

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO RIO
GRANDE DO SUL - IFRS CAMPUS IBIRUBÁ**

GABRIELA CECÍLIA GHENO

**INFLUÊNCIA DA ÉPOCA DE COLETA DE EXPLANTES PARA O
ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE DOIS CULTIVARES DE MIRTILO (*Vaccinium*
sp.)**

Ibirubá, RS, Brasil

2025

GABRIELA CECÍLIA GHENO

**INFLUÊNCIA DA ÉPOCA DE COLETA DE EXPLANTES PARA O
ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE DOIS CULTIVARES DE MIRTILO (*Vaccinium*
sp.)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado junto ao curso de Bacharelado em Agronomia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Daniela Batista dos Santos

Ibirubá, RS, Brasil

2025


GABRIELA CECÍLIA GHENO

**INFLUÊNCIA DA ÉPOCA DE COLETA DE EXPLANTES PARA O
ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE DOIS CULTIVARES DE MIRTILO (*Vaccinium*
sp.)**


Trabalho de conclusão de curso apresentado junto ao curso de Bacharelado em Agronomia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheira Agrônoma.

Orientadora: Prof^a Dr^a Daniela Batista dos Santos


Aprovado em 26 de junho de 2025.

 Documento assinado digitalmente
DANIELA BATISTA DOS SANTOS
Data: 08/07/2025 09:15:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof^a. Dr^a. Daniela Batista dos Santos – Orientadora

 Documento assinado digitalmente
EDUARDO MATOS MONTEZANO
Data: 08/07/2025 19:44:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Eduardo Matos Montezano

 Documento assinado digitalmente
SUZANA FERREIRA DA ROSA
Data: 08/07/2025 10:27:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Suzana Ferreira da Rosa

 Documento assinado digitalmente
BEN HUR COSTA DE CAMPOS
Data: 09/07/2025 08:59:30-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Ben-hur Costa de Campos – Coordenador do
Curso de Agronomia do IFRS – Campus Ibirubá

AGRADECIMENTOS

De antemão, agradeço a Deus pelo privilégio de realizar mais um dos meus sonhos, pela sabedoria concedida, pelo amparo nos momentos em que tudo parecia desabar. Obrigada por ouvir minhas preces e me conceder serenidade e força para trilhar o propósito que me foi confiado.

Agradeço e dedico esse trabalho aos meus pais pelo amor incondicional, pelo apoio e por me ensinarem a sonhar. À minha mãe, Simone Kunz que sempre esteve presente e é minha inspiração diária para me tornar uma pessoa e profissional cada dia melhor. Ao meu pai, Iloní Paulo Gheno, por me ensinar que as emoções entre seres humanos às vezes são extremamente complexas e que as atitudes das pessoas nem sempre são coerentes com aquilo que idealizamos. Sou grata por todo esforço e pelo trabalho árduo de ambos para que eu pudesse realizar este sonho.

Às minhas queridíssimas amigas, Karen, Laura e Bruna que tornaram todo o processo da graduação mais leve e divertido. Sou grata por todos os momentos, todas as risadas, todas as palavras de incentivo e motivação. Tenho imenso orgulho das excelentes profissionais que vocês se tornaram ao longo desta jornada.

Aos meus amigos e também colegas de pesquisa, Franciéli Maria Schneider e Yan Cherubini da Silva por tornarem possível a execução deste trabalho e pelos ensinamentos compartilhados.

À minha orientadora e amiga, Daniela Batista dos Santos, expresso a minha mais sincera gratidão. Sua dedicação, paciência e orientação foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho e certamente servirão de inspiração para meu futuro profissional.

Aos demais professores e colegas que compartilharam seus conhecimentos e experiências ao longo desta jornada.

À FAPERGS pela concessão da bolsa de iniciação tecnológica que permitiu o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul Campus Ibirubá, minha segunda casa desde do Ensino Médio, por oferecer ensino gratuito e de qualidade para a sociedade e por ceder o espaço e os equipamentos necessários para a execução deste trabalho.

RESUMO

Trabalho de Conclusão de Curso
Curso de Agronomia
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul - Campus
Ibirubá

INFLUÊNCIA DA ÉPOCA DE COLETA DE EXPLANTES PARA O ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE DOIS CULTIVARES DE MIRTILO (*Vaccinium* *sp.*)

AUTOR: Gabriela Cecília Gheno
ORIENTADOR: Daniela Batista dos Santos
Ibirubá/RS, 26/06/2025

O mirtilheiro é originário do Hemisfério Norte, onde o número de horas com temperaturas $\leq 7,2^{\circ}\text{C}$ exigidas para o desenvolvimento deste são naturalmente atingidas. No Brasil, a introdução de variedades com menor exigência em horas-frio viabilizou o cultivo do fruto nas regiões sul e sudeste. A estaquia é a principal técnica de propagação da cultura do mirtilo. Entretanto, a dificuldade de enraizamento e a baixa taxa de sobrevivência têm limitado a aplicação deste método. Assim, a propagação *in vitro* surge como alternativa para a produção de mudas. Apesar de promissora, existem diversas lacunas de pesquisas atreladas ao cultivo *in vitro*, as quais estão incluídas as épocas de coleta dos explantes. Além da época, existe também grande variação de resposta entre os genótipos. Visando contribuir para o aperfeiçoamento da micropropagação do mirtilheiro, este trabalho objetiva identificar a época de coleta dos explantes mais adequada, bem como verificar a adaptabilidade ao cultivo *in vitro* dos cultivares de mirtilo Clímax e Bluegem. O experimento foi desenvolvido junto ao Laboratório de Propagação Vegetal do IFRS Campus Ibirubá e os explantes coletados no pomar de mirtilos da mesma instituição em duas épocas de coleta (primavera e verão). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2x2 (2 cultivares x 2 épocas), com 15 repetições. Para ambas as épocas, o meio basal utilizado na fase de estabelecimento foi o WPM (Woody Plant Media, 1980) acrescido de 6 g.L^{-1} de ágar, 1 mg.L^{-1} de 6-Benzilaminopurina e sacarose (100 mg.L^{-1}), com pH do meio ajustado a 5,0. Os explantes contendo cerca de 1,5 cm de comprimento foram desinfetados e introduzidos nos tubos de ensaio contendo o meio WPM que foram lacrados e, posteriormente transferidos para a sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Após 60 dias do início da fase de estabelecimento, foram avaliadas a taxa de contaminação, taxa de oxidação, número de brotos e número de folhas. Os dados tabulados foram submetidos à análise de variância e ao teste T, a 5% de probabilidade de erro. Para o cultivar Bluegem obteve-se maiores taxas de contaminação quando os explantes foram coletados no verão. Para o cultivar Clímax, por outro lado, houve menor contaminação dos explantes quando coletados no verão. O cultivar Clímax apresentou maiores taxas de oxidação independente da época e não emitiu brotações quando os explantes foram coletados no verão. Para o número de folhas, a melhor época de coleta dos explantes ocorreu na primavera em ambos os cultivares testados.

ABSTRACT

Completion of course work
Agronomy Course
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul - Campus
Ibirubá

INFLUENCE OF EXPLANT COLLECTION SEASON ON IN VITRO ESTABLISHMENT OF TWO BLUEBERRY (*Vaccinium* sp.) CULTIVARS

AUTHOR: Gabriela Cecília Gheno
ADVISOR: Daniela Batista dos Santos
Ibirubá/RS, 26/06/2025

The blueberry plant originates from the Northern Hemisphere, where the number of hours with temperatures at or below 7.2°C required for its development is naturally achieved. In Brazil, the introduction of varieties with lower chilling hour requirements has made it possible to cultivate the fruit in the southern and southeastern regions. Cutting is the main propagation technique used for blueberry cultivation. However, the difficulty of rooting and the low survival rate have limited the application of this method. Therefore, *in vitro* propagation emerges as an alternative for seedling production. Although promising, there are several research gaps related to *in vitro* cultivation, including the appropriate timing for explant collection. In addition to the season of explant collection, genotype response varies considerably. This study aims to contribute to the refinement of blueberry micropropagation by identifying the optimal explant collection period and assessing the *in vitro* adaptability of the Climax and Bluegem cultivars. The experiment was conducted at the Plant Propagation Laboratory of IFRS – Ibirubá Campus, and the explants were collected from the institution's blueberry orchard during two different seasons (spring and summer). The experimental design followed a completely randomized design (CRD) in a 2x2 factorial scheme (2 cultivars × 2 seasons), with 15 replicates. For both seasons, the basal medium used during the establishment phase was WPM (Woody Plant Medium, 1980), supplemented with 6 g·L⁻¹ of agar, 1 mg·L⁻¹ of 6-benzylaminopurine, and sucrose (100 mg·L⁻¹), with the medium pH adjusted to 5.0. Explants approximately 1.5 cm in length were disinfected and placed into test tubes containing the WPM medium, which were sealed and subsequently transferred to a growth room with a 16-hour photoperiod and a temperature of 25 ± 2°C. After 60 days from the beginning of the establishment phase, contamination rate, oxidation rate, number of shoots, and number of leaves were evaluated. The tabulated data were subjected to analysis of variance and Student's t-test at a 5% significance level. For the Bluegem cultivar, higher contamination rates were observed when explants were collected in the summer. The Climax cultivar, on the other hand, showed lower contamination when explants were collected during the same season. Climax exhibited higher oxidation rates regardless of the collection period and did not produce shoots when explants were collected in the summer. As for the number of leaves, the best explant collection season was spring for both cultivars tested.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Total de horas de frio (<7,2 °C) entre maio e setembro no Rio Grande do Sul.....	21
Figura 2 – Explantes e detalhamento da sala de crescimento do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UPF.....	30
Figura 3 – Construção da sala de crescimento do Laboratório de Propagação Vegetal do IFRS Campus Ibirubá com as divisórias modulares.....	31
Figura 4 – Laboratório de Propagação Vegetal do IFRS Campus Ibirubá.....	32
Figura 5 – Localização do pomar de mirtilos utilizado como fonte de explantes.....	33
Figura 6 – Pó WPM (A), BAP (B) e ágar-ágar (C) utilizados no meio de cultivo.....	35
Figura 7 – Reconstituição do meio de cultivo WPM, adição do hormônio BAP e de sacarose (A); Determinação e ajuste do pH do meio (B); Adição de ágar e fervura do meio (C); Lacre dos Erlenmeyers contendo o meio de cultivo (D); Autoclavagem do meio (E); Derretimento do meio em banho-maria (F); Vertimento do meio para os tubos de ensaio (G); Coleta dos explantes a campo (H); Divisão dos segmentos caulinares (I); Assepsia com hipoclorito de sódio e álcool (J); Alocação do explante no tubo de ensaio (K) e condução dos explantes para a sala de crescimento (L).....	37
Figura 8 – Explante de mirtilo oxidado (A) e explante contaminado com micélios do fungo (B) e explante sadio (C).....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –Produção e área cultivada dos maiores países produtores de mirtilos no mundo.....	13
Tabela 2 –Comparativo entre a composição química dos meios basais MS, WPM, e Anderson.....	27
Tabela 3 –Porcentagem de contaminação dos cultivares de mirtilo Clímax e Bluegem coletados na primavera e no verão no município de Ibirubá/RS.....	40
Tabela 4 –Número médio de brotos por explante dos cultivares de mirtilo Clímax e Bluegem coletados na primavera e no verão no município de Ibirubá/RS.....	43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 DESENVOLVIMENTO.....	12
2.1 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1.1 Caracterização da cultura do mirtilheiro.....	12
2.1.1.1 <i>Relevância econômica.....</i>	12
2.1.1.2 <i>Descrição botânica.....</i>	16
2.1.1.3 <i>Caracterização dos genótipos e seus respectivos grupos.....</i>	18
2.1.1.4 <i>Exigências edafoclimáticas.....</i>	19
2.1.2 Cultivo in vitro.....	23
2.1.2.1 <i>O cultivo in vitro na cultura do mirtilheiro.....</i>	23
2.1.2.2 <i>Etapas do cultivo in vitro para a cultura do mirtilheiro.....</i>	24
2.1.2.3 <i>Meio de cultivo, fitormônios e reguladores de crescimento vegetal.....</i>	26
2.1.2.4 <i>Época de coleta dos explantes à campo.....</i>	28
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
2.2.1 Construção e organização do Laboratório de Propagação Vegetal.....	30
2.2.2 Condução do experimento.....	33
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
3 CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS.....	47
APÊNDICES.....	55

1 INTRODUÇÃO

A região do Alto Jacuí, no estado do Rio Grande do Sul, destaca-se pela produção de *commodities* agrícolas, como soja e milho, além da exploração da pecuária leiteira (COREDE, 2015). Constituída de 14 municípios, a região apresenta, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017), cerca de 15 mil estabelecimentos agropecuários dos quais aproximadamente 48% dispõem de área inferior a 20 hectares. Tal informação indica a presença de pequenos produtores rurais ocupando o espaço agrário da região.

Quanto ao tamanho dos estabelecimentos agropecuários, Schaeffer *et al.* (2023) salientam que a diversificação das atividades nessas propriedades consiste em uma alternativa para aumento da renda, já que a produção de *commodities* não é excepcionalmente rentável para o pequeno agricultor. Arbage (2000) afirma que a escala de produção dos pequenos agricultores para *commodities* agrícolas é incompatível com o tamanho mínimo de propriedade necessário para um razoável retorno por unidade de capital investido.

Diante da atual conjuntura, surge na região do Alto Jacuí, a demanda pela diversificação das atividades agrícolas com objetivo de gerar renda para as famílias proprietárias de pequenos estabelecimentos rurais. Dentre as possibilidades para diversificação, a fruticultura destaca-se como uma alternativa viável.

Fachinello *et al.* (2008) caracterizam a fruticultura como o conjunto de técnicas aplicadas adequadamente com o objetivo de explorar espécies vegetais a fim de obter-se frutos comestíveis. A imponente extensão do território brasileiro está associada à ocorrência de uma grande diversidade de climas e biomas que favorecem o cultivo de diferentes espécies frutíferas, sejam elas nativas ou exóticas. Dentre as espécies exóticas, o cultivo de “pequenas frutas” como morango, amora e mirtilo vem ganhando expressividade na cadeia produtiva e espaço na dieta da população (Antunes *et al.*, 2013). Em destaque, o mirtilo (*Vaccinium* spp.) caracteriza-se como uma fruta exótica, de sabor e aparência agradável capaz de atrair consumidores graças à beleza e propriedades medicinais antioxidantes.

O Brasil encontra-se em fase de consolidação das áreas cultivadas com mirtilo. Entretanto, as dificuldades relacionadas ao enraizamento para a produção de mudas constitui-se como um importante fator limitante para a expansão desta cultura

no país. Tal problemática gera um desequilíbrio entre oferta e demanda (Monteiro, 2004), o que resulta em preços mais elevados de aquisição das mudas.

Do ponto de vista comercial, a estaquia herbácea ou semilenhosa vem sendo utilizada como principal técnica de propagação da cultura do mirtilo no Brasil (Souza *et al.*, 2011). No entanto, os resultados práticos da propagação por estaquia são insatisfatórios dependendo do cultivar, já que cada material distingue-se quanto à capacidade de enraizamento (Schuch *et al.*, 2007).

Com intuito de atender a demanda por mudas de maneira rápida e eficiente, a propagação *in vitro* surge como alternativa na produção de mudas com elevada qualidade. Esta baseia-se na capacidade de rejuvenescimento das células vegetais, em que tecidos já diferenciados retornam ao seu estado juvenil, o que retoma a capacidade de enraizamento e o vigor de crescimento dos explantes (Carvalho, 1996).

De maneira geral, o cultivo *in vitro* pode ser fragmentado em três grandes etapas: estabelecimento, multiplicação e enraizamento. Dentre estas etapas, o estabelecimento caracteriza-se pela fase mais crítica em função da possibilidade de contaminação por agentes microbiológicos endógenos ou do ambiente e pela oxidação fenólica dos tecidos vegetais (Grattapaglia e Machado, 1998).

O adequado estabelecimento gera uma cultura livre de contaminantes visíveis, e suficientemente adaptadas às condições *in vitro*. Entretanto, fatores como o genótipo, a época de coleta dos explantes, as técnicas de desinfecção, o tipo de tecido vegetal utilizado e os agentes contaminantes podem interferir no sucesso do desta etapa.

Apesar de ser determinante, a literatura acerca dos protocolos envolvendo a etapa de estabelecimento para o cultivo *in vitro* do mirtilo ainda é escassa, sobretudo quanto à época de coleta dos explantes e o comportamento dos cultivares diante das condições *in vitro*. Nesse contexto, este trabalho objetiva avaliar a resposta de dois cultivares de mirtilo (Clímax e Bluegem) à etapa de estabelecimento *in vitro* com explantes coletados em duas épocas do ano distintas (primavera e verão) e, assim, contribuir para a construção de um protocolo de micropropagação próprio do IFRS Campus Ibirubá.

2 DESENVOLVIMENTO

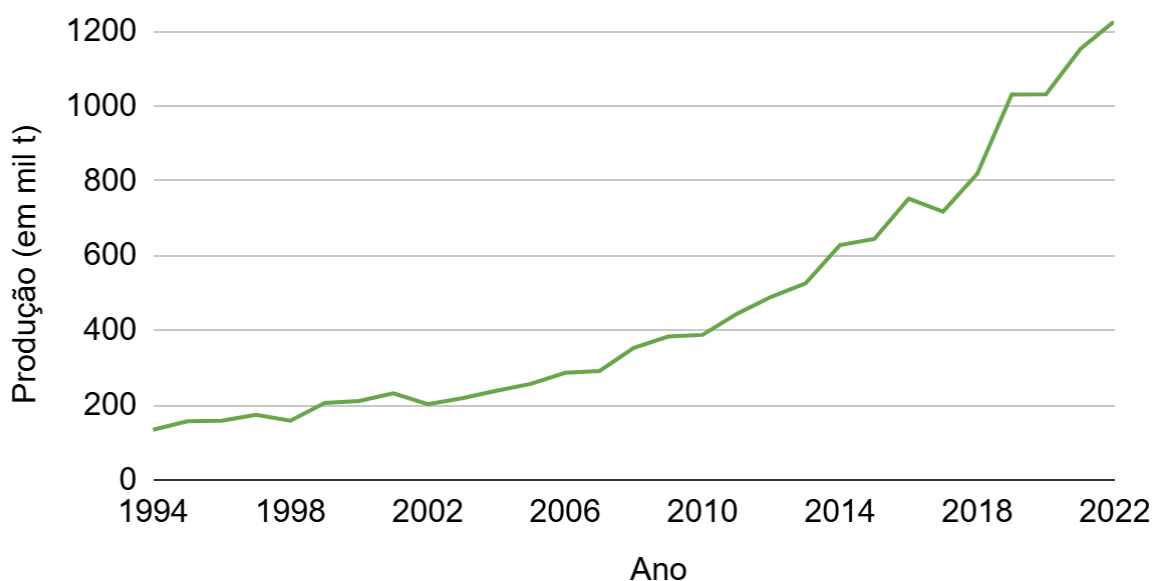
2.1 REVISÃO DE LITERATURA

2.1.1 Caracterização da cultura do mirtilheiro

2.1.1.1 Relevância econômica

A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2022), indica que nas últimas três décadas houveram ampliações significativas tanto na produção, quanto nas áreas cultivadas com mirtilo no mundo. O volume produzido passou de aproximadamente 134 mil toneladas em 1994, para 1,2 milhão de toneladas em 2022, o que representa um acréscimo próximo a 860% (Gráfico 1).

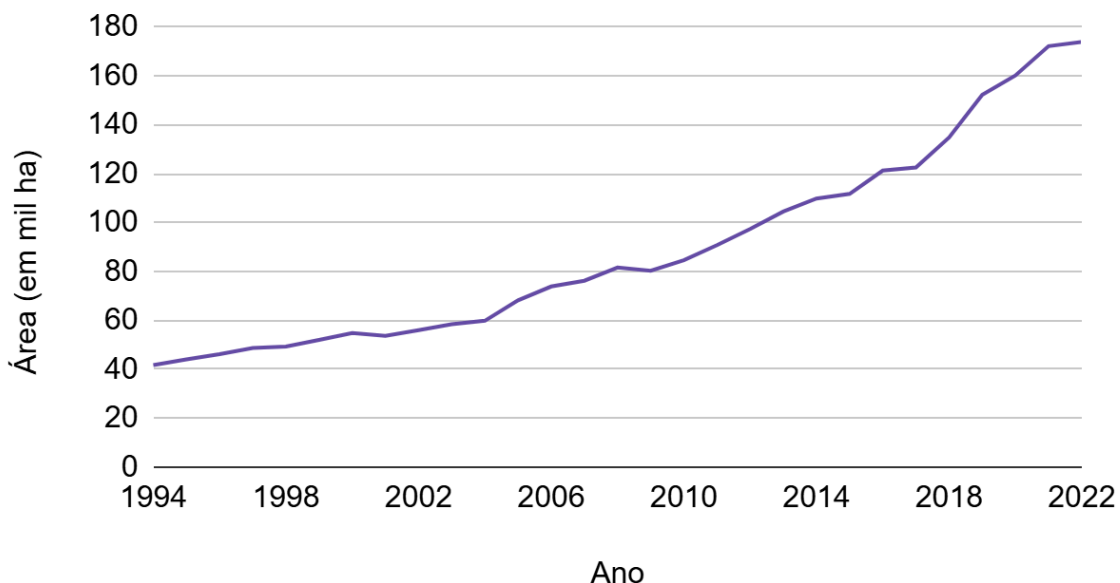
Gráfico 1 – Evolução da produção mundial de mirtilos em milhares de toneladas (1994 - 2022).



Fonte: Dados coletados pela FAO (2022), adaptado pela autora

Quanto à área de cultivo, a mesma entidade estima que em 1994, no mundo, eram destinados à produção de mirtilo cerca de 41 mil hectares, enquanto que em 2022, esse valor ultrapassou 170 mil hectares (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Evolução da área em milhares de hectares (ha) mundial destinada ao cultivo do mirtilo (1994 - 2022).



Fonte: Dados coletados pela FAO (2022), adaptado pela autora

Apesar do mirtilo ser originalmente cultivado em países de clima temperado do Hemisfério Norte, o melhoramento genético e lançamento de novos cultivares permitiu a inserção deste fruto em outros locais com condições distintas de temperatura. No *ranking* dos maiores produtores mundiais de mirtilo, disponibilizado pela FAO (2022), a entidade estabelece os dez principais países produtores, que incluem Estados Unidos da América, Peru, Canadá, Chile, Espanha, México, Polônia, Marrocos, Portugal e Alemanha com produção e área de cultivo descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Produção e área cultivada dos maiores países produtores de mirtilos no mundo.

País	Produção (t)	Área (ha)
Estados Unidos da América	317.150	46.539
Peru	292.584	21.899
Canadá	180.117	42.216
Chile	122.512	17.822
Espanha	70.420	4.810
México	67.304	5.887
Polônia	64.000	11.400
Marrocos	30.250	6.418
Portugal	19.050	2.620
Alemanha	15.370	3.400

Fonte: Dados coletados pela FAO (2022), adaptados pela autora

Apesar de ser relativamente recente, o cultivo comercial de mirtilos na América do Sul apresenta grande importância no cenário internacional, já que a região responsabiliza-se por 33,8% da produção mundial. Países como Chile, Peru, Argentina e Uruguai ampliaram os índices de produção e de área cultivada com mirtilo a partir dos anos 2000. Peru e Chile, na atualidade, são líderes na produção destes frutos na América do Sul dispendo de 21,8 mil hectares e 17,8 mil hectares cultivados, respectivamente (FAO, 2022).

No Brasil, o cultivo de mirtilo encontra-se em fase de consolidação e expansão das áreas de produção. As pesquisas iniciais envolvendo este fruto foram conduzidas pela Embrapa Clima Temperado no município de Vacaria/RS em 1983, enquanto que os primeiros pomares comerciais da região datam de 1990, ambos com cultivares oriundos da Flórida (EUA) (Caminiti *et al.*, 2016). Embora não existam dados estatísticos oficiais em relação ao mercado de mirtilo no país, Retamales e Hancock (2018) estimam que a área destinada à produção brasileira se aproxima de 400 hectares, distribuídas pelos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais.

No Rio Grande do Sul, segundo levantamento realizado pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER - Ascar) em 2023, existem aproximadamente 74,41 hectares com este cultivo distribuídos em 69 unidades produtivas nos municípios de Vacaria, Pelotas, Jaguarão, Caxias do Sul, Encruzilhada do Sul, São Francisco de Paula, Erval Grande, Capão Bonito do Sul, Farroupilha e Ipê.

A expansão da produção de mirtilo em diferentes locais tornou este fruto disponível o ano todo ao redor do mundo, já que as safras dos países produtores ocorrem em períodos distintos, conforme descrito no Quadro 1.

Na América do Norte, a temporada tem início no estado da Flórida no mês de março, seguido pela Califórnia, Geórgia e na Costa do Golfo na segunda metade de abril. Carolina do Norte inicia a colheita durante a metade de maio, seguido por Nova Jersey, Oregon e Washington na metade de junho. As últimas frutas são colhidas em Michigan, Washington e na Columbia Britânica (Canadá) durante os meses de setembro e outubro (Retamales e Hancock, 2018).

Na Europa, a safra inicia no mês de março na Espanha e em Portugal, e a colheita estende-se até setembro na Polónia. A safra sul-americana de mirtilos inicia na Argentina que produz durante os meses de setembro a janeiro. Mais tarde, em

Quadro 1 – Época de colheita dos países produtores de mirtilo no mundo (conclusão)

Países	Meses do ano											
	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Canadá ¹												
Estados Unidos ¹												
Nova Zelândia ²												
México ¹												
Chile ¹												
Argentina ¹												
Peru ¹												
Brasil ³												

Fontes: ¹ Adaptado de Brazelton (2015), dados citados por Retamales e Hancock (2018)

² Adaptado de Brazelton (2023)

³ Adaptado de Garces (2007)

2.1.1.2 Descrição botânica

O mirtilo pertence à família botânica *Ericaceae*, à subfamília *Vaccinoideae* e ao gênero *Vaccinium*. Tal gênero inclui cerca de 400 espécies, sendo que 40% delas são nativas da Ásia; 25% da América do Norte; 10% da América Central e Sul; 25% de outros locais do mundo (Antunes *et al.*, 2013). Destacam-se dentro dos programas de melhoramento genético algumas espécies nativas da América do Norte, como o *V. ashei* Reade, *V. corymbosum* L. e *V. angustifolium* (Retamales e Hancock, 2018).

O mirtilheiro apresenta porte arbustivo, em que as brotações vegetativas ocorrem preferencialmente nas gemas basais (Antunes *et al.*, 2012). O arbusto do mirtilo é composto por brotações que emergem das gemas recentemente formadas ou de gemas dormentes previamente formadas da coroa da planta. As brotações que emergem da base tornam-se lenhosas na segunda temporada de crescimento (Retamales e Hancock, 2018).

As raízes do mirtilheiro podem ser classificadas em dois tipos: raízes finas e raízes de suporte. As raízes finas dispõem de diâmetro inferior a 2 mm e

distribuem-se, majoritariamente, nos primeiros 30 a 40 cm do solo, onde são responsáveis pela absorção de água e nutrientes. As raízes de suporte, por outro lado, apresentam diâmetro entre 2 e 11 mm e alcançam profundidades próximas a 1 m. Têm como função o suporte e fixação do arbusto junto ao solo (Fonseca e Oliveira, 2007).

Outra característica marcante que distingue as espécies do gênero *Vaccinium*, relaciona-se com a ausência de pelos radiculares. Conforme Taiz e Zeiger (2017), os pelos radiculares são protusões subcelulares da epiderme da raiz que estão intimamente associados com a absorção de nutrientes pouco móveis no solo como o fósforo, por exemplo (Gonçalves e Lynch, 2014). Para minimizar os efeitos negativos da inexistência destas estruturas, o mirtilo desenvolve associações simbióticas com vários fungos de solo que, através de suas hifas, contribuem para a absorção de água e nutrientes (Fonseca e Oliveira, 2007).

As folhas são simples, inteiras ou serrilhadas e organizadas de maneira alternada ao longo dos ramos (Retamales e Hancock, 2018). O tamanho e formato das folhas varia em função do grupo de cultivar. De maneira geral, cultivares do grupo Highbush possuem folhas maiores, com comprimento entre 5 e 7 cm, ovaladas ou lanceoladas, com bordas inteiras ou levemente serrilhadas. Por outro lado, as folhas dos cultivares pertencentes ao grupo Rabbiteye são menores, com comprimento entre 4 e 5 cm, lanceoladas, com borda inteira ou serrilhada. (Queiroga *et al.*, 2021).

Para ambos os grupos, as folhas da maioria dos cultivares são decíduas, ou seja, caem durante o inverno (Queiroga *et al.*, 2021). A caracterização de cada um dos grupos de cultivares de mirtilo será descrita mais detalhadamente no tópico 2.1.1.3 do presente trabalho.

Conforme Moura (2013), a inflorescência do mirtilheiro pode ser classificada como racemo (ou cacho) contendo entre 8 e 16 flores que desenvolvem-se na porção terminal do ramo florífero. Quanto à morfologia, as flores assemelham-se a um sino e possuem corola simpétala com 4 ou 5 lóbulos. Os estames são em número de oito ou dez e as anteras apresentam a forma de tubos ocos, com um poro na extremidade final para a saída do pólen. O estigma é indiferenciado sobre um estilete com aparência filiforme (Antunes e Raseira, 2004).

Os frutos do mirtilo, segundo Cantuarias-Avilés (2010), são bagas de formato achatado que apresentam diâmetro entre de 1,0 a 2,5 cm formadas a partir de uma

única flor do ovário ínfero. Em geral, a porção inferior dos frutos possui uma cavidade em formato de coroa, resultado da persistência dos lóbulos do cálice da flor (Fachinello, 2009). Dependendo do genótipo cultivado, levam de 2 a 3 meses para serem formados a partir da polinização (Retamales e Hancock, 2018).

A coloração azul-escuro característica do mirtilo ocorre em função da concentração de um pigmento denominado antocianina encontrado nas camadas epidérmicas da casca. Tal pigmento, relaciona-se com a ação antioxidante que o consumo de mirtilo promove no corpo humano (Kuck *et al.*, 2011). O fruto do mirtilheiro é envolvido por uma fina camada serosa denominada pruína (Santos e Raseira, 2002).

2.1.1.3 Caracterização dos genótipos e seus respectivos grupos

Galletta e Ballington (1996) categorizaram as diferentes variedades de mirtilo comercialmente cultivadas com base no porte, na necessidade de frio e nas espécies selvagens de origem. Baseado nessa categorização surgiram diferentes grupos de variedades denominados Southern highbush, Northern highbush, Half High e Rabbiteye. No Brasil, o grupo Rabbiteye e alguns cultivares do grupo Highbush adequam-se às principais regiões de cultivo (Antunes *et al.*, 2012).

As variedades pertencentes ao grupo Highbush ou “arbusto alto” são plantas que podem atingir até 2m de altura e necessitam, em média, entre 650 a 850 horas de temperaturas \leq a 7,2°C (Silva *et al.*, 2008). Dependendo do local de origem da espécie predominante nos cruzamentos e da necessidade de horas de frio, esse grupo pode ser subdivido em Southern highbush ou Northern highbush.

O grupo Southern highbush inclui as espécies *V. corymbosum* e *V. australe* Small e os híbridos destas com o *V. darrowi* e *V. ashei* originários do Sul dos Estados Unidos. Neste grupo, é possível encontrar variedades com menor exigência em frio, adaptadas ao cultivo no Brasil e maior precocidade reprodutiva (Cantuarias-avilés, 2010). Esses genótipos requerem, de maneira geral, valores menores ou próximos a 550 horas com temperatura \leq 7,2°C. São exemplos de variedades pertencentes ao grupo Southern highbush e que podem ser cultivadas no Brasil, os materiais: O’Neal, Biloxi, Georgiagem e Misty (Retamales e Hancock, 2018; Antunes e Baccan, 2023).

Já o grupo Northern highbush inclui variedades com maior exigência em frio, com necessidades que variam entre 800 a 1000 horas de temperatura $\leq 7,2^{\circ}\text{C}$. Nas variedades comerciais constituintes deste grupo, predomina a espécie *V. corymbosum* que forma híbridos com as espécies *V. lamarckii*, *V. britonii*, *V. arkansanum*, *V. simulatum*, entre outras (Raseira e Antunes, 2004). Os materiais Duke, Bluecrop e Elliot são exemplos de genótipos pertencentes a esse grupo (Hancock, 2006).

As variedades incluídas no grupo Half High são caracterizadas como intermediárias aos grupos anteriores. Estes materiais necessitam, de maneira geral, mais frio que as variedades do grupo Southern highbush, porém não toleram o frio extremo o qual as variedades do grupo Northern highbush são adaptadas. A espécie selvagem *V. darrowi*, assim como nas variedades do Sul, também é importante para o desenvolvimento dos genótipos intermediários (Hancock, 2006).

O grupo Rabbiteye ou “olho de coelho” caracteriza-se por variedades vigorosas que podem atingir até 4m de altura. Apresentam elevada produtividade, longevidade e tolerância ao calor e à seca. Adaptam-se a regiões em que o acúmulo de temperaturas $\leq 7,2^{\circ}\text{C}$ permaneça entre 300 a 500 horas (Santos *et al.*, 2004). Este grupo é originário a partir de híbridos da espécie selvagem *Vaccinium ashei* Reade (Santos, 2015). Os genótipos Clímax, Bluegem, Delite, Brightwell, Aliceblue são exemplos de materiais pertencentes a esse grupo e que podem ser cultivados no Brasil.

Outros autores ainda incluem o grupo Lowbush ou “arbusto baixo” na classificação das variedades comerciais (Raseira e Antunes, 2004; Queiroga *et al.*, 2023, Strick, 2005). Os materiais desse grupo são originados, em sua maioria, da espécie selvagem *V. angustifolium*, o que os confere elevada necessidade de horas-frio. Raramente ultrapassam a altura de 60cm e os frutos apresentam-se ligeiramente menores quando comparados com os demais grupos. Os materiais incluídos no grupo Lowbush não são adaptados às condições climáticas brasileiras (Carpenedo *et al.*, 2022).

2.1.1.4 Exigências edafoclimáticas

A temperatura do ar é um elemento meteorológico de fundamental importância para a distribuição natural das espécies vegetais no mundo. Por estar

atrelado a ativação de inúmeras atividades fisiológicas nos vegetais, esse fator afeta diretamente o crescimento e desenvolvimento das plantas (Matzenauer *et al.*, 2005). Uma das atividades fisiológicas influenciadas pela temperatura do ar é a dormência.

O período de dormência compreende o intervalo entre a queda das folhas no outono e a aparição de primórdios foliares ou novas brotações na primavera. Nesse momento, as plantas cessam o crescimento vegetativo e reduzem a intensidade das atividades metabólicas (Petri *et al.*, 2021). Em frutíferas de clima temperado, como o mirtilheiro, a dormência é um fator preponderante à formação e produção adequada dos frutos.

No caso do mirtilheiro, a redução da temperatura no outono e o acúmulo de determinada quantidade de horas-frio durante o inverno estão associados, respectivamente, à indução e à superação da dormência (Petri *et al.*, 2021). Neste sentido, tanto a regularidade, quanto a quantidade de frio são indispensáveis para a superação natural da dormência. Em condições de frio deficitário, podem haver alterações significativas na capacidade de emissão de brotações, produção desuniforme de flores, além de redução na quantidade e na qualidade dos frutos produzidos (Retamales e Hancock, 2018).

O requerimento de maior ou menor quantidade de frio em espécies de clima temperado está diretamente associado ao material genético, estado nutricional da planta, e posição das gemas (Cardoso, 2011). Para que seja possível o início de um novo ciclo vegetativo na primavera, as frutíferas de clima temperado exigem exposição a uma determinada quantidade de horas-frio, com temperaturas $\leq 7,2^{\circ}\text{C}$.

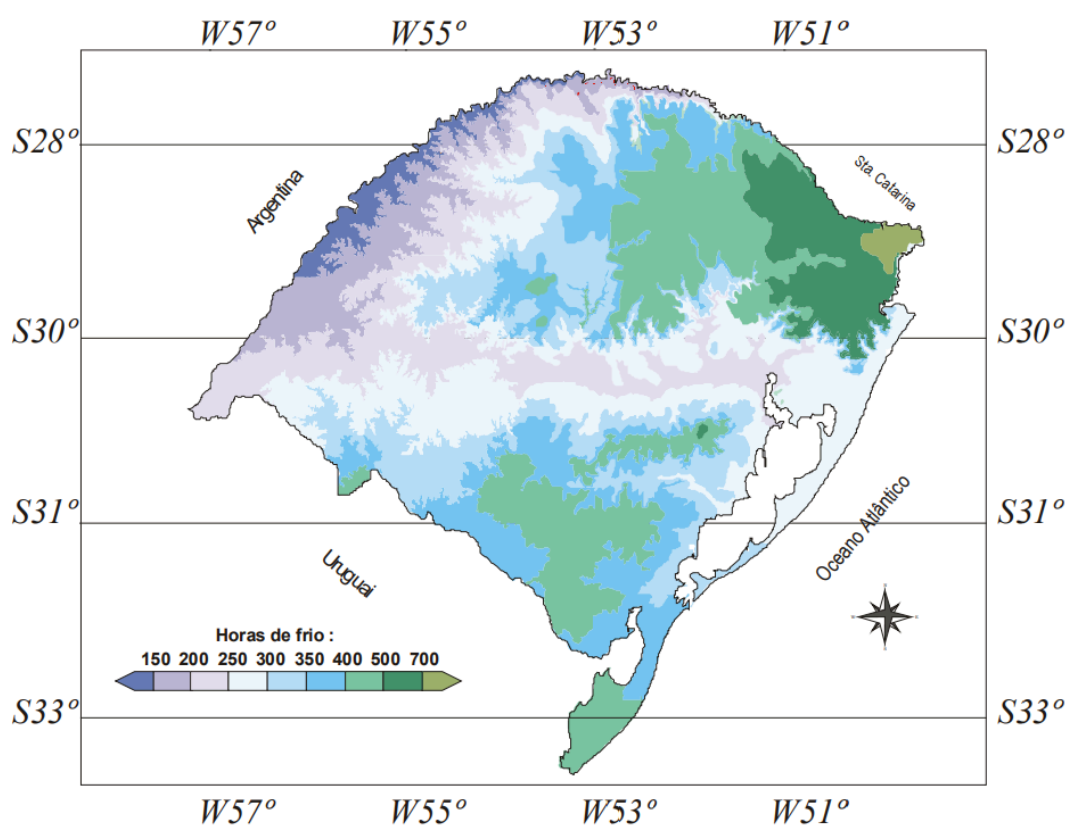
Buscando elaborar um levantamento do acúmulo de horas de frio para o zoneamento agrícola de frutíferas de clima temperado no estado do Rio Grande do Sul, Wrege *et al.* (2003) confeccionaram o mapa representado pela Figura 1. Nesse mapa, é possível identificar que as regiões mais frias são localizadas nos Campos de Cima da Serra, metade leste do Planalto Meridional, Escudo Sul-Riograndense, metade leste da Campanha e extremo sul do estado, locais onde o acúmulo de frio supera 350 horas.

O mapeamento realizado por Wrege *et al.* (2003), pode ser utilizado como ferramenta para delimitação da adaptação das variedades de mirtilo aos diferentes locais do Rio Grande do Sul quanto ao acúmulo de horas-frio. Com base nesse trabalho, as variedades adaptadas às condições de acúmulo de horas-frio

característico da região do Alto Jacuí pertencem ao grupo Rabbiteye ou ao grupo Southern highbush.

Segundo Júnior *et al.* (2013), os municípios de Vacaria e Pelotas são os locais onde o cultivo de mirtilo encontra-se em expansão significativa especialmente em função dos incentivos realizados por instituições de pesquisa como a Embrapa Clima Temperado por exemplo, e pelo acúmulo de horas-frio superior a 400 horas. No entanto, é possível observar a expansão desse cultivo para as demais regiões do estado, desde que estas atendam a demanda quanto ao acúmulo de horas-frio, como é o caso da região do Alto Jacuí, por exemplo.

Figura 1 – Total de horas de frio (<7,2 °C) entre maio e setembro no Rio Grande do Sul.



Fonte: Wrege *et al.*, 2003.

Quanto à necessidade hídrica, o mirtilo caracteriza-se como um cultivo dependente de irrigação, especialmente quando a quantidade e frequência de precipitações naturais não atendem as demandas da planta. De maneira geral, conforme Queiroga *et al.* (2021), a irrigação por gotejamento adequa-se à maior parte dos pomares, pois além do suprimento hídrico, também permite que sejam realizados manejos referentes à fertirrigação. Apesar disso, a irrigação por aspersão

também pode ser utilizada para minimizar os efeitos da geada sobre os tecidos vegetais (Phillips e Williamson, 2021).

Santos e Raseira (2002) definem que a necessidade semanal de água requerida pelas plantas de mirtilo durante a fase de produção dos frutos pode chegar a 50 mm. Entretanto, a exigência de água varia em função do tamanho da planta, estágio fenológico, cultivar, densidade de plantas, sistema de produção, condições climáticas e características do solo. Durante o ciclo, a demanda por água do mirtilheiro aumenta durante a formação dos frutos na primavera e no verão, durante o período de crescimento do dossel (Phillips e Williamson, 2021).

Embora sensível ao déficit hídrico, o mirtilheiro não tolera ambientes encharcados deficientes em gás oxigênio (O_2) (Raseira e Antunes, 2004). A baixa disponibilidade de oxigênio no solo, reduz a taxa de respiração do sistema radicular, o que afeta significativamente a produção de energia pelas plantas (ATP). No processo de respiração celular, o oxigênio atua como aceptor final de elétrons na etapa de maior produção de ATP conhecida como fosforilação oxidativa (Taiz e Zeiger, 2017).

Os efeitos do encharcamento do solo variam em função da duração, período de desenvolvimento e material genético. Para amenizar esta problemática, Queiroga *et al.* (2021) sugerem a construção de camalhões de 0,7-1,0 m de largura e 0,30-0,40 m de altura os quais podem ser incorporados serragem de pinheiro ou casca de arroz a fim de ampliar a drenagem e aeração do solo.

O pH do solo também é outro fator preponderante no crescimento e produção do mirtilheiro. Divergindo da maioria das espécies vegetais de produção agrícola, o mirtilheiro desenvolve-se melhor em solos ácidos, com valores de pH compreendidos entre 4,5 e 5,5 (Jiang *et al.*, 2019; Retamales e Hancock, 2018). Quando o mirtilheiro é conduzido em solos com pH elevado, as folhas tornam-se pequenas e amarelas com as nervuras verdes, ou totalmente amarelas (Retamales e Hancock, 2018).

Para acidificação do solo ou substrato, existem alternativas como a aplicação de enxofre elementar ou ácido sulfúrico (H_2SO_4). As aplicações de enxofre elementar exigem mais tempo e condições de temperatura e umidade adequadas para a redução do pH, já que as reações são catalisadas por microrganismos (Boaro *et al.*, 2014). As aplicações de H_2SO_4 , por outro lado, devem ser realizadas através do sistema de irrigação (Almutairi *et al.*, 2017).

A preferência por solos ácidos implica na adaptação do mirtilheiro em ambientes de baixa disponibilidade de nutrientes (Retamales e Hancock, 2018). Com o pH do solo entre 4,5 e 5,5, a disponibilidade de muitos nutrientes é limitada, o que reduz a capacidade de absorção de elementos minerais pelas plantas (Malavolta *et al.*, 1997).

Na cultura do mirtilheiro, a ordem de extração anual de nutrientes ocorre da seguinte maneira: nitrogênio > cálcio > potássio > fósforo > magnésio (Raseira e Antunes, 2004).

O nitrogênio, em muitas situações, é o único nutriente que exige a aplicação periódica para reposição dos níveis no solo (Raseira e Antunes, 2004). Para isso, podem ser utilizados a ureia e o sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ em sistemas convencionais. Em pomares orgânicos, esterco animal, adubação verde e resíduos de processos agroindustriais são alternativas para o fornecimento de N às plantas (Caspersen *et al.*, 2016).

Apesar da deficiência de cálcio ser incomum no mirtilheiro, Retamales e Hancock (2018) ressaltam a necessidade de acompanhamento dos níveis deste nutriente no solo, já que o cálcio tem papel preponderante na qualidade dos frutos. Nesse caso, a aplicação de gesso, pode ser utilizada como ferramenta para o suprimento de cálcio nos pomares de mirtilo (Queiroga *et al.*, 2021).

2.1.2 Cultivo *in vitro*

2.1.2.1 O cultivo *in vitro* na cultura do mirtilheiro

Acerca das técnicas de propagação do mirtilheiro, Farias *et al.* (2014), ressaltam três possibilidades: propagação por estaquia, propagação por sementes e propagação *in vitro*. Em geral, a propagação por sementes restringe-se a programas de melhoramento genético, quando o objetivo é gerar variabilidade para produzir novos cultivares através de cruzamentos. Todavia, na produção de mudas, o interesse consiste em manter as características genotípicas do cultivar. Portanto, as formas de propagação assexuada (estaquia e micropropagação) são mais eficientes.

Tradicionalmente, o mirtilheiro pode ser propagado através da estaquia herbácea ou semi-lenhosa (Marino *et al.*, 2014). Entretanto, a aplicação desta técnica pode não ser eficiente para todos os cultivares em função das baixas taxas

de enraizamento de determinados materiais (Lyra, 1981). Além disso, conforme Miller *et al.* (2004), a estaquia também não permite a rápida produção de grandes quantidades de propágulos para a comercialização, sobretudo de novos genótipos lançados no mercado.

Com o objetivo de atender a demanda por mudas de maneira rápida e eficiente, a micropropagação surge como alternativa para a produção de mudas com elevada qualidade e livre de agentes patogênicos. Esta baseia-se na capacidade de rejuvenescimento das células vegetais, em que tecidos já diferenciados retornam ao seu estado juvenil, o que retoma a capacidade de enraizamento e o vigor de crescimento (Carvalho, 1996).

2.1.2.2 *Etapas do cultivo in vitro para a cultura do mirtilo*

Carvalho (1999) fragmenta o cultivo *in vitro* em cinco grandes etapas: seleção e desinfecção dos explantes coletados a campo, estabelecimento dos explantes *in vitro*, multiplicação visando a produção massal de tecido vegetal para os sucessivos subcultivos, enraizamento e aclimatização das mudas.

O tipo e tamanho do explante a ser selecionado para dar início à micropropagação depende da adaptação da espécie vegetal à técnica utilizada. Erig e Schuch (2005), ao avaliar diferentes tamanhos de explantes de mirtilo coletados a campo para o início do cultivo *in vitro*, obtiveram maiores taxas de sobrevivência quando utilizado segmentos nodais contendo 1,5 cm de comprimento para os dois estados físicos de meio nutritivo testados.

Os explantes obtidos a campo necessitam ser submetidos à etapa de desinfecção para eliminação dos agentes patogênicos presentes. Entretanto, segundo Thorpe *et al.* (1991), a adequada desinfecção dos explantes de espécies lenhosas representa um dos maiores entraves no estabelecimento *in vitro*, especialmente se a origem dos explantes for de matrizes cultivadas a campo.

De maneira geral, a etapa de assepsia dos explantes de mirtilo pode ser descrita através dos seguintes passos: I) Dentro de uma câmara de fluxo laminar, imersão dos explantes em recipiente contendo álcool 70% por 10 segundos. II) Imersão em hipoclorito de sódio durante 5 minutos. III) Tríplex lavagem em água destilada e esterilizada.

Após a desinfecção e ainda sob ação da câmara de fluxo laminar, os explantes são adicionados em tubos de ensaio contendo o meio de cultivo + indutores de brotação (citocininas) apropriados à espécie para dar início a fase de estabelecimento. Em seguida, o material vegetal deve ser prontamente conduzido para a sala de crescimento, local onde serão fornecidas condições de luminosidade e temperatura exigidos para o estabelecimento e desenvolvimento de novas brotações (Carvalho, 2006).

Diante do adequado estabelecimento dos explantes coletados a campo, tem-se material vegetal suficiente destinado ao primeiro subcultivo. Para isso, as brotações são separadas, inseridas novamente em tubos de ensaio com meio de cultivo e realocadas na sala de crescimento. Sucessivos subcultivos podem ser realizados enquanto não houver perda da estabilidade genética dos explantes. Souza *et al.* (2011), obteve resultados satisfatórios quanto a produção de mudas micropropagadas de mirtilo dos cultivares Woodard, Bluegem e Briteblue mesmo no décimo subcultivo.

Após a multiplicação, a etapa seguinte é o enraizamento ou rizogênese. Esta objetiva a formação de raízes adventícias nos explantes obtidos a partir de diferentes subcultivos (Lattuada, 2010). Nesse momento, substituem-se os indutores de brotação por indutores de formação do sistema radicular no meio de cultivo. Os explantes são realocados no novo meio de cultivo e mantidos na sala de crescimento com condição controlada de fotoperíodo e temperatura até a formação das raízes.

Segundo Rocha *et al.* (2008), a etapa de aclimatização consiste na transferência da planta do ambiente *in vitro*, asséptico e ambientalmente controlado para um ambiente *ex vitro*, geralmente em casa de vegetação. Zimmerman (1988) descreve essa etapa como a retirada da muda de uma condição heterotrófica, em que os nutrientes são fornecidos diretamente no meio de cultivo para realocá-la em um ambiente que permita a adaptação da planta à condição autotrófica. Deste modo, é imprescindível que a planta disponha de órgãos fotossintéticos ativos e sistema radicular funcional, aspectos morfofisiológicos desenvolvidos nas etapas de multiplicação e enraizamento.

2.1.2.3 Meio de cultivo, fitormônios e reguladores de crescimento vegetal

Os meios de cultivo são indispensáveis à micropropagação vegetal, uma vez que suprem as necessidades em nutrientes, vitaminas e energia exigidos para o desenvolvimento pleno dos explantes. Em geral, os meios são utilizados na forma semi-sólida com a necessidade de adição de substâncias com ação gelificante como o ágar, agarose ou amido (Carvalho, 1999).

Na prática, vários meios de cultivo podem ser empregados para a micropropagação dependendo da espécie vegetal de interesse e dos objetivos atrelados à aplicação desta técnica. Dentre os meios passíveis de utilização nos laboratórios de micropropagação, destacam-se o meio White (1951), o meio MS (Murashige e Skoog, 1962), o meio B5 (Gamborg *et al.*, 1968), o meio SH (Schenk e Hildebrant, 1971), o meio Anderson (1980) e o meio WPM (Lloyd McCown, 1980) entre outros (Quisen e Angelo, 2008).

Entre os meios mencionados, o meio MS é o mais utilizado especialmente para espécies herbáceas. No entanto, conforme Tetsumura *et al.* (2008) há uma tendência do meio basal MS produzir materiais hiper hidratados dependendo da espécie e do genótipo. Para a produção de mudas de plantas lenhosas como o mirtilo, por exemplo, formulações especiais como os meios basais WPM (Woody Plant Medium) e Anderson atendem de maneira mais adequada a exigência destes materiais. A composição química básica dos meios MS, WPM e Anderson está descrita na Tabela 2.

Tabela 2 – Comparativo entre a composição química dos meios basais MS, WPM, e Anderson.

Componente	Meio MS Básico (mg.L ⁻¹)	Meio WPM Básico (mg.L ⁻¹)	Meio Anderson (mg.L ⁻¹)
Macroelementos			
NH ₄ NO ₃	1.650	400	400
CaCl ₂	332,20	72,50	332,20
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	386,34	-
KNO ₃	1.900	-	480
MgSO ₄ .7H ₂ O	180,69	180,69	180,69
NaH ₂ PO ₄	-	-	330,39
KH ₂ PO ₄	170	170	-
K ₂ SO ₄	-	990	-
Microelementos			
H ₃ BO ₃	6,20	6,20	6,20
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	0,025
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	36,044	37,30	74,50
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	27,8	55,70
MnSO ₄ .H ₂ O	16,90	22,3	16,90
CoCl ₆ .6H ₂ O	0,025	-	0,025
Na ₂ MoO ₄	0,213	0,213	0,213
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	8,60	8,60
KI	0,83	-	0,3
Vitaminas			
Mio-inositol	100	100	100
C ₆ H ₅ NO ₂	0,5	0,5	-
C ₈ H ₁₁ NO ₃ .HCl	0,5	0,5	-
C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OS	0,100	1,0	0,4
Aminoácido			
C ₂ H ₅ NO ₂	2	2	2

Fonte: Himedia (2017); Himedia (2021), adaptado pela autora.

Além dos nutrientes e vitaminas constituintes do meio de cultivo, podem ainda ser adicionados na solução basal hormônios vegetais e reguladores de crescimento sintéticos (Carvalho *et al.*, 2006).

Os hormônios vegetais, de acordo com Albuquerque *et al.* (2008), são compostos produzidos em pequeníssimas concentrações por diferentes partes dos vegetais. Tais compostos são capazes de promover, inibir e/ou modificar o crescimento de locais, em geral, diferentes daqueles que os produziram. Os reguladores de crescimento, por outro lado, são substâncias sintéticas capazes de promover efeitos semelhantes aos hormônios vegetais (Carvalho *et al.*, 2006).

Entre hormônios naturais e reguladores de crescimento, existem nove grupos que atuam como sinalizadores celulares no desencadeamento de respostas fisiológicas nas plantas, sendo eles: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno, ácido abscísico, brassinosteróides, jasmonatos, ácido salicílico e estrigolactonas (Taiz e Zeiger, 2017). Nas técnicas de cultivo *in vitro*, enfatiza-se a utilização principalmente das citocininas e das auxinas (Morais *et al.*, 2014).

As citocininas são importantes para as etapas de estabelecimento e multiplicação dos explantes e caracterizam-se por apresentarem efeito mitogênico, ou seja, estimulante da divisão celular de células vegetais (Sezgin e Kahya, 2018). Entretanto, quando adicionadas ao meio em concentrações elevadas, podem induzir a formação de brotos adventícios e inibir a formação de raízes. São exemplos de citocininas: Kinetina (KIN), zeatina (ZN), 6-benzilaminopurina (BAP ou BA) e isopenteniladenina (2iP) (Carvalho, 2006).

Os hormônios auxínicos são essenciais para a formação radicular e alongação celular na fase de rizogênese. Segundo Floss (2011), as raízes são extremamente sensíveis à presença das auxinas, especialmente no que se refere a indução a formação de raízes adventícias em estacas. Seguindo essa premissa, hormônios auxínicos como o AIB (ácido indolbutírico), o ANA (ácido naftalenoacético) e o AIA (ácido indolacético) são empregados na etapa de rizogênese das microestacas produzidas na fase de multiplicação.

2.1.2.4 Época de coleta dos explantes à campo

A época de coleta também é um fator de extrema importância para o adequado estabelecimento *in vitro* dos explantes. Grattapaglia e Machado (1998)

afirmam que a época de coleta dos explantes exerce influência no estabelecimento da cultura *in vitro* de material adulto, ocasionada principalmente pelos ciclos climáticos e pela ocorrência de outros tipos de flutuações do meio, que acabam afetando as condições fisiológicas das matrizes cultivadas a campo.

De acordo com Pasqual *et al.* (1998), a melhor época para coleta de explantes das espécies lenhosas corresponde àquela na qual as matrizes produzem brotações novas e vigorosas, evento variável conforme a espécie e com o tipo de explante que será utilizado.

Coletti (2009), em experimento realizado com 7 cultivares de mirtilo no município de Passo Fundo/RS, identificou que para todos os materiais testados, o início da brotação ocorreu uma ou duas semanas após o início da floração, fato comum para as espécies de clima temperado. Neste experimento, foi identificado que cultivares mais precoces como a Clímax e Aliceblue, iniciaram a emissão de brotações no mês de setembro, enquanto que cultivares mais tardias como a Bluecrop e Elliot iniciaram a emissão de brotações em novembro.

Segundo Fachinello *et al.* (1995), materiais herbáceos apresentam alta atividade meristemática e baixo grau de lignificação, o que pode influenciar positivamente o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais. Nesse sentido, compreende-se que quanto mais jovem o ramo utilizado como fonte de explantes for, haverá maior facilidade no estabelecimento *in vitro* em função da menor lignificação das paredes celulares.

Silva *et al.* (2008), ao comparar o grau de lignificação dos ramos fonte de explantes para três cultivares de mirtilo obteve que as porcentagens de contaminação fúngica e bacteriana apresentaram diferença para o tipo de ramo doador de explante. Explantes de ramos herbáceos (menos lignificados) apresentaram menor contaminação fúngica e bacteriana respectivamente em comparação com ramos lenhosos (mais lignificados). Neste experimento, os cultivares “Delite” e “Powderblue” não apresentaram diferença estatística significativa para a sobrevivência e estabelecimento quanto ao grau de lignificação do ramo. Entretanto, no cultivar “Florida”, os ramos herbáceos apresentaram maior sobrevivência.

Souza *et al.* (2006), obteve maior contaminação fúngica, maior contaminação bacteriana, menor sobrevivência e menor estabelecimento em explantes obtidos de ramos semi-lenhosos de araçá, em comparação aos ramos herbáceos. Os ramos

herbáceos, por outro lado, apresentaram maiores taxas de oxidação fenólica em comparação aos ramos semi-lenhosos.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

A execução deste trabalho foi dividida em duas etapas: I) a construção/organização do Laboratório de Propagação Vegetal do IFRS Campus Ibirubá e II) condução de experimento voltado para a micropropagação da cultura do mirtilheiro.

2.2.1 Construção e organização do Laboratório de Propagação Vegetal

Para o desenvolvimento deste trabalho, o IFRS Campus Ibirubá disponibilizou uma sala com 36m² junto ao Bloco F que já seria originalmente destinada ao Laboratório de Propagação Vegetal. Entretanto, o ambiente encontrava-se em desuso para a função a qual foi designado e servia como depósito de materiais de outros laboratórios, o que exigiu uma organização prévia do local.

Com o espaço físico apropriado, foi realizado um levantamento das condições de viabilidade de implantação da micropropagação através da identificação de materiais necessários já existentes no Campus, bem como materiais e reagentes a serem adquiridos. Os itens indispensáveis à micropropagação foram levantados a partir da literatura existente na área e através de visitas ao Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Passo Fundo (UPF) (Figura 2).

Figura 2 – Explantes e detalhamento da sala de crescimento do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UPF.



Fonte: A autora (2023; 2024)

A partir do diagnóstico das condições de viabilidade, identificou-se a necessidade de construção de uma repartição no ambiente do laboratório conhecida como “sala de crescimento” para que houvesse adequado controle do fotoperíodo e da temperatura. Com uma área de 5,6m², a sala de crescimento foi construída com divisórias modulares Eucatex® disponibilizadas pelo Campus (Figura 3). As janelas da sala de crescimento foram vedadas também com placas Eucatex® e as bordas das placas seladas com silicone acético para evitar escape do ar refrigerado da sala.

Figura 3 – Construção da sala de crescimento do Laboratório de Propagação Vegetal do IFRS Campus Ibirubá com as divisórias modulares.



Fonte: Schroeder, Laura Caroline Scheffel (2024)

Outro aspecto indispensável à micropropagação é o controle do fotoperíodo. Para isso, foi construído um sistema de iluminação simples em estantes de aço contendo 4 lâmpadas de LED 20W em cada nível da estante. No total, foram confeccionadas este modelo de iluminação em duas estantes para permitir a propagação de um volume expressivo de materiais vegetais simultaneamente.

Para os dois sistemas de iluminação, foram utilizados 40 soquetes, 40 lâmpadas LED 20W, 15 metros de cabo flexível amarelo 2,50mm, 15 metros de cabo flexível azul 2,50mm, 4 metros de cabo de transferência de energia e madeiras para suporte dos soquetes. O tempo de iluminação em relação ao tempo de escuro foi

controlado através de um timer digital da marca SH Automação Industrial® para cada estante configurado para 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

A temperatura do ar também é um fator limitante à micropropagação. No caso da micropropagação do mirtilo, a temperatura ideal deve permanecer próxima a 25 ± 2 °C, o que demandou a necessidade de instalação de um ar condicionado junto à sala de crescimento. Desse modo, um ar condicionado da marca Electrolux® de 9000 BTUs foi instalado na sala de crescimento para manutenção da temperatura na faixa adequada. Para monitoramento da temperatura e umidade, um termo-higrômetro digital foi fixado junto à sala de crescimento.

A Figura 4 demonstra um panorama geral da área de trabalho do Laboratório de Propagação Vegetal, bem como da sala de crescimento construída para a elaboração do presente trabalho.

Figura 4 – Laboratório de Propagação Vegetal do IFRS Campus Ibirubá



Fonte: A autora (2025)

2.2.2 Condução do experimento

O experimento foi conduzido junto ao Laboratório de Propagação Vegetal do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul Campus Ibirubá no município de Ibirubá (RS), durante o segundo semestre de 2024 e o primeiro semestre de 2025.

Os materiais vegetais utilizados para dar início à fase de estabelecimento do cultivo *in vitro* foram constituídos por segmentos caulinares da porção apical dos ramos contendo duas gemas vegetativas dos cultivares de mirtilo pertencentes ao grupo Rabbiteye Clímax e Bluegem coletados no pomar de mirtilos do IFRS - Campus Ibirubá, sob as coordenadas geográficas 28°39'11"S 53°06'41"W.

O pomar encontra-se localizado na região fisiográfica Planalto Médio Riograndense, com clima Cfa, conforme a Classificação de Köppen, em que há a ocorrência de verões quentes e chuvas distribuídas durante o ano inteiro (MORENO, 1961) (Figura 5). O solo é classificado como Latossolo Vermelho (EMBRAPA, 2018). As plantas foram transplantadas para o pomar no ano de 2020 e, portanto, encontravam-se bem estabelecidas no campo. Ademais, visualmente exibiam condições satisfatórias tanto de fertilidade, quanto de sanidade.

Figura 5 – Localização do pomar de mirtilos utilizado como fonte de explantes.



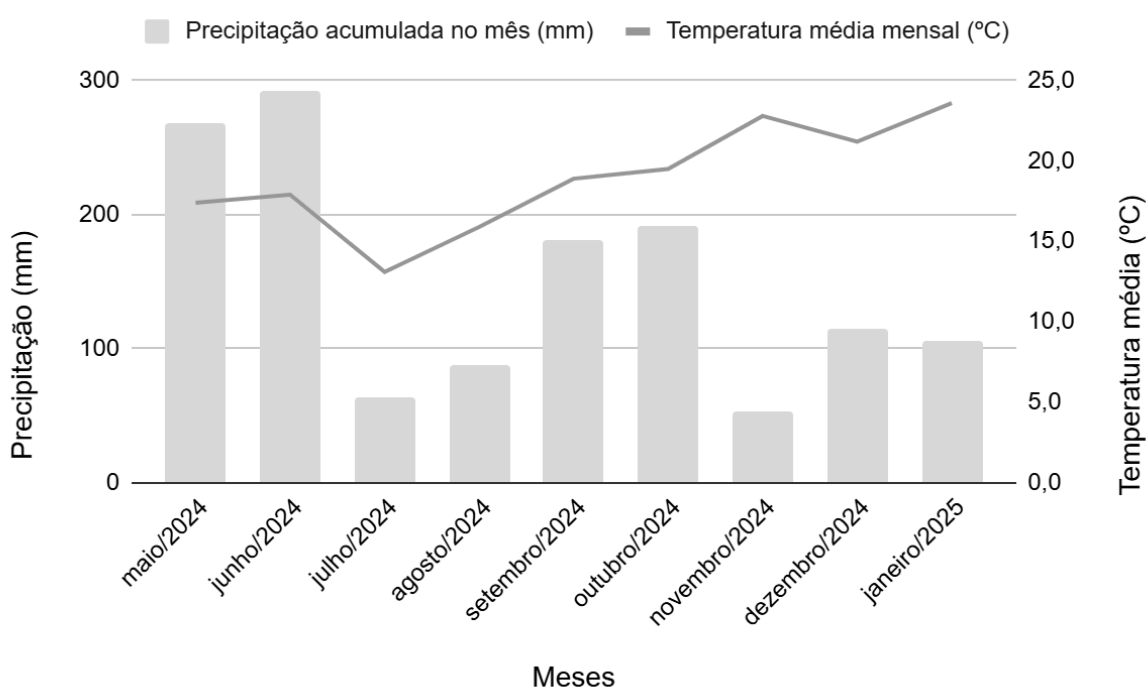
Fonte: Google Earth, 2025.

O delineamento experimental utilizado consistiu no inteiramente casualizado (DIC), organizados em um esquema fatorial 2x2 (2 cultivares x 2 épocas de coleta dos explantes), com 4 tratamentos e 15 repetições, totalizando 60 unidades

experimentais. Para a época 1, a coleta ocorreu no dia 6 de novembro de 2024 (primavera), enquanto na época 2, a coleta ocorreu no dia 31 de janeiro de 2025 (verão), para os cultivares Clímax e Bluegem. A primeira época de coleta ocorreu durante o período de floração/início da produção de frutos, quando os ramos possuíam menor grau de lignificação, enquanto que a segunda época ocorreu após o término do período produtivo quando os ramos dispunham de maior grau de lignificação.

Os dados meteorológicos de acúmulo de precipitação e temperatura média mensal entre os meses de maio à janeiro foram obtidos a partir da estação meteorológica da Cooperativa Agrícola Mista General Osório (Cotribá), localizada a aproximadamente 1.700 metros de distância do pomar fonte dos explantes. Os dados de acúmulo de precipitação e temperatura média mensais estão descritos no Gráfico 3.

Gráfico 3 – Médias de temperatura e acúmulo de precipitação (mm) mensal nos meses de maio de 2024 à janeiro de 2025.

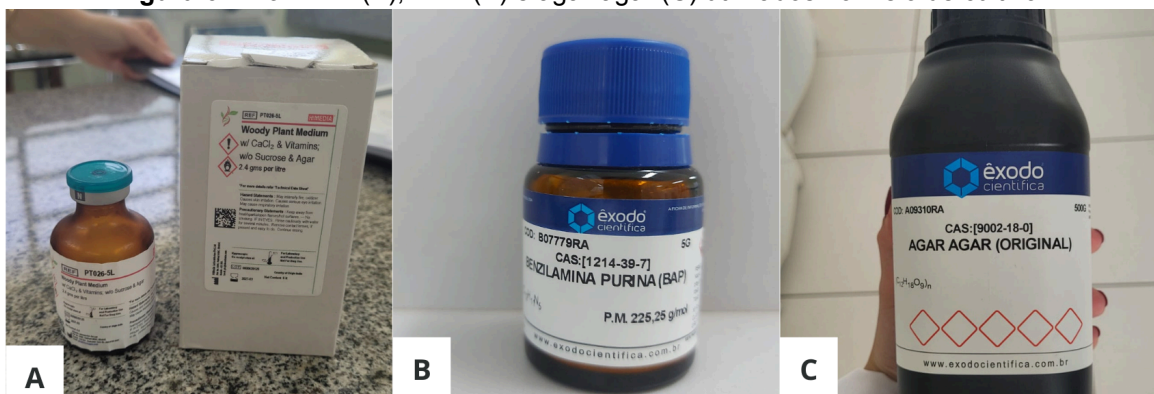


Fonte: Dados coletados pela estação meteorológica da Cotribá, adaptados pela autora (2025).

O meio de cultivo padrão utilizado para o estabelecimento em ambas as épocas de coleta foi o WPM (Wood Plant medium – Lloyd; McCown, 1980) da marca Himedia®, acrescido de sacarose (30g.L^{-1}), 6-Benzilaminopurina (1mg.L^{-1}) e

ágar-ágar ($6\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ambos da marca Êxodo Científica®. Os produtos comerciais utilizados para o preparo do meio padrão estão representados na Figura 6. Como fonte de sacarose foi utilizado açúcar de cozinha refinado.

Figura 6 – Pó WPM (A), BAP (B) e ágar-ágar (C) utilizados no meio de cultivo.



Fonte: A autora (2024)

Para o preparo de 1 litro de solução do meio WPM, foi necessário reconstituir 2,4 gramas do pó WPM em 700 mL de água destilada, adicionar 30 gramas de sacarose e o hormônio vegetal 6-Benzilaminopurina (BAP) na concentração de $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Em sequência, o volume da solução foi completado com água destilada até a obtenção de 1 L e o pH da solução foi determinado com auxílio de um peagâmetro de bancada. Após a determinação do pH da solução, foram adicionadas algumas gotas de hidróxido de sódio (NaOH) na concentração de $0,1\text{ mol/L}$ para que o meio de cultivo atingisse um pH próximo a 5,0.

Com o pH devidamente ajustado, foram acrescentados na solução 6 gramas de ágar-ágar. Para ativação das propriedades gelificantes do ágar, foi necessário ferver a solução em um agitador magnético com aquecimento. Após a fervura, o meio de cultivo foi fracionado em Erlenmeyers, que foram lacrados e prontamente conduzidos para a autoclavagem com objetivo de eliminar quaisquer contaminantes biológicos. O meio foi autoclavado a uma temperatura de 120°C , sob pressão de $1,5\text{ atm}$ por 20 minutos.

Para ambas as épocas, o meio foi preparado na semana anterior às datas de coleta e, portanto, para vertê-lo nos tubos de ensaio houve a necessidade de aquecimento em banho-maria nos dias da implementação dos tratamentos. O vertimento do meio de cultivo nos tubos de ensaio, a desinfecção dos explantes e a

transferência dos explantes para o meio ocorreram em câmara de fluxo laminar para minimizar a contaminação microbiológica.

Quanto à retirada dos explantes à campo, foram coletados ramos jovens com aproximadamente 10 cm de comprimento durante o período da manhã. Os explantes permaneceram acondicionados em caixa térmica com água destilada até o momento de esterilização e início do cultivo *in vitro*. Destaca-se que o início do cultivo *in vitro* foi realizado no mesmo dia da coleta dos explantes, nas respectivas datas de cada coleta/tratamento. Antes da esterilização, os ramos foram divididos em segmentos caulinares de aproximadamente 1,5 cm de comprimento, com duas gemas vegetativas.

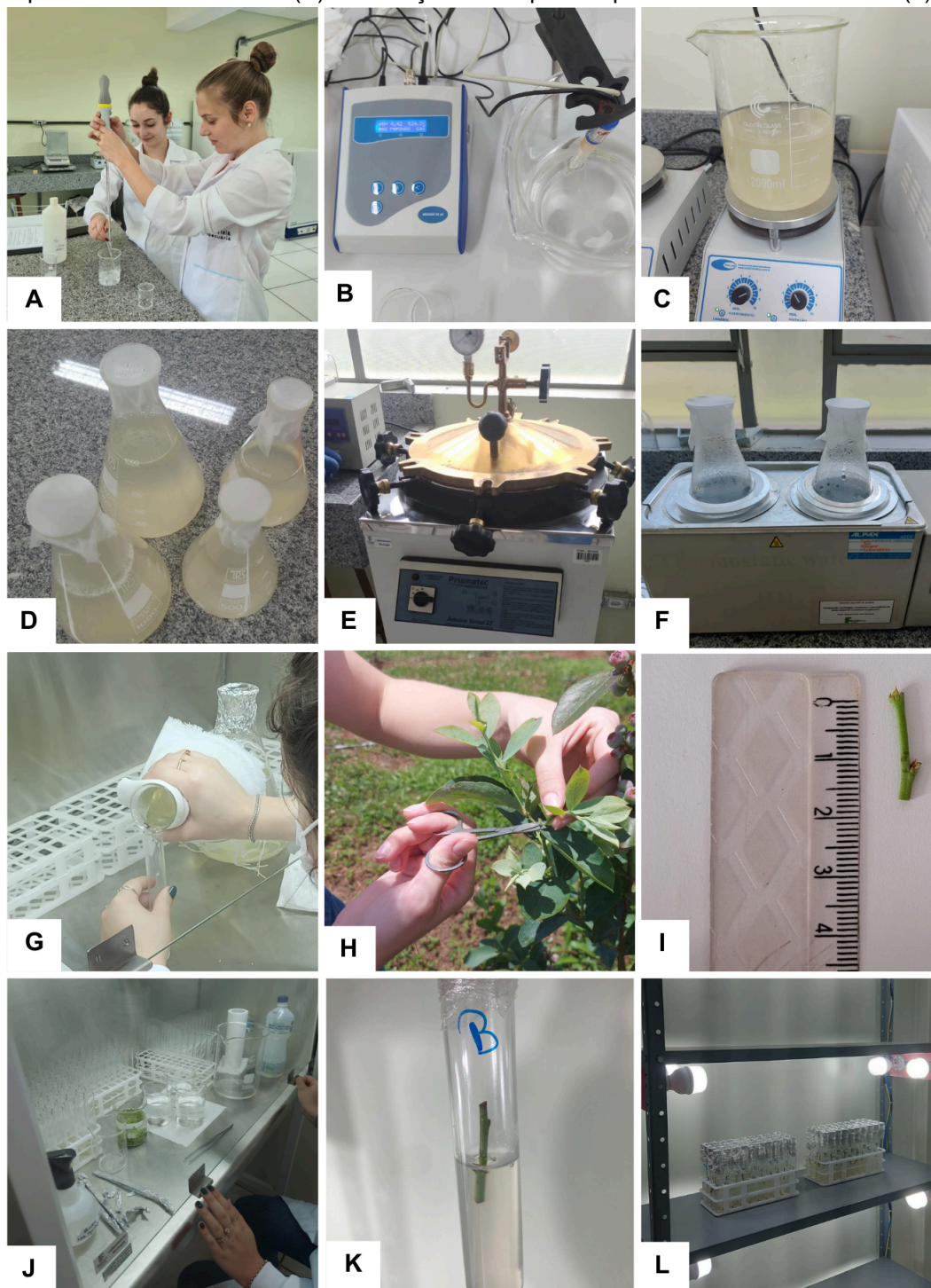
A desinfecção superficial dos explantes foi realizada inicialmente em álcool 70% por 10 segundos, seguida da desinfecção em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) (2,5%) por 5 minutos e, por fim, a tríplex lavagem com água destilada e estéril. A partir da esterilização, as demais atividades que envolveram o manuseio dos explantes foram conduzidas em câmara de fluxo laminar para evitar a recontaminação do material vegetal e do meio de cultivo. Além disso, todos os materiais utilizados (pinças, tubos de ensaio, bisturis e tesouras) também foram esterilizados e submetidos à autoclavagem.

Após o preparo do meio de cultivo e a desinfecção dos explantes, os segmentos caulinares foram transferidos com auxílio de uma pinça para dentro dos tubos de ensaio. Aproximadamente $\frac{1}{3}$ do comprimento total do segmento caulinar foi introduzido no meio de cultivo a fim de evitar a submersão das gemas vegetativas. Em sequência, os tubos de ensaio foram vedados com papel alumínio e plástico filme.

Ao concluir o processo de transferência dos explantes para o meio de cultivo, os tubos de ensaio foram conduzidos para a sala de crescimento do Laboratório de Propagação Vegetal. Durante os 7 dias iniciais da fase de estabelecimento, os explantes permaneceram totalmente no escuro com objetivo de reduzir a oxidação fenólica dos tecidos vegetais. Posterior a esse período, iniciou-se o controle do fotoperíodo mantendo as condições de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. A temperatura da sala de crescimento foi mantida durante toda a execução do experimento próxima a 25°C, com variação máxima de ± 2 °C através de um ar-condicionado.

A Figura 7 demonstra um fluxograma geral dos procedimentos necessários para a fase de estabelecimento do cultivo *in vitro* da cultura do mirtilleiro.

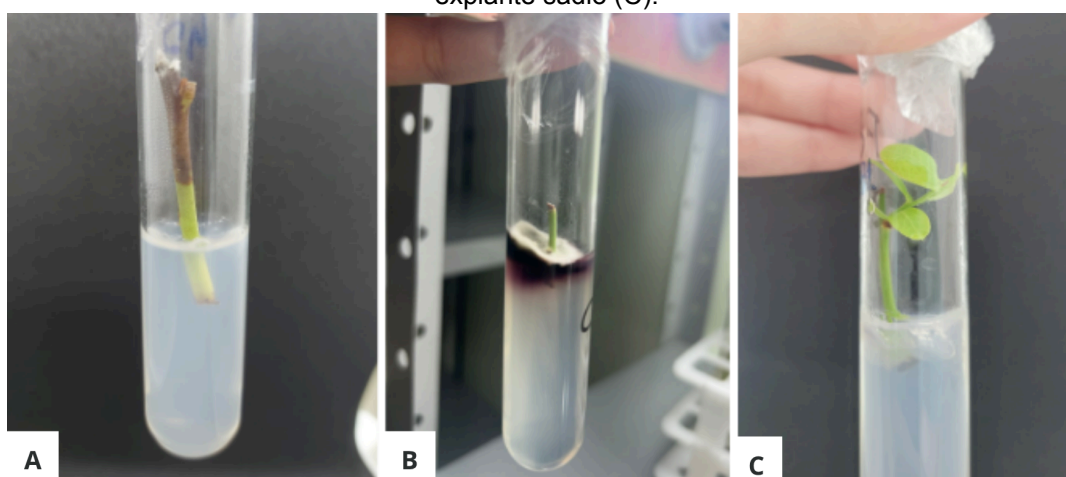
Figura 7 – Reconstituição do meio de cultivo WPM, adição do hormônio BAP e de sacarose (A); Determinação e ajuste do pH do meio (B); Adição de ágar e fervura do meio (C); Lacre dos Erlenmeyers contendo o meio de cultivo (D); Autoclavagem do meio (E); Derretimento do meio em banho-maria (F); Vertimento do meio para os tubos de ensaio (G); Coleta dos explantes a campo (H); Divisão dos segmentos caulinares (I); Assepsia com hipoclorito de sódio e álcool (J); Alocação do explante no tubo de ensaio (K) e condução dos explantes para a sala de crescimento (L).



Fonte: A autora (2024)

Durante o estabelecimento, foram realizadas avaliações aos 7, 14, 21, 28, 35, 42 e aos 60 dias do início do cultivo *in vitro*. Os fatores avaliados foram a taxa de oxidação fenólica dos explantes (indicada pela coloração marrom), a contaminação (indicada pela presença de micélios fúngicos ou colônia bacteriana), o número de brotos por explante e o número de folhas por broto. Os dados foram tabulados em planilha eletrônica do Excel. A Figura 8 caracteriza os explantes considerados oxidados, contaminados e sadios neste experimento.

Figura 8 – Explante de mirtilo oxidado (A) e explante contaminado com micélios do fungo (B) e explante sadio (C).



Fonte: A autora (2024)

Com os dados coletados na etapa de estabelecimento (número de brotos, oxidação, contaminação e número de folhas), foram elaborados gráficos através do Software Excel® que relacionam o desenvolvimento dos explantes para os dois cultivares, as duas épocas de coleta e os dias após o início do cultivo *in vitro*. À partir dos dados coletados na estação meteorológica da Cotribá, foi elaborado um gráfico comparando a temperatura média mensal e a precipitação acumulada no período de maio de 2024 até janeiro de 2025.

Os dados coletados aos 60 dias foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo Teste F. Quando a ANOVA indicou influência das causas de variação, as médias dos tratamentos e as interações foram comparadas estatisticamente pelo teste T, a 5% de probabilidade de erro através do software Sisvar® versão 5.8.92 e os gráficos gerados através do Excel®.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados tabulados durante a execução do experimento referente aos aspectos contaminação, oxidação, número de brotos e número de folhas foram submetidos à análise de variância, cujo resumo está descrito na Tabela 2.

Tabela 2 – Resumo da análise de variância entre os fatores analisados referente às diferentes cultivares atreladas à época de coleta dos explantes de mirtilo no município de Ibirubá/RS.

Fonte de variação	GL	Valor-p			
		Ct	Ox	Nbe	Nfe
Cultivar (Fator A)	1	0,2945	0,0350*	0,0481*	0,1050
Época de coleta do explante (Fator B)	1	0,2945	0,5913	0,0481*	0,0041*
A x B	56	0,0388*	0,9975	0,0481*	0,5048
CV (%)		26,14	130,39	127,78	145,91

Legenda: Ct (contaminação), Ox (oxidação), Nbe (número de brotos por explante) e Nf (número de folhas por explante).

Diante da Tabela 2, percebe-se que o cultivar (fator A) influenciou a oxidação dos explantes e o número de brotos. Já a época de coleta do explante (fator B) apresentou influência sobre o número de brotos por explante e o número de folhas. Referente à interação entre os fatores A e B, foi possível identificar efeito sobre os aspectos contaminação e número de brotos por explante.

A contaminação dos explantes foi uma problemática bastante presente ao longo do processo de estabelecimento para ambos os cultivares nas duas épocas de coleta testadas. A elevada taxa de contaminação dos explantes sugere ineficiência no protocolo de assepsia, o que segundo Xavier *et al.* (2013), é comum no cultivo *in vitro* de espécies lenhosas, pois a assepsia dos explantes não expõe os microrganismos endógenos aos agentes desinfestantes. O mesmo autor sugere iniciar o controle asséptico com a aplicação de tratamentos (fungicidas e bactericidas) na planta-matriz previamente à coleta dos propágulos.

Apesar do grau de contaminação dos explantes, foi possível identificar a ocorrência de interação entre os fatores época de coleta e cultivar para a taxa de contaminação.

Na Tabela 3, observa-se que para a contaminação dos explantes coletados a partir de matrizes do cultivar Bluegem não houve diferença estatística significativa entre as épocas de coleta. A contaminação dos explantes do cultivar Bluegem foi inferior à contaminação do cultivar Clímax na primavera, e superior no verão. O cultivar Clímax demonstrou menores taxas de contaminação quando os explantes foram coletados durante o verão.

Tabela 3 – Porcentagem de contaminação dos cultivares de mirtilo Clímax e Bluegem coletados na primavera e no verão no município de Ibirubá/RS.

Cultivar	Época de coleta de explante		Média
	Primavera	Verão	
Bluegem	93,33 Aa*	100,00 Ab	96,66
Clímax	100,00 Bb	80,00 Aa	90,00
Média	96,66	90,00	

*Médias seguidas de mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste T, a 5% de probabilidade de erro.

**Minúscula na coluna, maiúscula na linhas.

As altas taxas de contaminação, diferem do obtido por Ferri (2009) que observou uma porcentagem de contaminação fúngica média no cultivo *in vitro* dos cultivares de mirtilo Florida e Powderblue de aproximadamente 5,3%. A autora ressalta que a baixa contaminação dos explantes era esperada em função das plantas-matrizes terem sido cultivadas em ambiente protegido e asséptico, diferentemente do realizado no presente trabalho.

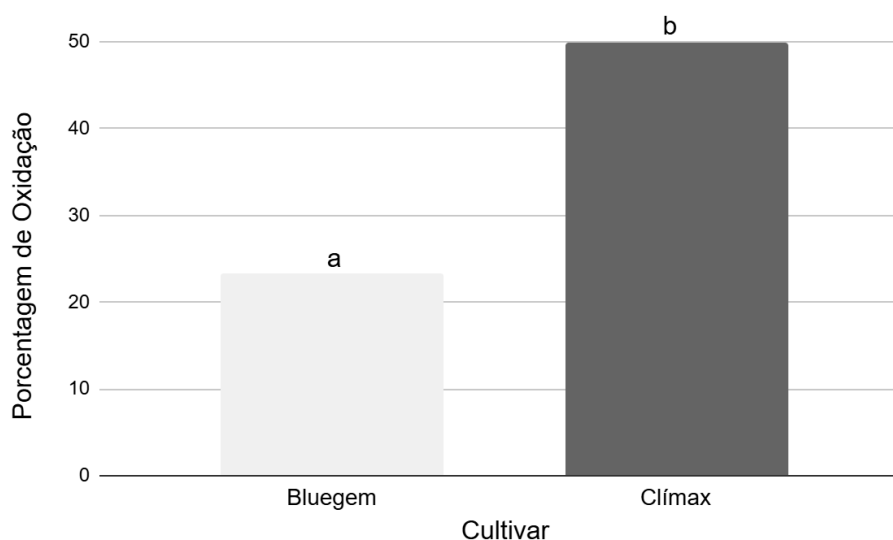
Os dados apresentados na Tabela 3 concordam parcialmente com o que foi obtido por Rosa *et al.* (2006) no cultivo *in vitro* da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em que foram avaliadas a época de coleta dos explantes em seis meses com condições ambientais distintas: agosto (inverno), setembro (inverno/primavera), dezembro (verão), março (verão), abril (verão/outono) e maio (outono). Os autores não observaram diferenças estatísticas significativas para contaminação fúngica nos explantes de erva-mate obtidos na primavera (setembro) e no verão (dezembro), semelhante ao ocorrido com o cultivar Bluegem. Rosa *et al.* (2006) constataram que

as menores taxas de contaminação foram obtidas quando os explantes foram coletados em março, abril e agosto.

A relação entre a precipitação, temperatura e genótipo também pode ter exercido influência nas taxas de contaminação dos explantes de cada um dos cultivares. Conforme indica o Gráfico 3, a primeira época de coleta ocorreu após um período mais úmido e de temperaturas mais baixas, com acúmulo de precipitação no mês anterior a coleta (outubro) de cerca de 191 mm e temperaturas médias próximas aos 20°C, o que pode ter proporcionado uma maior incidência de contaminação no cultivar Clímax de agentes patogênicos em que este é mais suscetível.

A oxidação dos explantes é altamente dependente da espécie, do genótipo e do tipo de material utilizado. Existe também uma correlação entre oxidação e a época do ano, já que nos períodos mais favoráveis ao crescimento, a oxidação fenólica dos explantes *in vitro* tende a ser menor (Carvalho *et al.*, 2006). Apesar da possível relação com a época do ano, não houveram diferenças significativas quando os explantes foram coletados na primavera ou no verão neste experimento (Tabela 2). Em contrapartida, quanto aos cultivares testados, o cultivar Clímax obteve uma taxa de oxidação significativamente superior ao cultivar Bluegem, conforme demonstra o Gráfico 4.

Gráfico 4 – Porcentagem de oxidação dos explantes dos cultivares Clímax e Bluegem coletados em Ibirubá/RS.



Médias diferem entre si pelo Teste T, a 5% de probabilidade de erro.

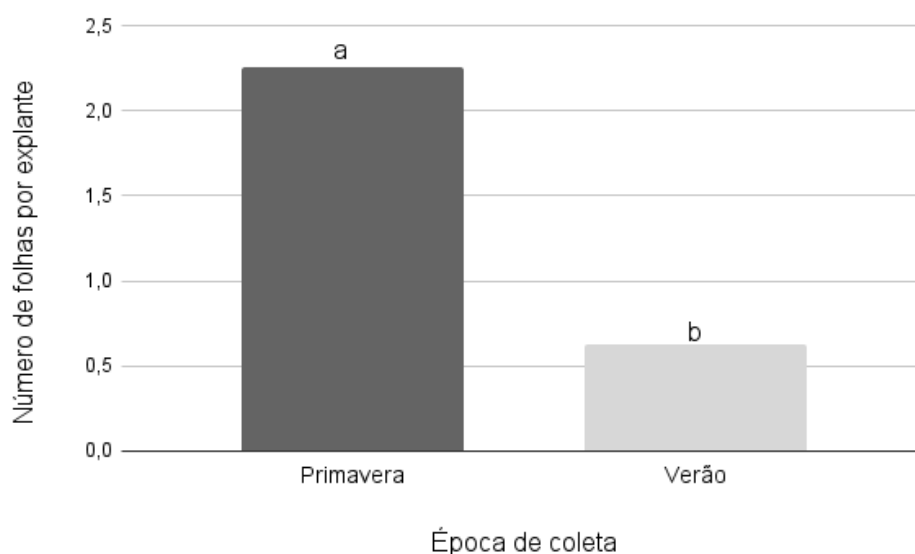
Fonte: A autora (2025)

Quanto ao cultivar Bluegem, a porcentagem de oxidação foi ligeiramente inferior aos valores obtidos por Silva *et al.* (2006) que, ao testar a adição de ácido indolacético (AIA) no meio de cultivo para a fase de estabelecimento obteve uma taxa de oxidação de 36,86%.

Assim como para a contaminação, as condições da planta matriz utilizada como fonte de explantes também influenciam nas taxas de oxidação. Silva (2006) ao trabalhar com estabelecimento *in vitro* de mirtilo, observaram maior porcentagem de oxidação nos explantes provenientes de matrizes a campo (12%), comparado aos explantes isolados de plantas da casa de vegetação (0,08%). Segundo Rout e Das (2002), isso ocorre em função das plantas cultivadas a campo estarem mais expostas a estresses bióticos e abióticos, o que aumenta o acúmulo de compostos fenólicos nas células como estratégia de defesa.

O número de folhas por explante foi influenciado significativamente pela época de coleta. Apesar de ser esperado uma variação entre os genótipos testados, a análise estatística não demonstrou efeito dos cultivares sobre o número de folhas por explante (Tabela 2). Os explantes coletados na primavera produziram um número significativamente superior de folhas em relação aos explantes coletados no verão, independente do cultivar, conforme indica o Gráfico 5.

Gráfico 5 – Número médio de folhas por explante de mirtilo quando coletados na primavera e no verão em Ibirubá/RS



Médias diferem entre si pelo Teste T, a 5% de probabilidade de erro.
Fonte: A autora (2025)

Apesar do número de folhas por explante ter sido superior na primavera, a média de folhas foi consideravelmente inferior aos valores obtidos por Leitzke *et al.* (2010), que obteve um número médio de folhas por explante de amoreira de 10 folhas por explante ao utilizar a combinação do meio WPM acrescido da citocinina BAP na concentração de $7,5\mu\text{M}$ (equivalente a $1,68\text{ mg.L}^{-1}$), próxima à testada no presente trabalho. Os mesmos autores identificaram que a concentração de BAP que teve maior efeito sobre o número de folhas na amoreira foi de $22,5\mu\text{M}$ (equivalente a $5,09\text{ mg.L}^{-1}$), o que sugere que a concentração de 1 mg.L^{-1} utilizada no presente trabalho possa ter sido insuficiente.

Cruz (2018) ao testar a utilização da citocinina 2iP no cultivo *in vitro* do cultivar de mirtilo Woodard obteve resultados ainda mais expressivos quanto ao número de folhas. A autora verificou que na presença da citocinina, o número médio de folhas por explante foi de 20,6. Mesmo no meio de cultivo ausente em citocinina, o número médio de folhas por explantes obtido pela autora foi de 8,81, superior ao encontrado neste trabalho.

O número de brotações é uma variável de extrema importância para a micropropagação quando objetiva-se a produção comercial. Quanto maior for o número de brotações, maior será a quantidade de explantes que poderão ser retirados de cada brotação, possibilitando uma multiplicação em larga escala e em um espaço de tempo menor (Ferri, 2009).

Com a execução do presente trabalho, observou-se uma interação entre os genótipos testados e a época de coleta para a variável número de brotos. Conforme a Tabela 4, é possível identificar que a coleta dos explantes do cultivar Clímax no verão culminou na ausência de brotação (embora nessa época o cultivar tenha apresentado menor contaminação conforme foi apresentado na Tabela 3). Isso sugere que para esse cultivar, a coleta de explantes a partir de ramos mais jovens e menos lignificados obtidos na primavera possa ser o mais adequado.

Tabela 4 – Número médio de brotos por explante dos cultivares de mirtilo Clímax e Bluegem coletados na primavera e no verão no município de Ibirubá/RS.

Cultivar	Época de coleta de explante		Média
	Primavera	Verão	
Bluegem	0,53 Aa*	0,46 Aa	0,49
Clímax	0,46 Aa	0,00 Bb	0,23
Média	0,49	0,23	

*Médias seguidas de mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste T, a 5% de probabilidade de erro.

**Minúscula na coluna, maiúscula na linhas.

Ferri (2009) em experimento com os cultivares de mirtilo Bluegem, Bluebelle e Woodard obteve as respectivas médias de brotos por explante: 1,8 (Bluegem), 1,6 (Bluebelle) e 1,0 (Woodard). Schuch *et al.* (2008), ao testar a adição ao meio de cultivo das citocininas 2iP e zeatina na micropropagação do cultivar de mirtilo Clímax, obtiveram um número de brotos por explante de 2,29 para 2iP e de 15,71 para zeatina, ambos na concentração de 7,5 mg.L⁻¹. Os dados alcançados por ambos os autores superam aos obtidos no presente trabalho independente do cultivar e época de coleta.

Os gráficos que acompanham o desenvolvimento semanal de cada um dos cultivares referente à taxa de contaminação, taxa de oxidação, número total de folhas e número total de brotos estão localizados nos apêndices 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 do presente trabalho.

A literatura acerca da emissão de brotos em explantes coletados em distintas épocas ainda é bastante escassa, o que evidencia a necessidade da realização de mais pesquisas acerca da temática para aprimorar os protocolos de micropropagação, tanto do mirtilo, quanto de outras espécies vegetais. A condução do presente trabalho representa um avanço inovador para o IFRS Campus Ibirubá e para a região do Alto Jacuí, já que caracteriza-se como o primeiro experimento com cultivo *in vitro* realizado no Laboratório de Propagação Vegetal da Instituição.

A execução do experimento forneceu fundamentação científica para a propagação *in vitro* e auxiliará o desenvolvimento de uma metodologia própria do IFRS Campus Ibirubá quanto aos protocolos de propagação vegetativa por micropropagação para espécies do gênero *Vaccinium*. Além dos aspectos metodológicos, a execução do trabalho permitiu a construção da infraestrutura

básica necessária a um laboratório de cultivo *in vitro*, outrora inexistente. Tal infraestrutura permitirá não apenas a realização de aulas práticas pelos acadêmicos, como também a continuidade das pesquisas envolvendo a cultura de tecidos.

À partir dos dados coletados neste experimento, recomenda-se que no futuro, as plantas fonte de explante sejam cultivadas em ambiente protegido, com aplicação periódica de fungicidas para reduzir a contaminação endógena dos explantes. Além disso, também sugere-se que sejam testadas tanto doses maiores de BAP e/ou outros tipos de citocininas para indução de brotações, quanto outras épocas de coleta dos explantes.

3 CONCLUSÃO

Embora viáveis, as metodologias desenvolvidas para propagação *in vitro* de mirtilo necessitam ser ajustadas conforme as condições da planta matriz e os cultivares testados. A época de coleta dos explantes caracteriza-se como um fator imprescindível para o sucesso do cultivo *in vitro*, sobretudo de espécies com período de dormência vegetativa, como é o caso do mirtilheiro. Contudo, existem poucos trabalhos na literatura acerca desta temática.

No experimento realizado, o cultivar Bluegem demonstrou maior adaptação quanto à variação das épocas de coleta dos explantes, já que, mesmo quando os explantes foram coletados no verão, houve a emissão de brotações e, conseqüentemente, a emissão de folhas. Além disso, o cultivar Bluegem demonstrou maior tolerância à oxidação, porém também apresentou taxas de contaminação mais elevadas quando os explantes foram coletados no verão, diferentemente do que ocorreu com o cultivar Clímax.

O cultivar Clímax, por outro lado, demonstrou maiores taxas de oxidação independente da época de coleta dos explantes e não emitiu brotações quando os explantes foram coletados no verão. Entretanto, obteve menores taxas de contaminação quando a coleta dos explantes foi realizada no verão.

A variável número de folhas sofreu influência da época de coleta, sendo que a emissão de folhas foi superior quando os explantes foram coletados na primavera para ambos os cultivares.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, T. C. S. de; MOUCO, M. A. do C; NETO, A. A. A. Reguladores de crescimento vegetal na concentração de macronutrientes em videira Itália. **Revista Bragantia**, 2008. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/brag/a/HzB6bHfsyjG6DhKx5wXnJNf/?format=pdf&lang=pt>>.

AMULTARI, K.F; MACHADO, R. M. A; BRYLA, D; STRIK, B. Chemigation with Micronized Sulfur Rapidly reduces soil pH in a new plating of northern highbush blueberry. **Hortscience**, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.21273/HORTSCI12313-17>

ANTUNES, Luis Eduardo Corrêa. **Pequenas frutas: Estratégias para o desenvolvimento**. Embrapa Clima Temperado, 2013. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/87256/1/Digitalizar0007.pdf>>.

ANTUNES, L. E. C; BACCAN, R. **Cultivares de mirtilo para a produção em vasos**. EMBRAPA, Circular Técnica 236, 2023. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1152387/1/CIRCULAR-CPACT-236.pdf>>.

ANTUNES, L. E. C; PAGOT, E; PEREIRA, J. F. M; TREVISAN, R; GONÇALVES, E. D; VIZZOTTO, M. **Aspectos técnicos da cultura do mirtilheiro**. 2012. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/68238/1/15834.pdf>>.

ARBAGE, Alessandro Porporatti. **Economia Rural: conceitos básicos e aplicações**. Chapecó: Grifos, 2000. 305 p.

AUSTIN, M. E; BONDARI, K. Soil pH effects on yield and fruit size of two rabbiteye blueberry cultivars. **Journal of Horticultural Science**, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1080/00221589.1992.11516309>.

BOARO, V; SCHARTZ, S. F; SOUZA, P. V. D. de; SOARES, W; LOUROS, G. V. Enxofre elementar no manejo do pH de substrato orgânico alcalino. **Revista Ciência Rural, Santa Maria**, 2014. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/cr/a/g6Fx7D7qyc3DDJkqQPFFvhVb/?format=pdf&lang=pt>>.

BRAZELTON, C; FAIN, C; OGG, M. **Global State of Blueberry Industry Report 2023**. International Blueberry Organization (IBO), 2023. Disponível em: <<https://www.internationalblueberry.org/2023-report>>.

CAMINITI, A.; SILVEIRA, C. A. P.; ANTUNES, L. E. C.; POTES, M. da L.; PAGOT, E. **Técnicas de produção de framboesa e mirtilo**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA, 2016. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/158076/1/Tecnicas-de-Producao-o-de-Framboesa-e-Mirtilo-Incluido.pdf>>.

CANTUARIAS-AVILÉS, Tatiana. **Cultivo do Mirtilheiro (*Vaccinium sp.*)**. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), 2010. Disponível em: <<https://www.esalq.usp.br/biblioteca/sites/default>>

/files/publicacoes-a-venda/pdf/SPR48.pdf>.

CARDOSO, L. S. **Modelagem Aplicada à fenologia de macieiras “royal gala” e “fuji suprema” em função do clima, na região de Vacaria, RS.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/33327/000789391.pdf?sequence=1>>.

CARPENEDO, S; RASEIRA, M. C; FRANZON, R. C. **Importância e Perspectivas para a Cultura do Mirtilo no Brasil.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Clima Temperado, 2022. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1148420/1/CPACT-DOCUMENTOS-526.pdf>>.

CARVALHO, J.M.F.C. de. **Aplicacion de las tecnicas de cultivo *in vitro* en la multiplicación y mejora del algodón (*Gossypium hirsutum* L).** 1996. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônoma) – Departamento de Biología Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agronomos de la Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, 1996.

CARVALHO, J. M. F. C. de. **Técnicas de Propagação.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: Embrapa Algodão, 1999. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/271622/tecnicas-de-micropropagacao>>.

CARVALHO, J. M. F. C. de; SILVA, M. M. de. A; MEDEIROS, M. J. L. **Fatores inerentes à micropropagação.** Embrapa Algodão, 2006. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPA/18325/1/DOC148.pdf>>.

CASPERSEN, S; SVENSSON, B; HAKANSSON, T; WINTER, C; KHALLI, S; ASP, H. Blueberry - Soil interactions from an organic perspective. **Scientia Horticulturae**, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.04.002>.

COLETTI, Roberto. **Fenologia, produção e superação de dormência do mirtilo em ambiente protegido.** Universidade de Passo Fundo, dissertação de mestrado, 2009. Disponível em: <<http://tede.upf.br/jspui/bitstream/tede/496/1/2009robertocoletti.pdf>>.

COREDE, Alto Jacuí. **Perfil socioeconômico da região do Alto Jacuí.** Governo do Estado do Rio Grande do Sul, 2015. Disponível em: <<https://planejamento.rs.gov.br/upload/arquivos/201512/15134127-20151117100501perfis-regionais-2015-alto-jacui.pdf>>.

CRUZ, Jéssica Gonzalez. **Qualidade de luz na micropropagação de mirtilheiro ‘Woodard’.** 2018. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas.

EMATER/RS-ASCAR. **Levantamento da Fruticultura Comercial do Rio Grande do Sul - 2023.** Disponível em: <https://www.emater.tche.br/site/arquivos_pdf/safra/safraTabela_12032024.pdf>.

ERIG, Alan Cristiano; SCHUCH, Márcia Wulff. Fatores que afetam a multiplicação *in vitro* de mirtilo. **Scientia Agraria**, 2006. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/pdf/995/99516263012.pdf>>.

FACHINELLO, J. C.; NACHTIGAL, J. C.; KERSTEN, E. **Fruticultura: Fundamentos e Prática**. Embrapa Clima Temperado, 2008. Disponível em: <<https://wp.ufpel.edu.br/fruticultura/files/2017/05/Livro-de-Fruticultura-Geral.pdf>>.

FACHINELLO, J.C. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2.ed. Pelotas: UFPel, 1995. 179p.

FACHINELLO, José Carlos. Mirtilo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 2009. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbf/a/7fR3MYFJZPqJ4pYF3hvFt9h/?format=pdf&lang=pt>>.

FAN, S; JIAN, D; WEI, X; CHEN, J; BEESON, R, ZHOU, Z; WANG, X. Micropropagation of blueberry 'Bluejay' and 'Pink Lemonade' through *in vitro* shoot culture. **Scientia Agriculturae**, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.052>. Acesso em: maio de 2024.

FAO, Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. **Item Blueberries**. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>>.

FARIAS, D. da H; PINTO, M. A. B; CARRA, B; SCHUCH, M. W; SOUZA, P. L. D. Desenvolvimento de mudas de mirtilo inoculadas com fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 2014. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbf/a/PxprzKnzn4MsHdsJLgn6QHG/?format=pdf&lang=pt>>.

FERRI, Juçara. **Micropropagação e desenvolvimento vegetativo de mirtilo**. 2008. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas.

FLOSS, Elmar Luiz. **Fisiologia de plantas cultivadas**. Editora Universidade Federal de Passo Fundo, 2011. Capítulo 10. 711p.

FONSCECA, L. L. da; OLIVEIRA, P. B. de. **A planta de mirtilo: morfologia e fisiologia**. 2007. Disponível em: <https://www.inia.pt/images/publicacoes/livros-manuais/planta_mirtilo_morfologia_fisiologia.pdf>.

GALLETTA, G.J.; BALLINGTON, J.R. **Blueberry, cranberries and lingonberries** In: JANICK, J.; MOORE, J.N. Fruit breeding. New York: J. Wiley & Sons, 1996.

GONÇALVES, S. L; LYNCH, J. P. **Pelos radiculares: seleção de genótipos em soja, girassol e trigo**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), 2014. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/109137/1/Boletim-PD-7.pdf>>.

GARCES, M. L. **Perspectivas de la producción de arándanos en Chile**, 2007.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. 1998. **Micropropagação**. Torres, A.C.; Caldas, L.S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília: EMBRAPA/CNPQ. p.100-161.

HANCOCK, J. Northern Highbush Blueberry Breeding. **Acta Horticulturae**, 2006. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.715.2>.

HIMEDIALABS. **Product information: Anderson Rhododendron Medium With Calcium Chloride, Vitamins, Sucrose, Adenine sulphate and Agar**. 2017. Disponível em: <<https://www.himedialabs.com/media/TD/PT019.pdf>>.

HIMEDIALABS. **Product information: Murashige and Skoog Medium With Calcium Chloride and Vitamins Without Sucrose and Agar**. 2021. Disponível em: <<https://www.himedialabs.com/media/TD/PT021.pdf>>.

HIMEDIALABS. **Product information: Woody Plant Medium With Calcium Chloride and Vitamins Without Sucrose and Agar**. 2017. Disponível em: <<https://www.himedialabs.com/media/TD/PT021.pdf>>.

Instituto Brasileiro de Pesquisa Agropecuária (IBGE). Censo Agropecuário 2017. **Tabela 6848: Número e tamanho dos estabelecimentos agropecuários**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6848#resultado>>.

JIANG, Y; ZENG, Q; WEI, J; JIANG, LI, Y; CHEN, J; YU, H. **Growth, Fruit Yield, Photosynthetic Characteristics, and Leaf Microelement Concentration of Two Blueberry Cultivars under Different Long-Term Soil pH Treatments**. *Agronomy*, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy9070357>

JÚNIOR, H, F, da R; FRANCESCHI, É. de; PASA, M da S; SCHMITZ, J. D; FISCHER, D. L. de. O; FACHINELLO, J. C. **Desempenho produtivo de cultivares de mirtilheiros em função da cobertura de solo**. Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas. Disponível em: <https://cti.ufpel.edu.br/cic/arquivos/2013/CA_00704.pdf>.

KUCK, L. S; COUTO, A, F; UCKER, C. D. L; MOREIRA, A. S; VENDRUSCOLO, C. M. **Relação entre o teor de antocianinas totais e cor da polpa de mirtilo adicionada a goma xantana**. VII Simpósio de Alimentos para a Região Sul. Disponível em: <https://www.upf.br/_uploads/Conteudo/simposio-sial-anais/2011/tecnologia/149.pdf>.

LATTUADA, Daiane Silva. **Micropropagação e miniestaquia de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.)**. Dissertação (mestrado em Fitotecnia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2010. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/24513/000747088.pdf?sequence=1>>. Acesso em: março de 2024.

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 de Fruticultura**, 2009. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbf/a/Cyhr4thLdCfmzL5f9cGTYCk/?format=pdf&lang=pt>>.

LYRENE, P. M. Juvenility and Production of Fast-rooting Cuttings from Blueberry Shoot Cultures. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 1981. DOI: <https://doi.org/10.21273/JASHS.106.3.396>.

MALAVOLTA, E. e VITTI, Godofredo César e OLIVEIRA, Sebastião Alberto de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba, 1997.

MARINO, S.R., WILLIAMSON, J.G., OLMSTEAD, J.W., HARMON, P.F. Vegetative growth of three southern highbush blueberry cultivars obtained from micropropagation and softwood cuttings in two Florida locations. **HortScience**, 2014. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.49.5.556>. Acesso em: abril de 2024.

MATZENAUER, R. Horas de frio no estado do Rio Grande do Sul. **Revista de Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, 2005. Disponível em: http://www.fepagro.rs.gov.br/upload/1398796957_art09.pdf.

MILLER, S. A; RAWNSLEY, E. K; GEORGE, J; PATEL, N. A comparison of blueberry propagation techniques used in New Zealand. **Acta Horticulturae**, 2006. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.715.59>.

MONTEIRO, C. La expansion de la producción de arándanos en Uruguay e su relación en el Hemisfério Sur. In: **Simposio Nacional do Morango**. 2004, Pelotas. Anais . p.233-242.

MORAIS, T. P; ASMAR, S.A; LUZ, J.M.Q. Reguladores de crescimento vegetal no cultivo *in vitro* de Mentha x Piperita L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpm/a/VLLDk8ZJG5JWnsc9yVsFyF/?format=pdf&lang=pt>.

MOURA, Gyseli Corrêa de. **Management aspects and blueberry cultivars: quality and productivity**. 132 p, tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Pelotas, 2013.

PASQUAL, M.; RAMOS, J. D.; HOFFMAN, A.; CARVALHO, G. R. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações — meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE. p.127, 1998.

PASQUALINI, Ana Paula de Azevedo. **Germinação de sementes e micropropagação de mirtilheiro**. Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2013. Tese (Mestrado em Agronomia). Disponível em: <https://tede2.uepg.br/jspui/bitstream/prefix/2265/1/Ana%20Paula%20Pasqualini.pdf>.

PETRI, J. L; SEZERINO, A. A; HAWERROTH, F. J; PALLADINI, L. A; LEITE, G. B; MARTIN, M. S. **Dormência e indução à brotação de árvores frutíferas de clima temperado**. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Florianópolis, 2021. Disponível em: <https://publicacoes.epagri.sc.gov.br/BT/article/view/1174/1044>.

PHILLIPS, D. A.; WILLIAMSON, J. G. **Irrigation Practices for Southern Highbush Blueberry in Florida.** IFAS Extension, 2021. DOI: <https://doi.org/10.32473/edis-HS1432-2021>.

QUEIROGA, V; GOMES, J; NETO, A; QUEIROZ, A; MENDES, N; ALBUQUERQUE, E. **Mirtilo (vaccinium spp.) tecnologias de plantio em típicas regiões serranas.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 1ª edição, 2021. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/354640881_MIRTILO_Vaccinium_spp_TE_CNOLOGIAS_DE_PLANTIO_EM_TIPICAS_REGIOES_SERRANAS_Edutores_Tecnicos.

QUISEN, R. C; ANGELO, P. C. da S. **Manual de procedimentos do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia.** Embrapa Amazônia, 2008. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/47132/1/Doc-61-A5.pdf>.

RASEIRA, Maria do Carmo Bassols; ANTUNES, Luis Eduardo Corrêa. **A cultura do mirtilo.** Embrapa Clima Temperado, 2004. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/744895/1/documento121.pdf>. Acesso em: março de 2024.

RETAMALES, Jorge B.; HANCOCK, James. **Crop production science in horticulture: blueberries.** 2ª edição, 2018. 409p.

ROCHA, E.L.J, CARVALHO, A. C. de.; AZEVEDO, B. M. de; MARINHO, A. B.; VIANA, T. A; VASCONCELOS, D. V. Aclimatização de mudas micropropagadas de helicônia em ambiente protegido em função do tipo de substrato. **Revista Ciência Agrotecnológica,** 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cagro/a/3kr4ZCyHxRh48JHWWCcVxSP/?format=pdf&lang=pt>.

ROUT, G.R., & DAS, P. **Recent trends in the biotechnology of ornamental plants: a review.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 71(1), 1–23,2002. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/9781003047766-4/advances-tissue-culture-techniques-ornamental-plant-propagation-rout-mohan-jain>.

SANTOS, A. M. dos; RASEIRA, M. C. R. **O cultivo de mirtilo.** Embrapa Clima Temperado, 2002. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/744138/1/documento96.pdf>.

SANTOS, A. M. dos; FREIRE, C. J. da S; GONÇALVES, E. D; COUTINHO, E. F; HERTER, F. G. **A cultura do mirtilo.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2004. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/744895/1/documento121.pdf>

SANTOS, L. F. dos. **Fenologia do Vaccinium corymbosum cv Duke em várias regiões de Portugal Continental.** Universidade do Porto, Faculdade de Ciências, 2015. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/83421/2/127590.pdf>.

SBCS, SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO. **Manual de calagem e adubação para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. Comissão de Química e Fertilidade - RS/SC, 2016. p. 214

SCHAEFFER, S. M; PADILHA, A. C. M; SECCHI, M. A estratégia de diversificação rural e o acesso aos capitais: um estudo de caso no interior do Rio Grande do Sul. **Revista Extensão Rural**, Universidade Federal de Santa Maria, 2023. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/extensaorural/article/view/65402/62908>>.

SCHUCH, M. W; DAMIANI, C. R; SILVA, L. C. da; ERIG, A. C. Micropropagação como técnica de rejuvenescimento em mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade), cultivar Clímax. **Revista Ciência Agrotecnológica**, 2007. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/cagro/a/JTHWNRpMyfBmJ9YtgrGgSyh/?format=pdf>>.

SEZGIN, M; KAHYA, M. Phytohormones. **Bitlis Eren University Journal of Science and Technology**, 2018. Disponível em: <<https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/496886>>.

SOUZA, A. L. K. de; SCHUCH, M. W; ANTUNES, L. E. C; SCHIMITZ, J. D; PASA, M. da. S. Desempenho de mudas de mirtilo micropropagadas ou estaquia. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 2011. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/pab/a/BYm95tKC4PmTCSjWLCK6ZjH/?lang=pt&format=pdf>>.

SOUZA, J.A.; SCHUCH, M.W; SILVA, L.C. da. Efeito do tipo de ramo e do regime de luz fornecido à planta matriz no estabelecimento *in vitro* de araçazeiro cv. "Irapuã". **Ciência Rural**, Santa Maria/RS, v.36, n.6, p.1920-1922, 2006. Disponível em:<<https://www.scielo.br/j/cr/a/GMRwMTrmdqB6z7LDW9KLqLx/?format=pdf&lang=pt>>.

STRICK, B. Blueberry: An expanding world berry crop. **Chronica Horticulturae**. V. 45, n. 1, p. 7-12, 2005.

SILVA, L.C.; SCHUCH, M.W.; SOUZA, J.A.; ERIG, A.C.; ANTUNES, L.E.C. Meio nutritivo, regulador 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, Luciane Couto da. **Estabelecimento *in vitro* de cultivares de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade), para início da micropropagação**. 2006. Dissertação. (Mestrado em Agronomia). Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2006.

SILVA, S. D. A. da; ANTUNES, L. E. C; ANTHONISEN, D. G; LEMÕES, J. S; GONÇALVES, E. Caracterização de genótipos de mirtilo utilizando marcadores moleculares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 2008. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbf/a/gfrFNvYC7KSxxRkGtgthGJg/?format=pdf&lang=pt>>.

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. Artmed, 6ª edição, 2017.

TETSUMURA, T., MATSUMOTO, Y., SATO, M., HONSHO, C., YAMASHITA, K., KOMATSU, H., SUGIMOTO, Y., KUNITAKE, H. Evaluation of basal media for micropropagation of four blueberry cultivars. **Sci Hortic**, 2008. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.06.028>.

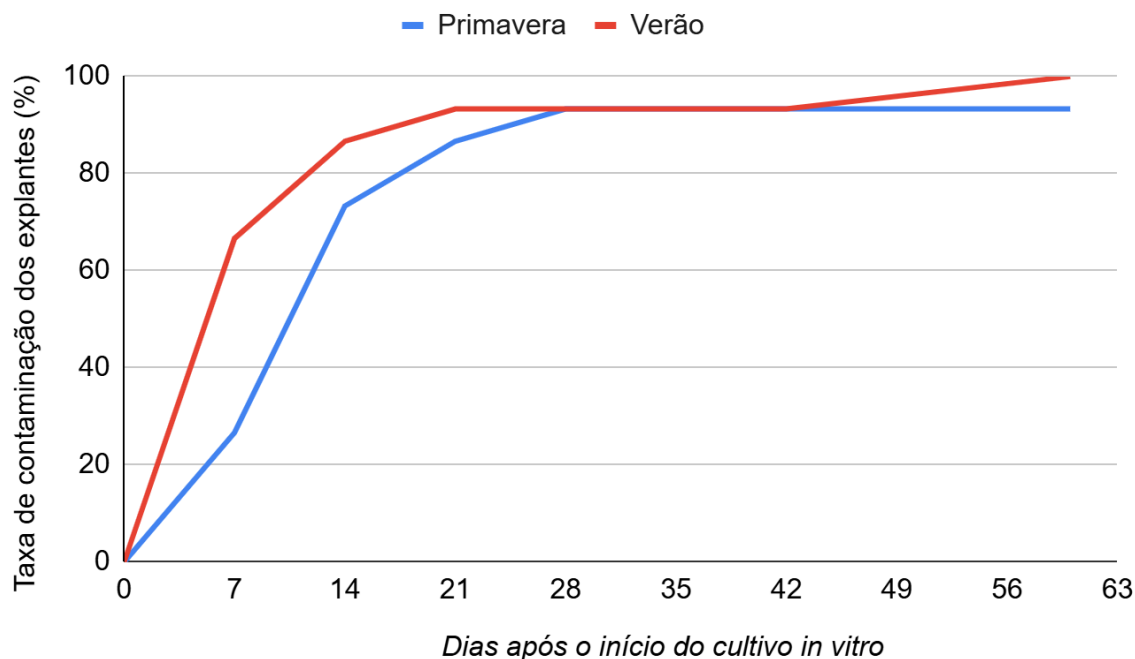
XAVIER A.; WENDLING L.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. da UFV, 2013. 279 p.

WERGE, M. S; HERTER, F. G; STEINMETZ, S. **Mapeamento das horas de frio para frutíferas de clima temperado no estado do Rio Grande do Sul**. Embrapa Clima Temperado, 2003. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/143042/1/CBAgro13-2003-Mapeamento-880.pdf>>.

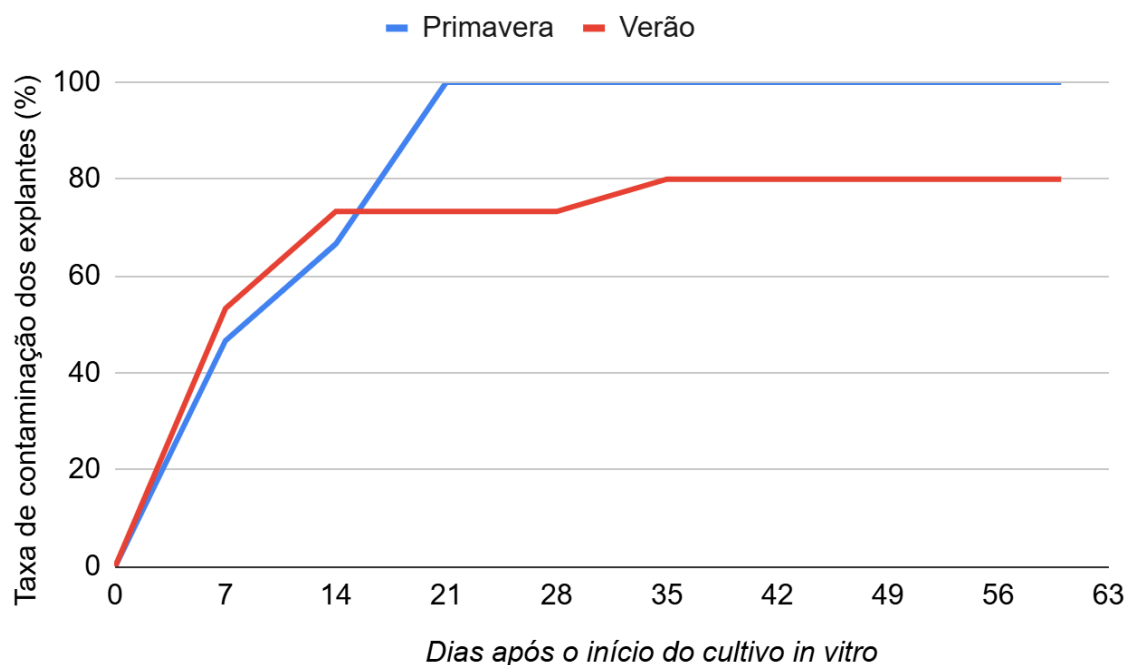
ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation of woody plants: post tissue culture aspects. **Acta Horticulturae**, Wageningen, n. 227, p. 489-499, 1988.

APÊNDICES

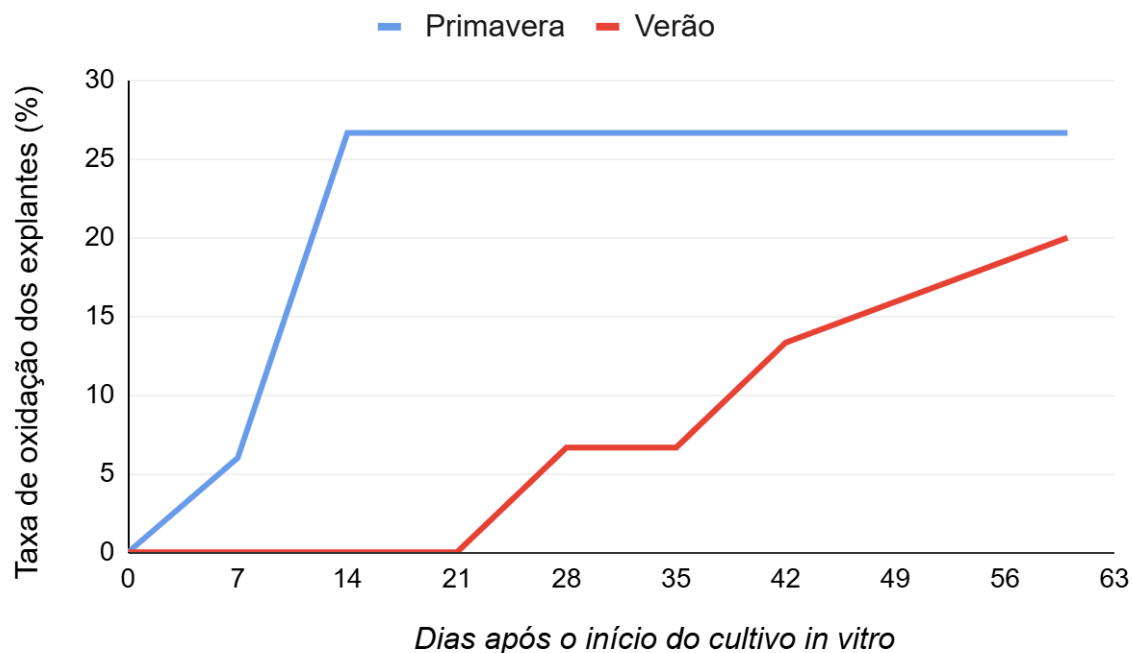
Apêndice 1 – Acompanhamento semanal das avaliações quanto à contaminação dos explantes do cultivar Bluegem para as duas épocas de coleta.



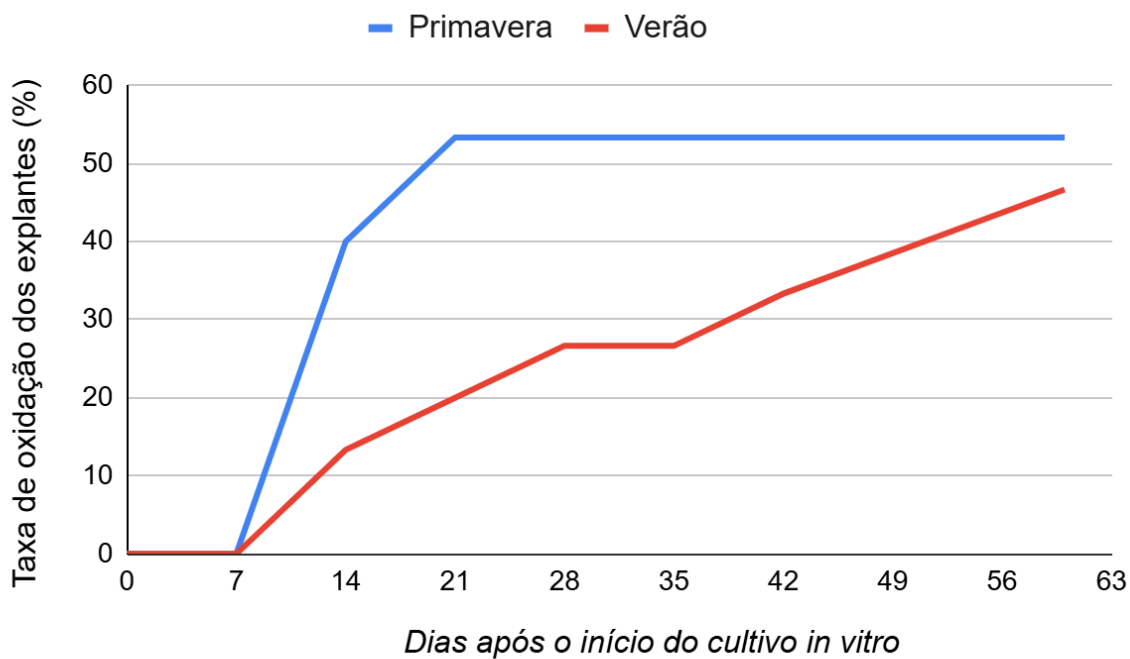
Apêndice 2 – Acompanhamento semanal das avaliações quanto à contaminação dos explantes do cultivar Clímax para as duas épocas de coleta.



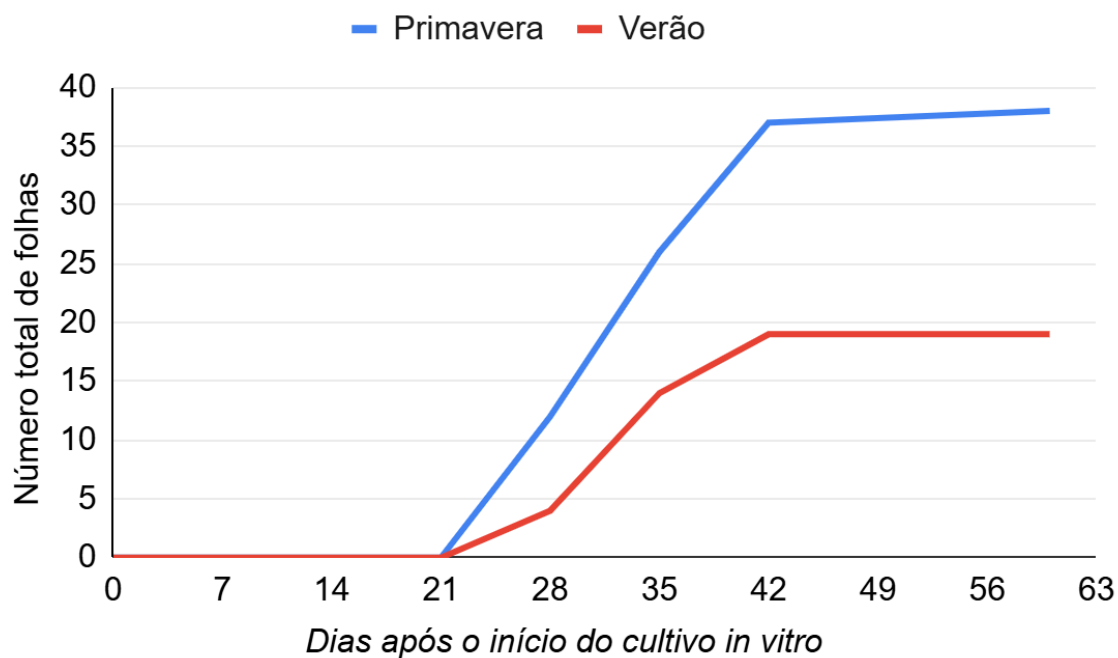
Apêndice 3 – Acompanhamento semanal das avaliações quanto à oxidação dos explantes do cultivar Bluegem para as duas épocas de coleta.



Apêndice 4 – Acompanhamento semanal das avaliações quanto à oxidação dos explantes do cultivar Clímax para as duas épocas de coleta.



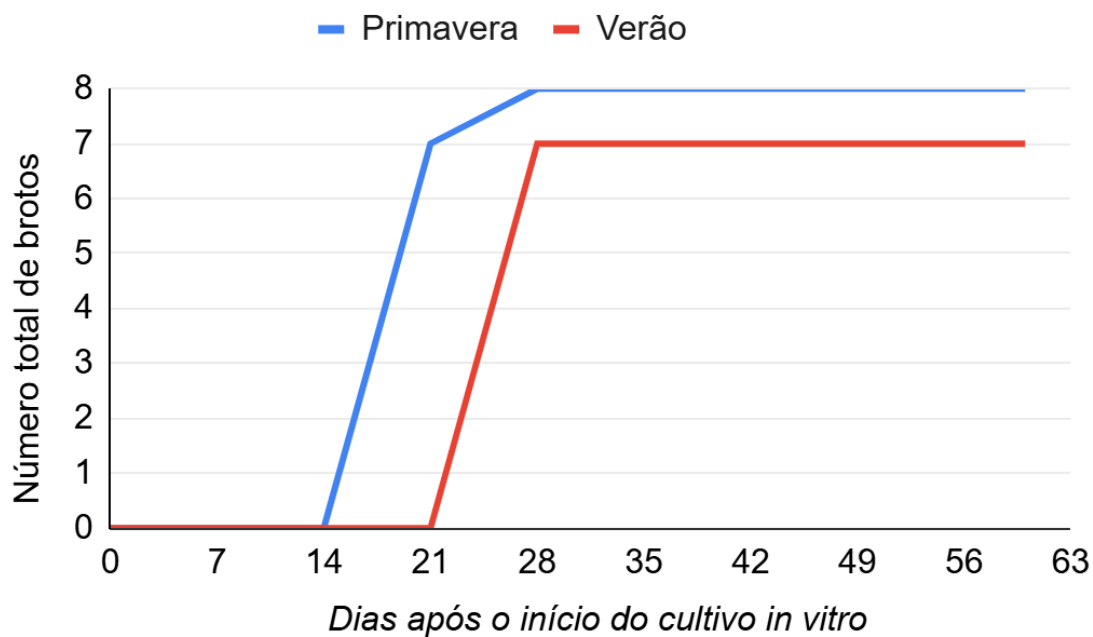
Apêndice 5 – Acompanhamento semanal das avaliações quanto ao número total de folhas dos explantes do cultivar Bluegem para as duas épocas de coleta.



Apêndice 6 – Acompanhamento semanal das avaliações quanto ao número total de folhas dos explantes do cultivar Clímax para as duas épocas de coleta.



Apêndice 7 – Acompanhamento semanal das avaliações quanto ao número total de brotos dos explantes do cultivar Bluegem para as duas épocas de coleta.



Apêndice 8 – Acompanhamento semanal das avaliações quanto ao número total de brotos dos explantes do cultivar Clímax para as duas épocas de coleta.

