes do tratamento controle, sem adição de brassinosteróide. Esse resultado pode estar associado a alta diversidade genética dos embriões testados. Porém, este resultado assemelha-se aos resultados encontrados nesse trabalho, onde o menor número de folhas era do tratamento com brassinosteróide (0,3 mg L⁻¹) isolado e o maior desenvolvimento de folhas foi no tratamento em que o brassinosteróide estava associado com a auxina, podendo concluir que a ação da auxina é fundamental no desenvolvimento de folhas *in vitro*.

Figura 10: Número de folhas de mirtilheiro micropropagado aos 60 dias. Ponta Grossa, 2015.



No que diz respeito ao enraizamento, o tratamento com a concentração média de brassinosteróide associado a maior concentração de auxina (0,3 mg L⁻¹ + 5µM) obteve maior percentual de enraizamento (70%). O segundo maior percentual de enraizamento (65%) foi do tratamento 3 que continha a menor dose de brassinosteróide associada a maior dose de auxina (0,1 mg L⁻¹ + 5µM). O tratamento controle não apresentou enraizamento. Os demais tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si, porém todos apresentaram enraizamento, mesmo que em menor percentual, resultado este esperado para o presente trabalho. A utilização de auxina associada a brassinosteróide para enraizamento de mirtilo *in vitro* foi satisfatória.

Grattapaglia e Machado (1998) relataram que na presença de altas concentrações de auxina houve inibição de fases do enraizamento, o crescimento de

raízes foi inibido. Trabalhando com brotos de amoreira preta *in vitro* foi constatado que os explantes enraizaram mais facilmente na ausência de reguladores de crescimento e também não houve formação de calos (VILLA et al., 2005).

Figura 11: Porcentagem de enraizamento de mirtilheiro micropropagado aos 60 dias. Ponta Grossa, 2015.

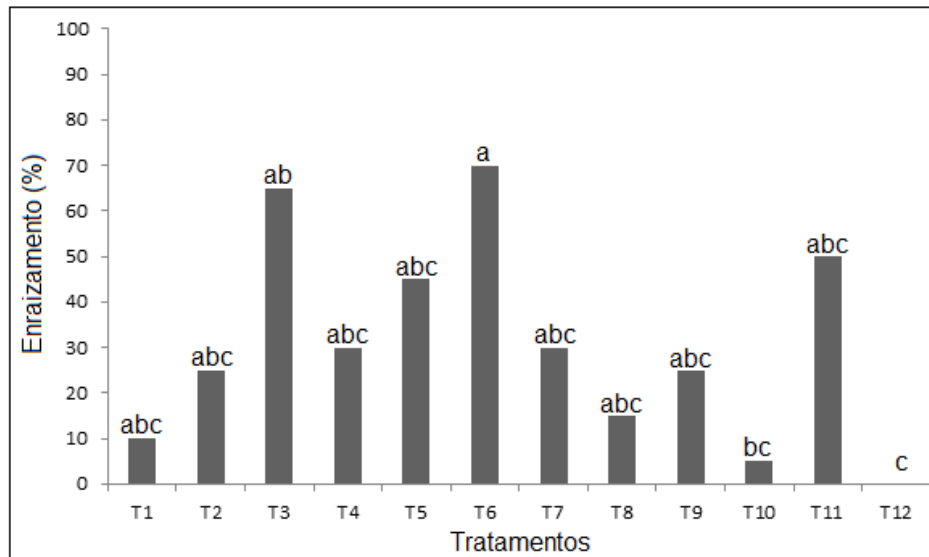


Tabela 4: Dados médios da formação de calos (FC); diâmetro de calos (DC); número de raízes (NR); comprimento de raízes (CR), comprimento total (CT); número de brotações (NB); comprimento das brotações (CB), número de folhas (NF) e massa fresca (MS) de plantas de mirtilo micropropagadas aos 60 dias. Ponta Grossa, 2015.

Tratamentos	FC %	DC mm	NB	CB ^{ns}	CT ^{ns} cm	NF	NR %	CR ^{ns} cm	MF ^{ns} gr
T1	42,5 ab	1,63 ab	1,8 ab	1,58	3,16	11,2 ab	10 abc	1,36	0,03
T2	15,0 b	1,1 b	1,2 b	1,16	3,11	9,00 ab	25 abc	1,20	0,02
T3	10,0 b	1,0 b	2,4 a	2,13	3,85	17,8 a	65 ab	1,35	0,10
T4	20,0 b	1,32 b	1,6 ab	1,91	3,73	9,33 ab	30 abc	1,40	0,03
T5	10,0 b	1,0 b	1,8 ab	2,28	4,48	11,8 ab	45 abc	1,89	0,12
T6	15,0 b	1,21 b	1,8 ab	2,25	5,39	14,7 ab	70 a	2,2	0,06
T7	35,0 ab	1,51 b	1,7 ab	2,12	5,50	12,9 ab	30 abc	1,75	0,11
T8	25,0 ab	1,29 b	1,7 ab	0,86	2,33	7,25 ab	15 abc	1,22	0,03
T9	62,5 a	2,61 a	1,3 b	0,71	4,51	8,46 ab	25 abc	2,34	0,06
T10	35,0 ab	1,0 ab	1,6 ab	0,23	2,91	11,0 ab	05 bc	1,16	0,04
T11	10,0 b	1,87 b	1,4 b	1,87	4,47	5,52 b	50 abc	1,89	0,12
T12	40,0 ab	1,8 ab	1,2 b	0,56	2,68	7,8 ab	00 c	1,39	0,03
Média geral	26,6	1,44	1,64	1,47	3,84	10,57	30	1,59	0,06
CV (%)	62,6	29,8	22,2	69,93	36,84	43,5	81,98	30,77	91,59

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. CV: coeficiente de variação

Conclusão

A utilização do análogo de brassinosteróide BIOBRAS 16[®] associado à ácido indolacético mostrou efeito positivo para características de desenvolvimento *in vitro* de mirtilheiro. As concentrações de 0,5 mg L⁻¹ de BIOBRAS 16[®] + 5 µM de AIA induziram a formação e diâmetro de calos, característica indesejável quando o objetivo é o enraizamento. Para os parâmetros número de brotações e número de folhas, o melhor resultado foi da concentração de 0,1 mg L⁻¹ de BIOBRAS 16[®] + 5 µM de AIA. Para enraizamento, as concentrações de 0,3 mg L⁻¹ de BIOBRAS 16[®] + 5 µM de AIA apresentaram maior percentual.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, G.; MARQUARDT, V. Brassinosteroids. **Phytochemistry**, Oxford-UK, v.25, p. 1787-1799. 1986.
- ALMEIDA, J.L. et al. Indução de enraizamento na micropropagação de urucuzeiro. **Revista da Faculdade de Agronomia** (Maracay), v.21, p.129-135, 1995.
- ARAÚJO, L.H.A.; CARVALHO, J.M.F.C. de. Técnicas de cultivo in vitro. Areia: UFPB/ Centro de Ciências Agrárias, 2005. (Programa de PósGraduação).
- ARIKATI, N.A. et al. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). **Scientia Horticulturae**, v.100, p.193-202, 2004.
- ARORA, N.; BHARDWAJ, R.; SHARMA, P.; ARORA, H.K. 28-Homobrassinolide alleviates oxidative stress in salt-treated maize (*Zea mays* L.) plants. **Braz. J. Plant Physiology**, 20(2):153-157, 2008.
- ARTECA, R.N. Plant growth substances: principles and applications. New York: CHAPMAN & HALL, 332p. 1995.
- ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília. Embrapa CNPH. p. 261-296. 1998.
- AVILÉS, T.C. et al. Cultivo do mirtilo: atualizações e desempenho inicial de variedades de baixa exigência em frio no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**. São Paulo, v.36, n.1, p.139-147. 2014.
- BAJAJ, Y.P.S. Biotechnology in agriculture and forestry 7: Medicinal and Aromatic Plant II. Berlin: Springer-Verlag, 1989.
- BANDURSKI, R.S. et al. Auxin biosynthesis and metabolism. In: Davies, P. (ed.). **Plant hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 39-65. 1995.
- BAO, F. et al. Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Washington, v.134, p.1624-1631, 2004.
- BARBOSA, W. et al. Efeito de concentrações do AIB no enraizamento *in vitro* de cultivares de figueira. **Bioscience Journal**. Uberlândia, v.24, n.2, p.1-6, abril, 2008.
- BLAZICH, F. A. Mineral nutrition and adventitious rooting. In: DAVIES, T. D.; HAISSIG, B. E.; SANKHLA, N. **Adventitious root formation in cuttings**. Portland: Dioscorides Press, p. 61-69. 1987.
- BONILLA, M.G.O. **Propagação in vitro, indução, curva de crescimento de calos e abordagem fitoquímica em *Rudgea viburnoides* (CHAM.) BENTH.** 2002. 262p. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BORCIONI,E.; NEGRELLE, R.R.B. Aplicação de análogo de brassinosteroide (BIOBRAS 16®) sobre a germinação e crescimento in vitro de embriões zigóticos e aclimatização de plântulas de bocaiuva. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.2, p.270-275, fev, 2012.

BROWN, D.C.W.; THORPE, T.A. Plant regeneration by organogenesis. In: VASIL, I.K. **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. Orlando: Academic. v.3, p.49-73. 1986.

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

CAO, H.; CHEN, S. Brassinosteroid-induced rice lamina joint inclination and its relation to índole-3-acetic acid and ethylene. **Plant Growth Regulation**, p. 189-196. 1995.

CATALÁ,C.; ROSE,J.K.C.; BENNETT,A.B. Auxin regulation and spatial localization o fendo-1,4-β-D-glucanase and xyloglucan endotransglycosylase in expanding tomato hypocotyls. **Plant Cell**, v.12, n.2. p.417-426. 1997.

CATUNDA, P.H.A; MARINHO, C.S.; GOMES, M.M.A.; CARVALHO, A.J.C. Brassinosteroide e substratos na aclimatização do abaxizeiro imperial. **Acta Sci Agron**. Maringá, v.30, n.3, p.345-352, 2008.

CORTES, P.A. et al. Brassinosteroid effects on the precocity and yield of cladodes of cactus pear (*Opuntia ficus-indica* (L) Mill.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.97, v. 1, p.65-73, 2003. Disponível em: . Acesso em: 14 abr. 2015. doi: 10.1016/S0304-4238(02)00080-8.

CLOUSE,S.D.; SASSE,J.M. Brassinosteroids: Essential regulators of plant growth and development. **Annual Rewiew of Plant Physiology. Plant Molecular Biology**, v.49, p.427-451. 1998.

COLL, M.T. et al. Polyhydroxyspirostanones as plant growth regulators: PCT Int. Appl. Co 7571/100, AOIN 45/ 00WO 97/13780, 780p, 1995.

CORTES, P.A. et al. Brassinosteroid effects on the precocity and yield of cladodes of cactus pear (*Opuntia ficus-indica* (L) Mill.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.97, v. 1, p.65-73, 2003.

COUVILLON, G.A. Rooting responses to diferent treatments. **Acta Horticulturae**. Georgia, v.227, p.187-196, 1988.

CUNHA, A. C. M. C. M.; PAIVA, H. N.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Papel da nutrição mineral na formação de raízes adventícias em plantas lenhosas. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 58, p. 35-47, 2009.

CÜCE, M.; BEKTAS, E.; SOKMEN, A. Micropropagation of *Vaccinium arctostaphylos* L. via lateral-bud culture. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**. 37: 40-44. 2013.

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

EMBRAPA. **Sistema de produção do mirtilo**. Novembro, 2007. Acesso em 03/03/2015. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mirtilo/SistemaProducaoMirtilo/nutricao.htm>.

ENGELMANN-SYLVESTRE, I.; ENGELMANN, F. Effect of 24-Epibrassinolide on Growth of *in vitro* Shoot Tips of Different Yam (*Dioscorea* Spp.) Species. **American Journal of Plant Sciences**, 4, 2271-2274, 2013.

EPAMIG. Pequenas frutas: tecnologias de produção. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v.33, n.268, p.27-37, mai-jun. 2012

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Estabelecimento *in vitro* de mirtilo a partir de segmentos nodais. **Scientia Agraria**, v.6, n.1-2, p.91-96, 2006.

EVANS, E.A.; BALLEEN, F.H. An Overview of US Blueberry Production, Trade, and Consumption, with Special Reference to Florida. 2014. UF/IFAS Extention. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/fe952>. Acesso em: 06 de fevereiro de 2016.

FACHINELLO, J.C. PASA, M.S.; SCHMTIZ, J.D.; BETEMPS, D.L. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, p. 109-120, 2011.

FEET-NETO, A.G.; FEET, J.P.; GOULART, L.W.V.; PASQUALI, G.; TERMIGNONI, R.R.; FERREIRA, A.G. Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globulus*. **Tree Physiology**, v.21, p. 457-464, 2001.

FONSECA, L.L.; OLIVEIRA, P.B. A planta de mirtilo – morfologia e fisiologia. Divulgação AGRO 556, n,2. 2007. 24p.

FROTA, H.M.; CARNEIRO, M.S.S.; ZARATÉ, R.M.L.; CAMPOS, F.A.P.; PEIXITO, M.J.A. Efeitos do BAP e AIA na indução e no crescimento *in vitro* de brotos de dez clones de palma forrageira. **Revista Ciência Agronômica**, v.35, out, p.279-283. 2004.

GARATE, J.L.M.; MAGALHÃES, G.C.de.; ROMEIRO, L.A.S. Síntese de análogo de brassinoesteróide a partir de vespertilina. **Química Nova**, vol.21, n.6. 1998.

GOMES, A. L. **Propagação clonal: princípios e particularidades**. Vila Real: Universidade de Trás-os- Montes e Alto Douro, 1987. 69 p. (Série Didática, Ciências Aplicadas, 1).

GOMES, M.M.A. Physiological effects related to brassinosteroid application in plants. In: HAYAT, S.; AHMAD, A. **Brassinosteroids: a class of plant hormone**. New York: Springer, p.119-142. 2011.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, p.183-260, 1998.

GREGORY, L.E. & MANDAVA, N.B., The activity and interaction of brassinolide and gibberelic acid in mung bean epicotyls, **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.54, n. 3, p. 239-243, 1982.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 7. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002.

HARDTKE, C.H.S., DORCEY, E., OSMONT, K.S., AND SIBOUT, R., Phytohormone Collaboration: Zooming in on Auxin–Brassinosteroid Interactions, **Trends Cell Biol.**, vol. 17, pp. 485–492. 2007.

HAUBRICK, L. L. & ASSMANN, S. M. 2006. Brassinosteroids and plant function: some clues, more puzzles. **Plant, Cell and Environment**, 29:446–457. 2006

HIGASHI, E.N.; SILVEIRA, R.L.V.A.; GONÇALVES, A.N. Nutritional monitoring and fertilization in clonal macro, mini and microgardens. **Forest nutrition and fertilization**. Piracicaba. IPEF, p.195-221, 2004.

HOFFMANN, A.; FACHINELLO, J.C.; SANTOS, A.M. Enraizamento de estacas de duas cultivares de mirtilo (*vaccinium ashei reade*) em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Agrociência**. Pelotas, v.1, n.1, p.7-11, 1995.

HOWELL, A.B. Update on health benefits of cranberry and blueberry. **Acta Horticulturae** n.810, p.779–784, 2009.

IBRAF. Instituto Brasileiro de Fruticultura. Estatísticas – Frutas frescas.. Disponível em: http://www.ibraf.org.br/estatisticas/Exporta%C3%A7%C3%A3o/Comparativo_das_Exporta%C3%A7%C3%B5es_Brasileiras_de_Frutas_frescas_2010-2009.pdf. Acesso em: março 2015.

JACOB, J.K.; TIWARI, K.; CORREA-BETANZO, J.; MISRAN, A.; CHANDRASEKARAN, R.; PALIYATH, G. Biochemical basis for functional ingredient design from fruits. **Annual Review of Food Science and Technology**, 3, p.79-104, 2012.

JAAKOLA, L.; TOLVANEN, A.; LAINE, K.; HOHTOLA, A. Effect of N-isopentenyladenine concentration on growth initiation in vitro and rooting of bilberry and lingonberry microshoots. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.66, p.73-77, 2001.

KALT, W.; JOSEPH, J.A.; SHUKITT-HALE, B. Blueberries and human health: a review of current research. **Journal of the American Pomological Society**, v.61, p.151-160, 2007.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. 2 Ed. Guanabara Koogan, 2008. 472p.

KUBOTA, C.; KOZAI, T. Growth and net photosynthetic rate of *Solanum tuberosum* in vitro under forced and natural ventilation. **HortScience**, Alexandria, v.27, p. 1312-1314, 1992.

LARKINS, B.A.; VASIL, I.K. Cellular and molecular biology of plant seed development. In: Kaminer, M. **Biologia Plantarum**, 43(2):238. 2000.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendro* spp. **HortScience**, v.15, n.3, p.416, 1981.

MALABADI, R.B.; NATARAJA, K. Brassinosteroids influences *in vitro* regeneration using shoot tip sections of *Cymbidium elegans* Lindl. **Asian Journal of Plant Sciences**. 6 (2), p.308-313. 2007.

MALAVASI, U. C. Macropropagação vegetativa de coníferas: perspectivas biológicas e operacionais. **Floresta e Ambiente**, v. 1, n. 1, p. 131-135, 1994.

MAZORRA, L.M.; NÚÑEZ, M. Estado actual sobre el conocimiento de la biosíntesis y los mecanismos moleculares de acción de los brasinoesteroides en las plantas. **Cultivos Tropicales**, Cuba, v.29, n.1, p.91-105, 2008.

MERCIER, H. Auxinas. In: KERBAUY, G.B. (Ed.). **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 215-245. 2004.

METIVIER, P.S.R. et al. *In vitro* rooting of microshoots of *Cotinus coggygria* Mill, a woody ornamental plant. **In vitro cellular development biology plant**, New York.43, p. 119-123, 2007.

MINAMO, L.N.; MACHARIA, C.M.; WASSILWA, L.A. Micropropagation a used tool for rapid multiplication of oil palm (*Elaeis guionensis*) hybrids in Kenya. In: KAR I BIENAL SCIENTIFIC CONFERENCE, Kenya. Anais, Kenya. 2010.

MORILLON,R.; CATTEROU,M.; SANGWAN,R.S.; SANGWAN,B.S.; LASSALLES,J.P. Brassinolide may controle aquaporin activies in *Arabidopsis thaliana*. **Plant**, v.212, n.2. p.199-204. 2001.

MOKOTEDI, M.E.O.; WATT, M.P.; PAMMENTER, N.W.; BLAKEWAY, F.C. In vitro rooting and subsequeute survival of two clones of cold-tolerant *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus nitens* Hibrid. **Hortscience**, v.35, n.6, p.1163-1165, 2000.

MÜSSIG, C. et al. Brassinosteroids promote root growth in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Washington, v.133, n.3, p.1261- 1271, 2003.

NICOLI, P.M.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R.C.; SANTANA, J.R.F.; SILVA, L.C.; SILVA, D.P.C.; PORTO, J.M.P. Ajuste do processo de micropropagação do barbatimão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.3, p.685-689, mai-jun, 2008.

NÚÑEZ, M. et. al. Influencia de la 24-epibrasinólida y un análogo espiroestanoide de brasinoesteroides en el crecimiento de plántulas de dos variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) en medio salino. **Cultivos Tropicales**, Cuba, v.27, n.1, p.75-82, 2006.

ONAY, A. Micropropagation of pistachio from mature trees. **Plant Cell and Organ Culture**, v.60, p.159-162, 2000.

PANAIA, M. et al. Micropropagation on the critically endangered Western Australian species, *Symonanthus bancroftii* (F. Muell.) L. Haegi (Solanaceae). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.63, p.23-9, 2000.

PATEL, S. Blueberry as functional food and dietary supplement: The natural way to ensure holistic health. *Med. J. Nutrition Metab.* **7**(2): 133-143. 2014.

PATI, P.K. et al. *In vitro* propagation of rose: a review. **Biotechnology Advances**, Seul, v. 24, p. 94-114, 2006.

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

PERES, L.E.P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas in vitro. **Biociência e Desenvolvimento**, Brasília, (25):44-48.2002

PRAXEDES, S.C.; SILVA, A.F.; FIGUEIREDO, F.L.B.; FIGUEIREDO, M.L.; CÂMARA, F.A.A.; OLIVEIRA, O.F. Estiolamento in vitro do abacaxizeiro Pérola em presença de AIA e ANA. **Caatinga**, Mossoró, RN, n.14, p.13-15, 2001.

QUISEN, R.C.; ANGELO, P.C.S. Manual de procedimento do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental. Dezembro, 2008.

RADMANN, E.B.; FACHINELLO, J.C.; PETERS, J.A. Efeito de auxinas e condições de cultivo no enraizamento in vitro de porta enxerto de macieira "M-9". **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.3, p.624-628. 2002.

RISTOW, N.C.; ANTUNES, L.E.C.; SHUCH, M.W.; TREVISAN, R.; CARPENEDO, S. Crescimento de plantas de mirtilo a partir de mudas micropropagadas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, p. 210-215, 2009.

ROA, G.N. El poder de las frutas en la medicina natural y frutas rojas. **Medicina natural**. México, v.1, n.2, 2005. 46p.

ROUT, G.R. et al. Biotechnology of the rose: a review of recent progress. **Scientia Horticulturae**. v.81, p. 201-228, 1999.

SANTOS, A.M. Situação e perspectivas do mirtilo no Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 2; ENCONTRO DE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS, 1., 2004, Pelotas. **Palestras e Resumos...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. p.281-284. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 124).

SANTOS, C.E. et al. **Anuário brasileiro da fruticultura 2013**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2013. 136 p.

SCHAEFER, S. et al. Brassinosteroid-driven enhancement of the in vitro multiplication rate for the marubakaido apple rootstock [*Malus prunifolia* (Willd.) Borkh]. **Plant Cell Rep.** 20. p. 1093-1097. 2002.

SCHUCH, M. W.; De ROSSI, A.; DAMIANI, C. R.; SOARES, G. C. AIB e substrato na produção de mudas de mirtilo cv. "Climax" através de microestaquia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 5, p. 1446-1449, 2007.

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

SEAB. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. DERAL. Departamento de Economia Rural. Fruticultura. Maio, 2015. Disponível em: < http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/fruticultura_2014_15.pdf>. Acesso em: outubro, 2015.

SHAHSAVARI, A.A.; MAHERAN, A.; SITI NOR AKMAR, A.; HANAFI, M.M. The effect of plant growth regulators on optimization of tissue culture system in Malaysian upland rice. **African Journal of Biotechnology**, vol 9, p. 2089-2094, April, 2010.

SHARPE, R.H. **Consultant's Report**. Pelotas, IICA/EMBRAPA-UEPAE de Cascata, 11p., 1980.

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

SILVA, F. de A.S; AZEVEDI, C.A.V de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SOUZA DE, V.R., PEREIRA, P.A.P., DA SILVA, T.L.T., DE OLIVEIRA LIMA, L.C., PIO, R., QUEIROZ, F.. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. **Food Chem.** 156: 362-368. 2014.

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

- SMET, I.; VANNESTE, S.; INZÉ, D.; BEECKMAN, T. Lateral root initiation or the birth of a new meristema. **Plant Molecular Biology**, v.60, n.6, p. 871-887, 2006.
- SOUZA, A.L.K. et al. Desempenho de mudas de mirtilo obtidas por micropropagação ou estaquia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.8, p.868-874, ago, 2011.
- STRIK, B.C.; CLARK, J.R.; FINN, C.E.; BANADOS, M.P. Worldwide Blackberry Production. **HortTechnology**. Alexandria, v.17, n.2, p. 205-213, 2007.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.
- TANAKA, K.; NAKAMURA, Y.; ASAMI, T.; YOSHIDA, S.; MATSUO, T.; OKAMOTO, S. Physiological roles of brassinosteroids in early growth of Arabidopsis: Brassinosteroids have a synergistic relationship with gibberellin as well as auxin in light-grown hypocotyl elongation. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v.22, p.259-271, 2003.
- TORRES, A.C.; TEIXEIRA, S.L.; POZZER, L. (1998) Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa, 133-145.
- TREVISAN, R.; ANTUNES, L.E.C.; GONÇALVES, D. G. propagação de plantas frutíferas nativas. In: RASEIRA, M. do C.B. et al, **Espécies frutíferas nativas do sul do Brasil**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, documento n.129, 2004. p.47-70.
- VANNESTE, S.; INZÉ, D.; BEECKMAN, T. Auxin fuels the cell cycle engine during lateral root initiation. **Cell cycle control and plant development: Annual Reviews**, v. 32. Oxford: Blackwell Pub. p. 187-202. 2007.
- VIEIRA, R.L.; LEITE, G.B.; WAMSER, A.F. Efeito de substratos porosos no enraizamento *in vitro* do porta enxerto de macieira M-9 *Malus pumilla*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.29, n.1, abr. 2007.
- VILLA, F. et al. Multiplicação *in vitro* da amoreira-preta 'Ebanó' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 582-589, 2005.
- WANG, Q.; ANDERSEN, A. S. Propagation of Hibiscus rosasinensis: relations between stock plant cultivar, age, environment and growth regulator treatments. **Acta Horticulturae**, v. 251, p. 289-309, 1989.
- WENDLING, I.; DUTRA, L. F. Produção de mudas de eucalipto por estaquia e miniestaquia. In: WENDLING, I.; DUTRA, L. F. Produção de mudas de eucalipto Colombo: **Embrapa Florestas**, 2010. cap.2, p. 50-80.
- WILLIAMSON, J. G.; MILLER, E.P. Effects of fertilizer rate and form on vegetative growth and yield of southern highbush blueberry in pine bark culture. **HortTechnology**, Alexandria, v. 19, p. 152-157, 2009.

- YOPP, J.H.; MANDAVA, N.B.; SASSE, J.M. Brassinolide, a growth promoting steroidal lactone. Activity in selected auxin bioassays. **Plant Physiology**, v.53, p. 445-452. 1981.
- ZULLO, M.A.T.; ADAM, G. Brassinosteroid phytohormones- structure, bioactivity and applications. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, (14). p 143-181. 2002.