

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

JESSÉ NEVES DOS SANTOS

BORO NO CRESCIMENTO *IN VITRO* E NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO
MIRTILEIRO

PONTA GROSSA – PR

2020

JESSÉ NEVES DOS SANTOS

BORO NO CRESCIMENTO *IN VITRO* E NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO
MIRTILEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, para obtenção do título de mestre.
Área de Concentração: Agricultura. Linha de Pesquisa: Fisiologia, Melhoramento e Manejo de Culturas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antônio Ayub

PONTA GROSSA – PR

2020

Ficha Catalográfica

Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

S237 Santos, Jessé Neves dos
Boro no crescimento *in vitro* e na atividade enzimática do mirtilheiro / Jessé
Neves dos Santos. Ponta Grossa, 2020.
53 f.

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub.

1. Vaccinium ashei Reade. 2. Ácido bórico. 3. Propagação de plantas. I.
Ayub, Ricardo Antonio. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Agricultura.
III.T.

CDD: 634



Universidade
Estadual de
Ponta Grossa

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

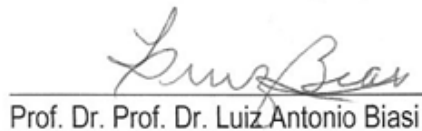
Título da Dissertação: "Boro no crescimento *in vitro* e na atividade enzimática do mirtilheiro".

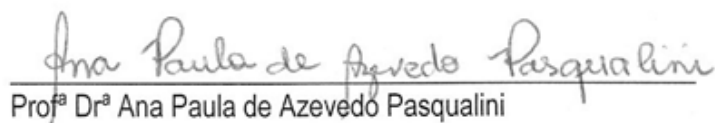
Nome: **Jessé Neves dos Santos**

Orientador: **Ricardo Antonio Ayub**

Aprovado pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub


Prof. Dr. Prof. Dr. Luiz Antonio Biasi


Prof.^a Dr.^a Ana Paula de Azevedo Pasqualini

À Deus, por sempre estar comigo e dar toda a força para prosseguir.
E à minha família, pelo amor, carinho e apoio, para chegar até aqui.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela força, consolo e ânimo nos momentos difíceis. Agradeço pelo direcionamento em todo o momento e por colocar as pessoas certas em minha vida, para que este dia chegasse.

À minha noiva Luanna, por sempre estar comigo, por me amar, incentivar, me aproximar de Deus, sempre ter uma palavra para os momentos difíceis e estar sempre ao meu lado. Ao meu pai Aran e à minha mãe Joelma, por sempre estarem presentes, pela educação, amor, suporte, conselhos e apoio. À minha irmã Jessyka e meu cunhado Leandro, por sempre apoiarem as minhas decisões e participarem de minhas conquistas. Enfim, a toda minha família e familiares, por serem benção em minha vida.

Aos professores que tive em toda essa jornada, por serem responsáveis pelo meu crescimento intelectual e pessoal. Ao Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub, pela orientação e suporte, que possibilitou a execução de muitas pesquisas e este trabalho. Agradeço também pelos ensinamentos, conselhos e exemplo. Agradeço ao Prof. Dr. Luiz Antonio Biasi e a Prof^a. Dr^a. Ana Paula de Azevedo Pasqualini por suas contribuições enriquecedoras ao meu trabalho.

A todos os meus amigos presentes nesta etapa, em especial a Keren Maciel, Kamila Los, Camila Audrey, Isabela Pessenti, Leticia Moraes, Daniela Moraes, Marília Stroka, Luane Bosetto e Wilson Padilha, que sempre me aconselharam e auxiliaram nos experimentos e análises, e por fazerem parte do meu crescimento pessoal. E a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para minha evolução.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG e a CAPES pelos auxílios financeiros e estrutura para a realização desta pesquisa.

Pois dele, por ele e para ele são todas as coisas. A ele seja a glória para sempre! Amém.

Romanos 11:36

RESUMO

O mirtilo é uma pequena fruta rica em antioxidantes, fato que tem atraído consumidores nos últimos anos. A produção de mudas pode ser feita pela micropropagação, gerando plantas de alta qualidade fitossanitária. Esta técnica utiliza como substrato diferentes composições nutricionais de meio de cultura, mas com mesma concentração de boro. Sob diferentes concentrações deste nutriente pode ocorrer alterações enzimáticas, visto sua essencialidade no metabolismo das plantas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do boro no crescimento *in vitro* de mirtilheiro e nas alterações enzimáticas. Foi utilizado o meio WPM, suplementado com sacarose (20 g L⁻¹), mio-inositol (0,1 g L⁻¹) e ágar (6,0 g L⁻¹). Para todos os experimentos foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado. No primeiro experimento de multiplicação *in vitro* (avaliado aos 90 dias) foi utilizado o esquema fatorial 3x4, com três concentrações de 2-isopentalinadenina - 2iP (0,0, 2,5 e 5,0 mg L⁻¹) e quatro concentrações de ácido bórico (0,0, 3,1, 6,2 e 9,3 mg L⁻¹). Foram realizados outros dois experimentos para avaliar o efeito de diferentes concentrações de boro (0,0, 3,1, 6,2 e 9,3 mg L⁻¹), um sob a influencia de 2iP (5,0 mg L⁻¹) e outro sob influencia de ácido indolbutírico - AIB (2,5 mg L⁻¹), ambos avaliados aos 180 dias e em esquema unifatorial. Para todos os experimentos foram utilizados 4 repetições compostas por 5 explantes. Foi avaliado o comprimento da parte aérea e da maior raiz, número de brotações e folhas, massa fresca, porcentagem de enraizamento e atividade das enzimas polifenol oxidase (PPO), fenilalanina amônia-liase (PAL), peroxidase (POD) e ácido indolacético oxidase (AIAO). No primeiro experimento observou-se que 6,2 mg L⁻¹ de boro gerou a maior formação de brotações (18,4), assim como, 5,0 mg L⁻¹ de 2iP (25,5). Na interação entre estas concentrações de boro e 2iP, houve a maior atividade da enzima POD e PPO, que são responsáveis por síntese de compostos como a lignina. No segundo experimento, em condição de deficiência de boro, observou-se maior quantidade de ápices necrosados (9), folhas vermelhas (31) e alta atividade das enzimas PAL, AIAO e POD. O crescimento das raízes e enraizamento foram inibidos, mostrando a essencialidade do boro nesta fase de desenvolvimento. Em meio sem auxina, a AIAO se correlacionou negativamente com o crescimento das raízes enquanto que em meio contendo o AIB a correlação foi positiva. Assim, conclui-se que 6,2 mg L⁻¹ de boro e 5,0 mg L⁻¹ de 2iP gera os melhores resultados para a multiplicação de mirtilheiro, em condições de deficiência aumenta a atividade enzimática e o enraizamento de mirtilheiro é dependente de boro e da regulação da enzima AIAO.

Palavras-chave: *Vaccinium ashei* Reade; Ácido bórico; Propagação de plantas.

ABSTRACT

The blueberry is a small fruit rich in antioxidants which has increased its consumption in the last few years. The plantlets production can be made through micropropagation, resulting in plants with high phytosanitary quality. This technique uses as substrate different nutritional compositions in the culture medium, but with the same boron concentration. Under different concentrations of this nutrient it may occur enzymatic alterations, because of its essentiality in the plant's metabolism. Thus, the purpose of this work was to study the effect of boron in the *in vitro* growth of the blueberry and in the enzymatic alterations. It was used the WPM supplemented with sucrose (20 g L⁻¹), myo-inositol (0,01 g L⁻¹) and agar (6,0 g L⁻¹). For every experiment the design was completely randomized. In the first experiment of *in vitro* multiplication (evaluated at 90 days) the factorial scheme was 3x4, with 3 concentrations of 2-isopentalinadenine - 2iP (0,0, 2,5 and 5,0 mg L⁻¹) and 4 concentrations of boric acid (0,0, 3,1, 6,2 and 9,3 mg L⁻¹). Another two experiments were made to evaluate the effect of different concentrations of boron (0,0, 3,1, 6,2 and 9,3 mg L⁻¹), one under the influence of 2iP (5,0 mg L⁻¹) and another one under the high concentration of indolbutyric acid - IBA (2,5 mg L⁻¹), both evaluated at 180 days and in a unifactorial scheme. For all the experiments it was used 4 repetitions composed by 5 explants. It was evaluated the length of the aerial part and of the largest root, the number of the shoots and leaves, fresh weight, rooting percentage and the activity of the enzymes polyphenol oxidase (PPO), phenylalanine ammonia-lyase (PAL), peroxidase (POD) and indoleacetic acid oxidase (IAAO). In the first experiment it was noticed that the 6,2 mg L⁻¹ of boron generated the biggest shoot formation (18,4), as well as 5,0 mg L⁻¹ of 2iP (25,5). In the interaction between these concentrations of boron and 2iP, there was the biggest activity of the POD and PPO enzymes, which are responsible for the synthesis of compounds such as lignin. On the second experiment, in the conditions of boron deficit, it was observed bigger quantity of shoot-tip necrosis (9), red leaves (31) and high activity of the PAL, IAAO and POD enzymes. The roots growth and the rooting were inhibited, showing how essential boron is in this phase of development. In an auxin-free medium the IAAO had a negative correlation with the root's growth, meanwhile in the medium with IBA the correlation with the rooting was positive. Therefore, it was concluded that the boron concentration of 6,2 mg L⁻¹ and the 2iP concentration of 5,0 mg L⁻¹ had better results for the multiplication of the blueberry, in deficiency conditions occurs the increase of enzymatic activity and the blueberry rooting depends of the boron and the IAAO.

Key words: *Vaccinium ashei* Reade; Boric acid; Plant propagation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Influência do ácido bórico e 2iP sobre o diâmetro do calo aos 90 dias	24
Figura 2	- Influência do ácido bórico e 2iP sobre o desenvolvimento da parte aérea de mirtilheiro aos 90 dias de cultivo <i>in vitro</i>	25
Figura 3	- Plantas de mirtilheiro cultivadas por 90 dias em diferentes concentrações	26
Figura 4	- Influência do ácido bórico e 2iP na atividade enzimática foliar aos 90 dias de cultivo <i>in vitro</i>	28
Figura 5	- Influência do ácido bórico na parte aérea de mirtilheiro cultivado por 180 dias em meio contendo 5,0 mg L ⁻¹ 2iP.....	29
Figura 6	- Plantas de mirtilheiro cultivadas por 180 dias em diferentes concentrações de ácido bórico em meio contendo 5,0 mg L ⁻¹ de 2ip.	29
Figura 7	- Influência do ácido bórico sobre o sistema radicular de mirtilheiro cultivado por 180 dias em meio contendo 5,0 mg L ⁻¹ 2iP.....	30
Figura 8	- Influência do ácido bórico na atividade enzimática do calo de plantas cultivadas em meio contendo 5,0 mg L ⁻¹ 2iP.	31
Figura 9	- Influência do ácido bórico na atividade enzimática foliar de plantas cultivadas em meio contendo 5,0 mg L ⁻¹ 2iP.....	31
Figura 10	- Influência do ácido bórico no crescimento de mirtilheiro cultivado por 180 dias em meio contendo 2,5 mg L ⁻¹ de AIB.....	34
Figura 11	- Plantas de mirtilheiro cultivadas por 180 dias em diferentes concentrações de ácido bórico em meio de cultura contendo 2,5 mg L ⁻¹ de AIB.	35
Figura 12	- Influência do ácido bórico na atividade enzimática do calo de plantas cultivadas por 180 dias em meio contendo 2,5 mg L ⁻¹ de AIB.	36
Figura 13	- Influência do ácido bórico na atividade enzimática da folha de plantas cultivadas por 180 dias em meio contendo 2,5 mg L ⁻¹ de AIB.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Correlação de Pearson entre as variáveis do experimento I de multiplicação <i>in vitro</i>	27
Tabela 2 - Correlação de Pearson para as variáveis do experimento II de multiplicação <i>in vitro</i>	33
Tabela 3 - Pontos críticos obtidos através da equação de regressão para as variáveis com R^2 acima de 0,95, referentes ao experimento I, II e III.	37
Tabela 4 - Correlação de Pearson para as variáveis do experimento III de enraizamento <i>in vitro</i>	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 Mirtileiro	14
3.2 Micropropagação de mirtileiro.....	14
3.3 Nutrição mineral na micropropagação.....	16
3.4 Boro: funções, sintomas de deficiência e influência na atividade enzimática.	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Material vegetal e meio de cultura.	20
4.2 Experimento I – Boro e citocinina na multiplicação de mirtileiro.	20
4.3 Experimento II – Boro na multiplicação de mirtileiro aos 180 dias de cultivo.	20
4.4 Experimento III – Boro no enraizamento de mirtileiro aos 180 dias de cultivo.	21
4.5 Sala de cultivo	21
4.6 Análise química.....	21
4.7 Análise bioquímica.....	21
4.8 Análise estatística	23
5 RESULTADOS.....	24
5.1 Experimento I – Boro e citocinina na multiplicação de mirtileiro.	24
5.2 Experimento II – Boro na multiplicação de mirtileiro aos 180 dias de cultivo.	28
5.3 Experimento III – Boro no enraizamento de mirtileiro aos 180 dias de cultivo.	34
6 DISCUSSÃO.....	39
7 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS.....	43
APÊNDICE A – VARIÁVEIS NÃO SIGNIFICATIVAS.....	51
ANEXO A - COMPARATIVO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO MS E WPM.....	53

1 INTRODUÇÃO

O mirtilheiro é nativo da Europa e América do Norte, sendo pertencente à família Ericaceae e ao gênero *Vaccinium* (ANTUNES, 2006; FACHINELLO, 2008). Os frutos de mirtilo apresentam alta concentração de compostos antioxidantes, o que tem atraído a população para seu consumo, visto sua importância como, por exemplo, o combate ao envelhecimento precoce e diabetes (MARTINEAU *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2014). Devido essas propriedades, a maior procura pela fruta tem aumentado, tornando o mercado de mirtilo promissor no Brasil. Assim, o aprimoramento de técnicas de produção e o conhecimento fisiológico a respeito da espécie são necessários.

A micropropagação é uma técnica utilizada para a obtenção de plantas com alta qualidade fitossanitária. Esta técnica é dividida em algumas etapas fundamentais, como o estabelecimento *in vitro*, multiplicação, enraizamento e aclimatização (AHLOOWALIA *et al.*, 2004; MURASHIGE, 1974). Na etapa da multiplicação é utilizado meio de cultura suplementado com citocinina, que atua na diferenciação e multiplicação celular, aumentando a quantidade de brotações e, conseqüentemente número de plantas formadas. Para o mirtilheiro algumas citocininas que podem ser utilizadas são Zeatina e o 2iP (SCHUCH *et al.*, 2008; ABREU *et al.*, 2014; CUCE; SOKMEN, 2017; FAN *et al.*, 2017). As citocininas agem tanto na parte aérea como no sistema radicular através de alguns receptores como o CRE1, AHK2 e AHK3 (INOUE *et al.*, 2001; LOPES-BUCIO *et al.*, 2007). Após a percepção da citocinina ocorre a indução da formação de brotações, como resultado da expressão do gene ESR1 e 2 identificado em *Arabidopsis thaliana* (MATSUO *et al.*, 2011).

Já na etapa de enraizamento é necessário aumentar os níveis de AIA interno (MENG *et al.* 2019), sendo então adicionada uma auxina ao meio de cultura, geralmente o AIB para mirtilheiro (CUCE *et al.*, 2013; CUCE; SOKMEN, 2015; CUCE; SOKMEN, 2017; FAN *et al.*, 2017). A principal auxina presente nas plantas é o ácido indolacético (AIA), regulado pela enzima ácido indolacético oxidase (AIAO). Alguns trabalhos têm mostrado que a maior atividade desta enzima esta associada aos maiores níveis de AIA e ao menor enraizamento (FU *et al.*, 2011; ELMONGY *et al.*, 2018; MENG *et al.*, 2019).

O principal meio de cultura utilizado para mirtilheiro é o Woody Plant Medium (WPM) idealizado para espécies lenhosas como bétula, rododendro, rosa e carvalho (LLOYD; MCCOWN, 1980), sendo indicado por muitos autores (SILVA *et al.*, 2006; CUCE *et al.*, 2013; CUCE; SOKMEN, 2015; CUCE; SOKMEN, 2017; PELIZZA *et al.*, 2013). Este meio apresenta menor concentração de alguns nutrientes quando comparado com outros meios de

cultura como o MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962), porém com a mesma concentração de boro (6,2 mg L⁻¹).

O boro é um micronutriente essencial que faz parte da parede celular nas ligações cruzadas de moléculas de Rhamnogalacturonan II (RGII) (O'NEILL *et al.*, 2004, CHORMOVA; FRY, 2016), atua na divisão e diferenciação celular (ABREU *et al.*, 2014; POZA - VIEJO *et al.*, 2018), translocação de açúcares e síntese de proteínas (LANDI *et al.*, 2012). Além disso, participa da formação das raízes por influenciar o metabolismo hormonal da planta, como a regulação do AIA interno. As raízes de mirtilheiro são isentas de pelos radiculares (BABA *et al.*, 2018), indicando que a nutrição deve ser adequada para que ocorra o melhor crescimento das raízes e assim melhor aproveitamento dos nutrientes.

Quando há deficiência de nutrientes no meio de cultura, pode ocorrer a maior ou menor atividade de enzimas como a fenilalanina amônia-liase (PAL), polifenol oxidase (PPO), peroxidase (POD) e AIAO. A PAL é uma enzima que inicia o ciclo dos fenilpropanoides formando compostos fenólicos, como a lignina (LIN e NORTHCOTE 1990; SU *et al.*, 2019). A PPO é uma enzima responsável pela degradação de compostos fenólicos formando quinonas (CAKMAK e ROMHELD, 1997) que podem causar a oxidação fenólica de explantes. A POD regula os níveis de peróxido de hidrogênio, faz parte da biossíntese de lignina e, além disso, juntamente com a AIAO participa da inativação do AIA, para manter níveis ótimos na planta (ROUT, 2006; WANG *et al.*, 2018).

Para mirtilheiro já foi verificado que o boro aumentou o número de gemas florais, reduziu danos causados pelo frio do inverno (EATON *et al.*, 2007) e aumentou a quantidade de pectina em frutos quando aplicado via foliar (EICHHOLZ *et al.*, 2011). Na produção de mudas, este nutriente aumentou a biomassa vegetal e induziu a produção de compostos fenólicos, como ácido clorogênico, ácido ferúlico, miricetina, quercetina e glicosídeo rutina (MERIÑO-GERGICHEVICH *et al.*, 2017; MERIÑO-GERGICHEVICH *et al.*, 2019). Porém, na micropropagação de mirtilheiro e sua função sobre a atividade enzimática os estudos são inexistentes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do boro no crescimento *in vitro* de mirtilheiro e sua influência nas alterações bioquímicas da planta.

2.2 Objetivos específicos

- (i) Estudar o efeito do 2iP e ácido bórico na multiplicação *in vitro* e sua relação com a atividade enzimática aos 90 dias de cultivo *in vitro*.
- (ii) Observar os efeitos bioquímicos associados à deficiência de boro aos 180 dias de cultivo e o crescimento das plantas.
- (iii) Analisar a influência do ácido boro no crescimento e nas atividades enzimáticas de plantas de mirtilheiro submetidas á alta concentração de AIB.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Mirtileiro

O mirtileiro é uma frutífera originada da Europa, Estados Unidos e Canadá, de porte arbustivo ou rasteiro, e hábito caducifólio. Pertence à família Ericaceae e ao gênero *Vaccinium*, sendo distribuído em alguns grupos de acordo com suas exigências climáticas (ANTUNES, 2006; FACHINELLO, 2008). Esses grupos são divididos em Lowbush (*Vaccinium angustifolium*) que necessita de menos de 1000 horas de frio para que ocorra o máximo florescimento; Highbush (*Vaccinium angustifolium*), subdividido em Northern highbush (800 – 1000 horas de frio), Southern highbush, (cerca de 550 horas) e Intermediate highbush (de 400 a 800 horas de frio); e, Rabbiteye (*Vaccinium ashei* Reade), que precisa de até 600 horas de frio (RETAMALES; HANCOCK, 2011).

De acordo com os dados da FAO (2017) a produção de mirtilo no mundo foi de 596 813 toneladas produzidas em uma área correspondente a 109 541 ha, sem incluir o Chile e Argentina, que são grandes produtores. O Chile se destaca por ser o maior produtor de mirtilo da América Latina e o segundo do mundo, sendo que as variedades cultivadas compreendem o grupo Highbush (RETAMALES *et al.*, 2014; CORDES *et al.*, 2016). No Brasil estima-se que a área plantada de mirtileiro corresponda a 400 ha, principalmente em pequenas propriedades localizadas nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais (CANTUARIAS-AVILÉS *et al.*, 2014). Sendo cultivado principalmente, cultivares pertencentes ao grupo Rabbiteye, devido à baixa exigência em frio (ANTUNES, 2006; HERTER; WREGGE, 2006; FACHINELLO, 2008).

O mirtilo possui grande quantidade de compostos antioxidantes, como por exemplo, antocianinas, que tem se mostrado eficiente no combate à diabetes, redução da predisposição das pessoas ao desenvolvimento do câncer e retardo do envelhecimento precoce (SMITH *et al.*, 2000; MARTINEAU *et al.*, 2006; FACHINELLO, 2008; FARIA, *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2014). Além disso, já foi encontrado em espécies dos grupos Southern Highbush e Intermediate Highbush a presença de iridoides, que são outros compostos bioativos que também auxiliam na prevenção de doenças (LEISNER, *et al.*, 2017).

3.2 Micropropagação de mirtileiro

A obtenção de novas plantas de mirtileiro pode ocorrer por sementes e por propagação vegetativa, porém, pela baixa porcentagem de germinação e variabilidade

genética utilizar as sementes para cultivo comercial é inviável, sendo restrito apenas para obtenção de novas cultivares (FACHINELLO, 2008; PASQUALINI *et al.*, 2016). Assim, a propagação vegetativa é recomendada, pois permite obter clones de uma planta matriz, sendo selecionadas, através de rebentos, estaquia, miniestaquia e micropropagação (CAMPOS *et al.*, 2005; ANTUNES *et al.*, 2006; SCHUCH *et al.*, 2007; FISHER *et al.*, 2008, AYUB *et al.*, 2017).

A micropropagação forma plantas inteiras e livres de microrganismos (CARVALHO *et al.*, 2006). Esta técnica se inicia com coleta de um material vegetal, que compreende uma planta matriz, com características desejadas para serem reproduzidas em um pomar. Esse material passa por um processo de assepsia, utilizando soluções esterilizantes. As plantas estabelecidas são multiplicadas e enraizadas, cada qual em um meio específico, e por fim ocorre a aclimatização, para a adaptação das plantas novamente no ambiente natural (AHLOOWALIA *et al.*, 2004; MURASHIGE, 1974).

Além das plantas de mirtilheiro micropropagadas apresentarem qualidade fitossanitária superior, podem apresentar melhor desempenho inicial no campo, quando comparadas com as plantas obtidas por estaquia. Marino *et al.* (2014) utilizando a micropropagação, obtiveram maior quantidade de brotações e rebentos para as cultivares Emerald, Jewel e Primadonna, bem como melhor peso seco das plantas das cultivares Emerald e Jewel. Já Souza *et al.* (2011), verificaram que as plantas das cultivares Woodard, Bluegem e Briteblue tiveram maior número de brotações do que as plantas obtidas por estaquia, sendo que não afetou o desenvolvimento e qualidade de frutos. Esse melhor estabelecimento das plantas em campo é vantajoso, pois as plantas podem entrar em produção precocemente, resultando em um retorno econômico mais rápido (DEBNATH, 2012).

Na micropropagação de mirtilheiro o meio WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) é o mais utilizado, sendo citado em muitos trabalhos (SILVA *et al.*, 2006; PELIZZA *et al.*, 2013; CUCE; SOKMEN, 2017) e a suplementação com reguladores de crescimento geralmente é necessária. Dentre as citocininas, a zeatina apresentou os melhores resultados para a espécie *Vaccinium uliginosum*, utilizando 2,0 mg L⁻¹ de zeatina, 0,1 mg L⁻¹ de AIB e 0,2 mg L⁻¹ de ácido giberélico (CUCE; SOKMEN, 2017); e para a cultivar Pink Lemonade (*Vaccinium ashei* Reade), utilizando 9,12 µM de Zeatina e 0,05 µM de ácido naftalenoacético (FAN *et al.*, 2017). Schuch *et al.* (2008) observaram que para a cultivar Climax, 7,5 mg L⁻¹ de zeatina favoreceu a formação de brotações, porém menores quando comparadas com as plantas crescidas em meio com 2iP.

Já no enraizamento de mirtilheiro tem-se verificado que o uso de AIB é mais benéfico que o AIA (FAN *et al.*, 2017). Como observado em alguns trabalhos, onde a concentração de 0,5 mg L⁻¹ de AIB juntamente com 1,0 mg L⁻¹ de carvão ativado, utilizando meio WPM, trouxeram os melhores resultados para o enraizamento (CUCE *et al.*, 2013; CUCE; SOKMEN, 2015; CUCE; SOKMEN, 2017).

3.3 Nutrição mineral na micropropagação

A nutrição mineral de plantas é essencial para aprimorar o cultivo, bem como atingir altas produtividades. Os nutrientes minerais são elementos obtidos pelas plantas da solução do solo, na forma de íons inorgânicos ou não, como é o caso do ácido bórico (TAIZ *et al.*, 2017). De acordo com Barker e Pilbeam (2007), nutriente vegetal é o elemento químico requerido pelas plantas para que elas possam crescer e se reproduzir, devendo se enquadrar em alguns critérios, como fazer parte da estrutura ou metabolismo das plantas, na sua ausência causa anormalidades ou impede que a planta complete seu ciclo de vida, não pode ser substituído totalmente por outro elemento e é necessário para todas as plantas (BARKER; PILBEAM, 2007; TAIZ *et al.*, 2017).

Tendo em vista a importância da nutrição mineral, na micropropagação utilizam-se diferentes meios de culturas, dentre eles, o mais utilizado é o meio MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962), mas para a cultura do mirtilheiro é mais indicado o Woody Plant Medium (WPM) (LLOYD; MCCOWN, 1980). Alguns autores já empregaram esse meio para espécies do gênero *Eucalyptus*, (DUTRA *et al.*, 2009; BRONDAMI *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2017), *Apuleia leocarpa* (LENCINA *et al.*, 2018) e *Quercus ilex* (MARTINEZ *et al.*, 2017). O uso do meio WPM é mais favorável para espécies lenhosas, pois quando comparado com o meio MS (ANEXO A), apresenta menor concentração de nutrientes (DUTRA *et al.*, 2009), em relação ao nitrogênio e potássio (OLIVEIRA *et al.*, 2017), que influencia no potencial osmótico (BRONDAMI *et al.*, 2012).

Tendo em vista que a necessidade nutricional de cada espécie é diferente, muitos autores adaptaram os meios de culturas para várias culturas. Para a micropropagação de *Pimpinella anisum*, os melhores resultados foram obtidos com o meio MS em 75 e 100% da concentração dos sais (TAMBOSI; ROGGE-RENNER, 2010), enquanto que, para *Physalis peruviana* (RODRIGUES *et al.*, 2013) e *Desmodium incanum* (SCHWALBERT *et al.*, 2014) o meio MS com 50% de sais foi mais eficiente. Utino *et al.* (2001) verificaram que alterar a

composição do meio de cultura MS, ao reduzir a concentração de Fe, Cu e Zn, gerou diminuição da oxidação dos explantes.

Para mirtilheiro a nutrição mineral é dificultada quando comparadas com outras culturas devido à falta de pelos radiculares, sendo que a função de absorção ocorre preferencialmente pelas raízes finas, capilares ou também chamadas de primeira e segunda ordem, com tamanho igual ou menor que 100 micrometros de diâmetro (BABA *et al.*, 2018). Baba *et al.* (2019) verificaram que em estacas as raízes diarcas (ou seja, as raízes finas que apresentam dois protoxilemas) são predominantes, por estarem iniciando o sistema radicular e assim maior necessidade de energia e absorção de nutrientes.

Na micropropagação de mirtilheiro, Pelizza *et al.* (2013) utilizaram meio WPM com 50% das concentrações de sais para as cultivares Bluecrop, Duke e Misty, porém esse mesmo meio em 100% da concentração dos sais foi muito utilizado para outros estudos (SILVA *et al.*, 2006; CUCE *et al.*, 2013; CUCE; SOKMEN, 2015; CUCE; SOKMEN, 2017). De acordo com Bandinelli *et al.* (2013) as alterações no meio de cultura são muito importantes para o desenvolvimento das plantas e pode aumentar a taxa de sobrevivência na fase da aclimatização.

3.4 Boro: funções, sintomas de deficiência e influência na atividade enzimática.

O boro é um mineral que forma ligações covalentes estáveis, sendo aplicado nas culturas na forma de ácido bórico (H_3BO_3). Este nutriente faz parte de compostos estruturais da parede celular e atua em diversos processos, como divisão celular, translocação de açúcares e sínteses de proteínas (LANDI *et al.*, 2012). Na sua ausência pode ocasionar necrose de folhas jovens e do ápice terminal, devido à suspensão da divisão celular, gerando a quebra da dominância apical, o que torna a planta muito ramificada (TAIZ *et al.*, 2017).

Na parede celular o boro faz ligações cruzadas entre duas moléculas de Ramnogalacturonan II - RGII, que compõe a rede de pectina responsável por manter a porosidade ideal para a absorção dos nutrientes (O'NEILL *et al.*, 2004, CHORMOVA; FRY, 2016). Assim, quando há a deficiência deste nutriente, ocorre o maior espessamento da parede celular, através da maior absorção de Ca. Logo, a presença de pectina é altamente dependente de boro e com isso pode determinar a maior sensibilidade da planta em casos de deficiência (SINGH *et al.*, 2010; PAN *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2018).

Em *Arabidopsis thaliana* foi demonstrado que a deficiência de boro provoca redução na atividade mitótica e falha na diferenciação celular, sendo relacionado à regulação

hormonal, reduzindo a concentração de citocinina. Na ausência de boro, ocorre a repressão do receptor de citocinina CRE1, diminuindo a diferenciação celular bem como diferenciação do xilema (ABREU *et al.*, 2014; POZA - VIEJO *et al.*, 2018). Dong *et al.* (2018) verificaram que com a deficiência de boro ocorre também o aumento na quantidade de aminoácidos, associados a morte celular e redução na diferenciação celular.

Eggert e Wiren (2017) estudaram o efeito da deficiência de boro no metabolismo dos fitormônios em mudas de *Brassica napus*. Verificaram uma correlação positiva na quantidade de citocinina de acordo com as concentrações de boro, enquanto que, a quantidade de auxina apresentou uma correlação negativa, confirmando o efeito antagônico entre os dois fitormônios. A auxina está ligada no enraizamento das plantas e pode ser regulada pela enzima AIA oxidase que é influenciada pelo boro (FU *et al.*, 2011; ELMONGY *et al.*, 2018; MENG *et al.*, 2019).

A deficiência de boro induz outras alterações metabólicas na planta, como aumento na produção de compostos fenólicos iniciados pela enzima PAL na via dos fenilpropanoides (LIN; NORTHCOTE 1990; LANDI *et al.*, 2012). Para mirtileiro alguns compostos identificados e que foram influenciados pela deficiência são o ácido clorogênico, ácido ferúlico, miricetina, quercetina e glicosídeo rutina (MERIÑO-GERGICHEVICH *et al.*, 2019). Com a alteração na quantidade de compostos fenólicos ocorre a ativação de outras enzimas como a PPO e a POD. A PPO degrada ácidos fenólicos formando quinonas, que são moléculas tóxicas para as plantas. Isso leva a produção de espécies reativas de oxigênio como o peróxido de hidrogênio, que são degradadas pela POD (CAKMAK; ROMHELD, 1997).

Dahajipour – Heidarabadi *et al.* (2011) trabalhando com 5 μM de boro em *Linum usitatissimum*, verificaram alta atividade da PAL e POD. Riaz *et al.* (2018b) observaram que a privação de boro quando comparado com o controle (10 μM de boro), prejudicou o alongamento das raízes primárias e laterais, reduziu o acúmulo de biomassa seca e aumentou a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), PAL e PPO, além de tender a acumular peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas pontas das raízes aumentando o número de células mortas.

Embora o boro atue principalmente sobre o sistema radicular, como observado para *Linum usitatissimum* (DAHAIPOUR – HEIDARABADI *et al.*, 2011), *Poncirus trifoliata* (RIAZ *et al.*, 2018a; RIAZ *et al.*, 2018b; RIAZ *et al.*, 2018c) e para o enraizamento de estacas de *Hylocereus undatus* (SANTOS *et al.*, 2010) o desenvolvimento aéreo também pode ser afetado. A exemplo disso em *Poncirus trifoliata*, 10 μM de boro gerou maior peso e número de folhas, peso de caule e altura das plantas (RIAZ *et al.*, 2018c) e maior biomassa vegetal (RIAZ *et al.*, 2018a). Foi verificado também aumento no teor de açúcares nas folhas, sendo

relacionado à redução do transporte induzindo a paralisação do crescimento (DONG *et al.*, 2018).

Na micropropagação tanto o meio MS (MURASHIGUE; SKOOG, 1962) quanto o WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) acrescentam 6,2 mg L⁻¹ de ácido bórico e há poucos trabalhos que estudam a ação específica deste nutriente sobre o desenvolvimento das plantas *in vitro*. Mouhtaridou *et al.* (2004) verificaram que a concentração de 1 mM de boro em meio MS as plantas de porta enxerto de macieira MM 106 tiveram melhor desenvolvimento, e conforme ocorreu o aumento de boro, a absorção de outros nutrientes foram prejudicadas, como por exemplo, o ferro, sendo evidenciado a menor absorção pela redução do teor de clorofila em níveis mais altos de boro. Bairu *et al.* (2009) verificou que as concentrações de 0,4 e 0,5 mM de boro causou fitotoxidez, inibindo o crescimento das plantas e reduziu a absorção de cálcio. Arici e Sari (2017) verificaram que com 1 mM de boro em meio MS as plantas de batata *in vitro* tiveram maior número e comprimento de folhas e raízes.

Já para a cultura do mirtilheiro, os trabalhos que avaliaram o boro não são para a micropropagação de plantas. Eaton *et al.* (2007) trabalhando com *Vaccinium angustifolium*, perceberam que aplicações de boro aumentaram o número de gemas florais e reduziu danos de inverno. Eichholz *et al.* (2011) verificou aumento no teor de pectina em frutos de mirtilheiro (*Vaccinium corymbosum*) quando aplicado 3% de boro via foliar. Meriño-Gergichevich *et al.* (2017) avaliaram a influência do boro no desenvolvimento de mudas de mirtilheiro Legacy e Brigitta, sendo que a concentração de 50 µM induziu a planta a ter maior biomassa vegetal. E Meriño-Gergichevich *et al.* (2019) verificaram que 3,0 mg L⁻¹ de boro induziu a planta a ter maior biomassa e apresentou aumento na atividade da PAL quando na deficiência do nutriente. Porém, para o cultivo *in vitro* os efeitos da variação da concentração de boro no meio de cultura ainda são poucos estudados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal e meio de cultura.

Plantas de mirtilheiro (*Vaccinium ashei* Reade) oriundas de germinação de sementes e clonadas *in vitro*, foram segmentadas em tamanho de 1,0 cm e colocadas em WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) com a quantidade de boro modificada de acordo com o experimento, suplementado com 20,0 g L⁻¹ de sacarose, 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol e 6,0 g L⁻¹ de ágar e pH regulado com hidróxido de sódio (1N) para 5,3. Foi adicionado 25,0 mL do meio em frascos, que foram fechados com tampas de plástico e previamente autoclavados a 120°C por 20 minutos.

4.2 Experimento I – Boro e citocinina na multiplicação de mirtilheiro.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), fatorial 3x4, sendo três concentrações de 2iP (0,0, 2,5 e 5,0 mg L⁻¹) e quatro concentrações de ácido bórico (0,0, 3,1, 6,2 e 9,3 mg L⁻¹) totalizando 12 tratamentos com 4 repetições, utilizando 5 explantes por frasco, representando uma repetição. Aos 90 dias de cultivo *in vitro* os explantes foram avaliados em função do diâmetro do calo, quantidade de folhas e brotações, comprimento da parte aérea e massa fresca. Logo após as plantas foram armazenadas em freezer a -20°C para a posterior análise bioquímica. Foram selecionados 4 tratamentos para análise enzimática de acordo com a maior quantidade de brotações e avaliados seguindo o DIC modelo fatorial 2x2 com duas concentrações de 2iP (0,0 e 5,0 mg L⁻¹) e duas concentrações de ácido bórico (0,0 e 6,2 mg L⁻¹).

4.3 Experimento II – Boro na multiplicação de mirtilheiro aos 180 dias de cultivo.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com quatro concentrações de ácido bórico (0,0, 3,1, 6,2 e 9,3 mg L⁻¹) totalizando 4 tratamentos com 4 repetições, utilizando 5 explantes por repetição. Neste experimento o WPM foi suplementado com 5,0 mg L⁻¹ de 2iP. Aos 180 dias de cultivo *in vitro* em cada planta foi avaliada o diâmetro do calo, quantidade de brotações e folhas, comprimento da parte aérea, massa fresca, quantidade de folhas vermelhas e ápices necrosados, quantidade e classificação de raízes e quantificação química de boro da parte aérea. Logo após as plantas foram armazenadas em freezer a -20°C para a posterior análise bioquímica de todos os tratamentos. As raízes foram

classificadas em primeira, segunda e terceira ordem. Entende-se que raízes de primeira ordem são as raízes mais finas, apresentando um ápice radicular. As raízes de segunda ordem são compostas por duas ou mais raízes de primeira ordem e as raízes de terceira ordem são compostas por duas ou mais raízes de segunda ordem (FITTER, 1982; BABA *et al.*, 2019)

4.4 Experimento III – Boro no enraizamento de mirtilheiro aos 180 dias de cultivo.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com quatro concentrações de ácido bórico (0,0, 3,1, 6,2 e 9,3 mg L⁻¹) totalizando 4 tratamentos com 4 repetições, utilizando 5 explantes por repetição. Neste experimento o WPM foi suplementado com 2,5 mg L⁻¹ de AIB. Aos 180 dias de cultivo *in vitro* em cada planta foi avaliada diâmetro do calo, quantidade de brotações, folhas e raízes, comprimento da parte aérea e da maior raiz, porcentagem de enraizamento e massa fresca. Logo após as plantas foram armazenadas em freezer a -20°C para a posterior análise bioquímica de todos os tratamentos.

4.5 Sala de cultivo

Após a montagem dos frascos do experimento I, II e III em ambiente de fluxo laminar, foram colocados em sala de crescimento com temperatura de 25±2°C, fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons do período de luz de 27 μmol m⁻² s⁻¹.

4.6 Análise química

Para a determinação do boro foi utilizado 0,2 g de matéria seca da parte aérea das plantas, seguindo o método de Colorimetria da Azometina (MALAVOLTA *et al.*, 1997). A análise foi realizada pelo laboratório Interpartner.

4.7 Análise bioquímica

Para fazer o extrato enzimático, 0,03 g do ápice da parte aérea ou da porção exterior e verde do calo, foi pesado e macerados em almofariz utilizando nitrogênio líquido e homogeneizados em 3,0 mL de tampão fosfato de potássio 50,0 mM (pH 7,0) suplementado com 0,1 mM de EDTA. Essa solução foi transferida para tubo tipo eppendorf contendo 0,0003 g de polivinilpirrolidona (PVP) e centrifugado a 13000,0×g durante 30 minutos a 4°C. O extrato enzimático (sobrenadante) foi armazenado em freezer -20°C até a realização das

análises da atividade das enzimas POD (E.C. 1.11.1.7), PPO (E.C. 1.10.3.1), PAL (E.C. 4.3.1.5) e AIAO (E.C. 1.2.3.7).

A atividade específica da POD foi determinada de acordo com o método de Urbanek *et al.* (1991) e Fu *et al.* (2011) com adaptações. Dessa forma, adicionou-se 100,0 µL de extrato enzimático em 2,9 mL de solução contendo tampão acetato de sódio (50 mM) pH 5,2, peróxido de hidrogênio (60 mM) e guaiacol (20 mM). Em seguida, essa solução foi incubada em banho-maria por 10 minutos em temperatura de 30°C. Posteriormente, foi efetuada a leitura em espectrofotômetro modelo UV 1650 PC (Shimadzu, Kyoto, Japão) à 480,0 nm. Uma unidade de atividade de POD é equivalente a um aumento em 0,01 vezes a quantidade de enzima para 1 g de peso fresco / min.

Para determinação da atividade da enzima PPO (GAUILLARD; RICHARD-FORGET; NICOLAS, 1993), utilizou-se como substrato enzimático 50,0 mL de tampão fosfato de potássio (0,1 M) pH 6,0 contendo catecol (25,0 mM). Adicionou-se 200,0 µL do extrato enzimático com 2,8 mL do substrato enzimático em tubos de ensaio e foram colocados por 10 minutos em banho-maria com temperatura de 30°C. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro modelo UV 1650 PC (Shimadzu, Kyoto, Japão) com comprimento de onda de 410,0 nm. Uma unidade de atividade de PPO é equivalente a um aumento em 0,01 vezes a quantidade de enzima para 1,0 g de peso fresco / min, conforme Fu *et al.* (2011).

Para a determinação da PAL (RODRIGUES *et al.*, 2006; FU *et al.*, 2011) foi utilizado 100,0 µL de extrato enzimático com 400,0 µL de tampão tris-hidroximetilaminometano (TRIS) e 500,0 µL de L-fenilalanina. Após incubação por 1 hora em banho-maria à 40°C adicionou-se 60,0 µL de ácido clorídrico (HCL) (0,5 M) e em seguida realizou-se a leitura em espectrofotômetro modelo UV 1650 PC (Shimadzu, Kyoto, Japão) com comprimento de onda de 290 nm. Uma unidade de atividade PAL é equivalente a um aumento de 0,01 vezes quantidade de enzima para 1 g de peso fresco / min.

A AIA oxidase foi determinada pelo método utilizado por Fu *et al.* (2011) com modificações, onde 0,1 mL do extrato enzimático foi adicionado em uma solução contendo 0,2 mL de cloreto de manganês (1,0 mM), 0,1 de 2,4-diclorofenol (1,0 mM), 0,2 mL de AIA (1,0 mM) e 0,5 mL de tampão fosfato pH 6,0, sendo colocados em banho-maria por 30 min a 30°C. Após isso, 0,2 mL da mistura foi adicionada em 0,4 mL do reagente de Salkowski (1 ml de cloreto de ferro (0,5 M) com 50.0 mL de ácido perclórico (35%)) e colocada em banho maria por 30 min à 30°C, realizando-se a leitura em espectrofotômetro modelo UV 1650 PC (Shimadzu, Kyoto, Japão) com comprimento de onda de 530 nm. Uma unidade da AIAO foi expressa em µg de AIA degradado/ 1 g de peso fresco/ h.

4.8 Análise estatística

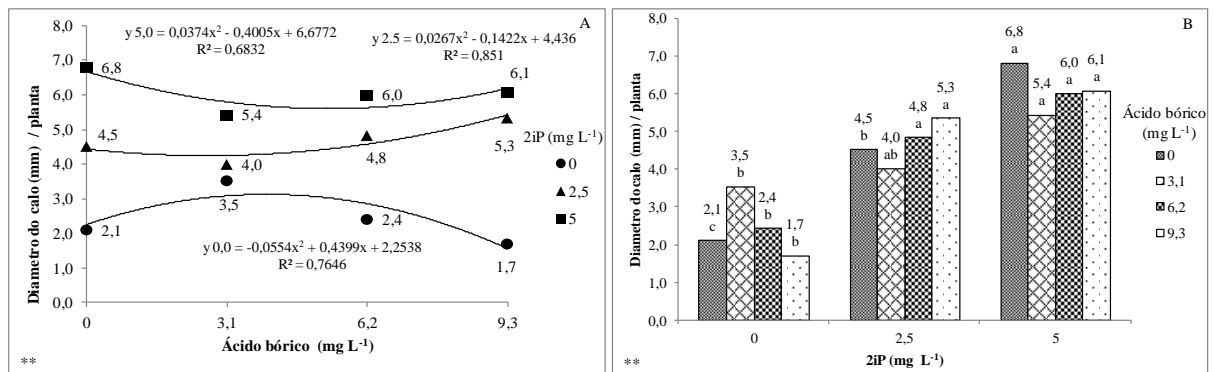
Para a análise dos dados foi utilizado o programa estatístico R (R CORE TEAM, 2018) e o pacote ExpDes, realizando o teste de Shapiro Wilk para avaliar a normalidade e posterior teste de regressão, calculando o ponto crítico através da 1ª derivada para as variáveis que apresentaram R^2 acima de 0,95. Variáveis que não se enquadravam no teste de regressão foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Realizou-se a correlação de Pearson para todas as variáveis, dentro de cada experimento.

5 RESULTADOS

5.1 Experimento I – Boro e citocinina na multiplicação de mirtilheiro.

Não houve interação significativa entre boro e 2iP nas variáveis analisadas, exceto para diâmetro do calo (FIGURA 1A e B), que apresentou as maiores médias com 5,0 mg L⁻¹ de 2iP e a maior média (6,8) sem a adição de ácido bórico. Enquanto que na ausência de 2iP a maior media observada (3,5) foi com 3,1 mg L⁻¹ de ácido bórico.

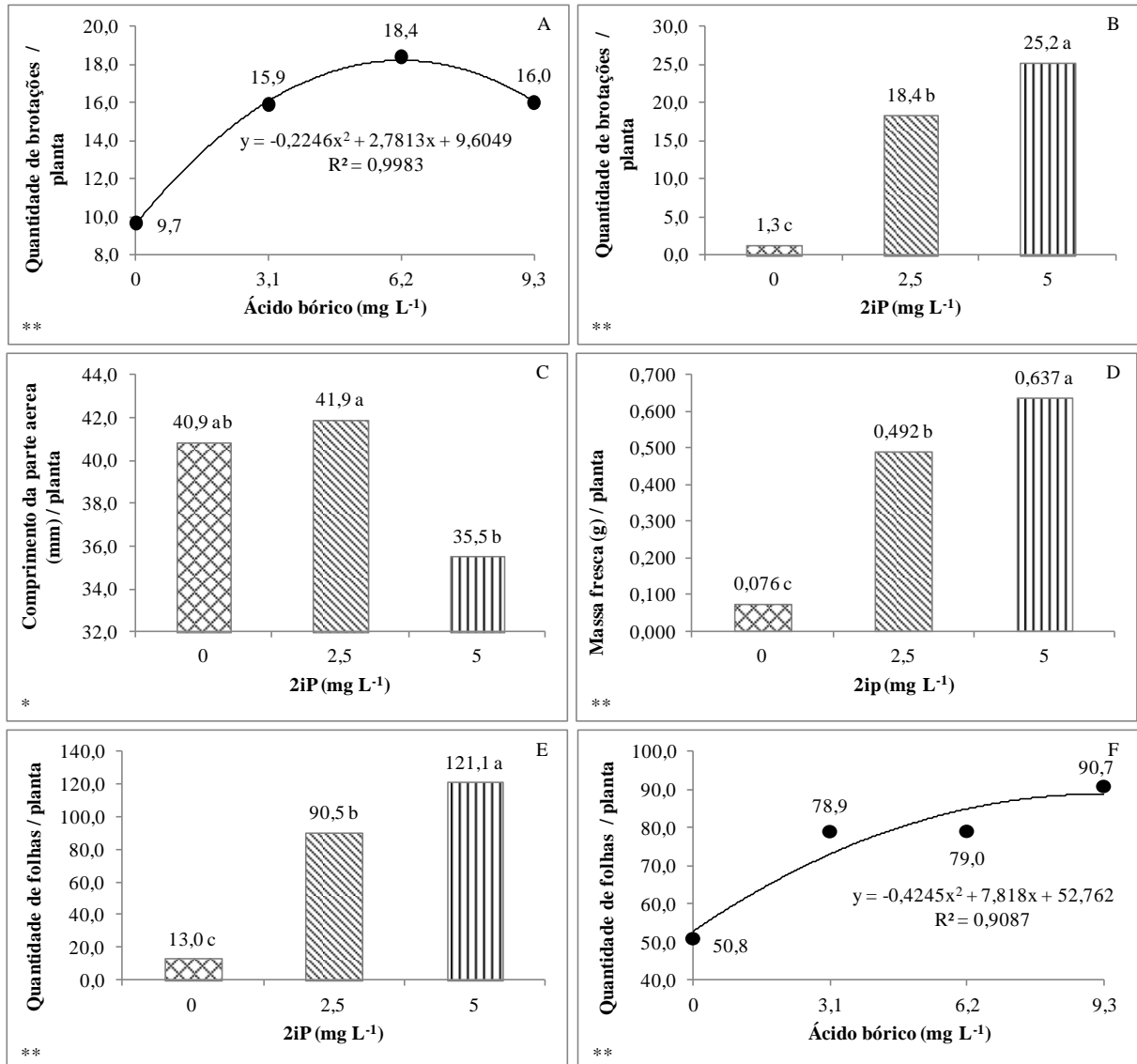
Figura 1- Influência do ácido bórico e 2iP sobre o diâmetro do calo aos 90 dias de cultivo. Medias seguidas da mesma letra entre as concentrações de 2iP não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. * Significativo a 5% de probabilidade de erro. ** Significativo a 1% de probabilidade de erro. ns – não significativo. Transformado pela formula $\sqrt{x + 1}$ para a estatística.



Fonte: O autor.

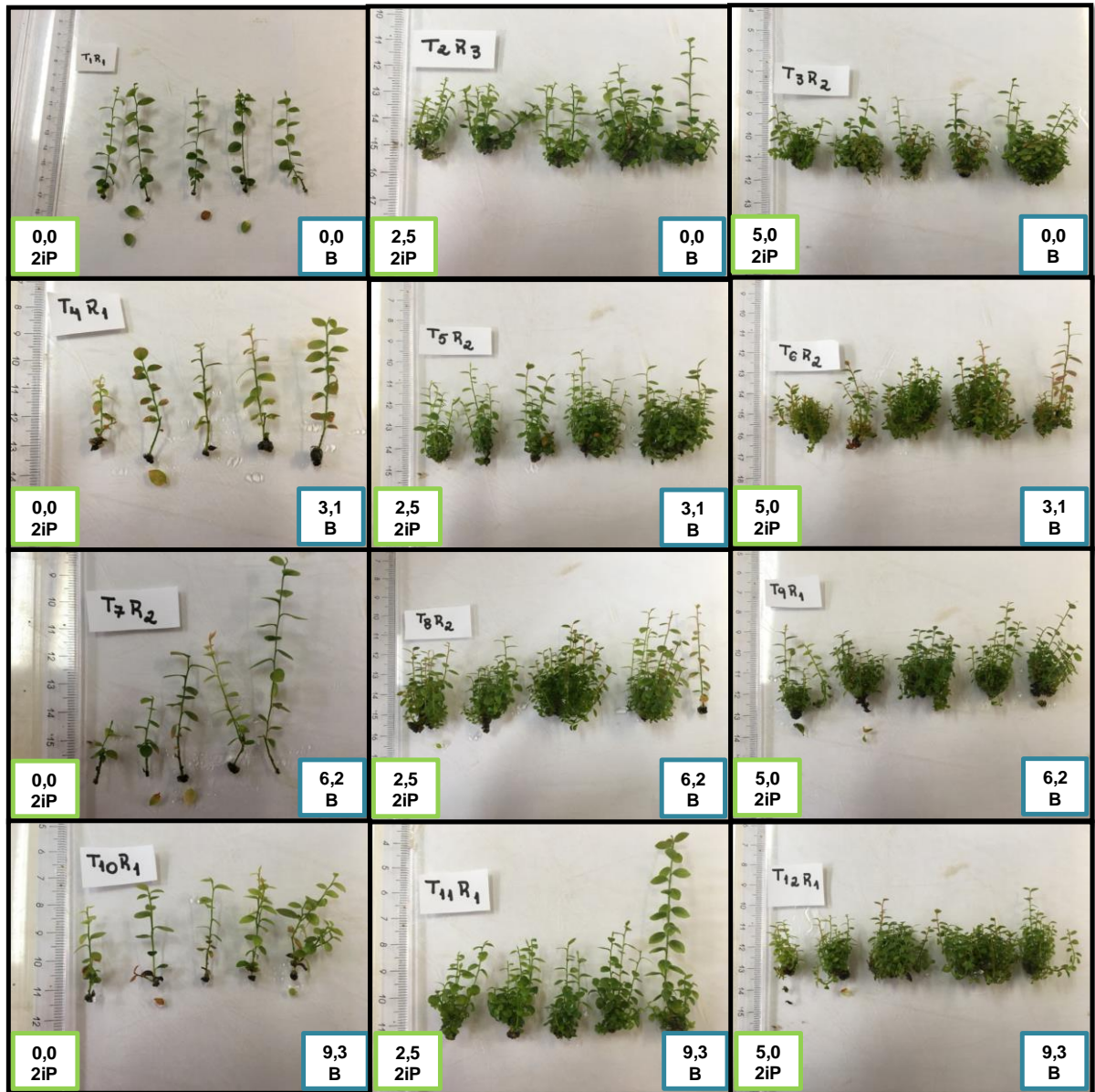
Para a quantidade de brotações (FIGURA 2A e B) houve diferença estatística entre as concentrações de ácido bórico e 2iP, mas não houve interação entre os fatores. Foi observado que 5,0 mg L⁻¹ de 2iP induziu a maior formação de brotações (25,2), como também observado na Figura 3, porém com os menores comprimentos (35,5 mm) (FIGURA 2C), quando comparado com 2,5 mg L⁻¹ de 2iP, e também a maior quantidade de folhas (121,1) e massa fresca (0,637g). Já entre as concentrações de ácido bórico, observou-se a maior média de brotações (18,4) para 6,2 mg L⁻¹ enquanto que, a maior quantidade de folhas (90,7) foi observado na concentração de 9,3 mg L⁻¹. Na correlação de Pearson (TABELA 1) houve alta correlação na quantidade de brotações, massa fresca e diâmetro do calo entre si e com o 2iP.

Figura 2 - Influência do ácido bórico e 2iP sobre o desenvolvimento da parte aérea de mirtilheiro aos 90 dias de cultivo *in vitro*. A e B - quantidade de brotações, C - comprimento da parte aérea, D - massa fresca, E e F - quantidade de folhas.. Médias seguidas da mesma letra entre as concentrações de 2iP não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. * Significativo a 5% de probabilidade de erro. ** Significativo a 1% de probabilidade de erro. A, B, E e F – transformados pela fórmula $\log(x+1)$ para a estatística.



Fonte: O autor.

Figura 3 – Plantas de mirtilheiro cultivadas por 90 dias em diferentes concentrações de ácido bórico (0,0, 3,1, 6,2 e 9,3 mg L⁻¹) e 2iP (0,0, 2,5 e 5,0 mg L⁻¹) em esquema fatorial.



Fonte: O autor.

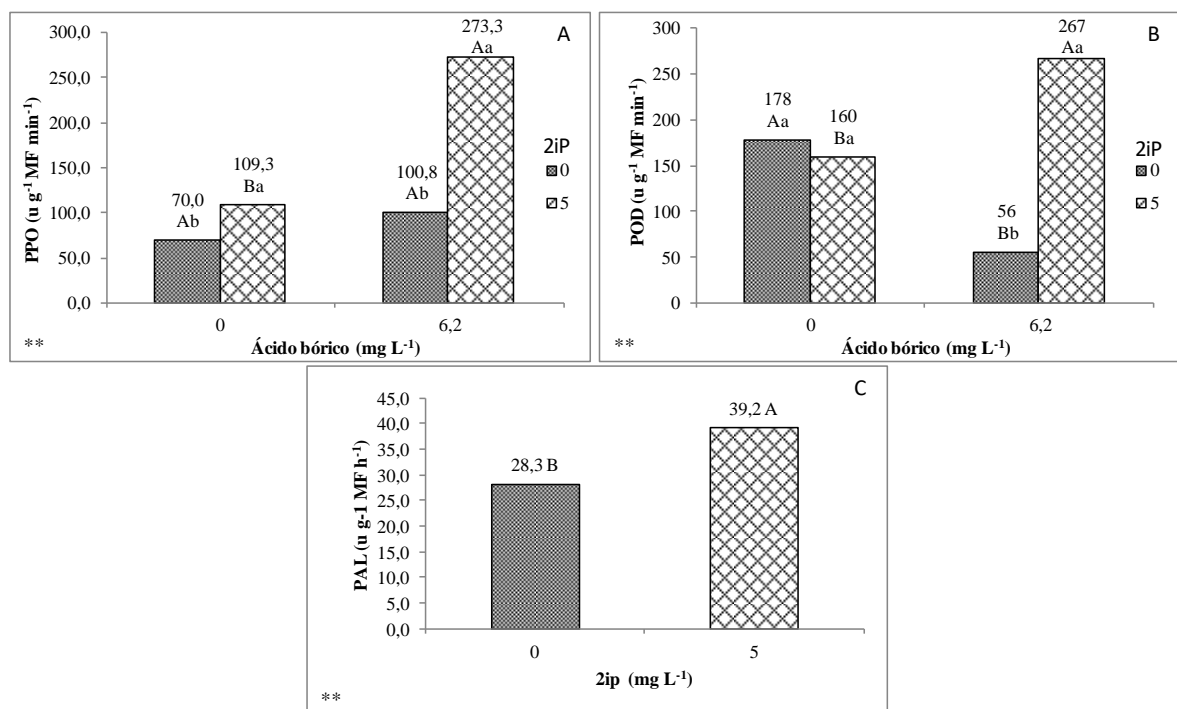
Tabela 1 – Correlação de Pearson entre as variáveis do experimento I de multiplicação *in vitro*. B – ácido bórico, C – citocinina 2iP, PPOF – PPO da folha, PALF – PAL da folha, PODF – POD da folha, AIAOF – AIAO da folha. CP – comprimento da arte aérea, MF – massa fresca, DC – diâmetro do calo, F – quantidade de folhas, BR – quantidade de brotações.

	B	C	PPOF	PALF	PODF	AIAOF	CP	MF	DC	F	BR
B	1,00	ns	0,60*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C	-	1,00	0,65**	0,90**	0,59*	0,64**	ns	0,95**	0,97**	0,84**	0,87**
PPOF	-	-	1,00	0,72**	0,71**	0,56*	ns	0,58*	0,54*	0,62*	0,80**
PALF	-	-	-	1,00	0,54*	0,56*	ns	0,76**	0,82**	0,87**	0,76**
PODF	-	-	-	-	1,00	0,66**	ns	0,57*	ns	0,60*	0,72**
AIAOF	-	-	-	-	-	1,00	ns	0,61*	0,57*	ns	0,72**
CP	-	-	-	-	-	-	1,00	ns	ns	ns	ns
MF	-	-	-	-	-	-	-	1,00	0,94*	0,67**	0,88**
DC	-	-	-	-	-	-	-	-	1,00	0,77**	0,85**
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,00	0,68**
BR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,00

* Significativo a 5% de probabilidade de erro . ** Significativo a 1% de probabilidade de erro. ns – não significativo.

Houve interação entre as concentrações de 2iP e ácido bórico para PPO e POD (FIGURA 4A e B), sendo que as maiores médias ocorreram utilizando 6,2 mg L⁻¹ de ácido bórico e 5,0 mg L⁻¹ de 2iP. A PAL (FIGURA 3C) foi influenciada principalmente pelo 2iP, obtendo alta correlação com a quantidade de folhas. (TABELA 1). Quando na ausência de ácido bórico e 2iP ocorreu as menores medias para PPO. Para a POD a menor média foi observada com 0,0 mg L⁻¹ de 2iP e 6,2 mg L⁻¹ de ácido bórico. Não houve diferença significativa para a enzima AIAO (APÊNDICE A).

Figura 4 - Influência do ácido bórico e 2iP na atividade enzimática foliar aos 90 dias de cultivo *in vitro*. A - polifenol oxidase, B - peroxidase, C - fenilalanina amônia liase. Médias seguidas da mesma letra maiúscula entre as concentrações de ácido bórico e minúsculas entre as concentrações de 2iP não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

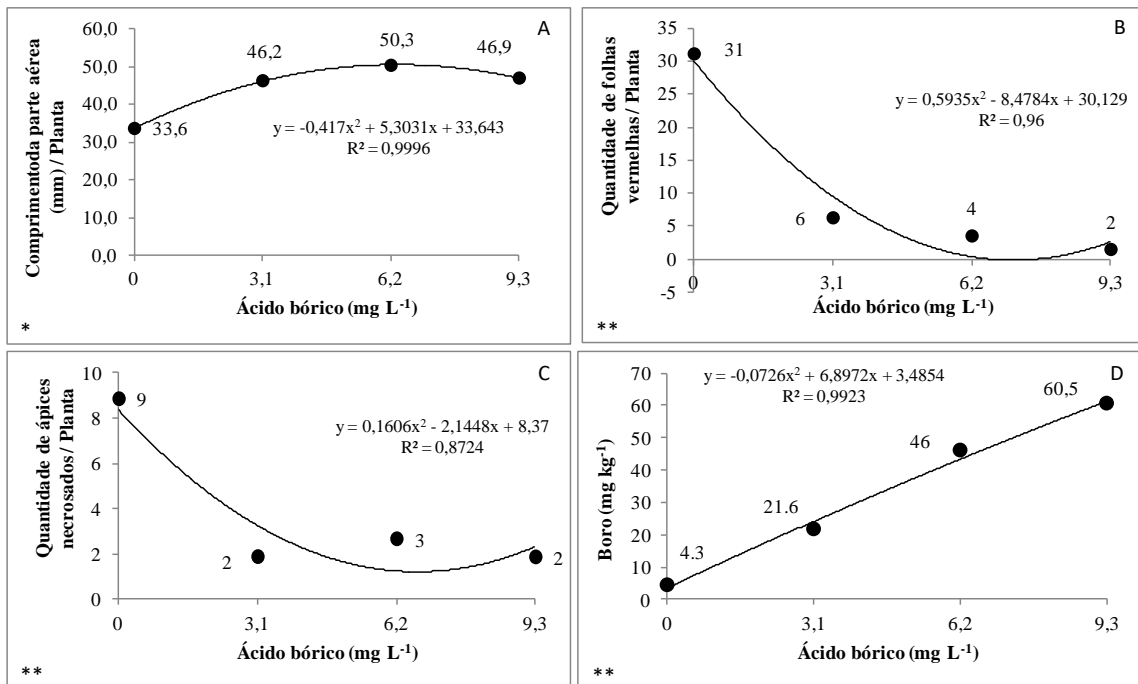


Fonte: O autor.

5.2 Experimento II – Boro na multiplicação de mirtilheiro aos 180 dias de cultivo.

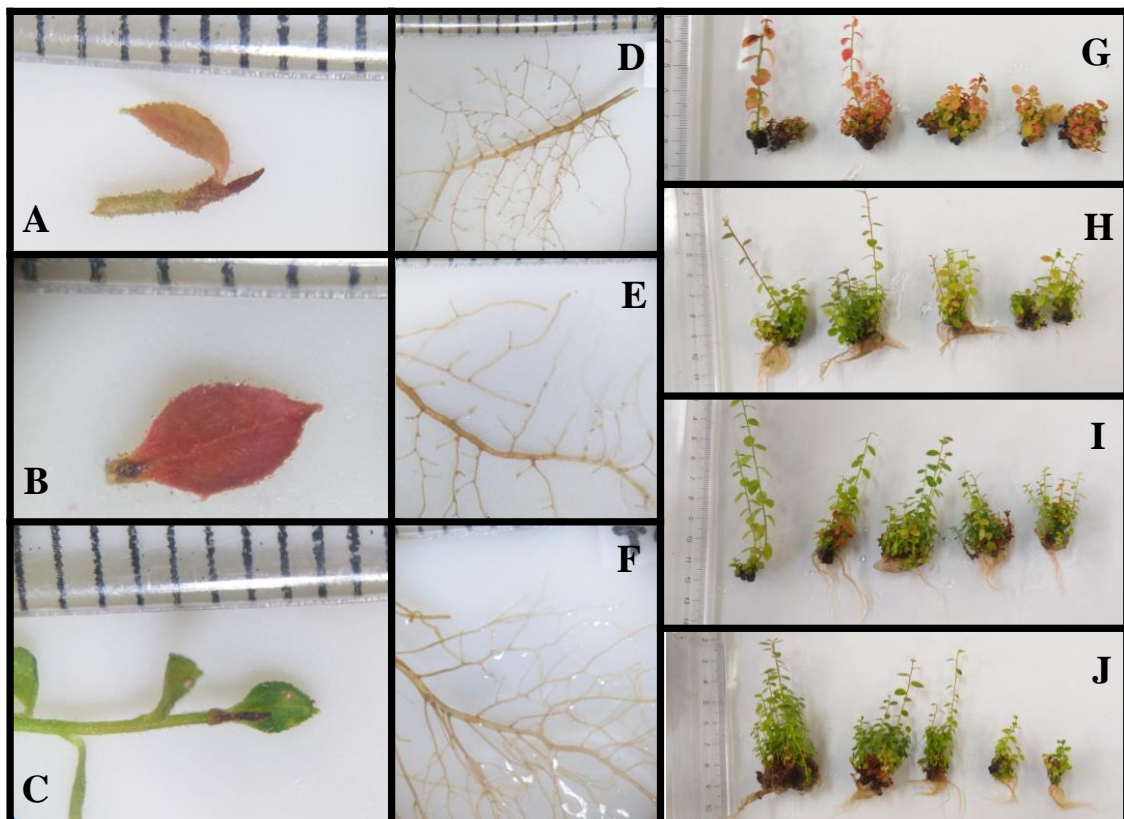
Não houve diferença significativa para quantidade de brotações, diâmetro do calo, massa fresca e quantidade de folhas (APÊNDICE A). De acordo com a análise da regressão, houve alta relação do ácido bórico com o comprimento da parte aérea, quantidade de folhas vermelhas e quantidade de plantas com ápices necrosados. O maior comprimento (FIGURA 5A) foi obtido com 6,2 mg L⁻¹ de ácido bórico, sendo que houve baixa quantidade de folhas vermelhas e ápices necrosados neste tratamento (FIGURA 5B e C), enquanto que o oposto ocorreu na deficiência de boro, sendo mostrado na Figura 6 (A, B e C) os sintomas observados. Na análise química, houve relação do boro da parte aérea com o ácido bórico acrescentado do meio, tendo um comportamento crescente (FIGURA 5D).

Figura 5 – Influência do ácido bórico na parte aérea de mirtilleiro cultivado por 180 dias em meio contendo 5.0 mg L⁻¹ 2iP A - comprimento da parte aérea, B - quantidade de folhas vermelhas, C - quantidade de ápices necrosados, D - quantidade de boro na parte aérea * Significativo a 5% de probabilidade de erro . ** Significativo a 1% de probabilidade de erro.



Fonte: O autor.

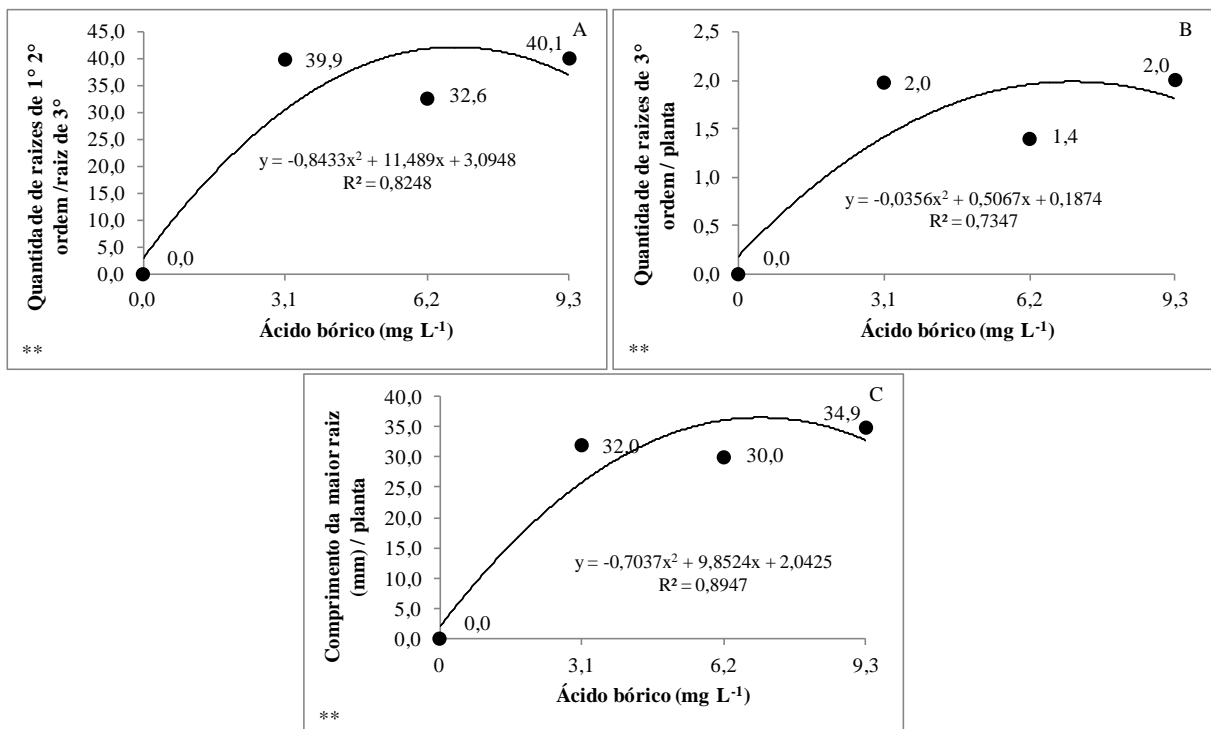
Figura 6 – Plantas de mirtilleiro cultivadas por 180 dias em diferentes concentrações de ácido bórico em meio contendo 5,0 mg L⁻¹ de 2iP. A e C – ápice necrosado. B - folha vermelha contendo um ápice necrosado. D, E e F – raiz de planta cultivada com 3,1, 6,2 e 9,3 mg L⁻¹ de ácido bórico, respectivamente. G, H, I e J – plantas cultivadas com 0,0, 3,1, 6,2 e 9,3 mg L⁻¹ de ácido bórico, respectivamente.



Fonte: O autor.

Verificou-se um aumento na quantidade de raízes tanto de primeira e segunda ordem (FIGURA 7A) quanto de terceira ordem (FIGURA 7B) de acordo com o aumento da concentração de ácido bórico. O mesmo comportamento foi observado no comprimento da maior raiz (FIGURA 7C). Não houve enraizamento das plantas na deficiência de boro (FIGURA 6G), enquanto que todos os tratamentos contendo boro apresentaram raízes formadas, como pode ser observado na Figura 6 (D, E, F, H, I e J).

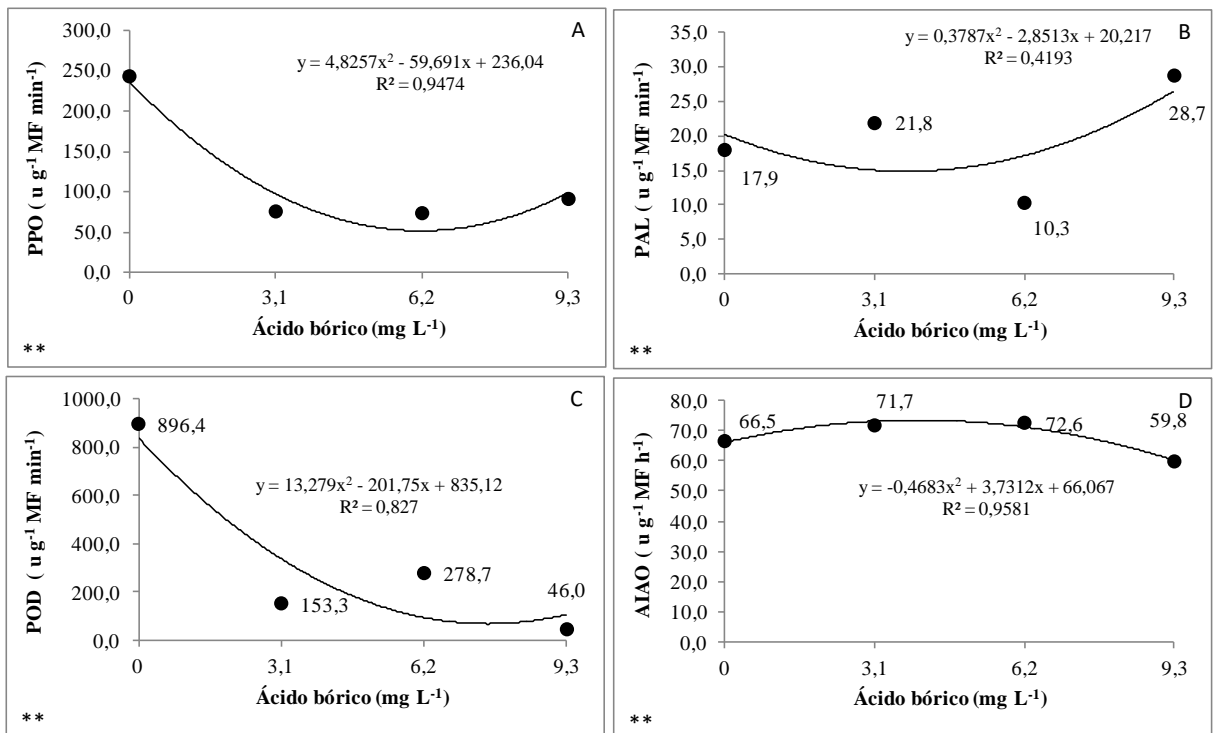
Figura 7 - Influência do ácido bórico sobre o sistema radicular de mirtilheiro cultivado por 180 dias em meio contendo $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP. A – quantidade de raízes de primeira e segunda ordem para cada raiz de terceira ordem, B – quantidade de raiz de terceira ordem e C – comprimento da maior raiz. * Significativo a 5% de probabilidade de erro. ** Significativo a 1% de probabilidade de erro. ns – não significativo. A, B e C – transformados por $1/(x+1)$ para a estatística.



Fonte: O autor.

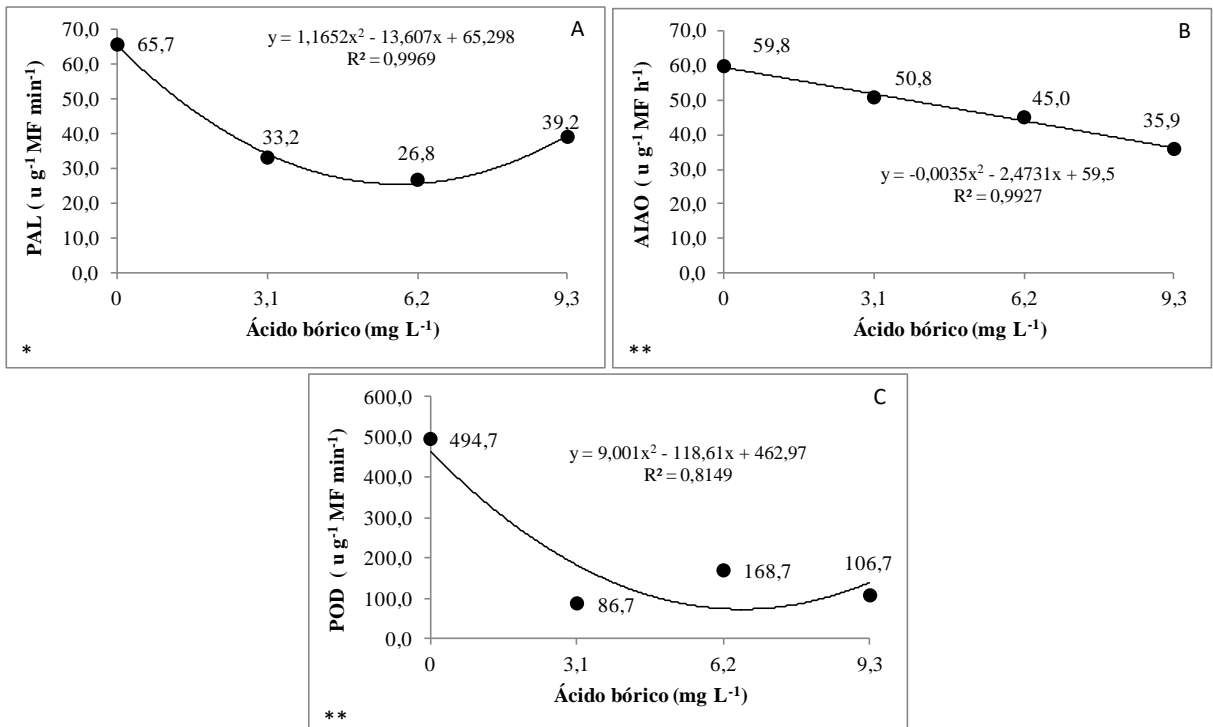
Para a atividade enzimática do calo foi observado uma alta atividade da PPO e POD (FIGURA 8A e C) no tratamento $0,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido bórico. Já a PAL (FIGURA 8 B) teve a maior atividade no tratamento $9,3 \text{ mg L}^{-1}$ e a AIAO (FIGURA 8D) no tratamento $6,2 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido bórico, com uma leve tendência a decair na maior concentração. E na atividade enzimática foliar (FIGURA 9) foi observada maior atividade de todas as enzimas na deficiência de boro com tendência decrescente para a POD e a AIAO (FIGURA 9C e B), enquanto que, a PAL (FIGURA 9A) decresceu até a concentração $6,2 \text{ mg L}^{-1}$, aumentando na concentração de $9,3 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido bórico.

Figura 8 - Influência do ácido bórico na atividade enzimática do calo de plantas cultivadas em meio contendo 5,0 mg L⁻¹ 2iP. A - polifenol oxidase, B - fenilalanina amônia liase, C – peroxidase e D - AIA oxidase. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.



Fonte: O autor.

Figura 9 - Influência do ácido bórico na atividade enzimática foliar de plantas cultivadas em meio contendo 5,0 mg L⁻¹ 2iP. A - fenilalanina amônia liase. B - AIA oxidase, C - peroxidase. * Significativo a 5% de probabilidade de erro. ** Significativo a 1% de probabilidade de erro.



Fonte: O autor.

Na análise de correlação de Pearson (TABELA 2) foi observada alta correlação positiva entre o ácido bórico, a quantidade de boro da parte aérea, quantidade de raízes de 1° e 2° ordem, quantidade de raízes de 3° ordem e comprimento da maior raiz. Enquanto que houve alta correlação negativa entre o ácido bórico e quantidade de folhas vermelhas e entre a quantidade de boro da parte aérea e AIAO. Foi observado também que a quantidade de folhas vermelhas e ápice necrosados tiveram alta correlação positiva com POD e PPO do calo e alta correlação negativa com as variáveis avaliadas sobre as raízes.

Tabela 2 - Correlação de Pearson para as variáveis do experimento II de multiplicação *in vitro*. B - ácido bórico, CP – comprimento da arte aérea, DC – diâmetro do calo, F – quantidade de folhas, FV – quantidade de folhas vermelhas, AM – quantidade de ápices necrosados, BR – quantidade de brotações, MF – massa fresca, R12 – quantidade de raízes de 1° e 2° ordem, R3 – quantidade de raízes de 3° ordem. CR comprimento da maior raiz, BF – quantidade de boro da parte área, PPOF – PPO da folha, PALF – PAL da folha, PODF – POD da folha, AIAOF – AIAO da folha, PPOC – PPO do calo, PALC – PAL do calo, POD C– POD do calo, AIAOC – AIAO do calo.

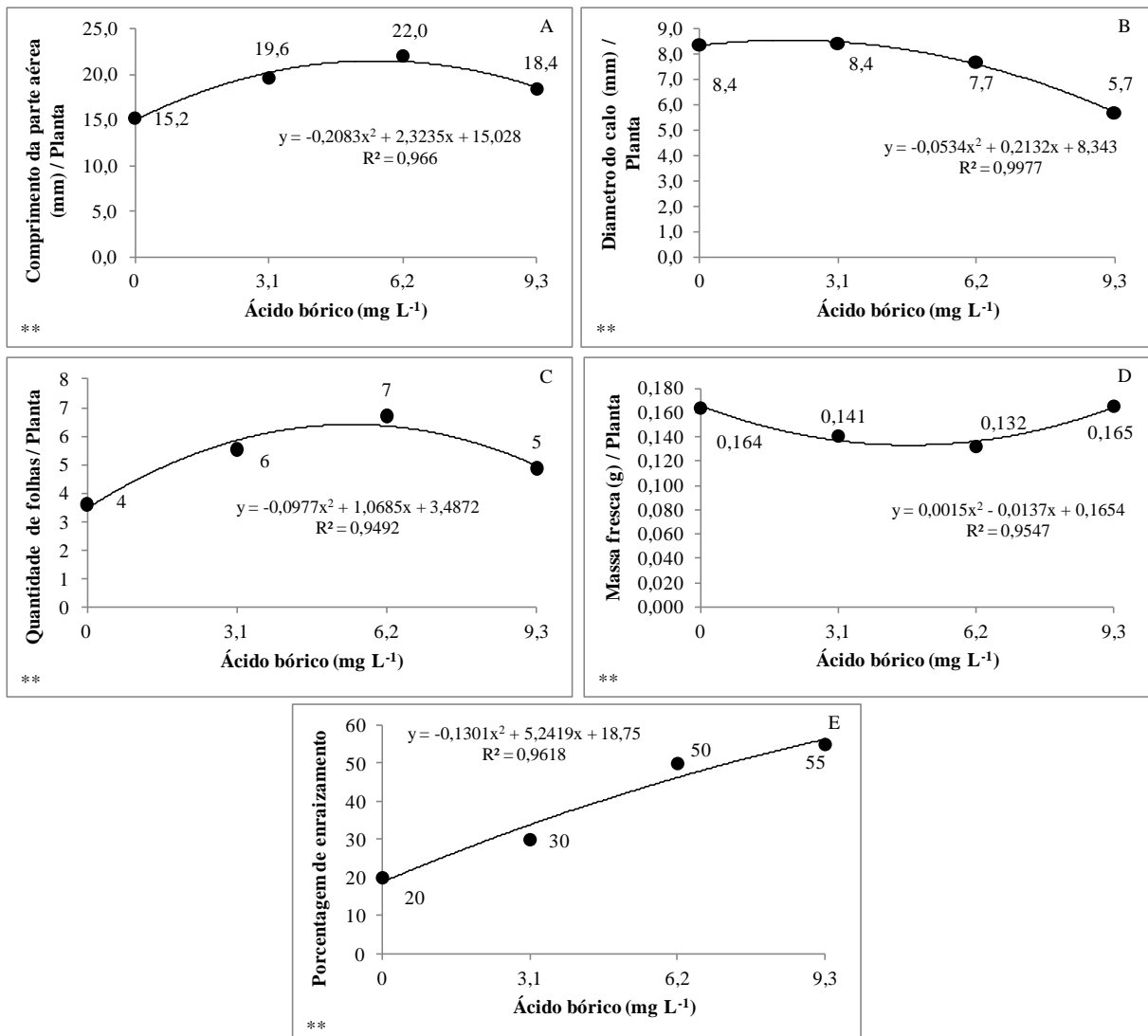
	B	CP	DC	F	FV	AN	BR	MF	R12	R3	CR	BF	PPOF	PALF	PODF	AIAOF	PPOC	PALC	PODC	AIAOC
B	1	ns	ns	ns	-0,85**	-0,66**	ns	ns	0,74**	0,72**	0,78**	0,98**	ns	ns	ns	-0,69**	-0,72**	ns	-0,82**	ns
CPA	-	1	ns	ns	-0,65**	-0,51*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0,59*	ns	-0,55*	ns
DC	-	-	1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
F	-	-	-	1	ns	ns	0,76**	0,55*	0,53*	0,52*	0,53*	ns	-0,69**	ns	-0,52*	ns	ns	ns	-0,52*	ns
FV	-	-	-	-	1	0,80**	ns	ns	-0,94**	-0,90**	-0,92**	-0,83**	ns	0,67**	0,89**	0,74**	0,96**	ns	0,95**	ns
AN	-	-	-	-	-	1	ns	ns	-0,77**	-0,78**	-0,81	-0,62	ns	0,50*	0,78**	0,70**	0,85**	ns	0,83**	ns
BR	-	-	-	-	-	-	1	0,67**	ns	0,51*	ns	ns	-0,66**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
MF	-	-	-	-	-	-	-	1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
R12	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,97**	0,93**	0,71**	-0,62*	-0,61*	-0,87**	-0,65**	-0,93**	ns	-0,96**	ns
R3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,93**	0,70**	-0,70**	-0,54*	-0,89**	-0,68**	-0,90**	ns	-0,96**	ns
CR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,78**	-0,64**	-0,64**	-0,91**	-0,72**	-0,93**	ns	-0,93**	ns
BF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	ns	ns	-0,69**	-0,88**	-0,71**	ns	-0,77**	ns
PPOF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	ns	0,53*	ns	ns	-0,62*	-0,58*	ns
PALF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,68**	ns	0,64**	ns	0,65**	ns
PODF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,64**	0,92**	ns	0,90**	ns
AIAOF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,67**	ns	0,78**	ns
PPOC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	ns	0,92**	ns
PALC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	ns	-0,74**
PODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	ns
AIAOC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1

* Significativo a 5% de probabilidade de erro. ** Significativo a 1% de probabilidade de erro. ns – não significativo.

5.3 Experimento III – Boro no enraizamento de mirtilheiro aos 180 dias de cultivo.

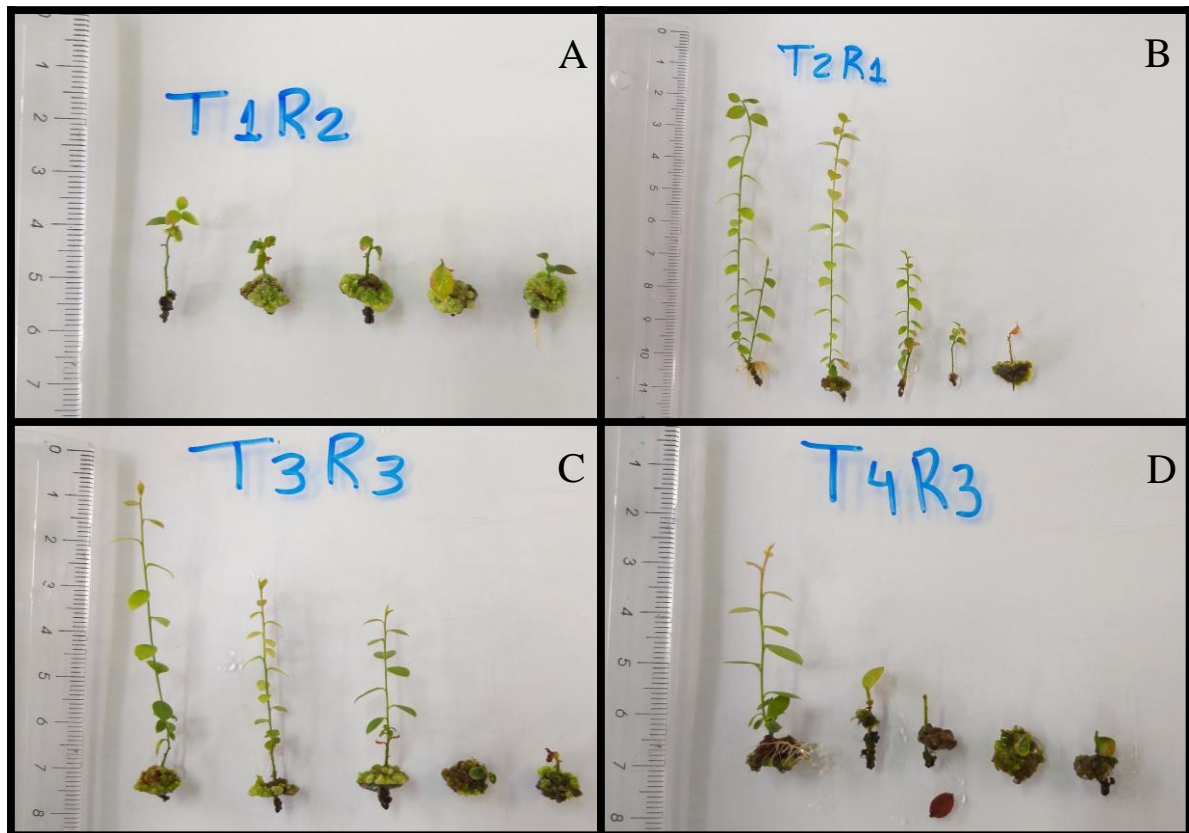
Na Figura 10A, C e E respectivamente, pode ser observado que houve o menor comprimento da parte aérea (15,2 mm), número de folhas (4) e porcentagem de enraizamento (20%) na ausência de boro. O menor diâmetro do calo (5,7 mm) (FIGURA 10B), ocorreu na concentração de 9,3 mg L⁻¹ de ácido bórico, porém em todas as concentrações houve grande formação de calo (FIGURA 11 A, B, C e D). Na porcentagem de enraizamento (FIGURA 10E), foi observada uma tendência crescente, conforme ocorreu o aumento da quantidade de ácido bórico. Para as variáveis quantidade de brotações, quantidade de raízes e comprimento da maior raiz, não foi observada diferença significativa (APÊNDICE A).

Figura 10 - Influência do ácido bórico no crescimento de mirtilheiro cultivado por 180 dias em meio contendo 2,5 mg L⁻¹ de AIB. A - comprimento da parte aérea. B - diâmetro do calo, C - quantidade de folhas, D - massa fresca, E - porcentagem de enraizamento. ** Significativo a 1% de probabilidade de erro.



Fonte: O autor.

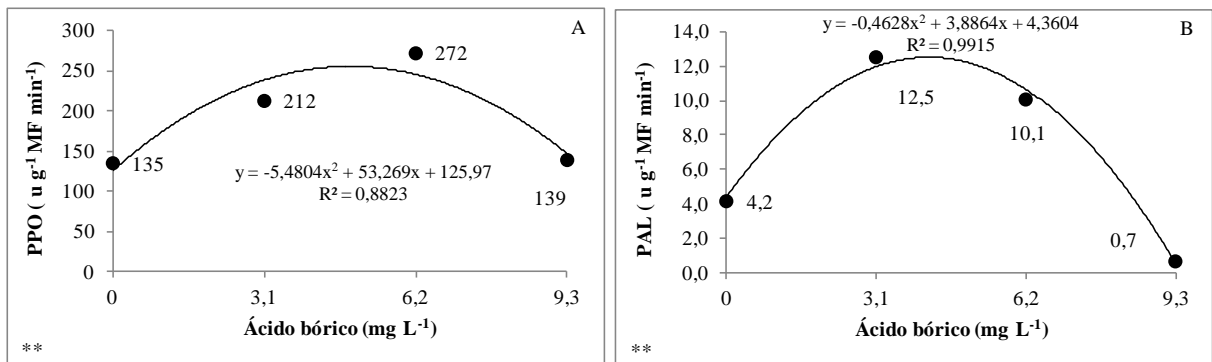
Figura 11 – Plantas de mirtilheiro cultivadas por 180 dias em diferentes concentrações de ácido bórico em meio de cultura contendo 2,5 mg L⁻¹ de AIB. A, B, C e D – plantas cultivadas com 0,0, 3,1, 6,2 e 9,3 mg L⁻¹ de ácido bórico, respectivamente.



Fonte: O autor.

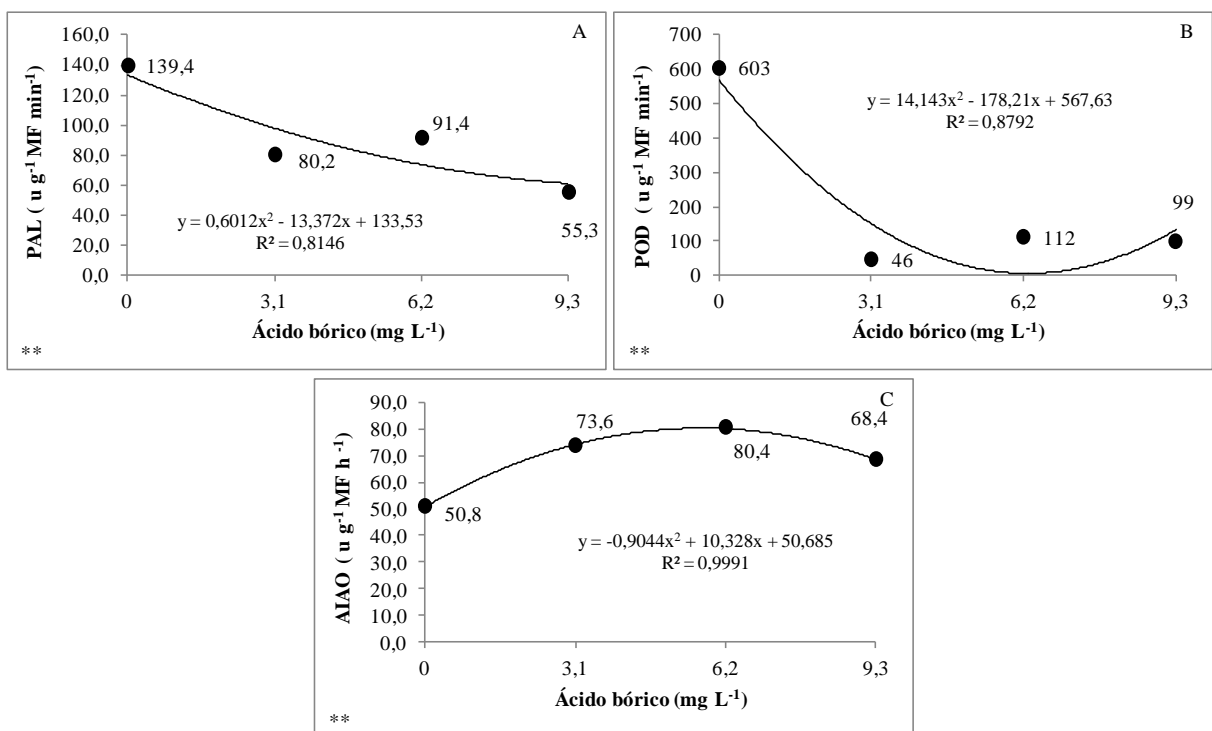
Na atividade enzimática deste experimento, foi observada uma alta atividade da PPO (FIGURA 12A) do calo na concentração de 6,2 mg L⁻¹ de ácido bórico. Na deficiência de boro a PAL (FIGURA 12B) do calo apresentou baixa atividade, sendo que houve um aumento nas concentrações de 3,1 e 6,2 mg L⁻¹ de ácido bórico. Para a AIAO (APÊNDICE A) do calo, não houve diferença estatística, porém os valores foram superiores ao encontrado nos experimentos anteriores. Já em relação à atividade enzimática da folha, foi observado que na deficiência de boro houve alta atividade da enzima PAL e da POD (FIGURA 13A e B), decrescendo nas outras concentrações. Enquanto que a AIAO (FIGURA 13C) apresentou baixa atividade na deficiência de boro quando comparada com as concentrações 3,1 e 6,2 mg L⁻¹ de ácido bórico. A PPO foliar (APÊNDICE A) não apresentou diferença significativa.

Figura 12- Influência do ácido bórico na atividade enzimática do calo de plantas cultivadas por 180 dias em meio contendo 2,5 mg L⁻¹ de AIB. A - polifenol oxidase e B - fenilalanina amônia liase. ** Significativo a 1% de probabilidade de erro.



Fonte: O autor.

Figura 13 Influência do ácido bórico na atividade enzimática da folha de plantas cultivadas por 180 dias em meio contendo 2,5 mg L⁻¹ de AIB. A - fenilalanina amônia liase, B – peroxidase e C - AIA oxidase. ** Significativo a 1% de probabilidade de erro.



Fonte: O autor.

Ao analisar os pontos críticos obtidos (TABELA 3), observou-se que a maioria das variáveis analisadas ficaram próximas do valor de 6,2 mg L⁻¹ de ácido bórico, como a quantidade de brotações e comprimento da parte aérea, com 6,19 e 6,36 mg L⁻¹, respectivamente. A PPO do calo também apresentou valor próximo (6,18 de mg L⁻¹ de ácido bórico), que nessas condições teve a menor atividade, o que é desejado, pois se correlacionou positivamente com os sintomas de deficiência e negativamente com a formação de raízes (TABELA 2). Nas condições do Experimento III a máxima porcentagem de enraizamento de

71,55 % poderia obtida com 20,15 mg L⁻¹ de ácido bórico, porém, a máxima atividade da AIAO, que se correlacionou positivamente com o enraizamento (TABELA 4) , poderia ser obtido com 5,71 mg L⁻¹ de ácido bórico.

Tabela 3 – Pontos críticos obtidos através da equação de regressão para as variáveis com R² acima de 0,95, referentes ao experimento I, II e III.

Experimento I		
Variável	Ponto crítico (x,y)	
	x (ácido bórico)	y (variável)
Quantidade de brotações	6,19 mg L ⁻¹	18,22
Experimento II		
Comprimento da parte aérea	6,36 mg L ⁻¹	50,5 mm
Folhas vermelhas	7,14 mg L ⁻¹	0,0
Boro- Parte aérea	47,5 mg L ⁻¹	167,3 mg kg ⁻¹
PPO calo	6,18 mg L ⁻¹	51,74 u g ⁻¹ MF min ⁻¹
AIAO calo	3,98 mg L ⁻¹	73,5 u g ⁻¹ MF h ⁻¹
PAL folha	5,84 mg L ⁻¹	25,57 u g ⁻¹ MF min ⁻¹
AIAO folha	23,29 mg L ⁻¹	0,0 u g ⁻¹ MF h ⁻¹
Experimento III		
Comprimento da parte aérea	5,58 mg L ⁻¹	21,51 mm
Diâmetro do calo	2,00 mg L ⁻¹	8,55 mm
Massa fresca	4,57 mg L ⁻¹	0,1341 g
Enraizamento	20,15 mg L ⁻¹	71,55 %
PAL Calo	4,20 mg L ⁻¹	12,52 u g ⁻¹ MF min ⁻¹
AIAO folha	5,71 mg L ⁻¹	139,15 u g ⁻¹ MF h ⁻¹

Na correlação de Pearson (TABELA 4), o ácido bórico se correlacionou negativamente com o diâmetro do calo, PPO e PAL foliar e positivamente com a porcentagem de enraizamento. Esta por sua vez, se correlacionou positivamente com o AIAO foliar e negativamente com a POD foliar e o diâmetro do calo. A AIA foliar teve correlação negativa com a POD foliar, diferentemente do observado nos experimentos anteriores.

Tabela 4 - Correlação de Pearson para as variáveis do experimento III de enraizamento *in vitro*. B – ácido bórico CP – comprimento da arte aérea. DC – diâmetro do calo. F – quantidade de folhas. BR – quantidade de brotações. MF – massa fresca. R – quantidade de raízes. CR comprimento da maior raiz. ER – porcentagem de enraizamento. PPOF – PPO da folha, PALF – PAL da folha, PODF – POD da folha, AIAOF – AIAO da folha, PPOC – PPO do calo, PALC – PAL do calo, PODC – POD do calo, AIAOC – AIAO do calo.

	B	CP	DC	F	BR	MF	R	CR	ER	PPOF	PALF	PODF	AIAOF	PPOC	PALC	PODC	AIAOC
B	1	ns	-0,74**	ns	ns	ns	ns	ns	0,78	ns	-0,60*	-0,71**	ns	ns	ns	ns	ns
CP	-	1	ns	0,62*	0,74**	ns	ns	ns	ns	-0,68**	ns	-0,56*	ns	0,66	ns	ns	ns
DC	-	-	1	ns	ns	ns	ns	ns	-0,59*	ns	ns	ns	ns	ns	0,54*	ns	ns
F	-	-	-	1	ns	-0,67**	ns	ns	ns	ns	ns	-0,78**	0,65**	0,74**	0,72**	ns	ns
BR	-	-	-	-	1	ns	ns	ns	ns	-0,51**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
MF	-	-	-	-	-	1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0,62**	-0,74	-0,64**	ns	ns
R	-	-	-	-	-	-	1	0,60*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CR	-	-	-	-	-	-	-	1	ns	-0,59	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ER	-	-	-	-	-	-	-	-	1	ns	ns	-0,53*	0,50*	ns	ns	ns	ns
PPOF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PALF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,54*	ns	ns	ns	ns	ns
PODF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-0,73**	-0,51*	ns	ns	ns
AIAOF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,72**	ns	ns	ns
PPOC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,67**	ns	ns
PALC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	ns	ns
PODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	ns
AIAOC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1

* Significativo a 5% de probabilidade de erro. ** Significativo a 1% de probabilidade de erro. ns – não significativo.

6 DISCUSSÃO

O boro e 2iP agiram concomitantemente sobre a formação das brotações, isso porque o boro está envolvido na expressão do receptor de citocinina CRE1, que atua na diferenciação celular e quando na deficiência ocorre a repressão deste (ABREU *et al.*, 2014; POZA - VIEJO *et al.*, 2018). Evidenciado pela maior formação de calo (FIGURA 1A e B) na ausência de boro, sendo este um tecido não diferenciado, e maior formação de brotações (FIGURA 2A) na presença de boro, resultado da diferenciação do tecido (WANG *et al.*, 2018). Sendo assim, a presença do boro induzindo a expressão de receptores e a disponibilidade de citocinina no meio, pode ter favorecido o melhor desenvolvimento das plantas e conseqüentemente maior quantidade de plantas formadas.

O tratamento com 6,2 mg L⁻¹ de ácido bórico e 5,0 mg L⁻¹ de 2iP gerou alta atividade da POD (FIGURA 4B). Esta enzima está associada ao processo de diferenciação celular. Vatankhah *et al.* (2010), verificaram a expressão de 7 isoformas de peroxidases no período da diferenciação da parte aérea e da raiz. Uma possível justificativa a isso, é a participação da POD na síntese de lignina, necessária para a diferenciação do xilema e formação de brotações (WANG *et al.*, 2018). O aumento da atividade da PAL (FIGURA 4C) na presença de citocinina e sua correlação com a maior quantidade de brotações e folhas, e massa fresca (TABELA1), também é um indicativo disso, pois há um maior requerimento da enzima na formação de compostos como a lignina, presente no xilema. A maior atividade desta enzima foi verificada por Hajiboland *et al.* (2015), que observaram maior atividade em folhas jovens.

No experimento II, o maior comprimento das brotações obtido com 6,2 mg L⁻¹ de ácido bórico (FIGURA 5A) pode estar associado à sua função na parede celular, pois faz a ligação cruzada das moléculas de RGII (O'NEILL *et al.*, 2004; ZHOU *et al.*, 2015; CHORMOVA; FRY, 2016), o que induz a planta a ter um tecido mais estruturado, evidenciado pelo menor comprimento observado na ausência deste nutriente (FIGURA 5A), também encontrado por Hajiboland *et al.* (2015). Além disso, com a deficiência do boro ocorre a maior absorção de Ca causando o espessamento da parede celular pela lignificação, o que reduz a extensibilidade e conseqüentemente o alongamento celular (WANG *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2015) induzindo a expressão deste sintoma.

Outros sintomas de deficiência que são frequentemente observados são a necrose do ápice da parte aérea (tecido mais jovem da planta) e amarelecimento das folhas (BAIRU *et al.* 2009; ZHOU *et al.*, 2014; GÓMEZ-SOTO *et al.*, 2019). Neste experimento foi observada a necrose do ápice (FIGURA 5C) na insuficiência de boro, também observada por Thakur e

Kanwar (2011), que eliminaram esse sintoma quando suplementaram o meio de cultura com boro. A necrose do ápice pode estar associada à falha na divisão celular e má formação dos compostos estruturais (ZHOU *et al.*, 2015).

Já o amarelecimento não foi observado, mas sim folhas avermelhadas (FIGURA 5B). Na correlação de Pearson (TABELA 2) podemos observar alta correlação de folhas vermelhas com a PPO e POD do calo (FIGURA 8A e C) e correlação negativa com o ácido bórico. Isso ocorre, pois, com a severa deficiência de boro gera o acúmulo de compostos fenólicos (YANG *et al.*, 2013). A alta atividade da PPO no calo leva a degradação destes compostos e forma quinonas, que são moléculas tóxicas e levam a necrose do tecido, reduzindo a absorção deste e outros nutrientes, causando os sintomas de deficiência (Figura 6A, B e C) (CAKMAK E ROMHELD, 1997; HAJIBOLAND; FARHANGHI, 2010). A PPO e a POD são citadas por muitos autores, que são enzimas associadas com o enraizamento (MACEDO *et al.*, 2013; ELMONGY *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018). Neste experimento, foi observada alta correlação negativa destas enzimas do calo (FIGURA 8A e C), com a formação radicular (FIGURA 7A, B e C). O que pode indicar que estas enzimas estavam atuando principalmente na regulação metabólica devido ao estresse, ao invés de induzir a formação de raízes.

Na deficiência de boro em meio sem auxina, foi observada maior quantidade de AIAO foliar (FIGURA 9B) e houve uma correlação negativa com as variáveis do sistema radicular (FIGURA 7A, B e C). Isso também foi observado por outros autores, indicando que o aumento de AIAO reduz os níveis de auxina livre e inibe o enraizamento (FU *et al.*, 2011; ELMONGY *et al.*, 2018; MENG *et al.*, 2019). Entretanto, Eggert e Wiren (2017), trabalhando com *Brassica napus*, verificaram correlação negativa do boro com a quantidade de auxina e Su *et al.* (2019) observaram regulação negativa de genes associados à auxina e seu transporte, também na deficiência. Isso significa que a deficiência de boro pode induzir o acúmulo de auxina e este aumento induz a maior atividade da AIA oxidase. Como afirmado por Bohnsack e Albert (1977), que a elevação no nível interno de auxina não está associada à inibição da AIA oxidase, mas sim o aumento da concentração induz sua maior atividade. E também, por Goldbach e Amberger (1986), que sugeriram que na deficiência de boro, a translocação de AIA poderia ser reduzida e conseqüentemente maiores concentrações no local de síntese eram observadas.

Porém, quando as plantas foram cultivadas em meio com alta concentração de auxina, foi observado menor atividade da AIAO (FIGURA 13C) na deficiência de boro, enquanto que nas outras concentrações de ácido bórico, houve um aumento na atividade da enzima. Isso indica que o boro auxilia diretamente na regulação interna desta enzima e não

apenas de forma secundária, como consequência do aumento de AIA interno da planta, induzido por regulação negativa de genes e redução do transporte. Fagan *et al.* (2015) sugeriram que a AIAO é ativada pelo boro e Barker e Pilbeam (2007) indicaram que o boro protege a enzima através de complexação com inibidores.

Foi observada correlação positiva entre a AIAO e a POD foliares no experimento II (TABELA 2), enquanto que no experimento III foi observada uma correlação negativa entre essas enzimas (TABELA 3). Alguns autores indicam que a POD pode participar da degradação do AIA interno para manter seus níveis adequados. Como observado por Sriskandarajah *et al.* (2006) que verificaram que houve aumento de AIAO e POD para controlar o AIA endógeno. Rout (2006) que avaliando estacas tratadas com AIB observou redução na AIAO durante a indução radicular e indicou que as peroxidases estão envolvidas no metabolismo de auxina. Entretanto, a correlação negativa observada no experimento III sugere que para o mirtilheiro em situação de deficiência de boro, o aumento da POD foliar pode estar relacionado à síntese de lignina (WANG *et al.*, 2018), juntamente com a PAL.

Na Figura 9A pode ser observado que houve uma maior atividade da PAL na deficiência de boro, decaindo até a concentração de $6,2 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido bórico, onde a partir de então ocorreu o aumento da atividade. Essa tendência também foi observada por Merino-Gergichevich *et al.* (2019), que analisaram a atividade da enzima em folhas de mudas de mirtilo highbush submetido a diferentes concentrações de boro. Esses mesmos autores obtiveram com a concentração de 3.0 mg L^{-1} de boro, a maior biomassa foliar e a menor atividade da PAL. Esse aumento da PAL indica uma maior síntese de lignina (LIN; NORTHCOTE, 1990), como verificado por Su *et al.* (2019) que a deficiência de boro regula positivamente genes relacionados com a síntese deste composto.

Tendo em vista que o mirtilheiro possui raízes isenta de pelos radiculares, a absorção de água e nutrientes ocorre principalmente através das raízes mais finas, também chamadas de raízes de primeira e segunda ordem (BABA *et al.*, 2018). Devido a isso, a nutrição do mirtilo deve ser adequada, devido à maior sensibilidade do sistema radicular. Considerando que na produção de mudas espera-se obter plantas enraizadas, com a deficiência de boro, pode ocorrer a lignificação, prejudicando o desenvolvimento das raízes (HAJIBOLAND *et al.*, 2015). Baba *et al.* (2019) observaram que em estacas de mirtilo as raízes diarcas são predominantes, devido a iniciação radicular e ter grande necessidade de energia e absorção de nutrientes. Com a deficiência e o acúmulo de lignina essas raízes perdem função de absorção, e assim gera menor crescimento das plantas (ZHOU *et al.*, 2015).

7 CONCLUSÃO

A micropropagação de mirtilheiro é afetada pelas concentrações de ácido bórico utilizadas, sendo que 6,2 mg L⁻¹ de ácido bórico com 5,0 mg L⁻¹ de 2-isopentalinadenina gera os melhores resultados para a multiplicação *in vitro*.

Em condições de deficiência severa de boro, ocorre alta atividade das enzimas polifenol oxidase (PPO), fenilalanina amônia-liase (PAL), peroxidase (POD) e ácido indolacético oxidase (AIAO).

O boro está relacionado com o enraizamento de mirtilheiro e há uma relação direta com a regulação da enzima AIAO. Assim, sugere-se a realização de estudos mais específicos, a fim de verificar o efeito do boro no enraizamento e na regulação desta enzima.

REFERÊNCIAS

- ABREU, I.; POZA, L.; BONILLA, I.; BOLANOS, L. Boron deficiency results in early repression of a cytokinin receptor gene and abnormal cell differentiation in the apical root meristem of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology and Biochemistry**. Paris, v.77, p.117-121, 2014.
- AHLOOWALIA, B. S.; PRAKASH, J.; SAVANGIKAR, V. A.; SAVANGIKAR, C. Plant tissue culture. In: AHLOOWALIA, B. S.; PRAKASH, J.; SAVANGIKAR, V. A.; SAVANGIKAR, C. **Low cost options for tissue culture technology in developing countries**. Vienna: International atomic energy agency., 2004. Cap. 1, p. 3 – 10.
- ANTUNES, L. E. C. Sistemas de Produção do Mirtilo. In: ANTUNES, L. E. C.; RASEIRA, M do C. B. **Sistema de produção: Cultura do Mirtilo (*Vaccinium* spp.)**. Pelotas- RS: Embrapa Clima Temperado, 2006. p. 13-16.
- ARICI, S. E.; SARI, M. Growth and antioxidant responses of potato (*Solanum tuberosum*, cv Agria) shoots cultured *in vitro* under different fusaric acid and boron concentrations. **Bitki koruma bülteni**, Ankara, v. 57, n.1, p. 73-87, 2017.
- AYUB, R. A.; PASQUALINI, A. P. de A.; SANTOS, J. N. dos; BOTELHO, V. R. Blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) cv. Brightwell *in vitro* establishment with silver thiosulfate. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 13, n.1, p. 1- 6, 2017.
- BABA, T.; NAKABA. S.; NOMA, S.; FUNADA, R.; BAN, T. Heterorhizy and fine root architecture of rabbiteye blueberry (*Vaccinium virgatum*) softwood-cuttings. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 131, p. 271-284, 2018.
- BABA, T.; NAKABA. S.; NOMA, S.; FUNADA, R.; BAN, T. The relationship between individual root anatomy and fine root system development in blueberry seedlings: dominance of diarch roots in initial root systems. **Plant Root**. Tokyo, v. 13, p. 1-8, 2019.
- BAIRU, M.W.; JAIN, N.; STIRK, W.A.; DOLEZAL, K., STADEN, J.V. Solving the problem of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens* by changing the cytokinin types, calcium and boron concentrations in the medium. *South African Journal of Botany*. **Pretoria**, v.75, p.122-127, 2009.
- BANDINELLI, M. G.; BISOGNIN, D. A.; GNOCATO, F. S.; MAMBRIN, R. B.; SAUSEN, D.; NICOLOSO, F. T. Concentração de sais e da sacarose do meio MS na multiplicação *in vitro* e na aclimatização de batata. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 31, n.2, abr./jun., 2013.
- BARKER, A. V.; PILBEAM, D. J. **Handbook of plant nutrition**. 1. ed.. Boca Raton: CRC Press, 2007, 662 p.
- BOHNSACK, C. W.; ALBERT, L. S. Early effects of boron deficiency on indoleacetic acid oxidase levels of squash root tips. **Plant Physiology**, v. 59, n. 6, p. 1047-1050, 1977.
- BRONDAMI, G. E.; ONDAS, H. W. de W. ; BACCARIN, F. J. B.; GONÇALVES, A. N.; ALMEIDA, M. de. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. **In Vitro Cel. Dev. Bio. – Plant**, v. 48, p. 478-487, 2012.
- CAKMAK, I.; ROMHELD, V. Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 193, n. 1-2, p. 71-83, 1997.

- CAMPOS, A. D.; ANTUNES, L. E. C.; RODRIGUES, A. C., UENO, B. **Comunicado Técnico 133: Enraizamento de estacas de mirtilo provenientes de ramos lenhosos.** Pelotas- RS: Embrapa Clima Temperado, 2005. 6p.
- CANTUARIAS-AVILÉS, T.; SILVA, S. R. da; MEDINA, R. B.; MORAES, A. F. G.; ALBERTI, M. F. Cultivo do mirtilo: Atualizações e desempenho inicial de variedades de baixa exigência em frio no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 1, p. 139-147, mar. 2014.
- CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. de A. MEDEIROS, M. J. L. e. **Documentos 148: Fatores inerentes à micropropagação.** Campina Grande, PB: Embrapa Algodão, 2006. 28 p.
- CHORMOVA, D.; FRY, S.C. Boron bridging of rhamnogalacturonan-II is promoted *in vitro* by cationic chaperones, including polyhistidine and wall glycoproteins. **New Phytologist**, Cambridge, v.209, p. 241–251, 2016.
- CORDES, H.; IRIARTE, A.; VILLALOBOS, P. Evaluating the carbon footprint of Chilean organic blueberry production. **The International Journal of Life Cycle Assessment**, v. 21, n.3, p. 281-292, 2016.
- CUCE, M.; BEKTAS, E.; SOKMEN, A. Micropropagation of *Vaccinium arctostaphylos* L. via lateral-bud culture. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 37, n.1, p. 40- 44, 2013.
- CUCE, M.; SOKMEN, A. *In vitro* production protocol of *Vaccinium uliginosum* L. (bog bilberry) growing in the Turkish flora. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 41, n.4, p. 294-304, 2017.
- CUCE, M.; SOKMEN, A. Micropropagation of *Vaccinium myrtillus* L. (Bilberry) naturally growing in the Turkish flora. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v. 39, n. 2 p. 233-240, 2015.
- DAHAIPOUR- HEIDARABADI, M.; GHANATI, F.; FUJIWARA, T. Interaction between boron and aluminum and their effects on phenolic metabolism of *Linum usitatissimum* L. roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 49, n.12, p. 1377 – 1383,2011.
- DEBNATH, S. C.; VYAS, P.; GOYALI, J. C.; INGABERDIEV, A. U. Morphological and molecular analyses in micropropagated berry plants acclimatized under *ex vitro* condition. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 92, n. 6, p. 1065-1073, 2012.
- DONG, X.; LIU, G.; WU, X.; LU., X.; YAN, L.; MUHAMMAD, R.; SHAH, A.; WU, L.; JIANG, C. Different metabolite profile and metabolic pathway with leaves and roots in response to boron deficiency at the initial stage of citrus rootstock growth. **Plant Physiology and Biochemistry**. Paris, v.108, p. 121-131, 2016.
- DUTRA, L. F.; WEDLING, I.; BRONDANI, G. E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 58, p. 49-59, 2009.
- EATON , L. J.; JU, H. Y; SANDERSON, K. R. Effects of summer and fall applications of foliar boron on fruit bud winter injury in wild blueberry (*Vaccinium* Ait.). **Canadian Journal of Plant Science**. Ottawa, v. 87, n. 4, p. 923-925, 2007.
- EGGERT, K.; WIRÉN, N. von. Response of the plant hormone network to boron deficiency. **New Phytologist**, Cambridge, v.216, p.868-881, 2017.
- EICHHOLZ, I.; HUYSKENS-KELL, S.; KROH, L.W.; ROHN, S. Phenolic compounds, pectin and antioxidant activity in blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) influenced by

boron and mulch cover. **Journal of Applied Botany and Food Quality** v.84, p. 26 – 32, 2011.

ELMONGY, M. S.; CAO, Y.; ZHOU, H.; XIA, Y. Root development enhanced by using indole-3-butyric acid and naphthalene acetic acid and associated biochemical changes of *in vitro* azalea microshoots. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.37, p. 813-825, 2018.

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

FAGAN, E. B.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J.D., CHALFUN JUNIOR, A.; DOURADO NETO, D. Auxinas. *In*: FAGAN, E. B.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J.D., CHALFUN JUNIOR, A.; DOURADO NETO, D. **Fisiologia vegetal: reguladores vegetais**. São Paulo: Andrei., 2015. Cap. 2, p. 61 – 94.

FAN, S.; JIAN, D.; WEI, X.; CHEN, J. BEESON, R. C.; ZHOU, Z.; WANG, X. Micropropagation of blueberry ‘Bluejay’ and ‘Pink Lemonade’ through *in vitro* shoot culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 226, p. 277-284, 2017.

FAO. FAOSTAT, FAO Statistics Division, Roma, 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data> Acesso em 01 de fevereiro de 2019.

FARIA, A.; PESTANA, D.; TEIXEIRA, D.; FREITAS, V. de; MATEUS, N.; CALHAU, C. Blueberry anthocyanins and pyruvic acid adducts: anticancer properties in breast cancer cell lines. **Phytotherapy Research**, London, v. 24, n. 12 p.1862-1869, 2010.

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

FITTER, A. H. Morphometric analysis of root systems: application of the technique and influence of soil fertility on root system development in two herbaceous species. **Plant, Cell and Environment**, v.5, p. 313-322, 1982.

FU, Z.; XU, P.; HE, S.; SILVA, J. A. T. de; TANAKA, M. Dynamic changes in enzyme activities and phenolic content during *in vitro* rooting of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) plantlets. **Maejo International Journal of Science and Technology**, v. 5, p. 252–265, 2011.

GAUILLARD, F.; RICHARD-FORGET, F.; NICOLAS, J. New spectrophotometric assay for polyphenol oxidase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 215, n. 1, p. 59–65, 15 nov. 1993.

GOLDBACH, H.; AMBERGER, A. Influence of boron deficiency on 3H indole-3yl-acetic acid uptake and efflux in cell cultures of *Daucus carota* L. **Plant Growth Regulation**, v.4, p.81-86, 1986.

GÓMEZ-SOTO, D.; FALVÁN, S.; ROSALES, E.; BIENERT, P.; ABREU, I.; BONILLA, I.; BOLANOS, L.; REGUERA, M. Insights into the role of phytohormones regulating pAtNIP5;1 activity and boron transport in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, Limerick, v. 287, p. 110198, 2019.

HAJIBOLAND, R.; BASTANI, S.; BAHRAMI-RAD, S.; POSCHENRIEDER, C. Interactions between aluminum and boron in tea (*Camellia sinensis*) plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 3, p. 54, 2015.

- HAJIBOLAND, R.; FARHANGHI, F. Remobilization of boron, photosynthesis, phenolic metabolism and anti-oxidant defense capacity in boron-deficient turnip (*Brassica rapa* L.) plants. **Soil Science & Plant Nutrition**, Tokyo, v. 56, p.427-437, 2010.
- HERTER, F. G.; WREGE, M. S. Fatores climáticos. In: ANTUNES, L. E. C.; RASEIRA, M do C. B. **Sistema de produção: Cultura do Mirtilo (*Vaccinium* spp.)**. Pelotas- RS: Embrapa Clima Temperado, 2006. p. 13-16.
- INOUE, T.; HIGUCHI M.; HASHIMOTO, Y.; SEKL, M.; KOBAYASHI, M.; KATO, T.; TABATA, S.; SHINOZAKI, K.; KAKIMOTO, T. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1060-1063, 2001.
- LANDI, M.; DEGL'INNOCENTI, E.; PARDOSSI, A.; GUIDI, L. Antioxidant and photosynthetic responses in plants under boron toxicity: a review. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**. v. 7, n.3, p. 255-270, 2012.
- LEISNER, C. P.; KAMILLEN, M. O.; CONWAY, M. E.; O'CONNOR, S. R.; BLUELL, C. R. Differential iridoid production as revealed by a diversity panel of 84 cultivated and wild blueberry species. **Plos One**, San Francisco, v. 12, n. 2, p. 1- 13, 2017.
- LENCINA, K. H.; BISOGNIN, D. A.; PIMENTEL, N.; KIELSE, P.; MELLO, U. S. de. In vitro productivity of *Apuleia leiocarpa*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 28, n.1, p. 150-159, 2018.
- LIN, Q.; NORTHCOTE, D. H. Expression of phenylalanine ammonia-lyase gene during tracheary-element differentiation from cultured mesophyll cells of *Zinnia elegans* L. **Planta**, v. 182, n. 4, p. 591-598, 1990.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings International Plant Propagators Society**, Seattle, v.30, p.421- 427, 1980.
- LÓPEZ-BICIO, J.; MILÁN-GODÍNEZ, M.; MÉNDEZ-BRAVO, A.; MORQUECHO-CONTRERAS, A.; RAMÍREZ-CHÁVES, E.; MOLINA-TORRES, J.; PÉREZ-TORRESM A.; HIGUCHI, M.; KAKIMOTO, T.; HERRERA-ESTRELLA, L. Cytokinin receptors are involved in alkamide regulation of root and shoot development in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 145, p. 1703-1713, 2017.
- MACEDO, E.; VIEIRA, C.; CARRIZO, D.; PORFIRIO, S.; HEGEWALD, H.; ARNHOLDT-SCHMITT, B.; CALADO, M. L.; PEIXE, A. Adventitious root formation in olive (*Olea europaea* L.) microshoots: anatomical evaluation and associated biochemical changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.88, n.1, p. 53-59, 2013.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2.ed.. Piracicaba- SP: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1997. 319 p.
- MARINO, S. R.; WILLIAMSON, J. G.; OLMSTEAD, J. W. Vegetative Growth of Three Southern Highbush Blueberry Cultivars Obtained from Micropropagation and Softwood Cuttings in Two Florida Locations. **HortScience**, Alexandria, v. 49, n. 5, p. 556-561, 2014.
- MARTINEAU, L. C.; COUTURE, A.; SPOOR, D.; BENHADDOU-ANDALOUSSI, A.; HARRIS, C.; MEDDAH, B.; LEDUC, C.; BURT, A.; VUONG, T.; LE, P. M.; PRETKI, M.; BENNETT, S. A.; ARNASON, J. T.; HADDAD, P. S. Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait. **Phytomedicine**, Jena, v. 13, n. 10, p. 612-623, 2006.

- MARTINEZ, M. T.; CORREDOIRA, E.; VIEITEZ, A. M.; CERNADAS, M. J.; MONTENEGRO, R.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, F. J.; SAN JOSE, M. C. Micropropagation of mature *Quercus ilex* L. trees by axillary budding. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 131, n.3, p. 499-512, 2017.
- MATSUO, N.; MAKINO, M.; BANNO, H. *Arabidopsis* ENHANCER OF SHOOT REGENERATION (ESR)1 and ESR2 regulate *in vitro* shoot regeneration and their expressions are differentially regulated. **Plant Science**, Limerick, v.181, p. 39-46, 2011.
- MENG, X.; WANG, Z.; HE, S.; SHI, L.; SONG, Y.; LOU, X.; HE, D. Endogenous hormone levels and activities of IAA-modifying enzymes during adventitious rooting of tree peony cuttings and grafted scions. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v.60, p. 187-197, 2019.
- MERIÑO-GERGICHEVICH, C.; MORINA, F.; JORQUERA-FONTENA, E.; SEGUEL, A. Differential Tolerance and Phenolic Leaf Profile in Response to Boron Supply in Two Highbush Blueberry Genotypes. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, p. 1-9, 2019.
- MERIÑO-GERGICHEVICH, C.; REYES – DIAZ, M.; GUERRERO, J.; ONDRASEK, G. Physiological and nutritional responses in two highbush blueberry cultivars exposed to deficiency and excess of boron. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 17, n.2, p. 307-318, 2017.
- MOUHARIDOU, G.N.; SOTIROPOULOS, T.E.; DIMASSI, K. N.; THERIOS, I. N. Effects of boron on growth, and chlorophyll and mineral contents of shoots of the apple rootstock MM 106 cultured *in vitro*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 48, n. 4, p. 617-619, 2004.
- MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue culture. **Annual Review of Plant and Physiology**, Palo Alto, v.25, p.135-166, 1974.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, 437-496, 1962.
- OLIVEIRA, C. de.; DEGENHARDT – GOLDBACH, J.; BETTENCOURT, G. M. de F.; AMANO, E.; FRANCISCON, L.; QUOIRIN, M. Micropropagation of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* AEC 224 clone. **J. For. Res.**, v. 26, n. 1, p. 29-39, 2017.
- O'NEILL, M. A.; ISHII, T.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G. Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. **Annual Review of Plant Biology**. Palo Alto, v. 55, p. 109-139, 2004.
- PAN, Y.; WANG, Z.; YANG, L.; WANG, Z.; SHI, L.; NARAN, R.; AZADI, P.; XU, F. Differences in cell wall components and allocation of boron to cell walls confer variations in sensitivities of *Brassica napus* cultivars to boron deficiency. **Plant soil**, v.359, p. 383-394, 2012.
- PASQUALINI, A. P. de A.; SANTOS, J. N. dos; AYUB, R. A. Behavior and viability of blueberry seeds through germination and tetrazolium test. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, Irvine, v. 7, n. 1, p. 11-18, 2016.
- PELIZZA, T. R.; SILVEIRA, F. N.; MUNIZ, J.; GRIMALDI, F.; RUFATO, L.; KRETZSCHMAR, A. A. Estabelecimento *in vitro* de mirtilheiro: Cultivares Bluecrop, Duke e Misty. **Plant Cell Culture & Micropropagation.**, Lavras, v.9, n. 1-2, p. 24-29, 2013.
- POZA-VIEJO, L.; ABREU, I.; GONZALEZ-GARCIA, M. P.; ALLAUCA, P.; BONILLA, I.; BOLANOS, L.; REGUERA, M. Boron deficiency inhibits root growth by controlling

meristem activity under cytokinin regulation. **Plant Science**, Limerick v.270, p.176-189, 2018.

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2018.

RETAMALES, J. B.; PALMA, M. J.; MORALES, Y. A.; LOBOS, G. A.; MOGGIA, C. E.; MENA, C. A. Blueberry production in Chile: Current status and future developments. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v. 36, n.1, p. 58 – 67, 2014.

RETAMALES, Jorge B.; HANCOCK, James F. **Blueberries**. Cabi, 2018.

RIAZ, M.; YAN, L.; WU, X.; HUSSAIN, S.; AZIZ, O.; IMRAN, M.; RANA, M. S.; JIANG, C. Boron reduces aluminum-induced growth inhibition, oxidative damage and alterations in the cell wall components in the roots of trifoliate orange. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 153, p. 107-115, 2018a.

RIAZ, M.; YAN, L.; WU, X.; HUSSAIN, S.; AZIZ, O.; JIANG, C. Boron deprivation induced inhibition of root elongation is provoked by oxidative damage, root injuries and changes in cell wall structure. **Environmental and Experimental Botany**, v. 156, p. 74-85, 2018b.

RIAZ, M.; YAN, L.; WU, X.; HUSSAIN, S.; AZIZ, O.; WANG, Y.; IMRAN, M.; JIANG, C. Boron alleviates the aluminum toxicity in trifoliate orange by regulating antioxidant defense system and reducing root cell injury. **Journal of Environmental Management**, London, v. 208, p. 149-158, 2018c.

RODRIGUES, A. A. C.; NETO, E. B.; COELHO, R. S. B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. Tracheiphilum em Caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 492–499, 2006.

RODRIGUES, F. A.; PENONI, E. dos S.; SOARES, J. D. R.; PASQUAL, M. Diferentes concentrações de sais do meio MS e BAP na multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 1, p. 77-82, jan./feb., 2013.

ROUT, G. R. Effect of auxins on adventitious root development from single node cuttings of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze and associated biochemical changes. **Plant Growth Regulation**, v.48, p.111-117, 2006.

SANTOS, C. M. G.; CERQUEIRA, R. C.; FERNANDES, L. M. de S.; RODRIGUES, J. D.; ONO, E. O. Efeito de substratos e boro no enraizamento de estacas de pitaya. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 57, n.6, p. 795-802, nov/dez., 2010.

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

SCHUCH, M. W.; ROSSI, A. de; 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, set./out. 2007.

SCHWALBERT, R.; MALDANER, J.; AITA, M. F.; AMARAL, G. A. do; TAROUÇO, A. K. Concentrações de sais do meio MS no cultivo *in vitro* de *Desmodium incanum*. **Enciclopédia biosfera**, Goiânia, v. 10, n. 18, p. 1009- 1015, 2014.

SILVA, L. C. da; SCHUCH, M. W.; SOUZA, J. A. de; ERIG, A. C.; ANTUNES, L. E. C.; Meio nutritivo, reguladores de crescimento e frio no estabelecimento *in vitro* de mirtilo

(*Vaccinium ashei* Reade) cv. Delite. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n.4, p. 405-408, out./dez., 2006.

SINGH, D. P.; LIU, L. H.; ØISETH, S. K.; BELOY, J.; LUNDIN, L.; GIDLEY, M. J., DAY, L. Influence of Boron on Carrot Cell Wall Structure and Its Resistance to Fracture. **Journal of Agricultural and food chemistry**. Easton, v.58, p.9181-9189, 2010.

SMITH, M. A. I.; MARLEY, K. A.; SEIGLER, D.; SINGLETARY, K. W.; MELINE, B. Bioactive properties of wild blueberry fruits. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 65, n.2, 2000.

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

SOUZA, V. R. de, PEREIRA, P. A. P.; SILVA, T. L. T. da; LIMA, L. C. de O.; 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 Chemistry**, London, v. 156, p. 362 – 368, 2014.

SRISKANDARAJAH, S.; PRINSEN, E.; MOTYKA, V.; DOBREV, P. I.; SEREK, M. regenerative capacity of cacti *Schlumbergera* and *Rhipsalidopsis* in relation to endogenous phytohormones, cytokinin oxidase/ dehydrogenase, and peroxidase activities. **Journal of Plant Growth Regulation**, v 25, p. 79-88, 2006.

SU, W. L.; LIU, N.; MEI, L.; LUO, J.; SHU, Y.J.; LIANG, Z. Global Transcriptomic Profile Analysis of Genes Involved in Lignin Biosynthesis and Accumulation Induced by Boron Deficiency in Poplar Roots. **Biomolecules**, v.9,n.4, p.156, 2019.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia vegetal e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017, p. 858.

TAMBOSI, G.; ROGGE-RENNER, G. D. Avaliação de métodos de esterilização, concentração de ágar e composição de meio de cultura para a propagação *in vitro* de *Pimpinella anisum* (Linn.)- Apiaceae. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 189-194, jul./dez. 2010.

THAKUR, A.; KANWAR, J. S. Effect of phase of medium, growth regulators and nutrient supplementations on *in vitro* shoot-tip necrosis in pear. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, Wellington, v. 39, v.2, p. 131-140, 2011.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, K. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, Poland, v. 13, p. 43–50, 1991.

UTINO, S.; CARNEIRO, I. F.; CHAVES, L. J. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira-prata (Musa AAB) *in vitro*. I. concentrações de sais de ferro, cobre e zinco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n.2, p. 225-229, ago 2001.

VATANKHAH, E.; NIKNAM, V.; EBRAHIMZADEH, H. Activity of antioxidant enzyme during *in vitro* organogenesis in *Crocus sativus*. **Biologia Plantarum**, Praha v.54, n.3, p.509-514, 2010.

WANG, J.; LI, X.; ZHANG, L.; ZHANG, Y.; PENG, Y.; GUO, M.; ZHANG, R.; HUANG, J. Developing micropropagation protocol and analyzing peroxidase activity during morphogenesis in *Arisaema decipiens* Schott, a medicinal plant. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 17, p. 145-150, 2018.

WANG, N.; YANG, C.; PAN, Z.; LIU, Y.; PENG, S. Boron deficiency in woody plants: various responses and tolerance mechanisms. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 916, 2015.

WU, X.; LU, X.; RIAZ, M.; YAN, L.; JIANG, C. Boron deficiency and toxicity altered the subcellular structure and cell wall composition architecture in two citrus rootstocks. **Scientia horticulturae**, , Amsterdam, v. 238, p.147-154, 2018.

YANG, C. Q.; LIU, Y. Z.; AN, J. C.; LI, S.; JIN, L. F.; ZHOU, G. F.; WEI, Q. F.; YAN, H. Q.; WANG, N. N.; FU, L.N.; LIU, X.; HU.; X. M.; YAN, T. S.; PENG, S. A. Digital gene expression analysis of corky split vein caused by boron deficiency in ‘newhall’ navel orange (*Citrus sinensis* osbeck) for selecting differentially expressed genes related to vascular hypertrophy. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 6, p. 1- 11, 2013.

ZHOU, G. F.; LIU, Y. Z.; SHENG, O.; WEI, Q. J.; YANG, C. Q.; PENG, S. A. Transcription profiles of boron-deficiency-responsive genes in citrus rootstock root by suppression subtractive hybridization and cDNA microarray. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 1-15, 2015.

ZHOU, G. F.; PENG, S. A.; LIU, Y. Z.; WEI, Q. J.; HAN, J.; ISLAM, M. Z. The physiological and nutritional responses of seven different citrus rootstock seedlings to boron deficiency. **Trees**, Berlin, v.28, p. 295-307, 2014.

APÊNDICE A – VARIÁVEIS NÃO SIGNIFICATIVAS

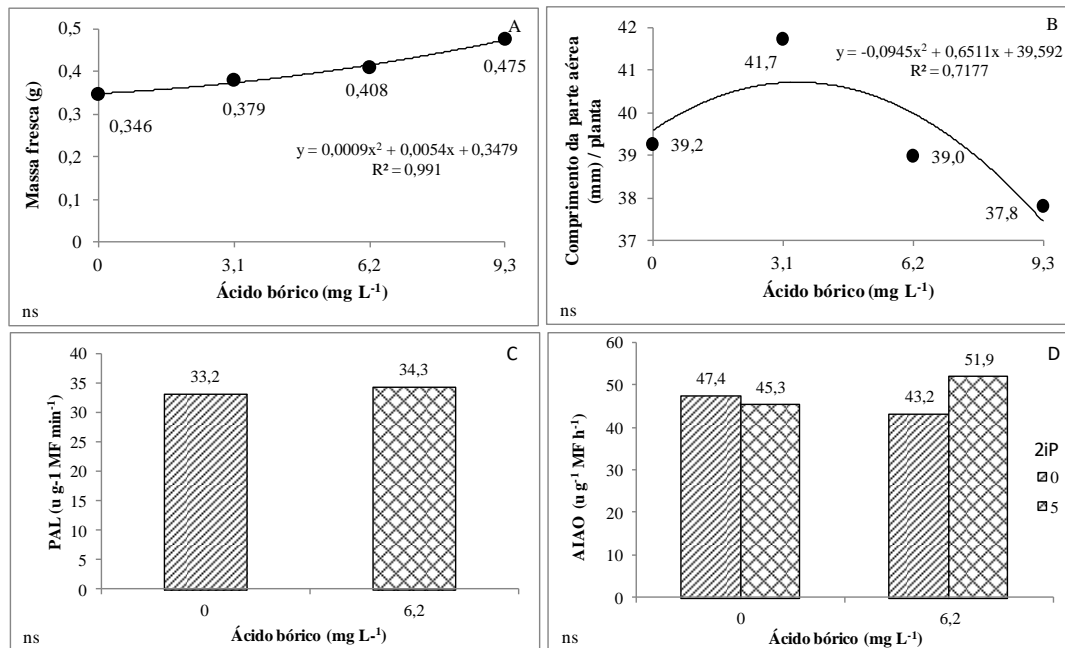


Figura 1 – Variáveis não significativas do experimento I. A – Massa Fresca, B – Comprimento da parte aérea, C – PAL foliar, D – AIA foliar.

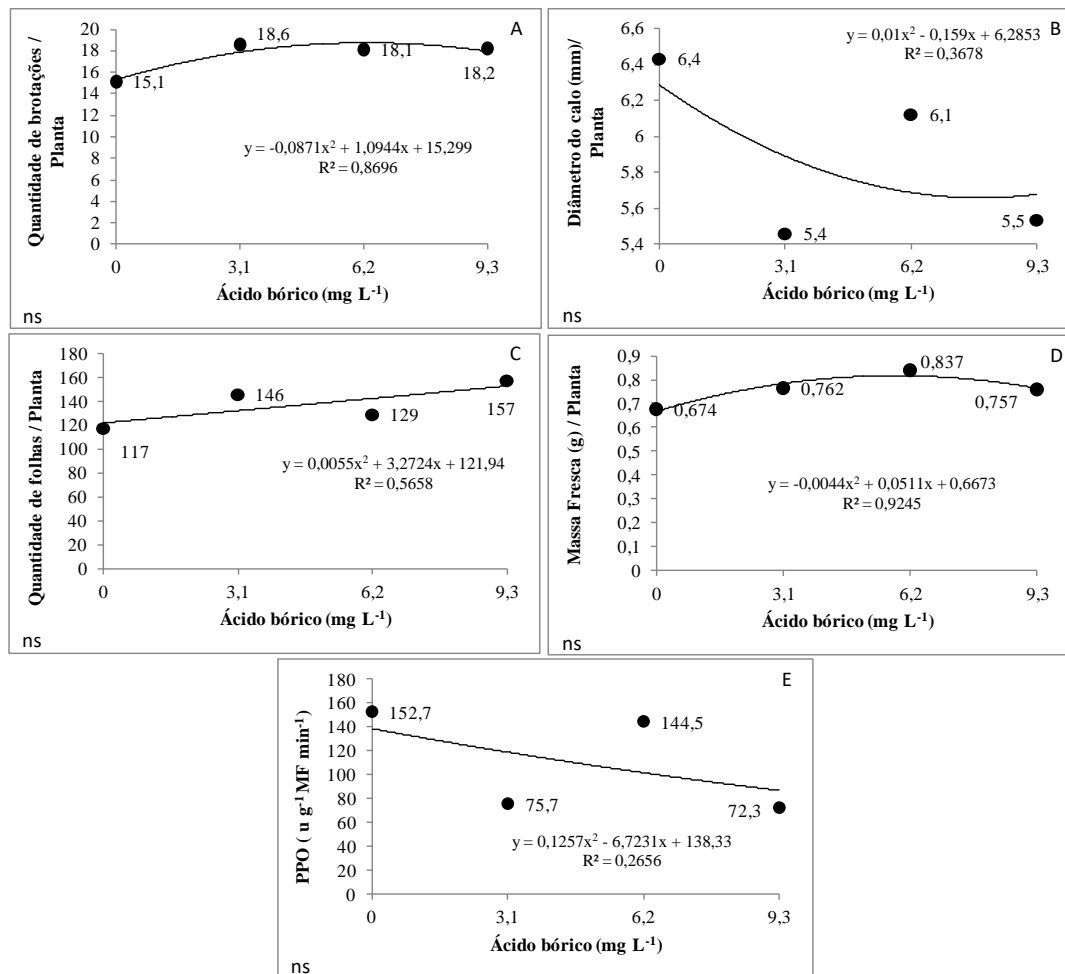


Figura 2 – Variáveis não significativas do experimento II. A – quantidade de brotações, B – diâmetro do calo, C – quantidade de folhas, D – massa fresca, E – PPO foliar.

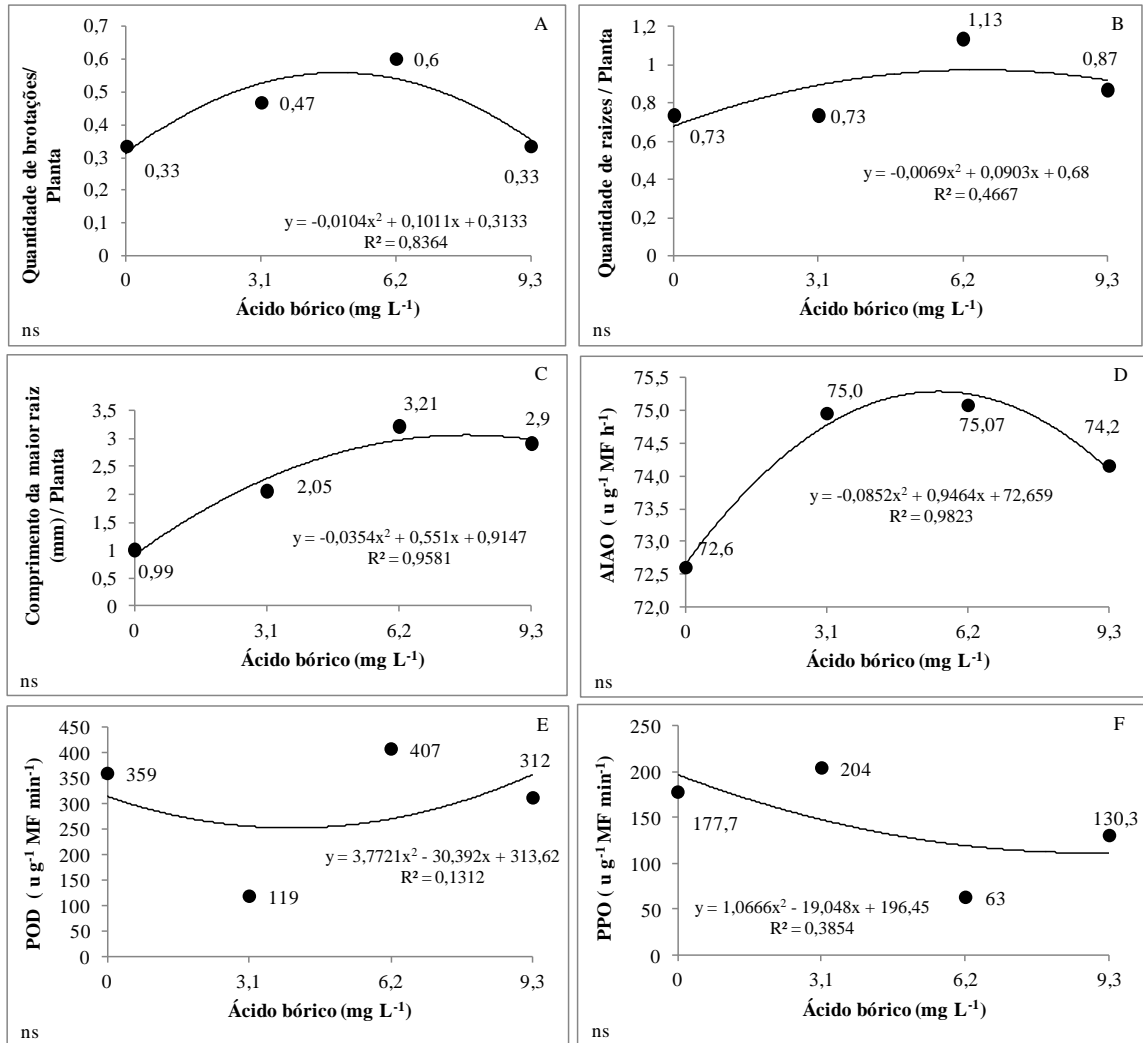


Figura 3 – Variáveis não significativas do experimento III. A – quantidade de brotações, B – quantidade de raízes, C – comprimento da maior raiz, D – AIA do calo, E – POD do calo e F – PPO foliar.

ANEXO A - COMPARATIVO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO MS E WPM

Nutriente	MS (mg L ⁻¹) ¹	WPM (mg L ⁻¹) ²
Nitrato de Amônio (NH ₄ NO ₃)	1650	400
Nitrato de cálcio (Ca (NO ₃) ₂ 4H ₂ O)	-	556
Nitrato de Potássio (KNO ₃)	1900	-
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂ 2H ₂ O)	440	36
Sulfato de Magnésio (Mg SO ₄ 7H ₂ O)	370	370
Sulfato de potássio (K ₂ SO ₄)	-	990
Fosfato de Potássio (KH ₂ PO ₄)	170	170
Sulfato de Manganês (MnSO ₄ H ₂ O)	22,3	22,3
Sulfato de Zinco (ZnSO ₄ 7H ₂ O)	8,6	8,6
Ácido Bórico (H ₃ BO ₃)	6,2	6,2
Molibdato de Sódio (Na ₂ Mo O ₄ 2H ₂ O)	0,25	0,25
Cloreto de Cobalto (CoCl ₂ 6H ₂ O)	0,025	-
Iodeto de Potássio(KI)	0,83	-
Sulfato de Cobre (Cu SO ₄ 5H ₂ O)	0,025	0,25
Sulfato ferroso (Fe SO ₄ 7H ₂ O)	27,8	27,8
Sódio EDTA (Na ₂ EDTA)	37,3	37,3
Ácido nicotínico (C ₆ H ₅ NO ₂)	0,5	0,5
Piridoxina (C ₈ H ₁₁ NO ₃)	0,5	0,5
Tiamina (C ₁₂ H ₁₇ O)	0,1	1,0
Glicina (C ₂ H ₅ NO ₂)	2,0	2,0

¹MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, 437-496, 1962.

²LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings International Plant Propagators Society*, Seattle, v.30, p.421- 427, 1980.