

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



Dissertação

**Substâncias húmicas e reguladores de crescimento na micropropagação de
mirtilheiro 'Woodard'**

Bruna Andressa dos Santos Oliveira

Pelotas, 2020

Bruna Andressa dos Santos Oliveira

Engenheira Agrônoma

**Substâncias húmicas e reguladores de crescimento na micropropagação
de mirtilheiro ‘Woodard’**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre em Ciências (área de conhecimento: Fruticultura de Clima Temperado).

Orientadora: Prof^a Dr^a Adriane Marinho de Assis

Coorientadora: Prof^a Dr^a Márcia Wulff Schuch

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

O48s Oliveira, Bruna Andressa dos Santos

Substâncias húmicas e reguladores de crescimento na micropropagação de mirtilheiro 'Woodard' / Bruna Andressa dos Santos Oliveira ; Adriane Marinho de Assis, orientadora ; Márcia Wulff Schuch, coorientadora. — Pelotas, 2020.

105 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. *Vaccinium* sp.. 2. Pequenas frutas. 3. Ácidos húmicos. 4. Biostimulantes. I. Assis, Adriane Marinho de, orient. II. Schuch, Márcia Wulff, coorient. III. Título.

CDD : 634.8

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Bruna Andressa dos Santos Oliveira

**Substâncias húmicas e reguladores de crescimento na micropropagação
de mirtilheiro 'Woodard'**

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 04/03/2020

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Adriane Marinho de Assis (Orientadora)
Doutora em Agronomia pela Universidade Estadual de Londrina-PR

Prof. Dra. Aline Ritter Curti
Doutora em Engenharia Florestal pela Universidade Federal de Santa Maria-RS

Dra. Cari Rejane Fiss Timm
Doutora em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas-RS

Prof. Dr. Marcio Paim Mariot
Doutor em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas-RS

**À memória de minha avó Eduvirges Oliveira
(19/08/2019), com todo o meu amor e gratidão,
dedico.**

Agradecimentos

À Deus, pela vida, pela força, por iluminar todos os dias da minha existência e abrir as portas certas nos momentos certos.

À Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade de realizar este trabalho.

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

À professora Adriane Marinho de Assis, pelos ensinamentos, atenção, confiança, amizade e palavras doces de conforto nas horas mais difíceis. Por me aceitar como sua orientanda, me acolher com toda dedicação e, através de suas aulas, ter me motivado e encantado com o mundo da docência. Faltam palavras para agradecer-lá por todo o carinho a mim dedicado.

À professora Márcia Wulff Schuch, que me acolheu calorosamente durante a graduação e também no mestrado, pela amizade, dedicação, carinho diário, conversas sábias, generosidade e por ser um exemplo de profissional e ser humano. Passamos momentos difíceis, mas com a senhora ao lado, tudo foi mais fácil. Agradeço por ter sido meu pilar!

Às amigas inesquecíveis Aline Ramm, Patrícia Maciejweski e Marilaine Garcia de Mattos, pela amizade, companheirismo diário, ajuda nos experimentos e conselhos de vida. Por me aturarem nos meus piores dias, serem meu porto seguro, me apoiarem sempre, me motivarem, por não terem me deixado desistir nas horas de desespero e por cada momento que vivemos juntas. Vocês foram o presente que a fruticultura me deu.

Ao amigo Dianini Brum Frölech, que sempre me apoiou nas horas difíceis, por ser meu parceiro de trabalho, com quem pude aprender muito. Através de seu talento no mundo dos vinhos pudemos fazer encontros agradáveis, alegres, tornando os momentos difíceis mais leves.

Às amigas do Laboratório de Propagação de Plantas Frutíferas, Tainara Gris e Zeni Tomaz Pinto, pelos anos de convivência e amizade, pelas

experiências compartilhadas, por toda a ajuda e por tornarem meus dias ainda melhores.

Aos amigos da Secretaria de Desenvolvimento Rural, Rosana Morales, Marcel Eicholz, Ana Celi Silva, Gabriele Delgado, Telmo Lena Garcez e Joaquim Dias de Oliveira, pelos dias agradáveis, pela amizade sólida que construímos e por todo o apoio que me foi dado para conseguir realizar este trabalho.

À minha avó Neli Lopes dos Santos, que foi incansável durante toda minha vida, sempre me acompanhando e motivando com palavras de carinho, se esforçando para me ajudar em todas as dificuldades e fazendo o impossível para a realização dos meus sonhos. Vó, sem ti nada seria possível e tê-la na minha vida é uma dádiva de Deus. Tu és meu maior exemplo.

À minha mãe Márcia Santos, que não mediu esforços durante toda minha vida, sempre sendo meu pilar, meu porto seguro, minha razão de viver. Agradeço pelo amor e força nas horas em que tudo dava errado, pelo companheirismo e pelas vibrações nos momentos de alegria. Simplesmente te amo!

Ao meu noivo Renan Rodrigues Machado, por ter sido meu maior incentivador nessa caminhada, ter acompanhado diariamente minhas dificuldades, sendo meu companheiro de todas as horas, por sempre me apoiar, motivar e fazer minha vida cada dia mais feliz. Tu despertas a melhor parte de mim e agradeço a Deus por fazer parte da minha vida.

À minha avó Eduvirges Nachtigall Oliveira (Viginha) (*In memoriam*), por ter sido tão especial na minha vida, pelas orações, por iluminar meus dias e transmitir uma energia inexplicável. Meu amor por ti é além da vida.

À minha irmã Marina Luiza dos Santos Oliveira, pelo amor e carinho, que tanto me confortaram em momentos difíceis, e ao meu irmão Gabriel dos Santos Soares, pelo sorriso que ilumina a minha vida. Você é meu anjo, anjo Gabriel.

Ao meu avô José Macedo, pelas palavras carinhosas de apoio e incentivo; também por ser meu pai de coração.

Aos meus padrinhos Fábio Erni Lopes dos Santos e Flávia Cardoso dos Santos e aos meus tios Sandro Eduardo Lopes dos Santos e Rosane Silva dos Santos, que com todo amor e carinho não mediram esforços para que eu

chegasse até esta etapa. Sempre me apoiaram, motivaram e proporcionaram todo o suporte necessário para que eu tivesse um bom estudo. Agradeço de coração.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu mais sincero agradecimento.

*” ...Às vezes a felicidade demora a chegar,
Aí é que a gente não pode deixar de sonhar,
Guerreiro não foge da luta e não pode correr,
Ninguém vai poder atrasar quem nasceu pra vencer.”
(Tá escrito - Grupo Revelação)*

Resumo

OLIVEIRA, Bruna Andressa dos Santos. **Substâncias húmicas e reguladores de crescimento na micropropagação de mirtilheiro 'Woodard'**. 2020. 105f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

O mirtilheiro (*Vaccinium* sp.) é uma frutífera promissora para a região sul do Brasil; entretanto, a dificuldade na propagação de algumas cultivares pode comprometer a expansão da cultura, sendo necessários estudos direcionados ao aperfeiçoamento no sistema de produção de mudas. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de substâncias húmicas e reguladores de crescimento na micropropagação de mirtilheiro 'Woodard'. O trabalho foi realizado em quatro etapas. No primeiro estudo foram avaliados o uso de 2iP (2-isopenteniladenina) e de concentrações de substâncias húmicas na multiplicação *in vitro*. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema bifatorial (duas concentrações (0; 100 mg L⁻¹) de 2iP e quatro concentrações (0; 1; 2; 3 mg L⁻¹) de substâncias húmicas), totalizando oito tratamentos e cinco repetições com cinco explantes. Aos 60 dias avaliou-se: sobrevivência, número de folhas, taxa de multiplicação, número de brotações, comprimento da maior brotação, comprimento da parte aérea, massa de matéria fresca e massa seca de parte aérea. No segundo estudo foram avaliados o efeito da presença e ausência de AIB (ácido indolbutírico), bem como concentrações de substâncias húmicas no enraizamento *in vitro* de mirtilheiro 'Woodard'. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema bifatorial (duas concentrações (0; 1 mg L⁻¹) de AIB e quatro concentrações (0; 1; 2; 3 mg L⁻¹) de substâncias húmicas), totalizando oito tratamentos e cinco repetições com cinco explantes por repetição. Aos 60 dias avaliou-se: enraizamento, número de brotações, comprimento da maior brotação, comprimento da parte aérea, número de raízes, comprimento da maior raiz, massa de matéria fresca e massa seca de parte aérea. No terceiro estudo foram avaliados o uso de substâncias húmicas e formas de aplicação na aclimatização de mirtilheiro 'Woodard'. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema bifatorial (três concentrações (0; 1; 2 mg L⁻¹) de substâncias húmicas e três formas de aplicação (imersão por 24h, pulverização a cada 7 dias e pulverização diária)), totalizando nove tratamentos com cinco repetições, sendo cada repetição constituída de uma embalagem articulada Sanpack[®] com 10 microestacas. Aos 60 dias foram avaliadas foram: sobrevivência, número de brotações, comprimento da maior brotação, comprimento da parte aérea, número de raízes, comprimento da maior raiz, massa seca de parte aérea e raiz. No quarto estudo foram avaliados o uso de substâncias húmicas e explantes oriundos de diferentes meios de cultura na aclimatização de mirtilheiro 'Woodard'. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema bifatorial (três concentrações de substâncias húmicas (Solohumics[®]) (0; 1; 2 mg L⁻¹) e explantes oriundos de diferentes meios de cultura (sem (0 mg L⁻¹) ou com (1 mg L⁻¹) substâncias húmicas), totalizando seis tratamentos e quatro repetições com uma embalagem articulada Sanpack[®] com 15 microestacas cada. Aos 60 dias foram avaliadas: sobrevivência, número de brotações, comprimento da maior brotação, comprimento da parte aérea, número de raízes, comprimento da maior

raiz, massa seca de parte aérea e raiz. Assim, concluiu-se que para a micropropagação de mirtilheiro 'Woodard': a) a multiplicação *in vitro* pode ser realizada com o uso de 1 mg L⁻¹ de substâncias húmicas, sem a utilização de 2iP (estudo 1); b) o enraizamento *in vitro* pode ser realizado com a utilização de 3 mg L⁻¹ de substância húmica e sem o uso de AIB (estudo 2); c) para a aclimatização, 2 mg L⁻¹ de substâncias húmicas e pulverização diária são as mais indicadas (estudo 3) e d) os explantes oriundos de meio de cultura com a presença de substâncias húmicas e, posteriormente, imersos por 24 horas na concentração 2 mg L⁻¹ dessas substâncias são os mais indicados para a aclimatização (estudo 4).

Palavras-chave: *Vaccinium* sp. Pequenas frutas. Ácidos húmicos. Biostimulantes.

Abstract

OLIVEIRA, Bruna Andressa dos Santos. **Humic substances in 'Woodard' blueberry micropropagation**. 2019. 105f. Qualification (Master Degree) – Program of Post-Graduation in Agronomy. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

The blueberry (*Vaccinium* sp.) is a promising fruit for the southern region of Brazil; however, the difficulty in propagating some cultivars can compromise the expansion of the crop, and studies aimed at improving the seedling production system are necessary. Therefore, the objective of this work was to evaluate the use of humic substances and growth regulators in the blueberry micropropagation 'Woodard'. The work was carried out in four stages. In the first study, the use of 2iP (2-isopentenyladenine) and concentrations of humic substances in *in vitro* multiplication were evaluated. The experimental design was completely randomized, in a bifactorial scheme (two concentrations (0; 100 mg L⁻¹) of 2iP and four concentrations (0; 1; 2; 3 mg L⁻¹) of humic substances), totaling eight treatments and five repetitions with five explants. At 60 days it was evaluated: survival, number of leaves, multiplication rate, number of shoots, length of the largest shoot, length of the aerial part, mass of fresh matter and dry mass of aerial part. In the second study, the effect of the presence and absence of IBA (indolbutyric acid) was evaluated, as well as concentrations of humic substances in the *in vitro* rooting of blueberry 'Woodard'. The experimental design was completely randomized, in a bifactorial scheme (two concentrations (0; 1 mg L⁻¹) of IBA and four concentrations (0; 1; 2; 3 mg L⁻¹) of humic substances), totaling eight treatments and five repetitions with five explants per repetition. At 60 days it was evaluated: rooting, number of shoots, length of the largest shoot, length of the aerial part, number of roots, length of the largest root, mass of fresh matter and dry mass of aerial part. In the third study, the use of humic substances and forms of application in the acclimatization of blueberry 'Woodard' were evaluated. The experimental design was completely randomized, in a bifactorial scheme (three concentrations (0; 1; 2 mg L⁻¹) of humic substances and three forms of application (immersion for 24 hours, spraying every 7 days and daily spraying)), totaling nine treatments with five repetitions, each repetition consisting of a Sanpack® tray with 10 micropiles. At 60 days, the following were evaluated: survival, number of shoots, length of the largest shoot, length of the aerial part, number of roots, length of the largest root, dry mass of aerial part and root. In the fourth study, the use of humic substances and types of culture medium in the acclimatization of blueberry 'Woodard' were evaluated. The experimental design was completely randomized, in a bifactorial scheme (three concentrations of humic substances (Solohumics®) (0; 1; 2 mg L⁻¹) and types of culture medium (without (0 mg L⁻¹) or with (1 mg L⁻¹) humic substances), totaling six treatments and four repetitions with a Sanpack® tray with 15 micropiles each 60 days were evaluated: survival, number of shoots, length of the largest shoot, length of the shoot, number of shoots roots, length of the largest root, dry mass of shoot and root. Thus, it was concluded that for the blueberry micropropagation 'Woodard':

a) the *in vitro* multiplication of can be performed with the use of 1 mg L⁻¹ of humic substances, without using 2iP (study 1); b) *in vitro* rooting can be performed using 3 mg L⁻¹ humic substance and without using IBA (study 2); c) for acclimatization, 2 mg L⁻¹ of humic substances and daily spraying are the most recommended (study 3) and d) explants from culture medium with the presence of humic substances and, subsequently, immersed for 24 hours in the concentration 2 mg L⁻¹ of these substances are the most suitable for acclimatization (study 4).

Keywords: *Vaccinium* sp. Small fruits. Humic acids. Biostimulants.

Lista de Figuras
Revisão bibliográfica

Figura 1	Frutos e folhas de mirtilheiro.....	26
Figura 2	Inflorescência de mirtilheiro.....	28
Figura 3	Mudas de mirtilheiro 'Woodard' cultivado em vasos em estufa agrícola.....	30
Figura 4	Aclimatização de mirtilheiro 'Woodard' em casa de vegetação (A) e detalhe das mudas de mirtilheiro durante a aclimatização (B)	35
Figura 5	Fertilizante organomineral Solohumics® (A) e detalhe do produto comercial (B)	38

Capítulo I - Substâncias húmicas e 2-isopenteniladenina na multiplicação *in vitro* de mirtilheiro 'Woodard'

Figura 1	Câmara de fluxo laminar na sala de transferência	41
Figura 2	Estante com vidrarias em sala de crescimento sob temperatura, fotoperíodo e intensidade luminosa controlados	41
Figura 3	Explante de mirtilheiro 'Woodard' 60 dias após a multiplicação <i>in vitro</i>	42
Figura 4	Explantos de mirtilheiro 'Woodard' em meio de cultura com a presença (100 mg L ⁻¹) (A) e ausência (0 mg L ⁻¹) (B) de 2iP e concentrações (0, 1, 2 e 3 mg L ⁻¹) de substâncias húmicas aos 60 dias multiplicados <i>in vitro</i>	44

Capítulo II - Substâncias húmicas e ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* de mirtilheiro 'Woodard'

Figura 1	Frascos de vidro com as concentrações de substâncias húmicas 0 (A), 1 (B), e 2 (C) e 3 (D) mg L ⁻¹	51
Figura 2	Peagâmetro Quimis® e autoclave vertical Phoenix Luterco®.....	51
Figura 3	Câmara de fluxo laminar onde foi realizada a transferência dos explantes em câmara de fluxo laminar.....	52
Figura 4	Frascos com explantes nas prateleiras da sala de crescimento em que os explantes permaneceram os 60 dias.....	52
Figura 5	Balança analítica Bioprecisa® e estufa com ventilação forçada Quimis®.....	53

Figura 6	Plantas mantidas em meio de cultura sem a presença de AIB e com substâncias húmicas nas concentrações 0 (A), 1 (B), 2 (C) e 3 (D) mg L ⁻¹ e com a presença de AIB e com substâncias húmicas nas concentrações 0 (E), 1 (F), 2 (G) e 3 (H) mg L ⁻¹ , após 60 dias da instalação do experimento.....	55
Figura 7	Enraizamento de plantas sem a presença de AIB e com substâncias húmicas nas concentrações 0 (A), 1 (B), 2 (C) e 3 (D) mg L ⁻¹ e com a presença de AIB e com substâncias húmicas nas concentrações 0 (E), 1 (F), 2 (G) e 3 (H) mg L ⁻¹ , após 60 dias da instalação do experimento.....	57

Capítulo III - Concentrações e formas de aplicação de substâncias húmicas na aclimatização de mirtilheiro 'Woodard'

Figura 1	Microestacas enraizadas (A), acondicionamento em embalagens articuladas (B) e pulverização com água destilada (C).....	66
Figura 2	Substâncias húmicas para pulverização nas concentrações 0(A), 1(B) e 2(C) mg L ⁻¹	66
Figura 3	Caracterização do substrato: pH (A), condutividade elétrica (B) e capacidade de retenção de água (C).....	67
Figura 4	Mirtilheiro 'Woodard' após aplicações de substâncias húmicas por imersão (A), pulverização a cada 7 dias (B) e pulverização diariamente (C), aos 60 dias de aclimatização.....	72

Capítulo IV - Concentrações de substâncias húmicas e explantes oriundos de diferentes meios de cultura na aclimatização de mirtilheiro 'Woodard'

Figura 1	Explantes de mirtilheiro 'Woodard' na fase inicial de enraizamento em meio de cultura sem (A) e com (B) substância húmica.....	76
Figura 2	Microestacas de mirtilheiro 'Woodard' acondicionadas em embalagens plásticas articuladas.....	77
Figura 3	Embalagens plásticas articuladas na casa de vegetação com temperatura controlada.....	78
Figura 4	Comprimento da maior raiz (cm) de plantas de mirtilheiro 'Woodard' oriundos de meio de cultura sem a presença (A – 0 mg L ⁻¹), (B – 1 mg L ⁻¹) e (C – 2 mg L ⁻¹) e ausência (D: 0 mg L ⁻¹), (E – 1 mg L ⁻¹) e (F – 2 mg L ⁻¹) de substância húmica aos 60 dias de aclimatização.....	83

Lista de Tabelas

Capítulo I - Substâncias húmicas e 2iP na multiplicação *in vitro* de mirtilheiro 'Woodard'

Tabela 1	Comprimento da parte aérea (cm), número de folhas e taxa de multiplicação de mirtilheiro 'Woodard' multiplicado <i>in vitro</i> , em função do uso de 2-Isopenteniladenina (2iP) e das concentrações de substâncias húmicas, aos 60 dias cultivados <i>in vitro</i> . UFPel, Pelotas-RS, 2020.....	43
Tabela 2	Número brotações, comprimento da maior brotação (cm), massa de matéria fresca e seca (g) na multiplicação <i>in vitro</i> de mirtilheiro 'Woodard', em função do uso de 2-Isopenteniladenina (2iP) e das concentrações de substâncias húmicas, aos 60 dias cultivados <i>in vitro</i> . UFPel, Pelotas-RS, 2020.....	46

Capítulo II - Substâncias húmicas e ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* de mirtilheiro 'Woodard'

Tabela 1	Sobrevivência (%) e comprimento da parte aérea (cm) de mirtilheiro 'Woodard' enraizadas <i>in vitro</i> , em função do uso de regulador de crescimento ácido indolbutírico (AIB) e das concentrações de substâncias húmicas. UFPel, Pelotas-RS, 2020.....	54
Tabela 2	Número de brotos e comprimento da maior brotação (cm) de mirtilheiro 'Woodard' enraizadas <i>in vitro</i> , em função do uso de regulador de crescimento ácido indolbutírico (AIB) e das concentrações de substâncias húmicas. UFPel, Pelotas-RS, 2020.....	56
Tabela 3	Enraizamento (%), número de raízes e comprimento da maior raiz (cm) de mirtilheiro 'Woodard' enraizadas <i>in vitro</i> , em função do uso de regulador de crescimento ácido indolbutírico (AIB) e das concentrações de substâncias húmicas. UFPel, Pelotas-RS, 2020.....	58
Tabela 4	Massa matéria fresca da parte aérea, massa matéria fresca das raízes, massa matéria seca da parte aérea e das raízes (g) de mirtilheiro 'Woodard' enraizadas <i>in vitro</i> , em função do uso de regulador de crescimento ácido indolbutírico (AIB) e das concentrações de substâncias húmicas. UFPel, Pelotas-RS, 2020.....	61

Capítulo III- Concentrações e formas de aplicação de substâncias húmicas na aclimatização de mirtilheiro 'Woodard'

Tabela 1	Sobrevivência (%) e comprimento da parte aérea (cm) de plantas de mirtilheiro 'Woodard' aos 60 dias após a aclimatização, em função das formas de aplicação e concentrações de substâncias húmicas. Pelotas-RS, 2020...	68
Tabela 2	Número de brotos e comprimento da maior brotação (cm) de plantas de mirtilheiro 'Woodard' aos 60 dias após a aclimatização, em função das formas de aplicação e concentrações de substâncias húmicas. Pelotas-RS, 2020...	69
Tabela 3	Número de raízes e comprimento da maior raiz (cm) de plantas de mirtilheiro 'Woodard' aos 60 dias após a aclimatização, em função das formas de aplicação e concentrações de substâncias húmicas. Pelotas-RS, 2020...	71
Tabela 4	Massa da matéria seca das raízes e da parte aérea (g) de plantas de mirtilheiro 'Woodard' aos 60 dias após a aclimatização, em função das formas de aplicação e concentrações de substâncias húmicas. Pelotas-RS, 2020...	73

Capítulo IV - Concentrações de substâncias húmicas e explantes oriundos de diferentes meios de cultura na aclimatização de mirtilheiro 'Woodard'

Tabela 1	Sobrevivência (%) e comprimento da parte aérea (cm) de plantas aclimatizadas de mirtilheiro 'Woodard', em função do tipo de explante e das concentrações de substâncias húmicas. Pelotas-RS, 2020.....	79
Tabela 2	Número de brotos e comprimento da maior brotação (cm) de plantas aclimatizadas de mirtilheiro 'Woodard', em função do tipo de explante e das concentrações de substâncias húmicas. Pelotas-RS, 2020.....	80
Tabela 3	Número de raízes, comprimento da maior raiz (cm), massa da matéria seca das raízes e da parte aérea (g) de plantas de mirtilheiro 'Woodard' aos 60 dias após a aclimatização, em função do tipo de explante e concentrações de substâncias húmicas. Pelotas-RS, 2020.....	82
Tabela 4	Massa da matéria seca das raízes e da parte aérea (g) de plantas de mirtilheiro 'Woodard' aos 60 dias após a aclimatização, em função do tipo de explante e concentrações de substâncias húmicas. Pelotas-RS, 2020.....	84

Sumário

1. Introdução.....	20
2. Revisão bibliográfica	23
2.1 Importância sócio econômica da fruticultura.....	23
2.2 Pequenas frutas.....	25
2.3 Mirtilo (<i>Vaccinium</i> spp.)	26
2.3.1 Origem e descrição botânica	26
2.3.2 Grupos de mirtilheiro	28
2.3.3 Mirtilheiro 'Woodard'	29
2.3.4 Propagação de mirtilheiro	30
2.4 Substâncias Húmicas	36
3. Capítulo I - Substâncias húmicas e 2iP na multiplicação <i>in vitro</i> de mirtilheiro 'Woodard'	39
3.1 Introdução	39
3.2 Materiais e Métodos	40
3.3 Resultados e Discussão	42
3.4 Conclusão	48
4. Capítulo II - Substâncias húmicas e ácido indolbutírico no enraizamento <i>in vitro</i> de mirteiro 'Woodard'	49
4.1 Introdução	49
4.2 Materiais e Métodos	50
4.3 Resultados e Discussão	53
4.4 Conclusão	63
5. Capítulo III - Concentrações e formas de aplicação de substâncias húmicas na aclimatização de mirtilheiro 'Woodard'	64
5.1 Introdução	64
5.2 Materiais e Métodos	65
5.3 Resultados e Discussão	67
5.4 Conclusões	74
6. Capítulo IV - Concentrações de substâncias húmicas e explantes oriundos de diferentes meios de cultura na aclimatização de mirtilheiro 'Woodard'.....	75
6.1 Introdução	75

6.2 Materiais e Métodos	76
6.3 Resultados e Discussão	78
6.4 Conclusão	85
7. Considerações finais	86
Referências	87

1 Introdução

A fruticultura é um importante segmento do agronegócio brasileiro, sendo o país um dos três maiores produtores mundiais de frutas, com cerca de 41 milhões de toneladas colhidas em 2018 (IBGE, 2020).

Dentre as espécies frutíferas, um grupo que tem merecido atenção especial por parte de produtores, comerciantes, consumidores e pesquisadores é o das pequenas frutas, por propiciar alto retorno financeiro em pequenas áreas, além do valor como alimento funcional. Nesse grupo estão o mirtilheiro (*Vaccinium* spp.), a amoreira-preta (*Rubus* spp.), a framboeseira (*Rubus idaeus*), o morangueiro (*Fragaria* spp.) e a physalis (*Physalis* sp) (LEITZKE, 2007; ANTUNES; PERES, 2013).

Para o cultivo no Sul do Brasil o mirtilheiro é uma das culturas mais promissoras, devido às condições edafoclimáticas favoráveis à adaptação de várias cultivares, além de ser muito apreciado pelo sabor exótico, valor econômico e ampla divulgação dos frutos como fonte da longevidade (SHARPE, 1980; RUFATO; ANTUNES, 2016). No entanto, para a expansão nas áreas de produção é fundamental o uso de mudas de qualidade.

Uma alternativa para aumentar a disponibilidade de mudas é o uso da micropropagação (DAMIANI; SCHUCH, 2009), que além de possibilitar a produção de grande quantidade de plantas em curto período de tempo, permite a obtenção de mudas livres de doenças e a propagação de espécies difíceis de serem multiplicadas por outros métodos. Outra vantagem do ponto de vista prático está relacionada à restauração da capacidade de enraizamento, resultado do rejuvenescimento obtido pelos sucessivos subcultivos e pelo uso de reguladores de crescimento (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Na micropropagação, vários fatores podem influenciar o potencial regenerativo da espécie, como o genótipo, os tipos e tamanhos de explantes, os tipos e as concentrações de reguladores de crescimento, os meios de cultura e as condições de cultivo (BERED et al., 1998). Conforme Schuch e Erig (2005), o uso de reguladores de crescimento, juntamente com as formulações básicas dos meios de cultura é imprescindível para que se obtenha êxito na propagação de algumas culturas *in vitro*.

Quanto aos reguladores de crescimento, o 2iP está entre as citocininas mais utilizadas e tem sido muito eficiente na multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias em diversas espécies (HU; WANG, 1983). Segundo Schuch et al. (2008), este regulador é comumente utilizado para espécies de mirtilo por promover desenvolvimento superior quando comparado a outras citocininas.

Outro regulador comumente usado é o ácido indolbutírico (AIB), do grupo das auxinas (HARTMANN et al., 1997). Esta substância têm a capacidade de promover o crescimento e a divisão celular em cultura de tecidos (KRIKORIAN, 1991), bem como na estimulação de raízes adventícias (TAIZ; ZEIGER, 2004). Apesar de ser utilizado isoladamente ou em combinação, no meio de enraizamento (GATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), é um reagente químico com custo elevado (BALDOTTO; BALDOTTO, 2014).

Visando reduzir o período de desenvolvimento da muda e, conseqüentemente, os custos de produção, algumas alternativas inovadoras podem ser adotadas, como as substâncias húmicas. Constituídas pelas frações ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e huminas, tais substâncias são compostos orgânicos com condensados produzidos pela ação microbiana durante o processo de degradação (BALDOTTO; BALDOTTO, 2014). Possibilitam o aumento na absorção de nutrientes e no crescimento vegetal (VAUGHAN; MALCOLM, 1985; CHEN; AVIAD, 1990; NARDI et al., 2002) e têm sido utilizadas na estimulação de raízes adventícias (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Considerando a importância da propagação de mirtilo e a escassez de estudos com a cultivar Woodard em relação as etapas da micropropagação, além da inexistência de informações sobre o uso de substâncias húmicas e reguladores de crescimento, torna-se justificável o desenvolvimento de pesquisas que envolvam estes aspectos, principalmente, no que se refere à avaliação da sua eficiência.

Com base nesses aspectos, o objetivo desse trabalho foi avaliar o uso de substâncias húmicas e reguladores de crescimento na micropropagação de mirtilo 'Woodard'. Para tanto, foram elaborados quatro capítulos, apresentados a seguir.

Capítulo I. Substâncias húmicas e 2-isopenteniladenina na multiplicação *in vitro* de mirtilheiro 'Woodard'

Capítulo II. Substâncias húmicas e ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* de mirteiro 'Woodard'

Capítulo III. Concentrações e formas de aplicação de substâncias húmicas na aclimatização de mirtilheiro 'Woodard'

Capítulo IV. Concentrações de substâncias húmicas e explantes oriundos de diferentes meios de cultura na aclimatização de mirtilheiro 'Woodard'

2 Revisão bibliográfica

2.1 Importância sócio econômica da fruticultura

A fruticultura é uma atividade de grande importância social e econômica. Os três maiores produtores mundiais são China, Índia e Brasil (ABRAFRUTAS, 2019) que, juntos, respondem por 45,9% do total mundial e têm suas produções destinadas principalmente aos seus mercados internos (DOSSA; FUCHS, 2017).

De acordo com os dados do IBGE (2019), no Brasil foram produzidas cerca de 41 milhões de toneladas de frutas em 2018. Além disso, a fruticultura gera cerca de cinco milhões de empregos, o que representa 16% do total de vagas no agronegócio brasileiro (ABRAFRUTAS, 2019; KIST et al., 2018).

Atualmente, o país encontra-se em 23º no *ranking* dos exportadores globais (KIST et al., 2018). No ano de 2019, a fruticultura brasileira alcançou a marca de 16% de aumento em volume exportado, com mais de 980 milhões de toneladas de frutas, comparados a 848 milhões em 2018 (ABRAFRUTAS, 2020). Os maiores importadores das frutas brasileiras são os países baixos (327.071.385 kg), o Reino Unido (143.262.238 Kg), os Estados Unidos (56.145.003 Kg) e a Espanha (99.760.478 Kg) (KIST et al., 2018).

Com relação às frutas mais exportadas, podem ser citadas: manga (*Mangifera indica* L.) (221.913.863 Kg), melão (*Cucumis melo* L.) (251.641.687 Kg), uva (*Vitis* sp.) e limões e lima (*Citrus* sp.) (47.323.288 Kg), com aumento de 30%, 27%, 19% e 10% respectivamente. Entretanto, melancia (*Citrullus lanatus*), banana (*Musa* sp.) e abacate (*Persea americana*) também apresentaram crescimento considerável nesse volume (ABRAFRUTAS, 2020).

A diversidade edafoclimática no Brasil possibilita o cultivo de espécies com diferentes exigências e origens. Dessa forma, além do vasto mercado interno, possui elevado potencial de atingir mercados consumidores no mundo todo, com a oferta de frutas de clima tropical e temperado durante boa parte do ano (HOFFMANN; SEBEN, 2003; ANDRADE, 2017). Em relação a área de plantio, merecem destaque São Paulo (540.623 ha), Bahia (308.913 ha) e Rio Grande do Sul, com 148.928 de hectares colhidas em 2016 (KIST et al., 2018).

No caso da produção gaúcha, o Estado é o maior produtor nacional de uva (*Vitis* sp.) (49.733 ha), pêssego (*Prunus persica*) (12.574 ha), figo (*Ficus carica*) (1.590 ha), pera (*Pyrus communis*) (810 ha), nectarina (*Prunus persica*),

kiwi (*Actinidia deliciosa*), amora (*Rubus* spp.), mirtilo, azeitona (*Olea europaea*) (231 ha) (CONTE, 2017; IBGE, 2015), entre outras. A produção diferencia-se pela possibilidade de colheita em épocas de entressafra e tal fato permite a obtenção de bons preços e viabiliza o comércio para o consumo de mesa em todo o Brasil.

Algumas características, como a diversidade de solos e a existência de regiões com diferentes condições climáticas, somadas à pluralidade de etnias têm favorecido o cultivo de um grande número de espécies no Rio Grande do Sul, proporcionando oferta de frutas durante todos os meses do ano (CONTE, 2017). Além disso, a produção tem crescido consideravelmente, pois muitos estão deixando o plantio das culturas mais tradicionais para se dedicar à fruticultura (FRUTICULTURA, 2019).

Uma alternativa aos produtores rurais é o cultivo do mirtilheiro, devido ao seu alto valor de venda no mercado, tanto como frutas *in natura*, como processadas na forma de geleias, sucos, sobremesas e outros (PASA et al., 2014). Inclusive, na América do Sul, muitos países beneficiam-se da possibilidade de produção durante a entressafra europeia e norte-americana, assim ocorrendo uma maior exportação da fruta (FACHINELLO, 2008; CANTUARIAS-AVILÉS, 2014); conseqüentemente, o Brasil tem grande potencial para ampliar a produção de mirtilos visando a exportação (FACHINELLO, 2008; HOFFMANN; ANTUNES, 2004).

Nas últimas duas décadas ocorreu um rápido crescimento da área de cultivo e da produção de frutos de mirtilo no mundo. De 1990 a 2014, a área plantada aumentou de 47.418 ha para 95.195 ha, enquanto a produção de frutos subiu de 135.547 toneladas em 1990 para 525.620 toneladas em 2014 (FAOSTAT, 2017). No Brasil, a produção está estimada em cerca de 300 toneladas, concentradas nas cidades de Vacaria, Pelotas, Erechim e Caxias do Sul - RS, Palmas - PR, Barbacena - MG e Campos do Jordão - SP, totalizando uma área de aproximadamente 118 ha. No Rio Grande do Sul, a região de Vacaria é a pioneira no cultivo de mirtilheiro e a referência na produção (RUFATO; ANTUNES, 2016).

2.2 Pequenas frutas

Segundo Barbieri e Vizzoto (2012), não existe uma definição botânica do que seriam as frutas vermelhas, tampouco as pequenas frutas. Tais termos fazem parte da linguagem informal para designar frutas com coloração avermelhada ou arroxeadas e de tamanho pequeno. Embora algumas apresentem coloração avermelhada e dimensões reduzidas, os dois termos não são sinônimos e nem todas as pequenas frutas são, ao mesmo tempo, frutas vermelhas.

No grupo das pequenas frutas, o mirtilheiro, a amoreira-preta, a framboeseira, o morangueiro e a *Physalis* (LEITZKE, 2007) representam uma oportunidade para o fruticultor diversificar a produção e obter bons lucros. Apresentam como característica geral a exigência de mão-de-obra; porém, com a possibilidade de obtenção de retorno econômico, mesmo em áreas de agricultura com base familiar (PAGOT; HOFFMANN, 2003). Além disso, existem empresas bem organizadas e conhecedoras do mercado internacional empenhadas em produzir e exportar estas frutas (ANTUNES; PERES, 2013).

Essas frutíferas podem ser cultivadas visando o consumo *in natura* ou a industrialização, para a produção de doces, geleias, sucos e néctares, o que segundo Pagot e Hoffmann (2003), agrega valor ao produto e auxilia na viabilização da agricultura.

De acordo com Antunes e Peres (2013), há uma grande procura por produtos à base dessas frutas pelos consumidores, incentivados especialmente por seu valor como alimento funcional. Para ser considerado como tal, o alimento deve propiciar efeito benéfico, relevante na melhoria do estado de saúde, bem-estar e na redução do risco de doenças (SOUSA et al., 2007). Cada espécie possui teores característicos de compostos fenólicos, constituídos essencialmente por antocianinas, flavonóis, proantocianidinas (elagitaninos e galtaninos), ácidos fenólicos, catequinas e isoflavonoides, reconhecidos por sua capacidade antioxidante (LILA; RASKIN, 2005).

A difusão da informação, o aumento da oferta, o interesse do consumidor, a atratividade em sabor e visual, bem como as estratégias de marketing são os principais fatores que têm impulsionado produtores de frutas a ingressarem neste ramo da fruticultura (PAGOT; HOFFMANN, 2003). Outro aspecto é o desenvolvimento de tecnologias que ajudam a reduzir as perdas pós-colheita e

a elaborar produtos diferenciados, no intuito de valorizar a produção local e viabilizar um maior período de atividade durante o ano em agroindústrias, maximizando a rentabilidade do produtor e reduzindo os preços do produto para o consumidor (ANTUNES; PERES, 2013).

2.3 Mirtilheiro (*Vaccinium* sp.)

2.3.1 Origem e descrição botânica

O mirtilheiro (Figura 1) é uma frutífera de clima temperado nativa de bosques do Norte da Europa e América do Norte, onde é denominado “blueberry” (SEVERO et al., 2008), sendo cultivada também na Ásia, África, Austrália, América do Sul (BRAZELTON; STRIK, 2007).



Figura 1. Frutos e folhas de mirtilheiro.
Fonte: Aline Ramm, 2019.

Pertencente à família Ericaceae, é classificada dentro da subfamília Vaccinioideae, na qual encontra-se o gênero *Vaccinium* (TREHANE, 2004), que compreende cerca de 400 espécies, sendo 40% nativas do Sudoeste da Ásia, 25% da América do Norte e 10% das Américas Central e do Sul com o restante espalhadas pelo mundo (DARNELL, 2006).

Em 1906 o pesquisador Coville iniciou a domesticação desta frutífera, estudando desde a germinação da semente até a maturação da fruta (GALLETA; BALLINGTON, 1996). Porém, há relatos do consumo de frutos de mirtilheiro pelo homem desde a pré-história (SEVERO et al., 2008).

As primeiras introduções do mirtilo no Brasil datam de 1983, através da Embrapa Clima Temperado (Pelotas – RS), que implantou uma coleção de cultivares oriundas da Universidade americana da Flórida, enquanto o cultivo comercial iniciou em 1990 na cidade de Vacaria-RS (MADAIL; SANTOS, 2004).

A planta pode ser caducifólia, arbustiva ou rasteira (BOURNOUS, 2009; RETAMALES; HANCOCK, 2012), com hábito de crescimento basitônico, ou seja, a brotação ocorre, preferencialmente, nas gemas basais. Sendo, este fator que define o porte da planta (HERTER; WREGUE, 2006).

Esta cultura adapta-se às mais variadas condições climáticas, que vão desde as regiões com 300 horas de frio abaixo de 7,2 °C, até regiões com mais de 1.100 horas nesta mesma temperatura (HERTER; WREGUE, 2006). Porém, a falta de frio causa brotação e floração deficiente e, por consequência, produção deficiente (RASEIRA; ANTUNES, 2004).

Em relação aos ramos do mirtilheiro, estes apresentam coloração amarelo dourado ou avermelhado. As folhas são decíduas, grandes (3-5 cm x 7-9 cm), com forma oval alongada (BOUNOUS, 2009), com sistema de arranjo alternado (DARNELL, 2006). Com o frio e a redução das horas de luz, há redução da clorofila e produção do pigmento responsável pela coloração avermelhada das folhas, que irá substituir a cor verde escuro que se observa no restante do ano.

O sistema radicular é superficial e caracterizado por ter raízes primárias muito finas, fibrosas e sem pelos radiculares (BOUNOUS, 2009).

As flores compõem uma inflorescência (Figura 2), formando racimos que se desenvolvem na parte terminal dos ramos (BUZETA, 1997). Cada racimo contém de oito a 16 flores, variando de acordo com a espécie e a cultivar (DARNELL, 2006). Na região de Pelotas - RS, a floração do mirtilheiro ocorre de meados de agosto ao início de setembro (RASEIRA; ANTUNES, 2004).



Figura 2. Inflorescência de mirtilheiro.
Fonte: Aline Ramm, 2020.

A frutificação se dá em ramos de um ano de idade (RASEIRA; ANTUNES, 2004). O fruto fresco é uma baga de formato achatado, corado pelos lóbulos existentes no cálice, diâmetro que pode variar de 8 a 22 mm (CHILDERS; LYRENE, 2006). A massa do fruto varia de 1,5 a 4,0 g, sabor doce a doce-ácido, com muitas sementes em seu interior, coloração azul escuro no epicarpo e superfície cerosa (DARNELL, 2006), que recebe o nome de pruína e dá ao fruto um aspecto visual de cor azul claro (BUZETA, 1997).

É um fruto não climatérico, não sendo observadas variações significativas na taxa respiratória ao longo do tempo de colheita e conservação (LAVADINHO et al., 2001).

2.3.2 Grupos de mirtilheiros

A maior parte da produção de mirtilos origina-se de cultivares derivadas principalmente de quatro grupos: Highbush, Southern Highbush, Lowbush, Rabbiteye e de seus híbridos (ROWLAND et al., 2012).

O grupo Highbush é originário da costa oeste da América do Norte (FACHINELLO, 2008), caracteriza-se por apresentar porte alto, com plantas de dois ou mais metros de altura. A necessidade em frio hibernal das plantas deste grupo está geralmente entre 650 e 850 horas (RASEIRA, 2004). Nos pomares brasileiros são bem difundidas, principalmente na região Sul do país, desde a introdução de cultivares com menos requerimentos de frio, como O'neal e Misty (RASEIRA; ANTUNES, 2004).

Outro grupo é o Southern highbush, que apresenta baixa necessidade em frio, sendo suficiente 200 a 600 horas (PAGOT, 2006). Possui porte alto, de até quatro metros (ANTUNES et al., 2013), sendo originário do Sul dos Estados Unidos. Neste grupo também predomina a espécie *V. corymbosum* (GALLETTA; BALLINGTON, 1996). Apresenta melhor desempenho nos planaltos, em solos pobres de matéria orgânica, além de ser resistente a doenças. Porém, são mais exigentes em água, qualidade de solo, drenagem e quantidade de matéria orgânica que as cultivares do tipo "rabbiteye" (VILELLA, 2003). Entre as cultivares pertencentes a este grupo estão Misty, Georgiagem, O'Neil, Jewel, Santa Fé, Bluecrisp, Millenia e Star (RUFATO; ANTUNES, 2016).

Quanto ao Lowbush, o grupo é caracterizado por possuir arbustos de pequeno porte, com plantas de até 50 cm de altura. A maioria delas pertence à espécie *V. angustifolium*, embora esteja neste grupo, o mirtilo do Canadá (*V. myrtilloides* e *V. boreale*) (GALLETTA; BALLINGTON, 1996). Sua origem é o Nordeste dos Estados Unidos e partes do Canadá (DARNELL, 2006), onde possui variedades com exigência de 1.000 a 1.200 número de horas de frio (FILHO, 2018). Em pesquisas recentes, houve melhoria na genética de cultivares, tais como Early Sweet e Bloodstone (OTTO, 1995).

Entre os grupos, o que mais se destaca no Brasil é o Rabbiteye, no qual pertence à espécie *V. ashei*, também conhecido como "olho de coelho". Originário do Sul da América do Norte (FACHINELLO, 2008), este caracteriza-se por possuir plantas de dois a quatro metros de altura (RASEIRA, 2004), além de possuir elevado vigor, plantas longevas, alta produtividade, tolerância ao calor e à seca, baixa exigência na estação fria, com cerca de 300 horas de frio (HERTER; WREGGE, 2004), floração precoce, longo período entre floração e maturação, e frutos firmes, com longa vida pós-colheita se conservados adequadamente (ANTUNES; RASEIRA, 2006; GOUGH, 1994; EHLENFELDT et al., 2007). Entre as cultivares mais plantadas estão: Aliceblue, Bluebelle, Bluegem, Briteblue, Climax, Delite, Powderblue e Woodard (CANTUARIAS-AVILÉS, 2010).

2.3.3 Mirtileiro 'Woodard'

É uma cultivar originária de Tifton, Geórgia, sendo oriunda de cruzamento entre 'Ethel' e 'Callaway' (SANTOS; RASEIRA, 2002). Os frutos têm boa

aparência, com peso médio de 1,0 a 1,2 g, enquanto o diâmetro varia de 1,1 a 1,5cm. Apresentam película azul-clara e são considerados macios e, portanto, inadequados para transporte a longas distâncias. O teor de sólidos solúveis tem sido superior a 12° Brix, podendo chegar a 13,9°Brix (SANTOS; RASEIRA, 2002).

Esta cultivar (Figura 3), além do consumo *in natura*, possui ampla possibilidade de industrialização, com o processamento dos frutos para comercialização em lata, congelado, seco ou em forma líquida (BISWAS, 2007), na mistura em pó de bebidas (SHEWFEL; AHMED, 1978) e na elaboração de *toppings* para cobertura e recheio de bolos, iogurtes, sorvetes, tortas, flans, pudins, entre outros (RODRIGUES, 2006).



Figura 3. Mudas de mirtilheiro 'Woodard' cultivadas em vasos em estufa agrícola.
Fonte: Aline Ramm, 2019.

2.3.4 Propagação do mirtilheiro

A propagação é um conjunto de práticas destinadas a perpetuar as espécies de forma controlada. Seu objetivo é aumentar o número de plantas, garantindo a manutenção das características agronômicas essenciais das cultivares (FACHINELLO et al., 2005).

Segundo Souza e Araújo (1999), a escolha do método a ser usado depende da espécie e do objetivo. Um bom método de propagação, basicamente, deve conter as seguintes características: ser de baixo custo, fácil execução e proporcionar um elevado percentual de mudas obtidas.

Os métodos de propagação podem ser agrupados em dois tipos: propagação sexuada, que se baseia no uso de sementes, e propagação assexuada, a partir do uso de estruturas vegetativas. Fundamentalmente, a diferença entre as duas formas de propagação é a utilização e a ocorrência da mitose e da meiose. Enquanto na propagação assexuada a divisão celular implica na multiplicação simples (mitose), mantendo o número de cromossomos inalterado, na propagação sexuada a meiose proporciona a redução do número de cromossomos (FACHINELLO et al., 2005).

Para Fachinello et al. (2005) e Franco et al. (2007), vários fatores influenciam na eficácia do método de propagação, como genótipo, condições fisiológicas da planta matriz, tipo de estaca e condições ambientais, entre outros.

Na maioria das plantas frutíferas a produção comercial de mudas é realizada por propagação vegetativa, que além de proporcionar mudas de qualidade, fixa características agrônômicas desejáveis de forma eficiente (BASTOS et al., 2005).

No caso do mirtilheiro, as mudas podem ser oriundas de sementes, enxertia, estaquia lenhosa, semilenhosa e herbácea ou através de técnicas de propagação *in vitro* (MAINLAND, 2006). No entanto, a micropropagação, além da produção de grande quantidade de plantas em curto período de tempo, permite a obtenção de mudas com qualidade fitossanitária, livres de doenças e a propagação de espécies difíceis de serem multiplicadas por outros métodos. Outra vantagem do ponto de vista prático está relacionada ao enraizamento e ao rejuvenescimento obtido pelos sucessivos subcultivos e uso de reguladores de crescimento (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

O processo de micropropagação divide-se em quatro etapas: a primeira é o estabelecimento do explante no meio de cultura; a segunda é aquela em que ocorre a multiplicação ou indução de brotos múltiplos; a terceira refere-se ao enraizamento e a quarta etapa é a aclimatização, com a transferência gradual das plantas para a condição *ex vitro* (HARTMANN et al., 1997).

O material vegetal utilizado para a propagação *in vitro* fica submetido a condições controladas de luz, fotoperíodo e temperatura, interagindo com substâncias orgânicas, como os hormônios, que desempenham importante função na regulação do crescimento (SCHUCH; ERIG, 2005).

No estabelecimento da cultura é necessário obter plantas saudáveis e adaptadas às condições *in vitro* para que, numa fase seguinte, possam ser multiplicadas. Primeiramente, é realizada a escolha do explante, que se refere a qualquer segmento de tecido oriundo de uma planta para iniciar um cultivo *in vitro*, podendo ser uma gema axilar ou segmento nodal, ápice caulinar ou radicular, entre outros (FACHINELLO et al., 2005). Para a propagação vegetativa de espécies lenhosas, e nesse caso inclui-se o mirtilheiro, a técnica mais comumente utilizada baseia-se no uso de gemas axilares (ou segmentos nodais) (XAVIER et al., 2007).

Erig e Schuch (2005), estudando o estabelecimento *in vitro* de mirtilheiro, verificaram que a adição de 24,6 μM de 2iP ao meio de cultura WPM (Wood Plant Media) favorece o estabelecimento da cv. Flórida. Silva et al. (2006), observaram resultados semelhantes para cv. Delite, obtendo resultados satisfatórios com o uso de WPM; entretanto, o regulador de crescimento acrescentado foi a citocinina zeatina.

Após o estabelecimento da espécie vegetal, inicia-se a multiplicação, quando as brotações são cultivadas com a finalidade de aumentar o seu número. Em seguida, tem-se a etapa do enraizamento *in vitro*, ou seja, a rizogênese, cujo propósito é a formação de raízes adventícias nas partes aéreas, obtidas no estágio de multiplicação, que permite a constituição de plantas completas, para posterior aclimatização às condições *ex vitro* (FACHINELLO et al., 2005).

Vale salientar que o crescimento *in vitro* está relacionado com a formulação do meio de cultura e pode apresentar variações nas respostas para tecidos de diferentes cultivares (COZZA et al. 1997), além de requerer técnicas eficientes e protocolos de propagação (MOREIRA, 2014). No que diz respeito à micropropagação de mirtilheiro, o meio de cultura utilizado nas fases de multiplicação e enraizamento *in vitro* é o WPM - Wood Plant Medium (LLOYD; MCCOWN, 1980), acrescentado de 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 30 g L^{-1} de sacarose e 6 g L^{-1} de ágar.

Para o sucesso da propagação de culturas *in vitro*, muitas vezes o uso de reguladores de crescimento é de suma importância. Estes são adicionados ao meio de cultura em concentrações específicas e desempenham um papel fundamental no crescimento e na morfogênese em cultura de tecidos (PIERIK, 1990; FLORES et al., 1998).

Na etapa da micropropagação denominada multiplicação é importante averiguar a necessidade do uso de citocinina, indicando o tipo e a concentração adequada. O 2ip (2-isopenteniladenina) está entre as citocininas mais utilizadas e tem sido muito eficiente na multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias em diversas espécies (HU; WANG, 1983). Testes com combinações de citocinina com outros reguladores de crescimento também são comuns nos meios de cultura (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Maciejewski et al. (2017) verificaram que a presença de 2iP na multiplicação *in vitro* de mirtilheiro 'Duke', proporcionou maior número de brotações, comprimento de brotações, número de folhas e taxa de multiplicação. Em outro estudo, Erig e Schuch (2006), concluíram que a multiplicação *in vitro* de brotos de mirtilo cv. Delite é favorecida com o cultivo dos explantes em meio de cultura com regulador de crescimento zeatina (18 mM).

Cruz et al. (2017), constataram que a presença de 100mg L⁻¹ de 2-Isopenteniladenina (2iP) associado a luz branca fluorescente proporcionou melhores resultados na multiplicação *in vitro* de mirtilheiro 'Woodard'.

Na fase de enraizamento *in vitro*, o tipo de meio de cultura, de auxina e suas concentrações, em geral, variam conforme a espécie e a cultivar (LEITZKE et al., 2009). As auxinas são substâncias que têm em comum a capacidade de promover o crescimento e a divisão celular em cultura de tecidos (KRIKORIAN, 1991) e têm sido utilizadas na estimulação de raízes adventícias (TAIZ; ZEIGER, 2004). O tipo de auxina mais utilizada é o ácido indolbutírico (AIB), por não causar fitotoxicidade aos explantes em uma larga faixa de concentração e ser eficiente em várias espécies (HARTMANN et al., 1997).

Em trabalho realizado por Cruz (2017), verificou-se que a presença de ácido indolbutírico (AIB) na concentração de 0,5mg L⁻¹, associado à luz branca fluorescente proporcionou os melhores resultados ao enraizamento *in vitro* de mirtilheiro 'Woodard'.

Camargo et al. (2017) observaram que o cultivo *in vitro* de mirtilheiro cv. Duke em substrato vermiculita e meio WPM líquido sem a adição de auxina favorece o crescimento de brotações e raízes, assim como o número de brotações e folhas; enquanto Damiani e Schuch (2009) descreveram que a adição de carvão ativado inibe o enraizamento *in vitro* de mirtilheiro. As mesmas autoras avaliaram substratos alternativos ao ágar e concluíram que o uso de

perlita promove o desenvolvimento do sistema radicular e aumenta a porcentagem de enraizamento.

Em estudo realizado por Fischer et al. (2008), testando o enraizamento de estacas semilenhosas de mirtilheiro sob o efeito de diferentes concentrações de AIB, os autores verificaram que a cultivar Bluebelle apresenta baixa capacidade de emissão de raízes e brotações a partir de estacas semilenhosas. Entretanto, a cultivar Delite apresenta facilidade de emissão de raízes e brotações independentemente do uso de AIB, com percentual de enraizamento superior a 82,5%.

Koyama et al. (2019) observaram que a eficácia no enraizamento das estacas de mirtilheiro 'Brite blue' é influenciada pela época de coleta das estacas, com maior enraizamento das estacas coletadas no verão, além de mencionarem que aplicação de 1.000 mg de L⁻¹ AIB não influenciou o enraizamento e desenvolvimento radicular de mudas.

Em relação ao uso do AIB na técnica de microestaquia de mirtilheiro, Schuch et al. (2007) descreveram que o emprego de microestacas oriundas da porção mediana proporcionaram elevados índices de enraizamento, independentemente da concentração de AIB utilizada. Porém, para microestacas apicais, a aplicação de 2000 mg L⁻¹ de AIB foi fundamental para o enraizamento.

Além da multiplicação e do enraizamento, outra etapa da micropropagação é a aclimatização, que é a transferência da planta da condição *in vitro* para a condição *ex vitro* (Figura 4) (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).



Figura 4. Aclimatização de mirtilheiro 'Woodard' em casa de vegetação (A) e detalhe das mudas de mirtilheiro em embalagem articulada com vermiculita durante a aclimatização (B).

Durante a aclimatização é comum a ocorrência de alto percentual de mortalidade das plantas. Para minimizar as perdas, a adaptação ao novo ambiente deve ser gradual (SOUZA et al., 2006), de forma que as plantas não sofram estresse e, conseqüentemente, venham a morrer (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Disponibilizar uma condição adequada de ambiente, mantendo as plantas sombreadas, com manutenção de alta umidade relativa, substrato adequado, controle fitossanitário e nutrição adequadas é suficiente para a sobrevivência e o desenvolvimento das plantas micropropagadas (SCHUCH; ERIG, 2005).

Nesta etapa também é necessário o uso do substrato adequado (PELIZZA, 2009). Conforme Backes e Kämpf (1991), a escolha e o manejo correto do substrato irão afetar a sobrevivência, o crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo de suma importância o uso do substrato correto para a obtenção de mudas de qualidade. Para Yamanishi et al. (2004), o mesmo deve apresentar características físicas, químicas e biológicas adequadas à espécie, possibilitando rápido desenvolvimento da muda, bom teor de matéria seca nas partes aérea e radicular, dentre outras características.

Dentre os materiais utilizados pode-se citar vermiculita, perlita, areia, turfa, casca de arroz carbonizada e pó de carvão, cujas proporções variam conforme a espécie (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

A vermiculita foi utilizada na aclimatização de mirtilheiro, amoreira-preta, physalis, abacaxizeiro (*Ananas comosus*), marmeleiro (*Cydonia oblonga*), entre outras culturas (PELIZZA et al., 2011; WAGNER JÚNIOR et al., 2012; MUNIZ, 2013; BRAGA et al., 2011; ERIG et al., 2004). Este substrato apresenta vantagens como: fácil obtenção, baixa densidade, uniformidade na composição química e granulométrica, porosidade e capacidade de retenção de água (MARTINS et al., 2009). De acordo com Kämpf (2000), apresenta densidade entre 50 e 100 kg m⁻³ e pH de 7,5 a 8,5 (KÄMPF et al., 2006).

2.4 Substâncias húmicas

A presença de substâncias húmicas no meio ambiente vem sendo observada há muito tempo (BERZELIUS, 1839; KONONOVA, 1958; ORLOV, 1985; FRIMMEL; CHRISTMAN, 1988). Estas originam-se da degradação química e biológica de resíduos de plantas e da atividade metabólica de micro-organismos e são construídas por ácido húmico (AH), ácido fúlvico (AF) e humina (HU) (SPEDDING, 1988).

Após o fracionamento químico, os ácidos húmicos e fúlvicos constituem as duas substâncias húmicas mais estudadas. Suas composições médias no solo são C₁₃₅ H₁₈₂ O₉₅ N₅ S₂, para os ácidos fúlvicos, e C₁₈₇ H₁₈₆ O₈₉ N₉ S, para os ácidos húmicos (SCHNITZER; KHAN, 1972).

As substâncias húmicas exercem efeitos estimulantes na parte aérea, como incrementos do acúmulo de nutrientes foliares e síntese de clorofilas e atuam no enraizamento de diversas plantas de interesse agrônômico (BALDOTTO et al., 2009). Elena et al. (2009) e Trevisan et al. (2011) afirmaram que estas influenciam no crescimento de raízes de forma semelhante à promovida pela auxina, pois ativam a bomba de prótons (H⁺), da plasmalema e do vacúolo dentro da rota de biossíntese da auxina

Com relação aos ácidos húmicos, esses possuem aspectos econômicos e ambientais vantajosos em relação ao uso do AIB, ou seja, o regulador de crescimento do tipo auxina (LOSS et al., 2009; PIZZATTO et al., 2011). São fontes naturais renováveis, pois podem ser extraídos de diferentes resíduos

urbanos, como lodo de lixo e esgoto (CANELLAS et al., 2000), bem como da agricultura, através de resíduos do processamento de frutos, esterco de animais, entre outros (MELO et al., 2008).

A resposta da planta a aplicação de ácidos húmicos não é uniforme e varia de acordo com a matéria-prima que esses compostos são extraídos, a concentração e o genótipo (BALDOTTO et al., 2011, 2012). No entanto, possui a fração reativa mais estável das substâncias húmicas (BALDOTTO et al., 2007).

Os resultados promovidos pelo uso de bioestimulantes dependem de uma série de fatores, tais como a espécie ou cultivar, o órgão ou a idade ideal da planta para aplicação, além da concentração recomendada para cada cultura (ZANDONADI et al., 2014) e o tempo de exposição da planta com estas substâncias (KELTING et al., 1997). Essas substâncias podem ser usadas em pequenas quantidades via foliar, solo, semente (DU JARDIN et al., 2015) ou inseridas no meio de cultura (Figura 6).

Quanto aos trabalhos realizados em outras culturas, as substâncias húmicas foram aplicadas através da hidroponia no trigo (*Triticum aestivum* L.) (MALIK E AZAM, 1985) e em diferentes espécies de tomate (*Lycopersicon esculentum* e *Bcopersicon esculentum* Mill.) (LULAKIS; PETSAS, 1995; LOFFREDO et al., 1997). Também foram aplicadas no solo em associação com fertilizantes, em frutíferas como o limoeiro (*Citrus macrophila*) (SÁNCHEZ-SÁNCHEZ et al., 2002) e macieira (NEILSEN et al., 2005).

Outros autores testaram aplicações foliares no campo em azeitona (*Olea europaea*) (FERNÁNDEZ-ESCOBAR et al., 1996), morangueiro 'Onda' (NERI et al., 2002), arroz (TEJADA; GONZALEZ, 2004), trigo duro (*Triticum durum* L.) (DELFINI et al., 2005), uvas para vinho (FERRARA; BRUNETI, 2008; BROWNELL et al., 1987; VERCESI, 2000), uva de mesa (COLAPIETRA, 2000; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ et al., 2006) e porta-enxertos de videira (ZACHARIAKIS et al., 2001), além de serem avaliadas no desenvolvimento inicial de alface (*Lactuca sativa* L.) (RODRIGUES et al., 2018).

Em estudo realizado por Ritter (2019), testando formas de aplicação das substâncias húmicas em estacas de oliveira, como irrigação, pulverização e imersão, a autora observou que as maiores médias para enraizamento e comprimento médio da maior raiz foram obtidas quando a aplicação foi feita por irrigação.

As substâncias húmicas também foram testadas na micropropagação, nas etapas de multiplicação e enraizamento de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) ((MACIEJEWSKI et al., 2019), morangueiro (RZEPKA-PLEVNES et al., 2011), macieira (BARALDI et al., 1991), kiwizeiro (MARINO et al., 2008), bananeira (*Musa* sp.) (FERNÁNDEZ et al., 2014), lírio oriental (*Lilium speciosum*) (WU et al., 2016), brahmi (*Bacopa monnieri* L.) (KASHYAP et al., 2015), erva-botão (*Eclipta alba*) (PRAKASH et al., 2015), vidoeiro de prata (*Betula pendula* Roth), amieiro preto (*Alnus glutinosa* L. Gaertn) (TAHIRI et al., 2016), entre outras.

Com o objetivo de promover o crescimento e diminuir o período de aclimatização, conseqüentemente os custos de produção, alguns autores testaram a utilização destas substâncias na aclimatização de bananeira 'Grand Naine' (NOMURA et al., 2012), abacaxizeiro 'Vitória', Pérola' e 'Imperial' (*Ananas comosus*) (BALDOTTO et al., 2010; VENÂNCIO et al., 2019), pereira (*Pyrus communis* L.) (MARINO et al., 2010), eucalipto (*Eucalyptus urograndis* e *Eucalyptus urophylla*) (LEONE, 2019) e também em espécies ornamentais, como a orquídea *Cymbidium* sp. (BALDOTTO et al., 2014).

Com base nesses resultados, verifica-se que o uso das substâncias húmicas representa uma opção promissora na micropropagação de mirtilheiro 'Woodard'. Outro aspecto que pode viabilizar o uso das mesmas é que existem no mercado várias fontes orgânicas, isoladas ou associadas a nutrientes. Dentre elas está o Solohumics® (Figura 5 e 6), um fertilizante organomineral constituído por carbono orgânico total (31%), potássio (3%), matéria orgânica (59%), ácidos húmicos (25%) e fúlvico (5%), sendo indicado para a fertirrigação.



Figura 5. Fertilizante organomineral Solohumics® (A) e detalhe do produto comercial (B).

3. CAPÍTULO I - Substâncias húmicas e 2-isopenteniladenina na multiplicação *in vitro* de mirtilheiro 'Woodard'

3.1 Introdução

O mirtilheiro (*Vaccinium* spp.) é uma espécie frutífera originária de algumas regiões da Europa e América do Norte, onde é muito apreciada por seu sabor exótico, pelo valor econômico e por suas propriedades medicinais, sendo considerada como “fonte de longevidade” (RUFATO; ANTUNES, 2016).

No Brasil essa cultura encontra-se em fase de desenvolvimento, ocasião em que se busca um sistema de produção eficiente e competitivo para inserir o país no rol dos grandes produtores mundiais (RUFATO; ANTUNES, 2016). Para tanto, é primordial a utilização de mudas de qualidade nas áreas de cultivo.

Uma alternativa para aumentar a disponibilidade de mudas é o uso da micropropagação (DAMIANI; SCHUCH, 2009), que além de possibilitar a produção de grande quantidade de plantas em curto período de tempo, permite a obtenção de plantas livres de doenças e a propagação de espécies difíceis de serem multiplicadas por outros métodos (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Para que o processo de multiplicação *in vitro* ocorra de maneira satisfatória é necessário um rigoroso controle de fatores, como o balanço hormonal (PASA et al., 2012). Segundo Schuch e Erig (2005), o uso de reguladores de crescimento, juntamente com as formulações básicas dos meios de cultura é imprescindível para que se obtenha êxito na propagação de algumas culturas *in vitro*. Dentre os reguladores de crescimento, o 2iP (2-isopenteniladenina) é comumente utilizado para espécies de mirtilheiro, por promover um desenvolvimento superior em relação a outras citocininas (SCHUCH et al., 2008).

Visando otimizar a micropropagação também é possível utilizar substâncias húmicas, como os ácidos húmicos, fúlvicos e húminas, que são bioestimulantes (TREVISAN et al., 2010), além de serem fontes de nutrientes, disponibilizando carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre (SILVA et al., 2015). Assim, estimulam o crescimento de plântulas quando usadas em concentrações relativamente pequenas (NARDI et al. 2007; AGUIAR et al. 2013)

Como são escassas as informações sobre o uso dessas substâncias na micropropagação de mirtilheiro, o objetivo do trabalho foi avaliar o uso de 2iP, bem

como concentrações de substâncias húmicas na etapa de multiplicação *in vitro* da cultivar 'Woodard'.

3.2 Material e Métodos

O experimento foi realizado no período de outubro a dezembro de 2018, no Laboratório de Propagação de Plantas Frutíferas, pertencente ao Departamento de Fitotecnia, da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel-UFPel, localizada no município de Capão do Leão-RS.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema bifatorial, sendo os fatores: presença (100 mg L⁻¹) ou ausência (0 mg L⁻¹) de 2-isopenteniladenina (2iP) e concentrações de substâncias húmicas (0; 1; 2; 3 mg L⁻¹), totalizando oito tratamentos com cinco repetições, sendo utilizados cinco explantes por cada repetição.

Em relação às substâncias húmicas, foi usado o produto comercial Solohumics® com a seguinte composição: ácido húmico (25%), ácido fúlvico (5%), matéria orgânica (59%), carbono orgânico total (31%) e potássio (3%).

Para a multiplicação, os explantes de mirtilheiro 'Woodard', previamente estabelecidos *in vitro*, foram cultivados em meio WPM (Wood Plant Media - LOYD; McCOWN, 1980), contendo 0,1 g L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, 6g L⁻¹ de ágar; adicionando o 2iP e as concentrações de substâncias húmicas, conforme o tratamento. O pH foi ajustado em peagâmetro Quimis® para 5,0 e, posteriormente, foram distribuídos 30 mL do meio em frascos de vidro com capacidade de 250 mL. Logo após, realizou-se a autoclavagem em autoclave vertical Phoenix Luterco® a 120°C e 1,5 atm de pressão por 20 minutos.

Em seguida, foi realizada a transferência dos explantes para os frascos em câmara de fluxo laminar (Figura 1), sendo a tampa dos mesmos vedada com papel alumínio e filme plástico transparente. Em seguida, foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25±2°C e intensidade luminosa de 27 μmol m⁻² s⁻¹ (Figura 2).



Figura 1. Câmaras de fluxo laminar na sala de transferência.



Figura 2. Estante com vidrarias em sala de crescimento com temperatura, fotoperíodo e intensidade luminosa controlados.

Após 60 dias (Figura 3), as variáveis avaliadas foram: a porcentagem de sobrevivência, número de folhas, número de brotações, taxa de multiplicação, comprimento da maior brotação (cm), comprimento da parte aérea (cm), massa de matéria fresca e massa seca de parte aérea (g).



Figura 3. Explantes de mirtilheiro 'Woodard' 60 dias após a multiplicação *in vitro*.

Foram considerados sobreviventes os explantes verdes que apresentaram, no mínimo, duas folhas. A taxa de multiplicação foi determinada a partir da divisão do número médio de gemas por explantes (obtido aos 60 dias) por dois (valor correspondente ao número de gemas por explante no início do experimento).

As mensurações de comprimento foram realizadas com o uso de uma régua graduada. Quanto à determinação da massa de matéria fresca e seca de parte aérea foi utilizada uma balança de precisão Bioprecisa®. Para a obtenção da massa de matéria seca foi feita a secagem em estufa Quimis® a 50°C até peso constante.

Os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F ($p \leq 0,05$). Constatando-se significância estatística, as médias das variáveis para os efeitos da presença ou ausência de 2iP foram comparados pelo teste t ($p \leq 0,05$) e para as concentrações de substâncias húmicas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.3 Resultados e Discussão

Em relação a variável sobrevivência, foi constatada 100%, ou seja, todos os explantes sobreviveram aos efeitos dos tratamentos. Quanto ao comprimento da parte aérea, também não houve significância estatística entre os tratamentos. Já em relação ao número de folhas e taxa de multiplicação houve interação entre os tratamentos testados (Tabela 1).

Tabela 1 – Comprimento da parte aérea (cm), número de folhas e taxa de multiplicação de mirtilheiro 'Woodard' multiplicado *in vitro*, em função do uso de 2-Isopenteniladenina (2iP) e das concentrações de substâncias húmicas, aos 60 dias cultivados *in vitro*. UFPel, Pelotas-RS, 2020.

Regulador de crescimento (2iP)	Concentrações de substâncias húmicas (mg L ⁻¹)			
	0	1	2	3
Comprimento da parte aérea (cm)				
Presença	6,78 ^{NS}	7,05 ^{NS}	6,57 ^{NS}	6,47 ^{NS}
Ausência	6,97	6,58	6,97	7,10
CV(%)	25,87	19,32	15,68	21,51
Número de folhas				
Presença	29,24 aA ^{1/}	32,20 aA	22,52 bB	20,31 bB
Ausência	28,76 aA	33,90 aA	37,96 aA	39,50 aA
CV(%)	23,34	6,80	24,40	9,62
Taxa de multiplicação				
Presença	14,62 aA	16,10 aA	11,26 bB	10,15 bB
Ausência	14,38 aA	16,95 aA	18,98 aA	19,75 aA
CV(%)	23,34	6,80	24,40	9,62

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando o uso de 2iP e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando as concentrações de SH. CV (%): coeficiente de variação. NS: não significativo pelo teste F ($p \leq 0,05$) da análise de variância.

Para a sobrevivência, resultados semelhantes foram relatados por Aquino et al. (2019), que não obtiveram diferença significativa nas diferentes concentrações de ácidos húmicos para a porcentagem de sobrevivência ao avaliarem a multiplicação *in vitro* de mirtilheiro 'Bluecrop'.

Kashyap et al. (2015), ao testar extratos de vermicompostos no meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) na multiplicação *in vitro* de Brahmi (*Bacopa monnieri*), verificaram 99,6% de sobrevivência. Entretanto, os autores também observaram que a utilização de extrato de vermicomposto associada a reguladores de crescimento, como ácido indol-3-acético (AIA) e 6-benzilaminopurina (BAP), micronutrientes ou vitaminas têm um efeito negativo na sobrevivência das plântulas.

De acordo com Schuch e Erig (2005), a sobrevivência é um dos principais aspectos para a viabilização da micropropagação como método de produção de mudas. Tal variável está relacionada a fatores como o correto balanço hormonal e a adequada assepsia durante o processo de micropropagação.

Em relação ao comprimento da parte aérea (Tabela 1), é possível observar que não é necessária a aplicação de regulador de crescimento (Figura 4), visto que não houve significância estatística entre os tratamentos.

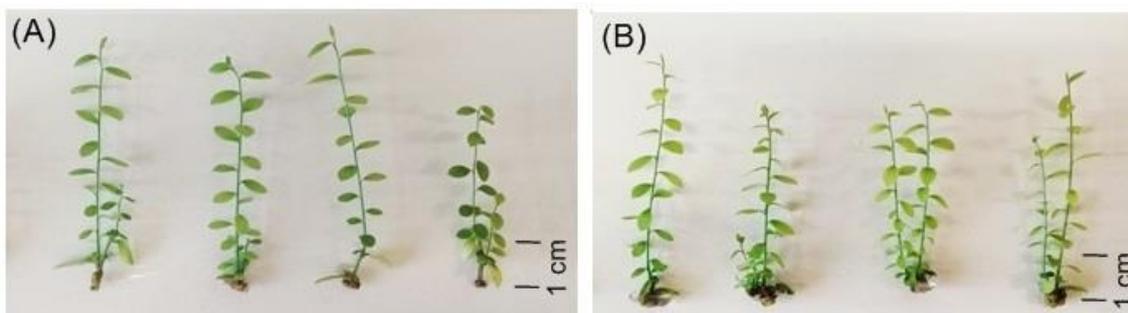


Figura 4. Explanetes de mirtilheiro 'Woodard' em meio de cultura com a presença (100 mg L⁻¹) (A) e ausência (0 mg L⁻¹) (B) de 2iP e concentrações (0, 1, 2 e 3 mg L⁻¹) de substâncias húmicas aos 60 dias multiplicados *in vitro*.

Resultados inferiores foram observados por Cruz (2017), que verificou o maior comprimento da parte aérea (2,18 cm), quando utilizado 100 mg L⁻¹ de 2iP na multiplicação *in vitro* de mirtilheiro 'Woodard'. Reis et al. (2008), descreveram que esta variável desempenha importante papel na sobrevivência e desenvolvimento da planta, considerando-se a relação altura/diâmetro do colo na ocasião do transplântio das mudas para o campo.

Para o número de folhas (Tabela 1), quando comparada a presença ou ausência de 2iP nas diferentes concentrações de substâncias húmicas, apenas ocorreu diferença estatística com o uso 2 e 3 mg L⁻¹ de substâncias húmicas, sendo que as plantas cultivadas em meio de cultura sem 2iP apresentaram as maiores médias, diferindo das plantas cultivadas com a presença de 2iP.

Analisando apenas as concentrações de substâncias húmicas, o maior número de folhas foi verificado na concentração de 3 mg L⁻¹ de substâncias húmicas, não diferindo estatisticamente dos demais tratamentos com a ausência de 2iP. Quanto ao tratamento com a presença de 2iP, o maior número de folhas foi observado na concentração 1 mg L⁻¹ de substâncias húmicas, não diferindo estatisticamente de quando não houve a aplicação de substâncias húmicas (Tabela 1).

Este resultado pode estar associado à utilização de substâncias húmicas no meio de cultura. Baldotto et al. (2009) descreveram que houve influência das substâncias húmicas no desenvolvimento da parte aérea de abacaxizeiro (*Ananas comosus*), onde a aplicação de ácidos húmicos extraídos das fontes vermicomposto e torta de filtro proporcionou incrementos de 10,12% no número de folhas.

A presença de folhas auxilia no processo fotossintético e na etapa seguinte da micropropagação, ou seja, no enraizamento das plantas, pois a auxina é produzida nas folhas novas e nas gemas e é conduzida com açúcares e outras substâncias nutritivas para a parte inferior da planta, acumulando-se base (HARTMANN et al., 2002), além da produção de fotoassimilados a partir das folhas garantir a energia necessária para a manutenção e o desenvolvimento vegetal (TAIZ; ZIGUER, 2013).

Quanto à taxa de multiplicação, comparando a ausência ou presença de 2iP nas diferentes concentrações de substâncias húmicas, apenas ocorreu diferença com o uso de 2 e 3 mg L⁻¹ de substâncias húmicas, onde as maiores médias foram obtidas no tratamento sem o uso de 2iP (Tabela 1).

Em relação as concentrações de substâncias húmicas, a maior média foi obtida pela concentração de 3 mg L⁻¹, não diferindo dos tratamentos com 0, 1 e 2 mg L⁻¹ de substâncias húmicas na ausência de 2iP e do tratamento em que 0 e 1mg L⁻¹ de substância húmica foi utilizada na presença de 2iP (Tabela 1).

Estes resultados diferem dos observados por Cruz (2017), que testando a presença ou ausência de 2iP em mirtilheiro 'Woodard' registrou 4,12% na taxa de multiplicação. Além disso, Baraldi et al. (1991), obtiveram a maior taxa de multiplicação (4,8%) quando adicionado humato de potássio na concentração de 50 mg L⁻¹ e 1,0 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), no cultivo *in vitro* de maçã 'Golden delicious'.

De acordo com Halupa (2002), a taxa de multiplicação é dependente do estado nutricional dos explantes e das condições ambientais. Contudo, o mesmo autor destaca a juvenilidade dos explantes como fator determinante para a obtenção de elevadas taxas de multiplicação e alongamento das brotações.

Em relação número de brotações e comprimento da maior brotação não houve significância estatística entre os tratamentos. Quando a massa de matéria fresca e seca observou-se interação entre os fatores testados (Tabela 2).

Tabela 2 – Número brotações, comprimento da maior brotação (cm), massa de matéria fresca e seca (g) na multiplicação *in vitro* de mirtilheiro 'Woodard', em função do uso de 2-Isopenteniladenina (2iP) e das concentrações de substâncias húmicas, aos 60 dias cultivados *in vitro*. UFPel, Pelotas-RS, 2020.

Regulador de crescimento (2iP)	Concentrações de substâncias húmicas (mg L ⁻¹)			
	0	1	2	3
Número de brotações				
Presença	2,24 ^{NS}	2,44 ^{NS}	1,72 ^{NS}	1,62 ^{NS}
Ausência	2,28	2,27	2,38	2,63
CV(%)	33,11	18,70	22,19	8,93
Comprimento maior brotação (cm)				
Presença	3,06 ^{NS}	4,43 ^{NS}	3,99 ^{NS}	3,40 ^{NS}
Ausência	3,21	4,30	4,95	5,30
CV(%)	30,78	9,38	47,23	14,22
Massa de matéria fresca (g)				
Presença	0,64 aA ^{1/}	0,78 aA	0,46 bB	0,38 bB
Ausência	0,57 bB	0,88 aA	0,81 aA	0,86 aA
CV(%)	31,38	10,88	28,43	21,86
Massa de matéria seca (g)				
Presença	0,13 aA	0,12 aA	0,08 bB	0,07 bB
Ausência	0,10 bB	0,17 aA	0,15 aA	0,16 aA
CV(%)	33,90	6,33	21,86	13,72

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando o uso de 2iP e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando as concentrações de SH. CV (%): coeficiente de variação. ^{NS}: não significativo pelo teste F ($p \leq 0,05$) da análise de variância.

Para o número de brotações (Tabela 2), não houve significância estatística entre os tratamentos, diferindo dos resultados relatados por Maciejewski et al. (2019) e Aquino et al. (2019), que avaliando o efeito de substâncias húmicas na multiplicação *in vitro* de marmeleiro 'Alongado' e mirtilheiro 'Bluecrop' observaram maior número de brotações quando utilizado 1 mg L⁻¹ de SoloHumics®.

Para Smagula (2006), a emissão de maior número de brotações oriundas do colo da planta possibilita a renovação das hastes produtivas, já que o mirtilheiro apresenta hábito basitônico, ou seja, suas brotações surgem da base da planta. Esse atributo faz com que sejam facilmente notadas diferenças no hábito de crescimento das plantas propagadas *in vitro*, com maior número de hastes principais e taxa de crescimento.

Quanto ao comprimento da maior brotação (Tabela 2), não constatou-se significância estatística entre os tratamentos. No entanto, o tamanho das brotações oriundas da fase de multiplicação é fator determinante para a próxima etapa de enraizamento (SILVA et al., 2003).

Os resultados obtidos neste trabalho diferiram dos registrados por Maciejewski et al. (2019), que na multiplicação *in vitro* de marmeleiro 'Alongado' verificaram a maior média de comprimento de brotação sem a utilização de substâncias húmicas (0,96 cm), e que houve um decréscimo com o aumento das concentrações, havendo redução de 50% da concentração de 0 mg L⁻¹ em relação a de 3 mg L⁻¹.

Para a massa de matéria fresca e seca, comparando a presença ou ausência de 2iP em relação as concentrações de substâncias húmicas, verifica-se que sem 2iP no meio de cultura as plantas apresentaram maior massa em comparação ao cultivo com a presença de 2iP, quando utilizada as concentrações de 1, 2 e 3 mg L⁻¹ de substância húmica, entretanto, não diferiram estatisticamente do tratamento com a presença de 2iP quando utilizada a concentração 0 e 1 mg L⁻¹ de substância húmica (Tabela 2).

Kashyap et al. (2015), estudando a multiplicação *in vitro* de *Bacopa monnieri* observaram maior média (0,414 g) no tratamento em que só havia a presença do vermicomposto no meio de cultura MS.

Na análise das concentrações de substâncias húmicas em relação a presença ou ausência de 2iP, a maior massa de matéria fresca e seca foi obtida na concentração de 1 mg L⁻¹ de substância húmica, não diferindo estatisticamente das concentrações de 2 e 3 mg L⁻¹. Na ausência do uso de 2iP o mesmo foi observado para as concentrações de 0 e 1 mg L⁻¹ de substância húmica, que foram superiores as concentrações de 2 e 3 mg L⁻¹, no tratamento com a presença de 2iP (Tabela 2).

No trabalho realizado por Fernández et al. (2014), testando ácidos húmicos em substituição do uso de AIB e BAP na multiplicação *in vitro* de bananeira (*Musa* sp.), observaram que não ocorreu diferença significativa para a massa seca das plântulas quanto ao uso ou não de ácido húmico. Entretanto, os autores constataram que a utilização de 10 e 30 mg L⁻¹ permite que as plantas estejam prontas e possam ir direto da fase de multiplicação para a aclimatização, reduzindo assim o tempo e os custos na etapa da micropropagação.

Em síntese, o uso de substâncias húmicas é uma alternativa promissora na multiplicação *in vitro* de mirtilheiro 'Woodard', pois a utilização destas substâncias proporcionou um incremento no crescimento das plantas, além de não haver a necessidade do uso da citocinina 2-isopenteniladenina (2iP), o que poderá contribuir com a redução de custos no cultivo *in vitro* desta cultivar.

3.4 Conclusão

A multiplicação *in vitro* de mirtilheiro 'Woodard' pode ser realizada com o uso de 1 mg L⁻¹ de substâncias húmicas, sem 2-isopenteniladenina.

4 CAPÍTULO II - Substâncias húmicas e ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* de mirteiro 'Woodard'

4.1 Introdução

O mirteiro (*Vaccinium* spp.), pertencente à família Ericaceae, é uma frutífera de clima temperado muito apreciada por seu sabor exótico e suas propriedades nutracêuticas. Devido ao seu alto retorno econômico em curto espaço de tempo, vem sendo pesquisado e produzido principalmente no Sul do Brasil como uma alternativa para a diversificação das propriedades agrícolas (DAMIANI; SCHUCH, 2008; RADÜNZ et al., 2014).

Para a produção de mudas de mirteiro pode ser adotada a micropropagação, em função da eficiência em qualidade, quantidade, além do tempo de formação das mudas (DAMIANI; SCHUCH, 2008). Porém, para o uso desse método de propagação tornar-se comercialmente viável na fruticultura e poder competir com os métodos tradicionais de propagação, tais como a estaquia, é necessário reduzir o custo de produção (SCHUCH; TOMAZ, 2019).

Os principais fatores que elevam o custo de produção na micropropagação estão ligados ao uso de determinados reagentes e equipamentos, além da contratação de mão de obra capacitada e estrutura de laboratórios específicos (SOUZA; JUNGHANS, 2006; COSTA et al.; 2007). Dentre os reagentes estão as auxinas, substâncias com capacidade de promover o crescimento e a divisão celular em cultura de tecidos (KRIKORIAN, 1991) que têm sido utilizadas isoladamente ou em combinação no meio de enraizamento (GATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), visando a estimulação de raízes adventícias (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Um dos tipos de auxina utilizada é o ácido indolbutírico (AIB) (HARTMANN et al., 1997) e, embora seja produzida por empresas especializadas, apresenta custo elevado (BALDOTTO; BALDOTTO, 2014).

Em função desses aspectos, visando reduzir o período de desenvolvimento da muda e, conseqüentemente, os custos de produção, algumas alternativas inovadoras podem ser dotadas, como o uso de substâncias húmicas. Constituídas pelas frações ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e huminas, estas exercem efeitos estimulantes na parte aérea, como incrementos do acúmulo de nutrientes foliares, síntese de clorofilas e atuam no enraizamento de várias plantas de interesse agrônômico (BALDOTTO et al., 2009;

BALDOTTO; BALDOTTO, 2014), ou seja, influenciam no crescimento de raízes de forma semelhante à promovida pela auxina, pois ativam a bomba de prótons (H^+), da plasmalema e do vacúolo dentro da rota de biossíntese da auxina (ELENA et al., 2009; TREVISAN et al., 2011).

Com relação aos ácidos húmicos, esses possuem aspectos econômicos e ambientais vantajosos em relação ao AIB, ou seja, o regulador de crescimento do tipo auxina (LOSS et al., 2009; PIZZATTO et al., 2011). Além disso, são fontes naturais renováveis, pois podem ser extraídos de resíduos urbanos, como lodo de lixo e esgoto (CANELLAS et al., 2000), bem como da agricultura, através de resíduos do processamento de frutos, esterco de animais, entre outros (MELO et al., 2008).

A resposta das plantas aos ácidos húmicos não é uniforme e varia de acordo com o genótipo, a matéria-prima em que esses compostos são extraídos e a concentração (BALDOTTO et al., 2011, 2012).

Como não existem informações sobre a combinação da utilização dessas substâncias com auxinas na micropropagação de mirtilheiro 'Woodard', objetivou-se avaliar o efeito da presença e ausência de ácido indolbutírico e concentrações de substâncias húmicas no enraizamento *in vitro* da referida cultivar.

4.2 Material e Métodos

O experimento foi realizado no período de maio a julho de 2019, no Laboratório de Propagação de Plantas Frutíferas, pertencente ao Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel-UFPel, localizada no município de Capão do Leão-RS.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema bifatorial 2x3, sendo os fatores: presença (1 mg L^{-1}) ou ausência (0 mg L^{-1}) de regulador de crescimento ácido indolbutírico (AIB) e concentrações de substâncias húmicas (Solohumics®) (0; 1; 2; 3 mg L^{-1}) (Figura 1), totalizando 8 tratamentos com cinco repetições, sendo utilizados cinco explantes para cada repetição.

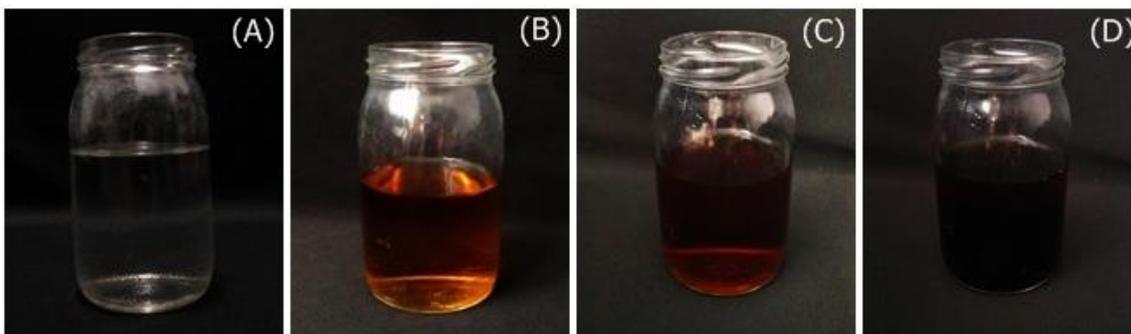


Figura 1. Frascos de vidro com as concentrações de substâncias húmicas 0 (A), 1 (B) mg L^{-1} , 2 (C) e 3 (D) mg L^{-1} .

O Solohumics[®] é um produto comercial composto por: ácido húmico (25%), ácido fúlvico (5%), matéria orgânica (59%), carbono orgânico total (31%) e potássio (3%).

Os explantes retirados da parte mediana de plantas cultivadas *in vitro* foram cultivados em meio WPM (Wood Plant Media - LOYD; McCOWN, 1980), contendo 0,1 g L^{-1} de mio-inositol, 30 g L^{-1} de sacarose, 6 g L^{-1} de ágar; adicionado AIB e concentrações de substâncias húmicas, conforme o tratamento. O pH foi ajustado para 5,0 em peagâmetro Quimis[®] (Figura 2A) e, posteriormente, foram distribuídos 30 mL do meio em frascos de vidro com capacidade de 250 mL. Logo após, realizou-se a autoclavagem em equipamento (autoclave) vertical Phoenix Luterco[®] (Figura 2B) a 120°C e 1,5 atm de pressão por 20 minutos.

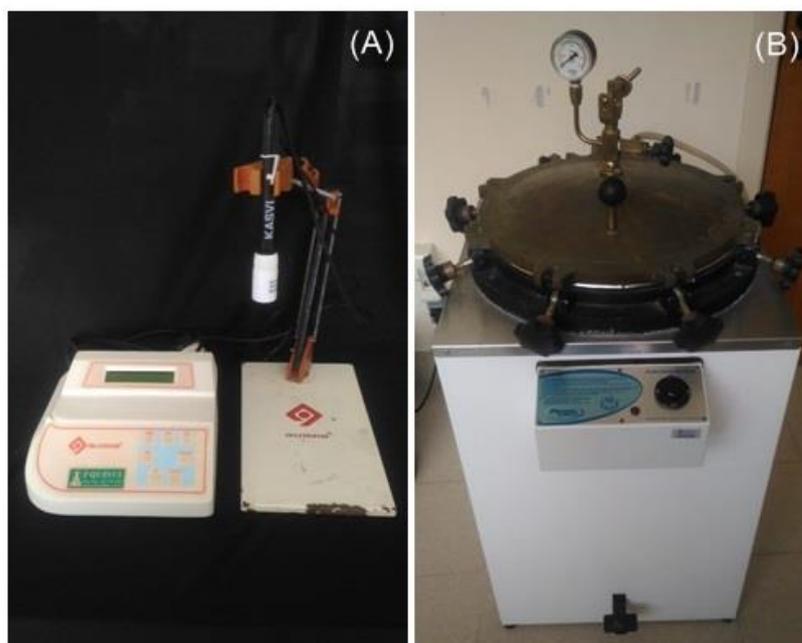


Figura 2. Peagâmetro Quimis[®] e autoclave vertical Phoenix Luterco[®].

Posteriormente, foi realizada a transferência dos explantes para os frascos em câmara de fluxo laminar (Figura 3), e os mesmos foram vedados com papel alumínio e filme plástico transparente e mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e intensidade luminosa de $27\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ (Figura 4).



Figura 3. Câmara de fluxo laminar onde foi realizada a transferência dos explantes.



Figura 4. Frascos com explantes nas prateleiras da sala de crescimento.

Após 60 dias as variáveis avaliadas foram: porcentagem de sobrevivência, comprimento da parte aérea (cm), número de brotações, comprimento da maior brotação (cm), porcentagem de enraizamento (%), número de raízes, comprimento da maior raiz (cm), massa de matéria fresca e seca de parte aérea e raiz (g).

Foi utilizada régua graduada para as mensurações de comprimento e balança analítica Bioprecisa® (Figura 5A) para aferir a massa de matéria fresca e seca da parte aérea e das raízes. Para a obtenção da massa de matéria seca o material foi colocado em estufa Quimis® (Figura 5B) com ventilação forçada a 50°C, até a obtenção de peso constante.

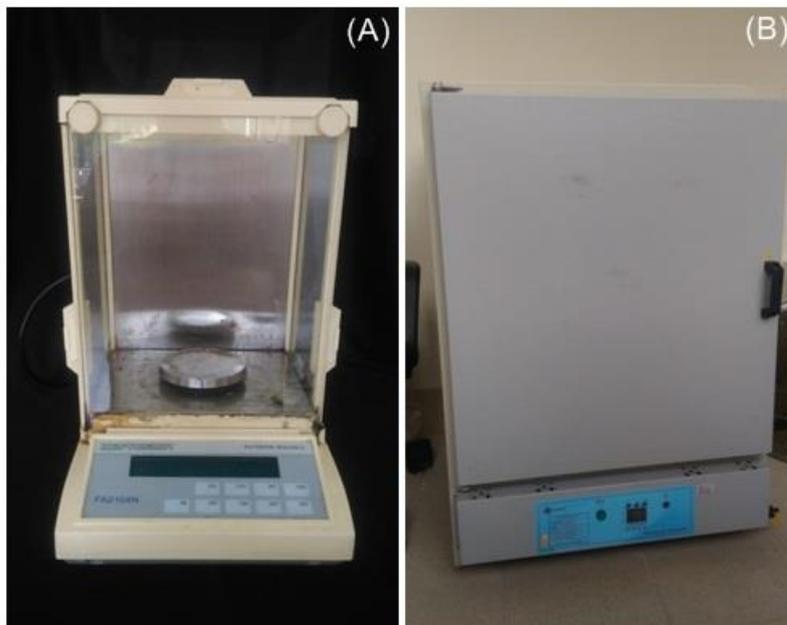


Figura 5. Balança analítica Bioprecisa® e estufa com ventilação forçada Quimis®.

Os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F ($p \leq 0,05$). Constatando-se significância estatística, as médias dos efeitos da presença ou ausência de AIB foram comparados pelo teste t ($p \leq 0,05$) e as concentrações de substâncias húmicas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

4.3 Resultados e discussão

Para as variáveis de sobrevivência e comprimento da parte aérea observou-se efeito significativo para os fatores de estudo (Tabela 1).

Tabela 1 - Sobrevivência (%) e comprimento da parte aérea (cm) de mirtilheiro 'Woodard' enraizadas *in vitro*, em função do uso de regulador de crescimento ácido indolbutírico (AIB) e das concentrações de substâncias húmicas. UFPel, Pelotas-RS, 2020.

Regulador de crescimento (AIB)	Concentrações de substâncias húmicas (mg L ⁻¹)			
	0	1	2	3
Sobrevivência (%)				
Com	100 aA ^{1/}	100 aA	100 aA	100 aA
Sem	63 bB	100 aA	100 aA	100 aA
CV(%)	57,25	0	0	0
Comprimento da parte aérea (cm)				
Com	2,32 aB	2,46 bB	2,71 bB	6,30 aA
Sem	3,54 aB	6,12 aA	6,63 aA	7,07 aA
CV(%)	45,25	35,86	55,19	34,01

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando o uso de AIB e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$) comparando as concentrações de SH. CV (%): coeficiente de variação.

Com relação à sobrevivência, o tratamento sem o uso de substância húmica e sem o uso de AIB apresentou o menor índice de sobrevivência, enquanto os demais tratamentos apresentaram 100% de sobrevivência (Tabela 1).

Em trabalho realizado por Cruz (2017) de enraizamento *in vitro* de mirtilheiro 'Woodard', a autora também verificou 100% de sobrevivência, quando utilizado 0,5 mg L⁻¹ de AIB. Conforme Ristow et al. (2009), o mirtilheiro apresenta lento desenvolvimento e baixo índice de sobrevivência das mudas após a formação das raízes.

Analisando a variável comprimento da parte aérea, comparando o uso ou não de regulador de crescimento AIB em relação as concentrações de substâncias húmicas, verificou-se diferença significativa apenas para as concentrações de 1 e 2 mg L⁻¹ de substâncias húmicas, em que as maiores médias foram verificadas no tratamento sem o uso de AIB (Tabela 1). Conforme a Figura 7 mostra as plantas nos diferentes tratamentos.

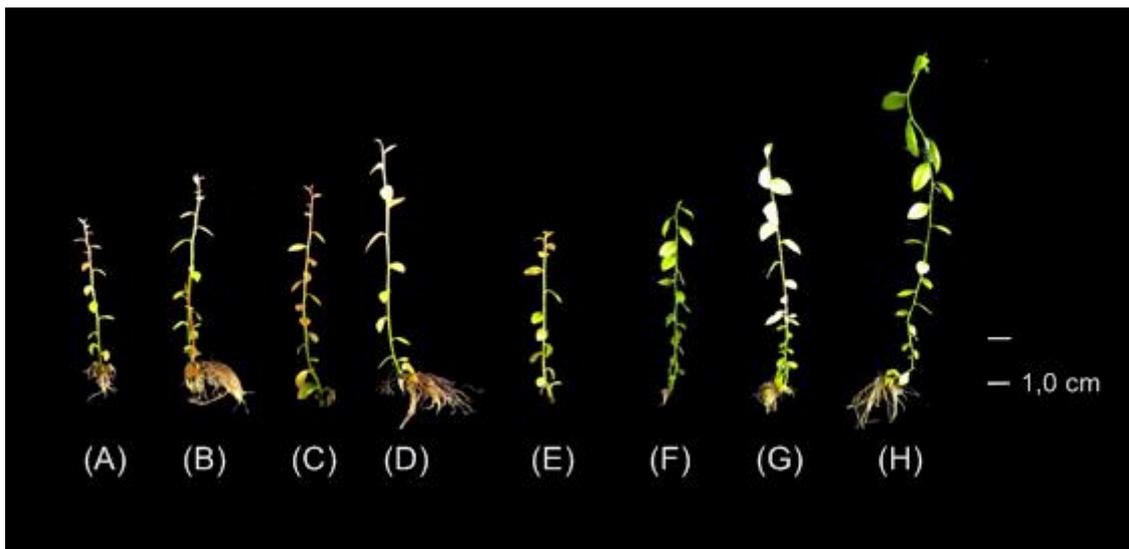


Figura 6. Plantas mantidas em meio de cultura sem a presença de AIB e com substâncias húmicas nas concentrações 0 (A), 1 (B), 2 (C) e 3 (D) mg L⁻¹ e com a presença de AIB e com substâncias húmicas nas concentrações 0 (E), 1 (F), 2 (G) e 3 (H) mg L⁻¹, após 60 dias da instalação do experimento.

Quando comparadas as concentrações de substâncias húmicas em função do meio de cultura com ou sem AIB, o maior comprimento da parte aérea foi obtido em 3 mg L⁻¹, não diferindo estatisticamente das concentrações 1 e 2 mg L⁻¹ para o tratamento sem o uso de AIB. Porém, com o uso de AIB a maior média foi observada na concentração de 3 mg L⁻¹, diferindo estatisticamente das demais (Tabela 1) (Figura 7). No enraizamento *in vitro* de bananeira (*Musa spp.*) 'Preciosa', Costa et al. (2008) notaram maior comprimento de parte aérea quando o ácido indolbutírico foi adicionado no meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

Camargo (2015), verificou que mirtilheiro oriundo de propagação *in vitro* desenvolve um maior crescimento vegetativo inicial, representado pela maior altura de planta, quando comparado a estaquia.

Quanto ao número de brotos, quando comparado o meio de cultura com ou sem o uso de AIB nas diferentes concentrações de substâncias húmicas, observou-se as maiores médias para os tratamentos sem o uso de AIB, independente da concentração de substância húmica utilizada, exceto para o tratamento com a concentração 3 mg L⁻¹ de substância húmica, em que não diferiu do tratamento com AIB (Tabela 2).

Tabela 2 - Número de brotos e comprimento da maior brotação (cm) de mirtilheiro 'Woodard' enraizadas *in vitro*, em função do uso de regulador de crescimento ácido indolbutírico (AIB) e das concentrações de substâncias húmicas. UFPel, Pelotas-RS, 2020.

Regulador de crescimento (AIB)	Concentrações de substâncias húmicas (mg L ⁻¹)			
	0	1	2	3
Número de brotos				
Com	1,14 bB ^{1/}	1,41 bB	2,16 bA	3,16 aA
Sem	3,28 aA	2,86 aA	4,24 aA	3,62 aA
CV(%)	48,34	14,36	23,14	43,79
Comprimento da maior brotação (cm)				
Com	1,76 Aa	0,68 bB	1,46 aA	2,65 aA
Sem	1,38 aA	1,49 aA	1,37 aA	2,67 aA
CV(%)	48,66	24,01	40,59	49,73

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando o uso de AIB e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$) comparando as concentrações de SH. CV (%): coeficiente de variação.

Em relação a concentração de substâncias húmicas comparada com ou sem o uso da auxina, 2 mg L⁻¹ propiciou a maior média de número brotos no tratamento sem AIB, não diferindo estatisticamente das demais concentrações. No entanto, no tratamento com adição de AIB a maior média foi verificada na concentração 3 mg L⁻¹ de substância húmica, não diferindo do tratamento com 2 mg L⁻¹ de substâncias húmicas (Tabela 2).

A maior brotação poderá contribuir com a taxa fotossintética das mudas na aclimatização, que é considerada uma das etapas mais críticas da micropropagação. Além disso, Rodrigues et al. (2018) descreveram que a variável número de brotos é fundamental para garantir um bom desempenho das mudas, principalmente na fase posterior à aclimatização. Bowling (2000) também salienta a importância do número de brotos, pois a brotação e o florescimento são deficientes podem ocasionar redução na produção de frutos.

Para o comprimento da maior brotação, quando comparado o meio de cultura com ou sem o uso de AIB em relação as concentrações, apenas ocorreu diferença estatística para a concentração de 1 mg L⁻¹ de substâncias húmicas,

onde para as plantas oriundas de cultivo *in vitro* sem o uso de AIB foi verificado a maior média (Tabela 2).

Analisando apenas as concentrações de substâncias húmicas em relação ao meio de cultura com ou sem AIB, o maior comprimento de brotação foi verificado com 3 mg L⁻¹ de substâncias húmicas para o tratamento sem o uso de AIB, não diferindo para as demais concentrações dessas substâncias (Tabela 2

Quando aplicado 3 mg L⁻¹, os resultados foram superiores aos encontrados por Cruz (2017), que avaliando o efeito da presença ou ausência do uso de AIB no enraizamento *in vitro* de mirtilheiro 'Woodard', verificou que o maior comprimento de brotação (2,39 cm) foi obtido com 0,5mg L⁻¹ de AIB em meio de cultivo WPM. Segundo Silva et al. (2003), o comprimento da brotação é determinado pelo fator genético, concentração do regulador de crescimento e tipo de meio de cultura.

Para o enraizamento, número de raízes e comprimento da maior raiz, ocorreu interação entre o meio de cultura com ou sem o uso do regulador de crescimento AIB e as diferentes concentrações de substâncias húmicas (Tabela 3).

Analisando o enraizamento, no tratamento sem o uso de AIB e substância húmica não houve formação de raiz, diferindo das demais, que apresentaram 100% de enraizamento (Tabela 3).



Figura 7. Enraizamento de plantas sem a presença de AIB e com substâncias húmicas nas concentrações 0 (A), 1 (B), 2 (C) e 3 (D) mg L⁻¹ e com a presença de AIB e com substâncias húmicas nas concentrações 0 (E), 1 (F), 2 (G) e 3 (H) mg L⁻¹, após 60 dias da instalação do experimento.

Tabela 3 – Enraizamento (%), número de raízes e comprimento da maior raiz (cm) de mirtilleiro 'Woodard' enraizadas *in vitro*, em função do uso de regulador de crescimento ácido indolbutírico (AIB) e das concentrações de substâncias húmicas. UFPel, Pelotas-RS, 2020.

Regulador de crescimento (AIB)	Concentrações de substâncias húmicas (mg L ⁻¹)			
	0	1	2	3
Enraizamento (%)				
Com	100 aA ^{1/}	100 ^{NS} A	100 ^{NS} A	100 ^{NS} A
Sem	0 bB	100 A	100 A	100 A
CV (%)	79,06	0	0	0
Número de raízes				
Com	1,74 aB ^{1/}	3,07 bB	2,40 bB	5,34 aA
Sem	0 bB	4,90 aA	4,72 aA	5,36 aA
CV (%)	29,14	27,17	21,36	28,14
Comprimento da maior raiz (cm)				
Com	0,76 aB	1,06 aA	1,36 aA	1,42 aA
Sem	0 bB	1,46 aA	1,29 aA	1,74 aA
CV (%)	44,17	47,66	41,57	33,40

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando o uso de AIB e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$) comparando as concentrações de SH. CV (%): coeficiente de variação.

Tahiri et al. (2016), avaliando a influência de substâncias húmicas no desenvolvimento do sistema radicular *in vitro* de duas espécies lenhosas, videoeiro de prata (*Betula pendula* Roth) e amieiro preto (*Alnus glutinosa* L. Gaertn), observaram enraizamento entre 95 e 100%. Em outro estudo, Baraldi et al. (1991) verificaram 96% de enraizamento *in vitro* em maçã 'Golden delicious', quando foi adicionado no meio de cultura humato de potássio na concentração de 500 mg L⁻¹ e 0 ou 0,06 mg L⁻¹ de AIB.

Segundo Damiani e Schuch (2009), o desenvolvimento de um sistema de enraizamento mais eficiente resulta em mudas com maior qualidade fisiológica e diminuição de perdas durante a fase de aclimatização. Kramer e Kozlowski (1972) citam que o enraizamento pode sofrer interferência de vários fatores,

entre eles destacam-se: estado nutricional das plantas, época do ano, taxa de respiração e fotossíntese, bem como a relação carbono/nitrogênio.

Comparando os meios de cultura, a concentração de 3 mg L⁻¹ de substância húmica no meio sem o uso de AIB proporcionou maior número de raízes, não diferindo estatisticamente do meio de cultura com AIB, para a mesma concentração de substância húmica (Tabela 3). No meio sem substância húmica a maior média foi obtida no tratamento com o uso de AIB, enquanto nas concentrações 1 e 2 mg L⁻¹ de substâncias húmicas o maior número de raízes foi observado na ausência de AIB (Tabela 3).

Para a produção de mudas em escala comercial, a emissão de raízes em maior número e comprimento de raiz é fator preponderante na constituição dos pomares, pois o sistema radicular bem formado favorece a absorção de nutrientes e água, propiciando, desta forma, um melhor desenvolvimento destas no campo (FRACARO, 2004; ZIETEMANN; ROBERTO, 2007; CARVALHO JUNIOR et al., 2009)

Rzepka-Plevnes et al. (2011), testando os efeitos de ácido húmico, AIB e ANA no enraizamento *in vitro* de duas cultivares de morangueiro 'Elsanta' e 'Senga Sengana', obtiveram maior número de raízes nas plantas cultivadas no meio com 1,0 mg dm⁻³ de AIB. Em relação ao uso de ácido húmico, a maioria das raízes da cultivar Elsanta foram observadas no meio com 1,0 mg dm⁻³ de ácido húmico oriundo de solo podzólico e para 'Senga Sengana,' no meio com 5,0 mg dm⁻³ de ácido húmico, oriundo de solo enferrujado.

No cultivo *in vitro* de maçã 'Golden delicious', houve aumento no número de raízes com a associação do regulador de crescimento AIB (sem e com 0,06 mg L⁻¹) com 250 e 500 mg L⁻¹ de humato de potássio (BARALDI et al., 1991),

Com relação ao comprimento da maior raiz, comparando o meio de cultura com ou sem o uso de AIB em relação as concentrações de substâncias húmicas, o maior comprimento da raiz foi obtido no meio de cultura sem o uso de AIB e com 3 mgL⁻¹ de substância húmica, não diferindo estatisticamente do tratamento com o uso de AIB (Tabela 3). Em se tratando das concentrações de substâncias húmicas para cada meio de cultura com ou sem o uso de AIB, a maior média foi obtida com a 3 mgL⁻¹ de substância húmica, mas não diferiu estatisticamente das concentrações de 1 e 2 mg L⁻¹, com ou sem o uso de AIB (Tabela 3).

Rzepka-Plevnes et al. (2011) observaram que a adição de ácido naftaleno acético no meio de cultura propiciou raízes mais longas em morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivado *in vitro*. Quanto aos ácidos húmicos, esses autores verificaram as maiores raízes (13,80 cm) de 'Elsanta' na concentração de 5 mg dm⁻³ e, em 'Senga Sengana', as maiores raízes (19,70 cm) foram observadas com 1,0 mg dm⁻³, ambas oriundas de solo podzólico.

De acordo com Vaughan e Malcolm (1985), este resultado pode estar relacionado ao forte estímulo das substâncias húmicas sobre o desenvolvimento radicular com concentrações relativamente pequenas de materiais húmicos em solução. Além de que, estas substâncias proporcionam a estimulação do alongamento radicular, pelos radiculares e produção radicular lateral (ZANDONADI et al. 2007; CANELLAS et al. 2002; 2009).

Quanto a massa de matéria fresca e seca da parte aérea e massa seca das raízes, ocorreu interação entre o meio de cultura com ou sem o uso do regulador de crescimento AIB e as diferentes concentrações de substâncias húmicas (Tabela 4).

Tabela 4 – Massa matéria fresca da parte aérea, massa matéria fresca das raízes, massa matéria seca da parte aérea e das raízes (g) de mirtilheiro 'Woodard' enraizadas *in vitro*, em função do uso de regulador de crescimento ácido indolbutírico (AIB) e das concentrações de substâncias húmicas. UFPel, Pelotas-RS, 2020.

Regulador de crescimento (AIB)	Concentrações de substâncias húmicas (mg L ⁻¹)			
	0	1	2	3
Massa matéria fresca da parte aérea (g)				
Com	0,41 bB ^{1/}	0,34 bB	0,50 aA	0,61 aA
Sem	0,76 aA	0,73 aA	0,56 aA	1,09 aA
CV(%)	42,28	28,05	39,94	43,23
Massa matéria fresca das raízes (g)				
Com	0,10 NS	0,10	0,05	0,07
Sem	0,08	0,13	0,10	0,22
CV(%)	36,27	49,96	36,31	28,76
Massa matéria seca da parte aérea (g)				
Com	0,01 aB	0,01 bB	0,01 bB	0,09 aA
Sem	0 bB	0,05 aA	0,05 aA	0,08 aA
CV(%)	21,76	41,12	48,30	30,32
Massa matéria seca das raízes (g)				
Com	0,021 aB	0,0041 bB	0,0034 bB	0,0126 aA
Sem	0 bB	0,0075 aA	0,0074 aA	0,0128 aA
CV(%)	37,22	41,97	35,92	35,30

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando o uso de AIB e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$) comparando as concentrações de SH. NS: não significativo. CV (%): coeficiente de variação.

A massa da matéria fresca da parte aérea foi maior no tratamento sem o uso de AIB; entretanto, não diferiu estatisticamente do tratamento com o uso de AIB nas concentrações 2 e 3 mg L⁻¹ (Tabela 4).

Em relação as concentrações de substâncias húmicas no meio de cultura com ou sem AIB, em 3 mg L⁻¹ verificou-se os maiores valores de massa fresca para ambos os tratamentos, mas não houve diferença estatística em comparação ao tratamento em que foi usado 2 mg L⁻¹ de substâncias húmicas

com o AIB e aos tratamentos com 0, 1 e 2 mg L⁻¹ de substâncias húmicas, sem o uso de AIB (Tabela 4).

Ayuso et al. (1996) explicam que a resposta da utilização dessas substâncias em relação à parte aérea é dependente de mais variáveis, como a espécie vegetal, a variedade da planta, a matéria-prima utilizada para extrair as substâncias húmicas e a sua origem, os grupos funcionais presentes nas substâncias húmicas e sua reatividade.

Para a massa de matéria fresca das raízes não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 4). Em outro experimento, Marino et al. (2008), analisando o conteúdo mineral e respiração das raízes *in vitro* de Kiwis tratados com substâncias húmicas verificaram a maior massa fresca das raízes, quando aplicaram 10 mg L⁻¹. Por outro lado, Silva et al. (2015) observaram que em *Cattleya warneri* a adição de ácidos húmicos no meio de cultura proporcionou um incremento de 81 e 159 % em relação ao controle, para a massa fresca das folhas e das raízes, respectivamente.

Verificou-se que a maior média da massa da matéria seca da parte aérea foi obtida pelo tratamento com o uso de AIB no meio de cultura, para concentração de 3 mg L⁻¹ de substância húmica (0,09 g), não diferindo do tratamento sem o uso de AIB (Tabela 4). Houve diferença significativa somente nas concentrações de 1 e 2 mg L⁻¹, em que o tratamento sem o uso de AIB obteve as maiores massas, ambas com 0,05 g (Tabela 4).

Quanto à massa de matéria seca das raízes, as maiores médias foram obtidas no tratamento sem o uso de AIB, para as concentrações 1, 2 e 3 mg L⁻¹ de substância húmica, diferindo estatisticamente da concentração 1 e 2 mg L⁻¹ de substância húmica do tratamento com o uso de AIB. Para a concentração 0 mg L⁻¹, os tratamentos com ou sem AIB não diferiram entre si (Tabela 4).

Para esta variável nas concentrações de substâncias húmicas com a utilização ou não de AIB, a maior média foi verificada em 3 mg L⁻¹ para o tratamento sem o uso de AIB, não diferindo estatisticamente das concentrações 1 e 2 mg L⁻¹ de substância húmica (Tabela 4).

Tavares et al. (1995) descreveram que o maior número, comprimento e massa seca de raízes favorecem o desenvolvimento das plantas e, conseqüentemente, a qualidade das mudas formadas.

Em estudo realizado por Baldotto et al. (2014), no qual foi avaliado o crescimento de orquídea *Cymbidium* sp. *in vitro* em resposta à aplicação de ácidos húmicos, os autores perceberam aumento da massa seca da raiz e da parte aérea das plântulas com aplicações de ácidos húmicos extraídos da compostagem de cama de frango e de compostagem de esterco bovino, com incrementos em relação ao controle de 21 e 28%, respectivamente.

Diante do exposto, de forma geral, o efeito das substâncias húmicas é variável em função do genótipo. Outro ponto importante é que existem substâncias húmicas oriundas de diferentes origens, ou seja, é importante testar outras formulações, a fim de atestar se isto pode levar a resultados distintos na mesma cultura.

No presente estudo, verifica-se que a utilização de substâncias húmicas no meio de cultura é promissora no enraizamento *in vitro* de mirtilheiro 'Woodard', não sendo necessária a aplicação do regulador de crescimento AIB. Além disso, a menor concentração de substâncias húmicas aplicada promoveu incremento no crescimento da parte aérea e do sistema radicular. Esses dois fatos podem resultar na redução dos custos de produção das mudas por micropropagação.

4.4 Conclusão

O enraizamento *in vitro* de mirtilheiro 'Woodard' pode ser realizado com o uso de 3 mg L⁻¹ de substância húmica, sem o ácido indolbutírico.

5 CAPÍTULO III - Concentrações e formas de aplicação de substâncias húmicas na aclimatização de mirtilheiro 'Woodard'

5.1 Introdução

O mirtilo (*Vaccinium* spp.), fruta de clima temperado pertencente à família Ericaceae, é muito apreciado pelo seu sabor exótico e por suas propriedades nutraceuticas (SILVA et al., 2006; DAMIANI; SCHUCH, 2008).

Para produzir mudas dessa frutífera com boa qualidade e em grande quantidade é necessário desenvolver sistemas eficientes para a propagação, de forma a otimizar o espaço de tempo e as garantias fitossanitárias (SCHUCH; TOMAZ, 2019).

Uma das técnicas utilizadas para disponibilizar tais mudas no mercado é a micropropagação (MILLER et al., 2006; ALBERT et al., 2009). Nesse método, a aclimatização é um período crítico e limitante, pois a planta passa de uma condição heterotrófica (laboratório) e necessita adaptar-se a uma condição autotrófica (casa de vegetação) (ZIMMERMAN, 1988). Para minimizar as perdas, é necessário disponibilizar uma condição adequada de ambiente, substrato, controle fitossanitário e nutrição, no intuito de possibilitar a sobrevivência e o desenvolvimento das plantas (SCHUCH; ERIG, 2005).

Além de que, as mudas micropropagadas apresentam como limitação o lento crescimento e, conseqüentemente, o longo período necessário de aclimatização das mudas (FARIA et al., 2012). Estratégias que acelerem o crescimento das plantas, como o uso de compostos bioestimulantes são almejadas (BALDOTTO et al., 2009). Entre estes compostos, destacam-se as substâncias húmicas.

As substâncias húmicas, formadas por ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e huminas, e estimulam a produção de hormônios vegetais naturais (auxinas, citocininas e giberelinas), o que pode afetar positivamente os mecanismos fisiológicos do desenvolvimento vegetal (SILVA et al., 2011). São aplicados exogenamente em pequenas quantidades via foliar, no solo ou na semente e possuem ações similares a grupos de hormônios vegetais (DU JARDIN et al., 2015; KLAHOLD et al., 2006).

Estas substâncias foram utilizadas durante a aclimatização de outras culturas, como a bananeira 'Grand Naine' (*Musa* spp.) (NOMURA et al., 2012);

o abacaxizeiro 'Vitória' (*Ananas comosus*) (BALDOTTO et al., 2010); a pereira (*Pyrus communis* L.) (MARINO et eal., 2010); o eucalipto (*Eucalyptus urograndis* e *Eucalyptus urophylla*) (LEONE, 2019) e também em espécies ornamentais, como a orquídea *Cymbidium* sp. (BALDOTTO et al., 2014). No entanto, não existem informações a respeito da utilização das mesmas na aclimatização de mirtilheiro 'Woodard', evidenciando a necessidade de estudos sobre esse tema.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações e formas de aplicação de substâncias húmicas na aclimatização de mirtilheiro 'Woodard'.

5.2 Material e Métodos

O experimento foi realizado no período de setembro a novembro de 2019, no Laboratório de Propagação de Plantas Frutíferas, pertencente ao Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel-UFPEl, localizada no município de Capão do Leão-RS.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema bifatorial, sendo os fatores: concentrações de substâncias húmicas (Solohumics®) (0; 1; 2 mg L⁻¹) e formas de aplicação das mesmas (imersão por 24h, pulverização a cada 7 dias (A) e pulverização diariamente (B)), totalizando nove tratamentos com cinco repetições. Cada repetição foi constituída de uma embalagem plástica transparente articulada Sanpack® (22 x 14 x 10 cm), com 10 microestacas por embalagem.

O Solohumics® é composto pelas seguintes substâncias: ácido húmico (25%), ácido fúlvico (5%), matéria orgânica (59%), carbono orgânico total (31%) e potássio (3%).

Foram utilizadas microestacas provenientes do cultivo *in vitro* de mudas de mirtilheiro 'Woodard', com $2,5 \pm 0,1$ cm de comprimento e aos 60 dias após o enraizamento (Figura 1A). As plantas foram retiradas dos frascos, lavadas em água corrente para a limpeza do meio de cultivo. Em seguida, no tratamento com substâncias húmicas por imersão, o sistema radicular foi imerso em solução por 24 horas (BALDOTTO et al., 2009).



Figura 1. Microestacas enraizadas (A), acondicionamento em embalagens articuladas (B) e pulverização com água destilada (C).

Em seguida, as microestacas foram acondicionadas em embalagens plásticas transparentes e articuladas Sanpack[®] (Figura 1B), previamente preenchidas com um litro de vermiculita de grânulos médios e hidratadas com 500 mL de água destilada. Após, as foram mantidas em casa de vegetação, com temperatura controlada de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Com o auxílio de um pulverizador manual Tramontina[®], a irrigação foi realizada com 25 mL de água destilada por embalagem (Figura 1C), a cada 3 dias, em média, e a aplicação das substâncias húmicas (Solohumics[®]), conforme o tratamento (Figura 2), mantendo-se as embalagens fechadas para evitar a desidratação.

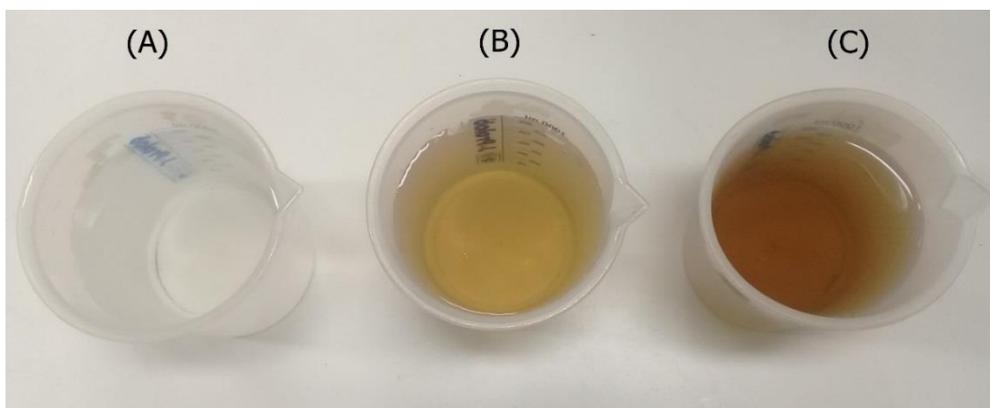


Figura 2. Substâncias húmicas para pulverização nas concentrações 0 (A), 1 (B) e 2 (C) mg L^{-1} .

Aos 60 dias, as variáveis avaliadas foram: a porcentagem de sobrevivência, número de brotações, comprimento da maior brotação (cm), comprimento da parte aérea (cm), número de raízes, comprimento da maior raiz (cm) e massa de matéria seca da parte aérea e da raiz (g).

A determinação do comprimento das raízes foi realizada com o auxílio de uma régua graduada. A massa de matéria seca da parte aérea e das raízes foi

obtida por meio de secagem em estufa a 50°C até peso constante, utilizando balança digital analítica para a pesagem.

Com relação ao substrato, foi realizada a caracterização das propriedades físicas e químicas, no início e final do experimento segundo Kämpf et al. (2006), sendo obtidos 6,1 para o pH em água na relação 1:1 (Figura 3A); 03 de condutividade elétrica (dS m^{-1}) (Figura 3B) e, 482,31 para a capacidade de retenção de água (mL L^{-1}) (Figura 3C).

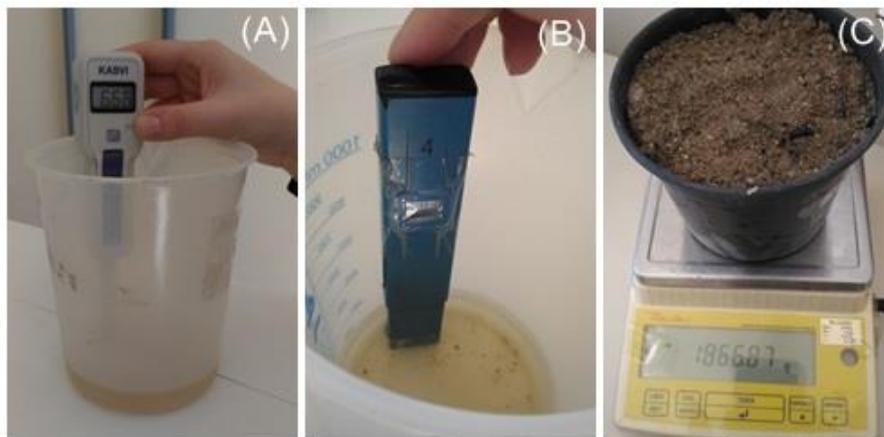


Figura 3. Caracterização do substrato: pH (A), condutividade elétrica (B) e capacidade de retenção de água (C).

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.3 Resultados e Discussão

Quanto à sobrevivência, quando comparadas as formas de aplicação em relação às concentrações de substâncias húmicas, não foi obtida diferença significativa. Entretanto, comparando as concentrações de substâncias húmicas com as formas de aplicação, a pulverização diária nas plantas na concentração de 0 e 2 mg L^{-1} de substâncias húmicas proporcionaram as maiores médias, para as demais formas de aplicação não ocorreu diferença significativa entre as concentrações (Tabela 1).

Tabela 1 – Sobrevivência (%) e comprimento da parte aérea (cm) de plantas de mirtilheiro 'Woodard' aos 60 dias após a aclimatização, em função das formas de aplicação e concentrações de substâncias húmicas. Pelotas-RS, 2020.

Forma de aplicação	Concentrações de substâncias húmicas (mg L ⁻¹)		
	0	1	2
	Sobrevivência (%)		
Imersão	94 A ^{NS}	94 A ^{NS}	84 A ^{NS}
Pulverização semanal	92 A ^{1/}	92 A	88 A
Pulverização diária	100 A	92 B	100 A
CV (%)	42,3	54,3	49,4
	Comprimento da parte aérea (cm)		
Imersão	6,51 ^{NS}	6,25 ^{NS}	5,71 ^{NS}
Pulverização semanal	6,56	6,55	7,10
Pulverização diária	6,40	7,21	6,31
CV (%)	38,4	28,4	36,8

^{1/} Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \geq 0,05$). ^{NS}: não significativo. CV (%): coeficiente de variação.

A porcentagem de sobrevivência pode interferir na rentabilidade do produtor, visto que está relacionada com a quantidade de mudas a ser comercializada.

Quanto ao comprimento da parte aérea (Tabela 1), não houve interação entre os tratamentos. Marino et al. (2010), avaliando a utilização de ácidos húmicos na aclimatização de pera 'Conference' (*Pyrus communis* L.), obtiveram maior comprimento da parte aérea (3,99 cm), quando foi utilizada a concentração de 0,5 mg L⁻¹. Porém, Nomura et al. (2012), testando o efeito da aplicação de biofertilizantes na aclimatização de mudas micropropagadas de bananeira 'Grand Naine', obtiveram maior desenvolvimento em altura com a aplicação de 8,0 mL/planta de Humitec[®] e 4,0 mL/planta de Ruter AA[®] (18,4 cm).

Para as variáveis número de brotos e comprimento da maior brotação, houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2 – Número de brotos e comprimento da maior brotação (cm) de plantas de mirtilleiro 'Woodard' aos 60 dias após a aclimatização, em função das formas de aplicação e concentrações de substâncias húmicas. Pelotas-RS, 2020.

Forma de aplicação	Concentrações de substâncias húmicas (mg L ⁻¹)		
	0	1	2
	Número de brotos		
Imersão	2,20 ^{NS}	2,40 ^{ab}	0,80 ^{NS}
Pulverização semanal	1,80	0,80 ^b	2,40
Pulverização diária	2,80 ^{AB^{1/}}	5,0 ^{aA}	1,00 ^B
CV (%)	28,1	27,4	16,7
	Comprimento da maior brotação (cm)		
Imersão	1,95 ^{NS}	1,68 ^b	2,32
Pulverização semanal	2,10	1,15 ^b	2,74
Pulverização diária	1,32 ^B	3,23 ^{aA}	1,35 ^B
CV (%)	19,8	23,4	32,4

^{1/} Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \geq 0,05$). ^{NS}: não significativo. CV (%): coeficiente de variação.

Na análise do número de brotos verifica-se que quando comparadas as formas de aplicação em relação às concentrações de substâncias húmicas, a maior média foi obtida quando 1 mg L⁻¹ de substância húmica foi pulverizado diariamente, não diferindo da forma de aplicação por imersão (Tabela 2).

Em relação às concentrações de substâncias húmicas para cada forma de aplicação, 1 mg L⁻¹ propiciou o maior número de brotos na aplicação semanal, não diferindo estatisticamente daquelas sem aplicação de substância húmica (Tabela 2). Ritter (2019), avaliando formas de aplicação de substâncias húmicas em estacas de oliveira (*Olea europaea* L.), não verificaram diferença significativa entre os tratamentos por imersão, pulverização e irrigação, diferindo do que foi observado neste trabalho em que a pulverização diária apresentou os melhores resultados.

Conforme Assis et al. (2009), o número de brotos é uma característica importante, pois o maior o número de brotações poderá contribuir para a maior taxa fotossintética. Este fato poderá interferir no pegamento das mudas no campo.

Quanto ao comprimento da maior brotação, comparando as formas de aplicação em cada concentração de substância húmica, a pulverização realizada diariamente, apresentou a maior média, diferindo estatisticamente da imersão e da pulverização realizada semanalmente quando 1 mg L^{-1} de substâncias húmicas foi testada. A aplicação por imersão e pulverização semanal não apresentaram diferença estatística nas demais concentrações (Tabela 2).

Quando comparadas as concentrações de substâncias húmicas dentro de cada forma de aplicação, para imersão e pulverização semanal não houve diferença entre as médias nas diferentes concentrações. Para a pulverização realizada diariamente, a maior média foi observada com 1 mg L^{-1} , diferindo de 0 e 2 mg L^{-1} (Tabela 2).

Na estaquia de oliveira (*Olea europaea* L.), Ritter (2019) observou maior média (1,29 cm) para comprimento de brotação com a aplicação de substâncias húmicas por irrigação; porém, não houve diferença em relação aos tratamentos por imersão e pulverização.

Na avaliação de número de raízes e comprimento da maior raiz houve interação entre as formas de aplicação e as concentrações de substâncias húmicas (Tabela 3).

Tabela 3 – Número de raízes e comprimento da maior raiz (cm) de plantas de mirtilheiro 'Woodard' aos 60 dias após a aclimatização, em função das formas de aplicação e concentrações de substâncias húmicas. Pelotas-RS, 2020.

Forma de aplicação	Concentrações de substâncias húmicas (mg L ⁻¹)		
	0	1	2
Número de raízes			
Imersão	4,40 A ^{NS}	4,68 A ^{1/}	4,12 bA
Pulverização semanal	4,47 A	5,04 A	5,00 abA
Pulverização diária	3,88 B	3,91 B	5,84 aA
CV (%)	42,3	38,5	29,8
Comprimento da maior raiz (cm)			
Imersão	4,42 aA	3,70 B ^{NS}	3,43 bB
Pulverização semanal	3,32 b ^{NS}	3,24	3,18 b
Pulverização diária	2,80 bB	3,48 B	5,24 aA
CV (%)	36,1	45,4	39,8

^{1/} Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \geq 0,05$). ^{NS}: não significativo. CV (%): coeficiente de variação.

Verificando as formas de aplicação em relação as concentrações de substâncias húmicas, na pulverização diária com 2 mg L⁻¹ de substâncias húmicas as plantas apresentaram maior número de raízes, diferindo estatisticamente do tratamento cuja pulverização foi feita por imersão. Além disso, não houve diferença estatística nas formas de aplicação com 0 e 1 mg L⁻¹ de substâncias húmicas (Tabela 3). Estes resultados diferem do registro feito por Ritter (2019) na cultura da oliveira (*Olea europaea* L.), tendo em vista que o maior número de raízes (11,88) foi obtido quando o mesmo adotou a aplicação de substâncias húmicas por irrigação.

Para o comprimento da maior raiz, analisando as formas de aplicação, a pulverização diária de substância húmica, as plantas apresentaram o maior comprimento, diferindo do tratamento cuja pulverização foi realizada semanalmente (Figura 4).



Figura 4. Mirtileiro ‘Woodard’ após aplicações de substâncias húmicas por pulverização diária, nas doses (A) 0 mg L⁻¹, (B) 1 mg L⁻¹ e (C) 2 mg L⁻¹, aos 60 dias de aclimatização.

Com relação às concentrações, houve diferença significativa apenas quando aplicadas 0 e 2 mg L⁻¹ de substância húmica, em que a maior média foi obtida em 2 mg L⁻¹ de substâncias húmicas pelo método de pulverização diária. Em relação, a concentração 0 mg L⁻¹, a maior média foi verificada quando as plantas foram imersas por 24 horas (Tabela 3). Ritter (2019), testando formas de aplicação do produto Solohumics® (10 mL) na cultura da oliveira verificou que a pulverização semanal, a irrigação e a imersão por 1 hora e 30 minutos não diferiram entre si quanto ao comprimento de maior raiz.

O sucesso de uma cultura, em grande parte, está relacionado com a utilização de mudas de qualidade. Plantas com maior aporte no sistema radicular tendem a ter melhores condições de crescimento em campo após transplante, o que pode contribuir para antecipar o florescimento e, conseqüentemente, aumentar o ciclo de produção, com reflexos diretos na produtividade da cultura (VERDIAL et al., 2000; MELO et al.; 2011).

Para a massa seca da parte aérea, não houve diferença significativa entre os tratamentos testados (Tabela 4); entretanto, os resultados do presente trabalho foram superiores aos obtidos por Pelizza (2009), na aclimatização de mirtileiro ‘Climax’ em que a autora verificou 0,06 g aos 210 dias, quando utilizou Casca de arroz carbonizada + Húmus Fértil®.

Tabela 4 – Massa de matéria seca da parte aérea e das raízes (g) de plantas de mirtilheiro 'Woodard' aos 60 dias após a aclimatização, em função das formas de aplicação e concentrações de substâncias húmicas. Pelotas-RS, 2020.

Forma de aplicação	Concentrações de substâncias húmicas (mg L ⁻¹)		
	0	1	2
Massa de matéria seca da parte aérea			
Imersão	0,10 ^{NS}	0,15	0,11
Pulverização semanal	0,09	0,10	0,12
Pulverização diária	0,12	0,10	0,10
CV (%)	17,3	14,5	18,9
Massa de matéria seca das raízes (g)			
Imersão	0,09 ab	0,09 ab	0,05 b ^{NS}
Pulverização semanal	0,01 b	0,06 ab	0,07 ab
Pulverização diária	0,07 abB	0,17 aA	0,12 aAB
CV (%)	42,1	28,7	19,8

^{1/} Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \geq 0,05$). ^{NS}: não significativo. CV (%): coeficiente de variação.

Em relação à massa de matéria seca das raízes, comparando as formas de aplicação, sem a pulverização de substâncias húmicas as maiores médias foram obtidas na pulverização realizada diariamente e imersão por 24 horas, diferindo estatisticamente da pulverização semanal. Para as formas de aplicação na concentração 1 e 2 mg L⁻¹ não houve diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 4).

Para as concentrações de substâncias húmicas em relação às formas de aplicação, em 1 mg L⁻¹ foi constatada a maior massa seca quando foi realizada a pulverização diária, não diferindo estatisticamente da concentração 2 mg L⁻¹. Nas demais formas de aplicação, não houve entre as médias para as concentrações testadas (Tabela 3). Os resultados do presente trabalho são superiores aos verificados aos encontrados por Pelizza, que na aclimatização de mirtilheiro 'Climax' verificaram 0 g de massa seca de raízes.

Silva e Jablonski (1995), trabalhando com alface 'Babá de verão' observaram que a utilização de substâncias húmicas na solução nutritiva favoreceu incremento de 240% na massa seca de raízes. Outros autores

também constataram efeitos dessas substâncias nas características radiculares de outras hortícolas, como o abacaxi (BALDOTTO et al., 2009) e a melancia (COSTA et al., 2008).

Em síntese, os resultados demonstram a eficácia da utilização de substâncias húmicas na aclimatização de mudas de mirtilheiro 'Woodard', o que pode representar uma alternativa promissora para esta etapa da micropropagação. Com relação às formas de aplicação, embora na pulverização diária haja maior demanda por mão de obra, em geral, foi a que propiciou a maiores médias nas variáveis avaliadas.

5.4 Conclusão

A utilização de 2 mg L^{-1} de substâncias húmicas e a pulverização diária são as mais indicadas para a aclimatização de mirtilheiro 'Woodard'.

6 CAPÍTULO IV - Concentrações de substâncias húmicas e explantes oriundos de diferentes meios de cultura na aclimatização de mirtilheiro 'Woodard'

6.1 Introdução

A região Sul do Brasil apresenta grande potencial para o cultivo de pequenas frutas, especialmente mirtilo (*Vaccinium* sp.) (SCHUCH; TOMAZ, 2019), espécie que possibilita alto retorno econômico em um curto período, sendo uma alternativa para os produtores (PASA et al., 2014).

Para a expansão da cultura é imprescindível o uso de mudas de boa qualidade. Segundo Damiani e Schuch (2009), uma alternativa para aumentar a disponibilidade de tais mudas é o uso da micropropagação. Porém, para o sucesso desta técnica é necessário selecionar explantes adequados (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998), bem como meios de cultivo que forneçam substâncias essenciais para o crescimento e o desenvolvimento do material vegetal (CARVALHO, 2006).

Dentre as etapas da micropropagação, a aclimatização é um período crítico e limitante. Esse processo deve ser progressivo, de forma que as plantas não sofram estresse ou venham a morrer devido às mudanças de ambiente (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). É necessário o fornecimento de ambiente, substrato, controle fitossanitário e nutrição adequados, além da manutenção de sombreamento e alta umidade relativa para a sobrevivência e o desenvolvimento das plantas (SCHUCH; ERIG, 2005).

Para otimizar a micropropagação podem ser usadas substâncias húmicas, que estão presentes na matéria orgânica do solo e são capazes de promover efeitos diretos sobre o crescimento vegetal e de fornecerem nutrientes para as plantas por meio da mineralização (CANELLAS et al., 2015). Estas são substâncias bioestimulantes (BALDOTTO et al., 2009), constituídas pelas frações de ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e huminas (BALDOTTO; BALDOTTO, 2014); possibilitam o aumento na absorção de nutrientes e no crescimento vegetal (VAUGHAN; MALCOLM, 1985; CHEN; AVIAD, 1990; NARDI et al., 2002), podendo influenciar no crescimento de raízes (FAÇANHA et al., 2002).

Os resultados promovidos pelo uso de bioestimulantes dependem de uma série de fatores, tais como: a espécie ou cultivar, o órgão ou a idade ideal da

planta para aplicação, além da concentração recomendada para a cultura (ZANDONADI et al., 2014) e o tempo de exposição da planta a estas substâncias (KELTING et al., 1997). As mesmas podem ser aplicadas exogenamente em pequenas quantidades via foliar, solo, semente (DU JARDIN et al., 2015) ou adicionadas no meio de cultura (MACIEJEWSKI et al., 2019).

Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar o uso de substâncias húmicas e explantes oriundos de diferentes meios de cultura na aclimatização de mirtilheiro 'Woodard'.

6.2 Material e Métodos

O experimento foi realizado no período de setembro a novembro de 2019, no Laboratório de Propagação de Plantas Frutíferas, pertencente ao Departamento de Fitotecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM)/Universidade Federal de Pelotas (UFPel), localizada no município de Capão do Leão – RS.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema bifatorial, sendo os fatores: concentrações de substâncias húmicas (Solohumics[®]) na imersão dos explantes (0; 1; 2 mg L⁻¹) e explantes oriundos de diferentes meios de cultura (sem (0 mg L⁻¹) ou com (1 mg L⁻¹) substâncias húmicas) (Figura 1), totalizando seis tratamentos com quatro repetições, sendo cada repetição constituída de uma embalagem plástica transparente articulada Sanpack[®] (22 x 14 x 10 cm) com 15 microestacas.

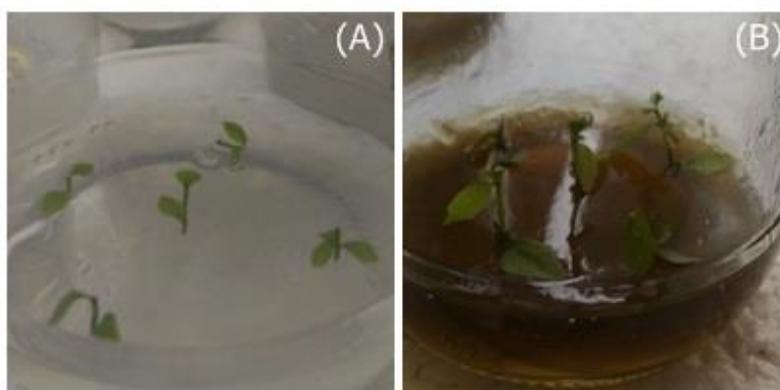


Figura 1. Explantes de mirtilheiro 'Woodard' na fase inicial de enraizamento em meio de cultura sem (A) e com (B) substância húmica.

Foram utilizadas microestacas provenientes do cultivo *in vitro* de mudas de mirtilheiro 'Woodard', medindo 2,5 cm, mantidas em meio WPM (Wood Plant

Media - LOYD; McCOWN, 1980), sem adição de reguladores de crescimento e substâncias húmicas, conforme o tratamento.

Aos 60 dias após o enraizamento *in vitro* as plantas foram retiradas dos frascos, lavadas em água corrente para a limpeza do meio de cultivo e, em seguida, o sistema radicular foi imerso em solução de substâncias húmicas (Solohumics®) por 24 horas, conforme o tratamento (BALDOTTO et al., 2009). Este produto comercial é composto pelas substâncias húmicas: ácido húmico (25%), ácido fulvico (5%) e matéria orgânica (60%).

Em seguida, as microestacas foram acondicionadas em embalagens plásticas transparentes e articuladas Sanpack® (Figura 2), previamente preenchidas com um litro de vermiculita grânulos médios e hidratadas com 500 mL de água destilada. Após, as embalagens foram mantidas em casa de vegetação com temperatura controlada de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ (Figura 3). Durante a aclimatização, procedeu-se a pulverização de 25 mL, de água destilada a cada 3 dias, em média, mantendo-se as embalagens fechadas para evitar a desidratação.



Figura 2. Microestacas de mirtilheiro 'Woodard' acondicionadas em embalagens plásticas articuladas.



Figura 3. Embalagens plásticas articuladas na casa de vegetação com temperatura controlada.

Aos 60 dias as variáveis avaliadas foram: a porcentagem de sobrevivência, número de brotações, comprimento da maior brotação (cm), comprimento da parte aérea (cm), número de raízes, comprimento da maior raiz (cm), massa seca de parte aérea e raiz (g).

A determinação do comprimento das raízes foi realizada com o auxílio de uma régua graduada. A massa de matéria seca da parte aérea e das raízes foi obtida por meio de secagem em estufa a 50°C até peso constante, utilizando balança digital analítica para a pesagem.

Também foi realizada a caracterização das propriedades físicas e químicas da vermiculita segundo Kämpf et al. (2006), sendo obtidos 6,3 para o pH em água na relação 1:1; 03 para a condutividade elétrica (dS m^{-1}) e 492, 59 para a capacidade de retenção de água (mL L^{-1}).

Os dados foram submetidos à análise de variância e a significância determinada pelo teste F ($p \leq 0,05$). Constatando-se significância estatística, os diferentes meios de cultura foram comparadas pelo teste t ($p \leq 0,05$) e as concentrações de substâncias húmicas pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

6.3 Resultados e discussão

Em relação à sobrevivência, não houve significância estatística entre os tratamentos. Para o comprimento da parte aérea, observou-se efeito significativo entre os tipos de meio de cultura e concentrações testadas na imersão das raízes (Tabela 1).

Tabela 1 - Sobrevivência (%) e comprimento da parte aérea (cm) de plantas aclimatizadas de mirtilheiro 'Woodard', em função do meio de cultura sem e com substâncias húmicas e das concentrações de substâncias húmicas na imersão de raízes. UFPel, Pelotas-RS, 2020.

Meio de cultura	Concentrações de SH (mg L ⁻¹)		
	0	1	2
	Sobrevivência (%)		
Sem SH	100 ^{NS}	95 ^{NS}	92 ^{NS}
Com SH	92	100	92
CV(%)	11,02	7,25	16,22
	Comprimento da parte aérea (cm)		
Sem SH	4,21 bB ^{1/}	3,91 bB	7,38 aA
Com SH	7,30 aA	7,52 aA	8,08 aA
CV(%)	19,40	20,91	26,28

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando os tipos de explantes e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando as concentrações de SH (Substâncias húmicas) em cada tipo de explante. ^{NS}: não significativo. CV (%): coeficiente de variação.

Em todos os tratamentos a sobrevivência foi superior a 95%. Este resultado pode ser atribuído as vantagens da técnica de micropropagação, dentre as quais estão o aumento no índice de enraizamento, melhor qualidade do sistema radicular em termos de vigor, uniformidade, volume, aspecto e formato; redução no tempo de permanência das mudas no viveiro, maior taxa de crescimento e sobrevivência das mudas no campo, obtenção de mudas de qualidade, redução da mão-de-obra, entre outras (XAVIER; COMÉRIO, 1996; ASSIS, 1996; XAVIER et al., 1997; DUTRA et al., 2009).

Os resultados deste trabalho corroboram com os encontrados por Soares et al. (2006), em que verificaram 100% de sobrevivência durante a aclimatização de mirtilheiro 'Georgiagem' para os explantes enraizados na ausência de AIB.

Para o comprimento da parte aérea, os tratamentos em que os explantes foram provenientes de meio de cultura com substâncias húmicas apresentaram as maiores médias, independente da concentração de substância húmica utilizada na imersão das raízes. Porém, não houve diferença estatística do

tratamento sem substâncias húmicas no cultivo *in vitro* e com imersão das raízes na concentração de 2 mg L⁻¹ (Tabela 1).

Estes resultados são superiores aos encontrados por Pelizza (2009) na aclimatização de mirtilheiro 'Climax', em que foi observado 0,90 cm de incremento da altura da parte aérea após 60 dias da instalação do experimento. Porém, pode-se inferir que isso tenha ocorrido em função do genótipo, além do autor ter usado casca de arroz carbonizada + húmus fértil®.

Em relação ao número de brotos e comprimento da maior brotação, houve interação entre os meios de cultura e as concentrações de substâncias húmicas testadas (Tabela 2).

Tabela 2 - Número de brotos e comprimento da maior brotação (cm) de plantas aclimatizadas de mirtilheiro 'Woodard', em função do tipo de explante e das concentrações de substâncias húmicas. UFPel, Pelotas-RS, 2020.

Meio de cultura	Concentrações de SH (mg L ⁻¹)		
	0	1	2
Número de brotos			
Sem SH	1,50 bB ^{1/}	1,75 bB	3,25 bA
Com SH	3,75 aB	5,75 aA	6,0 aA
CV(%)	35,52	22,86	17,71
Comprimento maior brotação (cm)			
Sem SH	2,50 aB	2,03 bB	2,32 bA
Com SH	1,00 bB	3,35 aA	3,56 aA
CV(%)	42,48	37,90	17,43

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando os tipos de explantes e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando as concentrações de SH (Substâncias húmicas) em cada tipo de explante. CV (%): coeficiente de variação.

Em relação ao número de brotos, as maiores médias foram com os tratamentos em que os explantes eram oriundo da presença de substâncias húmicas no cultivo *in vitro* e com imersão nas concentrações de 1 e 2 mg L⁻¹ de substâncias húmicas, diferindo estatisticamente do tratamento sem a presença de substância húmica no meio de cultura em que foram oriundos os explantes (Tabela 2).

Comparando as concentrações de substâncias húmicas com os tipos de explantes, nas concentrações de 1 e 2 mg L⁻¹ verificou-se o maior número de brotos, no tratamento com explantes provenientes de meio de cultura com a presença de substâncias húmicas. Para as concentrações do tratamento sem substâncias húmicas não houve diferença significativa (Tabela 2).

Vale salientar que o número de brotos é uma característica importante, pois poderá resultar em maior taxa fotossintética, o que possivelmente contribuirá para o pegamento das mudas no campo (ASSIS et al., 2009).

Para o comprimento da maior brotação, comparando os meios de cultura em cada concentração de substância húmica, os explantes que foram cultivados *in vitro* com a presença de substâncias húmicas apresentaram as maiores médias nas concentrações de 1 e 2 mg L⁻¹. No tratamento sem substância húmica no cultivo *in vitro* e sem imersão prévia de substâncias húmicas dos explantes na aclimatização obteve-se o maior comprimento da parte aérea, diferindo estatisticamente do tratamento com substância húmica no cultivo *in vitro* (Tabela 2).

Quanto as concentrações de substâncias húmicas em cada tipo de explante, 1 e 2 mg L⁻¹ propiciaram as maiores médias para o tratamento com explantes retirados de meio de cultura com substâncias húmicas. Em relação às concentrações, para o tratamento de explantes sem substâncias húmicas no meio de cultura não houve diferença estatística (Tabela 2).

Para as variáveis número de raízes e comprimento da maior raiz, observou-se interação para os fatores de estudo (Tabela 3).

Tabela 3 - Número de raízes e comprimento maior raiz (cm) de plantas aclimatizadas de mirtilheiro 'Woodard', em função do tipo de explante e das concentrações de substâncias húmicas. UFPel, Pelotas-RS, 2020.

Tipos de explante	Concentrações de SH (mg L ⁻¹)		
	0	1	2
	Número de raízes		
Sem SH	2,33 bB ^{1/}	2,85 bB	3,52 aA
Com SH	4,08 aA	2,35 bB	4,89 aA
CV(%)	23,8	34,5	19,8
	Comprimento da maior raiz (cm)		
Sem SH	2,79 aA	2,50 aA	3,68 aA
Com SH	1,36 bB	1,92 bB	4,19 aA
CV(%)	38,7	36,9	45,9

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando os tipos de explantes e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando as concentrações de SH em cada tipo de explante. CV (%): coeficiente de variação.

Avaliando o número de raízes através da comparação entre os meios de cultura e as concentrações de substâncias húmicas, no explante com a substância húmica no meio de cultura o maior número de raízes foi verificado em 0 e 2 mg L⁻¹ (Tabela 3).

A quantidade de raízes interfere na absorção de água e nutrientes; e conseqüentemente, pode promover maior desenvolvimento vegetativo (SORACE et al., 2007). Ritter (2019), avaliando a utilização de substâncias húmicas em oliveira (*Olea europaea* L.), observou o maior número de raízes quando utilizado o produto comercial Solohumics®.

Em relação ao comprimento da maior raiz, comparando os tipos de explante com as concentrações de substâncias húmicas, houve diferença estatística apenas entre 0 e 1 mg L⁻¹, onde nos explantes sem a presença de substâncias húmicas, foram observadas as maiores médias (Tabela 3) (Figura 4).



Figura 4. Comprimento da maior raiz (cm) de plantas de mirtilheiro ‘Woodard’ oriundos de meio de cultura sem a presença (A – 0 mg L⁻¹), (B – 1 mg L⁻¹) e (C – 2 mg L⁻¹) e ausência (D: 0 mg L⁻¹), (E – 1 mg L⁻¹) e (F – 2 mg L⁻¹) de substância húmica aos 60 dias de aclimatização.

Analisando as concentrações em relação os tipos de explante, para o tratamento sem a presença de substâncias húmicas no meio de cultura não houve diferença estatística. No tratamento com a presença de substâncias húmicas no meio de cultura, a maior média foi obtida na concentração 2 mg L⁻¹, diferindo estatisticamente das demais (Tabela 3). Segundo Silva et al. (2011), o crescimento das raízes é um dos principais efeitos fisiológicos das substâncias húmicas nas plantas.

Costa et al. (2008), trabalhando com duas fontes de bioestimulantes em mudas de melancia também concluíram que houve efeito das substâncias húmicas, com maior comprimento das raízes obtido na concentração de 0,26% do bioestimulante Fertiactyl GZ®.

Para a massa da matéria seca da raiz, aos compararmos os tipos de explante para cada concentração de substância húmica, os explantes com a presença de substâncias húmicas apresentaram a maior massa. Quando comparadas as concentrações de substâncias húmicas em relação aos tipos de explante, as maiores médias foram observadas para os explantes com a presença de substâncias húmicas, independente da concentração aplicada (Tabela 4).

Tabela 4 - Massa da matéria seca das raízes e da parte aérea de plantas aclimatizadas de mirtilheiro 'Woodard', em função do tipo de explante e das concentrações de substâncias húmicas. UFPel, Pelotas-RS, 2020.

Tipos de explante	Concentrações de SH (mg L ⁻¹)		
	0	1	2
Massa matéria seca da raiz (g)			
Sem SH	0,05 bB ^{1/}	0,04 bB	0,08 bB
Com SH	0,14 aA	0,18 aA	0,13 aA
CV(%)	19,7	17,8	19,2
Massa matéria seca da parte aérea (g)			
Sem SH	0,11 bB	0,11 bB	0,13 bB
Com SH	0,15 aA	0,20 aA	0,19 aA
CV(%)	17,3	16,4	15,7

^{1/} Médias acompanhadas por mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$) comparando os tipos de explantes e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) comparando as concentrações de SH em cada tipo de explante. CV (%): coeficiente de variação.

Em se tratando da massa da matéria seca da parte aérea, comparando os tipos de explantes com as concentrações, as maiores massas foram obtidas nos tipos de explantes com a presença de substâncias húmicas para ambas concentrações testadas (Tabela 4).

Quando comparadas as concentrações em relação aos tipos de explante, 0, 1 e 2 mg L⁻¹ não diferiram entre si para os explantes com a presença de substância húmica; no entanto promoveram as maiores médias em relação ao tratamento sem a presença de substâncias húmicas no meio de cultura (Tabela 4). Morgado (1998) considerou a massa da matéria seca da parte aérea como a característica que mais contribui para a capacidade de resistência das mudas às condições adversas, após o estabelecimento no campo.

Ferri (2008), utilizando composto orgânico em misturas com diferentes substratos observou que o uso do substrato constituído por 70% de serragem + 20% de fibra de coco + 10% de esterco bovino é o que proporciona maior matéria seca da parte aérea e radicular de plantas micropropagadas de mirtilheiro 'Climax' e 'Aliceblue', enquanto 'O'Neal' e 'Georgiagem' apresentaram melhores

resultados em substrato constituído por 70% de casca de arroz carbonizada + 20% de serragem + 10 % de esterco bovino.

Tendo em vista esses aspectos, no presente estudo, em geral, o uso de substâncias húmicas no meio de cultura WPM resultou em explantes de mirtilheiro 'Woodard' mais promissores para a etapa considerada crítica da micropropagação, que é a aclimatização. Ademais, apesar de ter sido a maior concentração, a imersão dos mesmos em 2 mg L⁻¹ antes desta etapa poderá ser uma alternativa interessante, uma vez que o custo do produto usado representará acréscimo de menos de 0,75 centavos, em média, a cada 10.000 mudas.

6.4 Conclusão

O explante oriundo de meio de cultura com presença de substâncias húmicas e a imersão dos mesmos em 2 mg L⁻¹ dessas substâncias são os mais indicados para a aclimatização de mirtilheiro 'Woodard'.

7 Considerações finais

- O uso de substâncias húmicas é uma alternativa para a micropropagação de mirtilheiro 'Woodard'. As mesmas podem ser utilizadas em substituição ou associada a outros reguladores de crescimento.
- Os efeitos das substâncias húmicas podem variar em função da fonte de extração das mesmas, da concentração utilizada, do genótipo a ser testado, entre outros fatores. Assim, é importante o estudo com produtos de diferentes origens, assim como o teste com outras concentrações do bioestimulante.
- Apesar dos resultados promissores do presente estudo, não existem outros trabalhos relacionados ao uso dessas substâncias na micropropagação do mirtilheiro 'Woodard', embora as mesmas possam ser adquiridas no comércio de produtos agrícolas.
- As informações deste trabalho poderão auxiliar produtores, alunos, pesquisadores e empresas produtoras de mudas quanto às etapas da micropropagação de mirtilheiro cultivar Woodard, com o uso de substâncias húmicas.

Referências

- AGUIAR, N. O.; OLIVARES, F. L.; NOVOTNY, E. H.; DOBBSS, L. B.; BALMORI, D. M.; SANTOS-JÚNIOR, L. G.; CANELLAS, L. P. Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages. **Plant and Soil**, Netherlands, 362, n.1-2, p.161-174, 2013.
- ALBERT, T.; STARAST, M.; KARP, K.; KALDMÄE, H.; VOOL, E.; PAAL, T. The influence of propagation method on growth of the half-highbush blueberry 'Northblue'. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.812, p.141-146, 2009.
- ANDRADE, P. F. S. **Análise da conjuntura agropecuária, safra 2016/17**. Secretaria de Agricultura e de Abastecimento. Departamento de economia rural. Paraná. 9p. 2017.
- ANTUNES, L. E. C. **A cultura do mirtilo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 69p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 121).
- ANTUNES, L. E. C.; PERES, N. A. Strawberry production in Brazil and South America. **International Journal of Fruit Science**, Philadelphia, v. 13, n.1-2, p.156-161, 2013.
- ANTUNES, L. E. C.; RASEIRA, M. do C. B. **Aspectos técnicos da cultura da amora-preta**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 54 p. (Documento, 122).
- ANTUNES, L. E. C.; RASEIRA, M.C.B. (Ed.). **Cultivo do mirtilo (*Vaccinium spp.*)**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. 99p. (Embrapa Clima Temperado. Sistema de Produção, 8).
- AQUINO, E.L.; SCHUCH, M.W.; ASSIS, A.M de. Ácidos húmicos na multiplicação *in vitro* de mirtilheiro cv. Bluecrop. In: II FRUSUL – Simpósio de Fruticultura da Região Sul, 2019, Chapecó. **Anais...Chapecó: UFFS**, 2019.
- ASSIS, A. M. D.; FARIA, R. T. D.; UNEMOTO, L. K.; COLOMBO, L. A.; LONE, A. B. Aclimatização de bastão-do-imperador (*Etilingera elatior*) em substratos à base de coco. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31. n.1, p.43-47, 2009;
- ASSIS, T. F. Propagação vegetativa de Eucalyptus por microestaquia. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo, PR: EMBRAPA, 1997. v. 1, p. 300-304.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES EXPORTADORES DE FRUTAS E DERIVADOS (ABRAFRUTAS). **Dados estatísticos**. Disponível em: <<https://abrafrutas.org/dados-estatisticos/>>. Acesso em: 28 jul. 2019.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES EXPORTADORES DE FRUTAS E DERIVADOS (ABRAFRUTAS). **Exportação de frutas cresce 16%**

em 2019. Disponível em: < <https://abrafrutas.org/2020/01/28/exportacoes-de-frutas-cresce-de-16-em-2019/>>. Acesso em: 01 fev. 2020.

AYUSO, M.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C.; PASCUAL, J.A. Stimulation of barley growth and nutrient absorption by humic substances originating from various organic materials. **Bioresource and Technology**, New York, v.57, p.251-257, 1996.

BACKES, M. A.; KÄMPF, A. N. Substratos à base de composto de lixo urbano para a produção de plantas ornamentais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 4/5, p. 753-758, 1991.

BACKES, M. A.; KÄMPF, A. N. Substratos à base de composto de lixo urbano para a produção de plantas ornamentais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 4/5 p. 753-758, 1991.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; GIRO, V. B.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; BRESSAN-SMITH, R. Desempenho do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à aplicação de ácidos húmicos durante a aclimação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 33, p. 979-990, 2009.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; GIRO, V. B.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; BRESSAN-SMITH, R. Desempenho do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à aplicação de ácidos húmicos durante a aclimação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.33, n.4, p. 979-990, 2009.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; GONTIJO, J. B.; DE OLIVEIRA, F. M.; GONÇALVES, J. Aclimação de orquídea (*Cymbidium* sp.) em resposta à aplicação de ácidos húmicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.5, p.830-833, 2014.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; OLIVARES, F. L.; VIANA, A. P.; BRESSAN SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 34, p. 349-360, 2010.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; SOARES, R.R.; MARTINEZ, H. E. P.; VENEGAS, V. H. A. Adventitious rooting in cuttings of croton and hibiscus in response to indolbutyric acid and humic acid. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, p.476-483, 2012.

BALDOTTO, M. A.; BALDOTTO, L. E. B. Ácidos húmicos. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, p. 856-881, 2014.

BALDOTTO, M. A.; CANELLAS, L. P.; CANELA, M. C.; SIMÕES, M.L.; MARTIN-NETO, L.; FONTES, M. P. F.; VELLOSO, A. C. X.; Propriedades redox e grupos funcionais de ácidos húmicos isolados de adubos orgânicos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 3, p. 465-475, 2007.

BALDOTTO, M. A.; MUNIZ, R. C.; BALDOTTO, L. E. B.; DOBBSS, L. B.; Root growth of *Arabidopsis thaliana* treated with humic acids isolated from typical

- soils of Rio de Janeiro state, Brazil. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, p.504-511, 2011.
- BARALDI, R.; MALAVASI, F. F. F.; PREDIERI, S.; CASTAGNETO, M. Effect of potassium humate on apple cv. 'Golden Delicious' cultured *in vitro*. **Plant cell, tissue and organ culture**, Hague, v.24, n.3, p.187-191, 1991.
- BARBIERI, R.L.; VIZZOTTO, M. Pequenas frutas ou frutas vermelhas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.33, n.268, p.7-10, 2012.
- BASTOS, D. C.; SCARPE FILHO, J. A.; FATINANSI, J. C.; PIO, R. Estiolamento, incisão na base da estaca e uso de AIB no enraizamento de estacas herbáceas de caramboleira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 281-284, 2005.
- BEDNAREK, R.; DZIADOWIEC, H.; POKOJSKA, U.; PRUSINKIEWICZ, Z. **Ecopedological studies**. Polish Scientific Publisher PWN, Warsaw (*in Polish*). 2004. 344P.
- BERED, F.; SERENO, M. J. C. M.; CARVALHO, F.I.F. de; LANGE, C.E.; ANDEL, C.L.; DORNELLES, A.L.C. Regeneração de plantas de aveia a partir de calos embriogênicos e organogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.33, p.1827-1833, 1998.
- BERZELIUS, J. J. **Lehrbuch der Chemie**. Leipzig: Wöhler, 1839. 279p.
- BISWAS, R. **Development of technologies for the production of polyphenolic nutraceuticals from muscadine grapes and rabbiteye blueberries**. 2007. 328f. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Pós-Graduação da Universidade da Geórgia, Athens, GA.
- BOUNOUS, G. **Piccoli frutti. Mirtilli, lamponi, ribes, uvaspina. Come coltivarli, raccogliarli e utilizzarli**. Edagricole. Bologna. 2009, 393 p.
- BOWLING, B.L. **The berry grower's companion**. Oregon: Timber Press, 2000. 284p.
- BRAGA, F.T.; PASQUAL, M.; CASTRO, E.M.; RAFAEL, G.C. Características morfofisiológicas de abacaxizeiro 'gomo de mel' enraizado *in vitro* sob luz natural e substrato vermiculita. **Revista Brasileira de fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 551-557, 2011.
- BRAZELTON, D.; STRIK, B.C. Perspective on the U.S. and global blueberry industry. **Journal of American Pomological Society**, Massashuttes, v.61, p.144-147, 2007.
- BROWNELL J.R.; NORDSTROM, G.; MARIHART, J.; JORGENSEN, G. Crop responses from two new leonardite extracts. **Sci Total Environ**, Amsterdam, n. 62, p.491-499, 1987.
- BUSATO, J. G.; ZANDONADI, D. B.; SOUSA, I. M.; MARINHO, E. B.; DOBBS, L. B.; MÓL, A. R. Efeito do extrato húmico solúvel em água e biofertilizante

sobre o desenvolvimento de mudas de *Callophyllum brasiliense*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 36, n. 86, p. 161-168, 2016.

BUZETA, A. Requerimientos edafoclimaticos. **Berries para el 2000**. Chile, p. 60-63, 1997.

CAMARGO, Samila Silva. **Aspectos propagativos de espécies frutíferas com atividade antioxidante: romãzeira e mirtilheiro**. 2015. 103f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

CAMARGO, S. S.; MENEGUZZI, A.; ARRUDA, A. L.; PAIANO, G. M.; RUFATO, L. Substratos e formas de imersão de auxina no cultivo *in vitro* de mirtilheiros cv. Duke. **Revista da Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa-Congrega Urcamp**, Bagé, p. 2561-2570, 2017.

CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. A.; MORAES, A. A.; RUMJANEK, V. M.; OLIVARES, F. L. Avaliação de características de ácidos húmicos de resíduos de origem urbana: I. Métodos espectroscópicos (UV-Vis, IV, RMN 13C-CP/MAS) e microscopia eletrônica de varredura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 24, p. 741-750, 2000.

CANELLAS, L.P.; FAÇANHA, A.O.; FAÇANHA, A.R. & OLIVARES, F.L. Humic acids isolated from earthworm induces root mitotic sites and plasma membrane H⁺-ATPase. **Plant Physiology**, Glasgow, v.30, p.1951-1957, 2002.

CANELLAS, L.P.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A.; DOBBSS, L.B.; OKOROKOVA-FACANHA, A.; SANTOS, G.A.; OLIVARES, F.L. & FACANHA, A.R. Relationships between chemical characteristics and root growth promotion of humic acids isolated from Brazilian Oxisols. **Soil Science**, Philadelphia, 174, p.611-620, 2009.

CANTUARIAS- AVILÉS, T. **Cultivo do Mirtilheiro**. Série produtor rural, n.48. Piracicaba: ESALQ, 38p. 2010.

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

CARVALHO JUNIOR, W. G. O.; MELO, M. T. P. de; MARTINS, E. R. Comprimento da estaca no desenvolvimento de mudas de alecrim-pimenta. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 7, p. 2199-2202, out. 2009.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. de A.; MEDEIROS, M. J. L. Fatores Inerentes à Micropropagação. Campina Grande, PB. 2006. (EMBRAPA. Documentos, 148).

CHEN, Y.; AVAID, T. Effects of humic substances on plant growth. *In*: MACCARTHY, P.; CAPP, C. E.; MALCOLM, R.L.; BLOOM, P. R. (Eds.) **Humic substances in soil and crop sciences**: selected readings. Madison, American Society of America, 1990. p.161-186.

- CHILDERS, N. F.; LYRENE, P. M. **Blueberries for growers, gardeners, promoters**. Florida: E. O. Painter Printing Company, 2006. 266p.
- COLAPIETRA, M. Clorosi ferrica e biostimolazione del diradamento degli acini. **L'Informatore Agrario**, Verona, v. 56, p. 33-39, 2000.
- CONTE, A. **Fruticultura**. EMATER. 2017. Disponível em: <<http://www.emater.tche.br/site/area-tecnica/sistema-de-producao-vegetal/fruticultura.php#.WSOiuOsrLIU>>. Acesso em: 29 jul. 2019.
- COSTA, F. D. S.; PASQUAL, M.; PEREIRA, J. E. S.; RODRIGUES, F. A.; MIYATA, L. Y. Relação entre o tempo de enraizamento *in vitro* e o crescimento de plantas de bananeira na aclimatização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.1, p. 31-37, 2008.
- COSTA, F.H.S.; PEREIRA, M.A.A.; OLIVEIRA, J.P.; PEREIRA, J.E.S. Efeito de agentes geleificantes alternativos no meio de cultura no cultivo *in vitro* de abacaxizeiro e bananeira. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 41-46, 2007.
- COZZA, R.; TURCO, D.; BATI, C. B.; BITONTI, M.B. Influence of growth medium on mineral composition and leaf histology in micropropagated plantlets of *Olea europaea*. **Planta Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 51, p.215-223, 1997.
- CRUZ, Jéssica Gonsalez. **Qualidade de luz na micropropagação de mirtilheiro 'Woodard'**. 2017. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.
- DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Diferentes substratos e ambientes no enraizamento *in vitro* de mirtilo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.2, p. 563-566, 2009.
- DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. Multiplicação fotoautotrófica de mirtilo através do uso de luz natural. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.2, p.482- 487, 2008.
- DARNELL, R.L. Blueberry botany/environmental physiology. *In*: CHILDERS, N.F.; LYRENE, P.M. **Blueberries for growers, gardeners, promoters**. Florida: E. O. Painter Printing Company, 2006. p. 5-13.
- DELFINE, S.; TOGNETTI, R.; DESIDERIO, E.; ALVINO, A. Effects of foliar application of N and humic acids on growth and yield of durum wheat. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v.25, p.183-191, 2005.
- DOSSA, D.; FUCHS, F. Melancia: Produção, mercado e preços na CEASA-PR. **Boletim Técnico 05**. MELANCIA: outubro de 2017.
- DU JARDIN, P. Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 196, p. 3-14, 2015.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I; BRONDANI, G. E. Micropropagação do eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 58, p.49-59, 2009.

EHLENFELDT, M.K.; ROWLAND, L.J.; OGDEN, E.L.; VINYARD, B.T. Floral bud cold hardiness of *Vaccinium ashei*, *V. constablaei*, and hybrid derivatives and the potential for producing Northern-adapted rabbiteye cultivars. **HortScience**, Alexandria, v.42, p.1131-1134, 2007.

ELENA, A.; DIANE, L.; EVA, B.; MARTA, F.; ROBERTO, B.; ZAMARREÑO, A. M.; GARCÍA-MINA, J. G. The root application of a purified leonardite humic acid modifies the transcriptional regulation of the main physiological root responses to Fe deficiency in Fe-sufficient cucumber plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 47, p. 215-223, 2009.

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

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W.; DA COSTA CHAVES, A. Enraizamento *in vitro* e aclimatização de mudas de marmeleiro. **Scientia Agraria**, Curitiba, v.5, n.1, 61-68, 2004.

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

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHITIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 221 p. 2005.

FAOSTAT. **FAOSTAT database results**. 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 18 agosto 2019.

FARIA, R.T.; ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L.K.; CARVALHO, J.F.R.P. **Produção de orquídeas em laboratório**. Londrina: Mecenas, 2012. 124p.

FERNÁNDEZ, M. B. M.; COSIO-VARGAS, L. E.; MONTERO, D. C.; GARCÍA, A. C.; LÓPEZ, D. M. Potentiality of vermicompost humic acids in banana *in vitro* micropropagation clone: *Enano Guantanamero*. **Journal of Environmental Science and Engineering**, v. 2 n.11A, 2014.

FERNANDEZ-ESCOBAR, R.; BENLLOCH, M.; BARRANCO, D.; DUENAS, A.; GAÑÁN, J. G. Response of olive trees to foliar application of humic substances extracted from leonardite. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.66, n.3-4, p.191-200, 1996.

FERRARA, G.; BRUNETTI, G. Influence of foliar applications of humic acids on yield and fruit quality of table grape cv. Itália. **Journal international des sciences de la vigne et du vin**, Villenave d'Ornon, v. 42, p. 79-87, 2008.

FERRI, Juçara. **Micropropagação e desenvolvimento vegetativo do mirtilo**. 2008. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

FISCHER, D. D. O.; FACHINELLO, J. C.; ANTUNES, L. E. C.; TIMM, C. R. F.; GIACOBBO, C. L. Enraizamento de estacas semilenhosas de mirtilo sob o efeito de diferentes concentrações de ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, n.2, 557-559, 2008.

FLORES, R., STEFANELLO, S., FRANCO, E.; MANTOVANI, N. Regeneração *in vitro* de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). **Revista Brasileira de Agrocência**, Pelotas, v.4, n.3, p.201-205, 1998.

FRACARO, A. A.; PEREIRA, F. M. Distribuição do sistema radicular da goiabeira 'Rica' produzida a partir de estaquia herbácea. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 183-185, abr. 2004.

FRANCO, D.; OLIVEIRA, I. V. de M.; CAVALCANTE, Í. H. L.; CERRI, P. E.; MARTINS, A. B. G. Estaquia como processo de clonagem do Bacuri (*Redhia gardneriana* Miers ex Planch e Triana). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 176-178, 2007.

FREITAS, GA; RODRIGUES, LU; SANTOS, ACM; CARNEIRO, JSS; DEUSDÁRA, TT; SILVA, RR. Influência de frações de ácidos húmicos na produção de mudas de alface. **Amazon Soil** – I Encontro de Ciência do Solo da Amazônia Oriental, p. 130-139, 2014.

FRIMMEL, F. H.; CHRISTMAN, R. F. **Humic substances and their role in the environment**. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons, 1988. 271 p.

FRUTICULTURA tem se tornado boa alternativa de negócios para produtores do RS. **G1**, Porto Alegre, 18 fev. 2019. Campo e lavoura. Disponível em: <<https://g1.globo.com/rs/rio-grande-do-sul/campo-e-lavoura/noticia/fruticultura-tem-se-tornado-boua-alternativa-de-negocios-para-produtores-do-rs.ghtml>>. Acesso em: 15 out. 2019.

GALLETTA, G.J.; BALLINGTON, J.R. Blueberry, cranberries, and lingonberries *In*: JANICK, J.; MOORE, J.N.[Ed]. **Fruit Breeding**. New York: John Wiley & Sons, 1996. p. 1-108.

GOUGH, R.E. **The highbush blueberry and its management**. Nova York: Haworth Press, 1994. 272p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. *In*: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Eds.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília, DF: ABCTP/EMBRAPA, 1990. p. 99-169.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. *In*: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Embrapa-SPI: Embrapa-CNPQ. v.1, p.183-260. 1998.

HALUPA, V. C. *In vitro* propagation of mature trees of *Sorbus aucuparia* L. and field performance of micropropagated trees. **Journal of Forest Science**, Praga, v. 48, n. 12, p. 529-535, 2002.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES, F. T.; GENEVE, R. L. **Plant propagation: principles and practices**. 6. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. p. 549-622.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES JUNIOR, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 7.ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. 880p.

HERTER, F. G; WREGE, M. S. Fatores edafoclimáticos. *In*: RASEIRA, M. C. B.; ANTUNES, L.E.C. **Cultivo do mirtilo** (*Vaccinium* spp). Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p. 17-20, 2006. (Embrapa Clima Temperado. Sistema de produção, 8).

HOFFMANN, A.; ANTUNES, L. E. C. **Grande Potencial**. Cultivar Hortaliças e Frutas, Pelotas, v. 5, n. 27 p. 28-30, 2004.

HOFFMANN, A.; SEBBEN, S. S. **1º Seminário brasileiro sobre pequenas frutas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. 64p. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 37).

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. *In*: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Eds.). **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan, 1983. p. 117-227.

IBGE. **Censo agropecuário 2015**: Lavoura permanente e temporária. Disponível

em:<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2015/default_xls.sh>. Acesso em: 21 julho 2019.

IBGE. **Produção agrícola municipal 2018**: Lavoura permanente e temporária. Disponível em:<<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>>. Acesso em: 28 janeiro 2020.

IBGE. **Produção agrícola municipal 2019**: Lavoura permanente e temporária. Disponível em:<<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>>. Acesso em: 28 janeiro 2020.

JAMIESON, A.R.; NICKERSON, N.L. Field performance of the lowbush blueberry propagated by seed, stem cuttings and micropropagation. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.626, p.431-436, 2003.

KÄMPF, A. N. Substrato. *In*: KÄMPF, A.N. **Produção comercial de plantas ornamentais**. Guaíba: Agropecuária, 2005. p. 45-72.

KÄMPF, A.N. **Seleção de Materiais para uso como substrato**. *In*: KÄMPF, A.N.; FERMINO, M.H. Substratos para plantas: a base de produção vegetal em recipientes. Porto Alegre, Editora Gênese. 2000. p. 139–145.

KÄMPF, N. A.; TAKANE, R. J.; SIQUEIRA, P. T. V. **Floricultura: técnicas de preparo de substratos**. Brasília: LK Editora e Comunicação, 2006. v. 1, 132 p.

KASHYAP, S.; KAPOOR, N.; KALE, R.D. Effect of vermicompost extracts on the *in vitro* micropropagation of *Bacopa monnieri*. **International Journal of Green Pharmacy**, Mandasaur, v.9. p.63-68, 2015.

KELTING, M.; HARRIS, J. R.; FANELLI, J.; APPLETON, B.; NIEMIERA, A. Humate-based biostimulants do not consistently increase growth of container-grown Turkish hazelnut. **Journal of Environmental Horticulture**, Washington, v. 15, n. 4, p. 197-199, 1997.

KIST, B. B.; CARVALHO, C.; TREICHEL, M.; SANTOS, C. E. **Anuário brasileiro da fruticultura 2018**. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2018. 88 p.

KLAHOLD, C. A.; GUIMARÃES, V. F.; ECHER, M. DE MORAES.; KLAHOLD, A.; CONTIERO, R. L.; BECKER, A. Resposta da soja (*Glycine max* L. Merrill) à ação de bioestimulante. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 2, P: 179, 2006.

KONONOVA, M. M. **Die Humusstoffe des Bodens**: Ergebnisse und Probleme de Humusforschung. Berlin: VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, 1958. 341 p.

KOYAMA, R., HUSSAIN, I., SHAHAB, M., AHMED, S., DE ASSIS, A. M., ZEFFA, D. M., ANTUNES, L.E.C; ROBERTO, S. R. Métodos de aplicação de ácido indolbutírico e épocas de coleta de estacas de mirtilo 'Brite Blue. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, V.14, n.3, e.6542, 2019.

KRAMER, P.J.; KOZLOWSKI, I. T. **Fisiologia das árvores**. Lisboa: Caloute. Gulbenkian, 1972. 745 p.

KRIKORIAN, A. D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. *In*: ROCA, W. R.; MROGINSKI, L. A. **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1991. p. 41-78.

LAVADINHO C.; SOUSA M. B.; MOLDÃO-MARTINS, M. Influência da data de colheita na qualidade do mirtilo. Atas 5º Encontro de Química de Alimentos: Qualidade, Segurança, Inovação, p. 346-348, 2001.

LEITZKE, Luciane Nolasco. **Micropropagação fotoautotrófica de amoreira-preta (*Rubus spp.*) e framboeseira (*Rubus idaeus* L.) com a utilização de luz natural**. 2007. 88f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Meio de cultura, concentração de AIB e tempo de cultivo no enraizamento *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 582-587, 2009.

LEONE, Gabriela Ferraz. **Otimização da produção de mudas clonais de eucalipto com o uso de bioestimulantes** .2019. 50f. Tese (Doutorado em

Ciências) – Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2019.

LILA, M. A.; RASKIN, I. Health-related interactions of phytochemicals. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 70, n. 1, p. 20-27, 2005.

LITWINCZUK, W.; SZCZERBA, G.; WRONA, D. Field performance of highbush blueberries (*Vaccinium x corymbosum* L.) cv. 'Herbert' propagated by cuttings and tissue culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.106, p.162-169, 2005.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagation Society**. Seattle, USA, 1980. p. 421-427.

LOFFREDO, E.; SENESI, N.; D'ORAZIO, V. Effects of humic acids and herbicides, and their combinations on the growth of tomato seedlings in hydroponics. **Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde**, Weinheim, v.160, n.4, p. 455-461, 1997.

LOSS, A.; TEIXEIRA, M. B.; SANTOS, T. J.; GOMES, V. M.; QUEIROZ, L. H. Indução do enraizamento em estacas de *Malvaviscus arboreus* com diferentes concentrações de ácido indol–butírico (AIB). **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, p. 269-273, 2009.

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

LULAKIS, M. D.; PETSAS, S. I. Effect of humic substances from vine-canecan mature compost on tomato seedling growth. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.54, n.2, p.179-182. 1995.

MACIEJEWSKI, P.; RAMM, A.; OLIVEIRA, B. A. S.; MATTOS, M. G.; SCHUCH, M.W.; ASSIS, A. M. Substâncias húmicas na multiplicação *in vitro* de marmeleiro 'alongado'. In: XXI Encontro de Pós Graduação, 2019, Pelotas. **Anais...Pelotas: UFPel**, 2019.

MACIEJEWSKI, P.; SCHMIDT, R.; ESPINEL, G.; FRÖLECH, D.; LESSA, F.; TOMAZ, Z.F.P.; SCHUCH, M.W.; Uso de 2iP e Filtros de Luz na Multiplicação *in vitro* do Mirtileiro. In: IX Seminário Brasileiro sobre Pequenas Frutas, 2017, Vacaria. **Anais...Vacaria: Embrapa Uva e Vinho**, 2017.

MADAIL, J. C. M.; SANTOS, A. M. Aspectos econômicos. **A cultura do mirtilo**. Pelotas: Embrapa Clima temperado, 2004. p.63-68. (Documentos, 121).

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

- MALIK, K.A.; AZAM, F. Effect of humic acid on wheat (*Triticum aestivum* L.) Seedling growth. **Environmental and Experimental Botany**, Riga, v. 25, n. 3, p. 245-252, 1985.
- MARINO, G.; CELLINI, A.; MASIA, A.; SIMONI, A.; FRANCIOSO, O.; GESSA, C. *In vitro* treatment with a low molecular weight humic acid can improve growth and mineral uptake of pear plantlets during acclimatization. **Acta Horticulture**, Wageningen, n.884, p. 565-572, 2010.
- MARINO, G.; FRANCIOSO, O.; CARLETTI, P.; NARDI, S.; GESSA, C. Mineral content and root respiration of *in vitro* grown kiwifruit plantlets treated with two humic fractions. **Journal of plant nutrition**, Filadélfia, v.31.p.6, p.1074-1090, 2008.
- MARTINS, C. C.; BOVI, M. L. A.; SPIERING, S. H. Umedecimento do substrato na emergência e vigor de plântulas de pupunheira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 1, p. 224 - 230, 2009.
- MELO, L. A. DE; XAVIER, A.; PAIVA, H. N DE; BORGES, S. R. Otimização do tempo necessário para o enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus grandis*. **Revista Arvore**, Viçosa, v.35, n .4, 2011.
- MELO, L. C. A.; SILVA, C. A.; DIAS, B. O. Caracterização da matriz orgânica de resíduos de origens diversificadas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 32, p. 101-110, 2008.
- MILLER, S.; RAWNSLEY, E.; GEORGE, J.; PATEL, N. A comparison of blueberry propagation techniques used in New Zealand. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.715, p.397-402, 2006.
- MOREIRA, Roseane Madaina. **Estabelecimento *in vitro* de cultivares de oliveira**. 2014. 83f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.
- MORGADO, Ivan Ferreira. **Resíduos agroindustriais prensados como substrato para a produção de mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden e *Saccharun spp.*** 1998. 102 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos de Goytacazes, 1998.
- MUNIZ, Jaqueline Nogueira. **Micropropagação e aclimatização de *Physalis peruviana* e *Physalis alkekengi***. 2013. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2013.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473- 497, 1962.
- NARDI, S.; MUSCOLO, A.; VACCARO, S.; BAIANO, S.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Relationship between molecular characteristics of soil humic

- fractions and glycolytic pathway and krebs cycle in maize seedlings. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.39, n.12, p.3138-3146, 2007.
- NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, A.; VIANELLO, A. Physiological effects of humic substances on higher plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 34, p. 1527-1536, 2002.
- NEILSEN, G. H.; HOGUE, E. J.; NEILSEN, D.; BOWEN, P. Postbloom humic- and fulvic-based zinc sprays can improve apple zinc nutrition. **HortScience**, Alexandria, v. 40, n.1, 205-208, 2005.
- NERI, D.; LODOLINI, E. M.; SAVINI, G.; SABBATINI, P.; BONANOMI, G.; ZUCCONI, F. Foliar Application of Humic Acids on Strawberry (cv Onda). **Acta Horticulture**, Wageningen, 594, p. 297-302, 2002.
- NOMURA, E. S., JUNIOR, E. R. D., FUZITANI, E. J., SAES, L. A., & JENSEN, E. Aclimatização de mudas micropropagadas de bananeira 'Grand Naine' com aplicação de biofertilizantes em duas estações do ano. **Revista Ceres**, Viçosa, v.59, n.4, p. 518-529, 2012.
- NOMURA, E. S.; JUNIOR, E. R. D.; FUZITANI, E. J.; SAES, L. A.; JENSEN, E. Aclimatização de mudas micropropagadas de bananeira "Grand Naine" com aplicação de biofertilizantes em duas estações do ano. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 4, p. 518-529, 2012.
- ORLOV, D.S. **Humus acids of soils**. New Delhi: Oxonian Press Pvt. Ltd., 1985. 378p.
- OTTO, S. **The back-yard berry book**. Ed. OttoGraphics. Maple City, Michigan. 1995. 284 p.
- PAGOT, E. **Cultivo de pequenas frutas: amora-preta, framboesa, mirtilo**. Porto Alegre: EMATER/RS-ASCAR. 2006.
- PAGOT, E.; HOFFMANN, A. Produção de pequenas frutas no Brasil. *In*: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 2003, Vacaria, RS. **Anais** [...] Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. p.9-17. (Documentos 37).
- PASA, M. DA S., CARVALHO, G.C., SCHUCH, M.W., SCHMITZ, J.D., TORCHELSEN, M. DE M., NICKEL, G.K., SOMMER, L.S., LIMA, T.S., CAMARGO, S.S. Qualidade de luz e fitoreguladores na multiplicação e enraizamento *in vitro* da amoreira-preta 'Xavante'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.8, p.1392-1396, 2012.
- PASA, M. S.; FACHINELLO, J. C.; SCHMITZ, J. D.; FISCHER, D. L. O.; ROSA, H. F. Desempenho de cultivares de mirtilheiros dos grupos rabbiteye e highbush em função da cobertura de solo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. 1, p. 161-169, 2014.
- PELIZZA, T. R.; DAMIANI, C. R.; RUFATO, A. R.; AFFONSO, L. B.; HAMERROTH, F. J.; SCHUCH, M. W. Aclimatização e crescimento de

plântulas de mirtilheiro 'climax' micropropagadas em função do substrato e da cobertura plástica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 3, p. 898-905, 2011.

PELIZZA, Tânia Regina. **Propagação de mirtilheiro através de micro e miniestaquia**. 2009. 110 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

PIERIK, R.L.M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Ediciones Mudi-Prensa, 1990. 326p.

PIZZATTO, M.; WAGNER JÚNIOR, A.; LUCKMANN, D.; PIROLA, K.; CASSOL, D. A.; MAZARO, S. M. Influência do uso do AIB, época de coleta e tamanho de estaca na propagação vegetativa de hibisco por estaquia. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, p. 4877-4892, 2011.

PRAKASH, P.; SHARUMATHY, D.; SUNKAR, S.; NANDAGOPAL, D.; NARENDRAKUMAR, G. Micropropagation of *eclipta alba* using humic acid as Media componente. **Plant Archives**, Etawah, v. 15, n. 1, p 181-185, 2015.

RADÜNZ, A.L.; ACUNHA, T.D.S.; GIOVANAZ, M.A.; HERTER, F.G.; CHAVES., F.C. Intensidade de poda na produção e na qualidade dos frutos de mirtilheiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.36, n.1, p.186-191, 2014.

RAMM, Aline. **Inflorescência de mirtilheiro**. 2020. 1 fotografia.

RAMM, Aline. **Frutos e flores de mirtilheiro**. 2020. 1 fotografia.

RAMM, Aline. **Mudas de mirtilheiro 'Woodard' cultivado em vasos em estufa agrícola**. 2020. 1 fotografia.

RASEIRA, M. C. B. Descrição da planta, melhoramento genético e cultivares. *In*: RASEIRA, M. C. B.; ANTUNES, L. E. C. **A Cultura do mirtilo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 64p. (Documento, 121), 2004.

RASEIRA, M. C. B.; ANTUNES, L.E.C. **A cultura do mirtilo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 64p. (Documento, 121), 2004.

READ, P.E.; WILDUNG, D.K.; HARTLEY, C.A. Field performance of *in vitro* propagated 'Northblue' blueberries. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v.241, 191-194, 1989.

REIS, E. R.; LÚCIO, A. D. C.; FORTES, F. O.; LOPES, S. J.; SILVEIRA, B. D. Período de permanência de mudas de *Eucalyptus grandis* em viveiro baseado em parâmetros morfológicos. **Revista Árvore**, Viçosa, v.32, n.5, p. 809-814, 2008.

RETAMALES, J.B.; HANCOCK, J.F. **Blueberries: Crop Production Science in Horticulture**. CABI Publ. Co Oxfordshire, UK, 2012. 336 p.

RISTOW, N. C.; ANTUNES, L. E. C.; SCHUCH, M. W.; TREVISAN, R. Crescimento de plantas de mirtilo a partir de mudas micropropagadas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 1, p. 210-215, 2009.

RITTER, Giovana. **Microrganismos e substâncias húmicas no enraizamento de estacas de cultivares de oliveira**. 2019. 37 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2019.

RODRIGUES, L. U; SILVA, R. R. da; FREITAS, G. A. de; SANTOS, A. C. M. dos; TAVARES, R. de. C; Ácidos húmicos no desenvolvimento inicial de alface. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, Guarapuava v.11, n.2, p.101-109, 2018.

RODRIGUES, L. U; SILVA, R. R. da; FREITAS, G. A. de; SANTOS, A. C. M. dos; TAVARES, R. de. C. Ácidos húmicos no desenvolvimento inicial de alface. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, Guarapuava, v.11, n.2, p.101-109, 2018.

RODRIGUES, Sabrina Ávila. **Efeito de acidulantes, espessantes e cultivares nas características físico-químicas e estruturais de topping de mirtilo**. 2006. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

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

RUFATO, A, R.; ANTUNES, L, E, C. **Técnicas de produção de framboesa e mirtilo**. Embrapa Clima Temperado, 92 p. 2016.

RZEPKA-PLEVNES, D.; KULPA, D.; GOŁĘBIEWSKA, D.; PORWOLIK, D. Effects of auxins and humic acids on *in vitro* rooting of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Journal of Food, Agriculture & Environment**, Helsinki, V.9, n.3- 4, p. 592-595, 2011.

SANCHEZ-SANCHEZ, A.; SANCHEZ-ANDREU, J.; JUAREZ, M.; JORDA, J.; BERMUDEZ, D. Improvement of iron uptake in table grape by addition of humic substances. **Journal of Plant Nutrition**, Filadélfia, n.29, p.259-272, 2006.

SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, A.; SÁNCHEZ-ANDREU, J.; JUÁREZ, M.; JORDÁ, J.; BERMÚDEZ, D. Humic substances and amino acids improve effectiveness of chelate FeEDDHA in lemon trees. **Journal of Plant Nutrition**, Filadélfia, v.25, n.11, 2433-2442, 2002.

SANTOS, A. M. dos; RASEIRA, M. do C.B. **A cultura do mirtilo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. 23 p.; 2002.

- SCHNITZER, M.; KHAN, SU. **Humic substances in the environment**. New York, Marcel Dekker. 1972. 327p.
- 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, 2008.
- SCHUCH, M. W.; DE ROSSI, A.; DAMIANI, C. R.; SOARES, G. C. Aib e substrato na produção de mudas de mirtilo cv. " Climax" através de microestaquia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.5, p.1446-1449, 2007.
- SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. **Micropropagação de plantas frutíferas**. In: FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. Propagação de plantas frutíferas. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 221 p.
- SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Micropropagação de plantas frutíferas. In: FACHINELLO, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: DF: Embrapa Informação Tecnológica. p.155-173. 2005.
- SCHUCH, M.W.; TOMAZ, Z.F.P. Avanços na propagação do mirtilo vegetativo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.41, n.1, 2019.
- SEVERO, J.; MONTE, F.G.; CASARIL, J.; SCHREINERT, R.S.; ZANATTA, O.; ROMBALDI, C.V.; SILVA, J.A. Avaliação de compostos fenólicos, antocianinas e capacidade antioxidante de morango e mirtilo. In: SIMPÓSIO DO MORANGO, 4.; ENCONTRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 3., 2008, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2008. p. 103.
- SHARPE, R.H. **Consultant's Report**. Pelotas, IICA/EMBRAPA-UEPAE de Cascata, 11p., 1980.
- SHELTON, L.L.; MOORE, J.N. Highbush blueberry propagation under southern U.S. climatic conditions. **HortScience**, Alexandria, v.16, n.3, p.320-321, 1981.
- SHEWFELT, R. L.; AHMED, E. M. Enhancement of powdered soft drink mixes with anthocyanin extracts. **Journal of food science**, Chicago, v. 43, n.2, p. 435-438, 1978.
- SILVA, A.C.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; DOBBSS, L. B.; AGUIAR, N. O.; FRADE, D. A. R.; REZENDE, C. E.; PERES, L. E. P. Promoção do crescimento radicular de plântulas de tomateiro por substâncias húmicas isoladas de turfeiras. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 35, n. 5, p. 1609-1617, 2011.
- SILVA, A.L.; ROGALSKI, M.; MORAES, L. K. A.; FESLIBINO, C.; CRESTANI L.; GUERRA, M. P. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de Prunus. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n.2, p.297-300, 2003.
- SILVA, L.C.; SCHUCH, M.W.; SOUZA, J.A.; ERIG, A.C.; ANTUNES, L.E.C. Meio nutritivo, reguladores de crescimento e frio no estabelecimento *in vitro* de

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

SILVA, M.A.C.; SANTOS, W.O.; SIMOURA, N.T.; TESCH, J.A.; RUAS, K.F.; COLODETE, C.M.; TANNURE, F.P.; BARBIRATO, J.O.; RAMOS, A.C.; DOBBS, L.B. Ácidos húmicos de vermicomposto estimulam o crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya warnieri* (Orchidaceae). **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 3, p. 759-768, 2015.

SILVA, R.M.; JABLONSKI. A. Uso de ácidos húmicos e fúlvicos em solução nutritiva na produção de alface. **EGATEA: Revista da Escola de Engenharia**, Porto Alegre, v. 23, p. 71-78, 1995.

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

SOARES, G. C.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Efeito do tempo de exposição ao aib no meio de cultura no enraizamento *in vitro* de mirtilo. In: XV Congresso de Iniciação Científica, 2006, Pelotas. **Anais...Pelotas: UFPel**, 2019.

SORACE, M; FARIA, R.T; YAMAMOTO, L.Y.; SCHNITZER, J.A.; TAKAHASHI, L. S. A. Influência de auxina na aclimatização de *Oncidium baueri* (Orchidaceae). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, n. 28, p.195-200, 2007.

SOUSA, M. B.; CURADO, T.; VASCONCELLOS, F. N.; TRIGO, M. J. **Framboesa: qualidade pós-colheita**. Folhas de Divulgação Agro 556, nº 1, novembro, 2007.

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

SOUZA, A.S.; JUNGHANS, T.G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. 152p.

SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. C.; NETO, H. P. da S. Aclimatização. In: SOUZA, A. da S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 131-140.

SOUZA, F. X. de; ARAÚJO, C.A.T. Avaliação dos métodos de propagação de algumas spondias agroindustriais. **Comunicado Técnico**, Fortaleza: EMBRAPA Agroindústria Tropical, n.31, p. 1-4, 1999.

SPEDDING, Peter J. Peat. **Fuel**, v. 67, n. 7, p. 883-900, 1988.

STRIK, B.C.; CLARK, J.R.; FINN, C.E.; BANADOS, M.P. Worldwide Blackberry Production. **Hortechology**, Alexandria, v.17, n.2, p. 205-213, 2007.

TAHIRI, A.; DESTAIN, J.; THONART, PH.; ONGENA, M.; DRUART, PH. Comparison of explant responses treated with leachate and leonardite sources of humic substances during in vitro rooting of woody plants. **Communications in agricultural and applied biological sciences**, Gante, v.81, n.1, p. 158-165, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed., Artmed, 2013. 918 p.

TAVARES, M.S.W.; KERSTEN, E.; SIEWERDT, F. Efeitos do ácido indolbutírico e da época de coleta no enraizamento de estacas de goiabeira (*Psidium guajava* L.). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.52, n.2, p.310-317, 1995.

TEJADA, M.; GONZALEZ, J.L. Effects of foliar application of a byproduct of the two-step olive oil mill process on rice yield. **Europe Journal of Agronomy**, Conthey, v.21, p.31-40, 2004.

TREHANE, J. **Blueberries, cranberries and other vacciniums**. Cambridge: Timber Press, 2004. 256p.

TREICHEL, M.; KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; CARVALHO, C.; BELING, R. R.; **Anuário brasileiro da fruticultura 2016**. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2016. 92 p.

TREVISAN, S.; BOTTON, A.; VACCARO, S.; VEZZARO, A.; QUAGGIOTTI, S.; NARDI, S. Humic substances affect Arabidopsis physiology by altering the expression of genes involved in primary metabolism, growth and development. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 74, p. 45-55, 2011.

TREVISAN, S.; PIZZEGHELLO, D.; RUPERTI, B.; FRANCIOSO, O.; SASSI, A.; PALME, K.; QUAGGIOTTI, S.; NARDI, S. Humic substances induce lateral root formation and expression of the early auxin responsive IAA19 gene and DR5 synthetic element in Arabidopsis. **Plant Biology**, Berlin, v.12, p. 604-614, 2010.

VAUGHAN, D.; MALCOLM, R. E. Effect of humic acid on invertase synthesis in roots of higher plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 11, p. 247-252, 1979.

VAUGHAN, D.; MALCOLM, R.E. & ORD, B.G. **Influence of humic substances on growth and physiological process**. In: VAUGHAN, D. & MALCOLM, R.E., eds. Soil organic matter and biological activity. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1985. p.77-108.

VENÂNCIO, J. B.; ARAÚJO, W. F.; CHAGAS, E. A. Acclimatization of micropropagated seedlings of pineapple cultivars on organic substrates. **Científica**, Jaboticabal, v.47, n.1, p.52-61, 2019.

VERCESI, A. Concimi organici a terreno e foglie in viticoltura. **L'Informatore Agrario**, Verona, v. 6, p.83-89, 2000.

VERDIAL, M. F.; LIMA, M. S. de.; TESSARIOLI NETO, J.; DIAS, C. T. dos. S.; BARBANO, M. T. Métodos de formação de mudas de maracujazeiro amarelo. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 4, p. 795-798, 2000.

VILELLA, F. CD do *In: CURSO DE PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE ARANDANOS, FRAMBUESAS Y MORAS*, 2003, Montevideo. Montevideo: **Sociedad Uruguaya de Horticultura**, 2003. 1 CD-Rom. www.smallfruit.org North Caroline Blueberry News, v.8, n. 3, Out. 2003.

WAGNER JUNIOR, A.; FRANZON, R. C.; COUTO, M.; CONCEIÇÃO, P. C.; DE LUCES FORTES, G. R. Níveis de vermiculita em mistura de substrato na aclimatização de plantas de amoreira-preta 'Tupy'. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.18 n. 2-4, p.188-195, 2012.

WU, Y.; LI, Y.; MA, Y.D.; ZHANG, L.; REN, Z. M.; XIA, Y.P. Hormone and antioxidant responses of *Lilium* Oriental hybrids 'Sorbonne' bulblets to humic acid treatments *in vitro*. **The journal of horticultural science and biotechnology**, Ashford, v.92, n.2, p. 155-167, 2016.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de Eucalyptus. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 20, n. 1, p. 9-16, 1996.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J.; IANNELLI, C. M. Eficiência da microestaquia e da micropropagação na clonagem de *Eucalyptus* spp. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo, PR: EMBRAPA, 1997. v. 4, p. 40-45.

XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. (ed.). **Biociência Florestal**. Viçosa: UFV, 2007. p. 55-74

YAMANISHI, O. K.; FAGUNDES, G. R.; MACHADO FILHO, J. A.; VALONE, G. V. Efeito de diferentes substratos e duas formas de adubação na produção de mudas de mamoeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, p. 276-279, 2004.

YAMANISHI, O. K.; FAGUNDES, G. R.; MACHADO FILHO, J. A.; VALONE, G. D. V. Efeito de diferentes substratos e duas formas de adubação na produção de mudas de mamoeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 1, n. 2, p. 276- 279, 2004.

ZACHARIAKIS, M.; TZORAKAKIS, E; KRITSOTAKIS, I.; SIMINIS, C.I.; MANIOS, V. Humic substances stimulate plant growth and nutrient accumulation in grapevine rootstocks. **Acta Horticulture**, Wageningen n.549, p. 131-136, 2001.

ZANDONADI, D. B.; SANTOS, M. P.; MEDICI, L. O.; SILVA, J. da. Ação da matéria orgânica e suas frações sobre a fisiologia de hortaliças. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 14-20, 2014.

ZANDONADI, D.B.; CANELLAS, L.P. & FAÇANHA, A.R. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. **Planta**, Berlin, 225, p.1583-1595, 2007.

ZIETEMANN, C.; ROBERTO, S. R. Efeito de diferentes substratos e épocas de coleta no enraizamento de estacas herbáceas de goiabeira, cvs. paluma e século XXI. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 31-36, 2007.

ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation of woody plants: post tissue culture aspects. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 227, p. 489-499, 1988.