

**INSTITUTO FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - IFRS
CAMPUS IBIRUBÁ**

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES DE DOIS
CULTIVARES DE MIRTILO SUBMETIDOS A TÉCNICAS DE
ASSEPSIA**

KAREN NAYARA DURIGON

**IBIRUBÁ
2025**

KAREN NAYARA DURIGON

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES DE DOIS CULTIVARES DE
MIRTILO SUBMETIDOS A TÉCNICAS DE ASSEPSIA**

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 – Campus Ibirubá como requisito parcial da obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientadora: Prof^a Dra. Daniela Batista dos Santos

**IBIRUBÁ
2025**


KAREN NAYARA DURIGON

**ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES DE DOIS CULTIVARES DE
MIRTILO SUBMETIDOS A TÉCNICAS DE ASSEPSIA**


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 – Campus Ibirubá como requisito parcial da obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientadora: Prof^a Dra. Daniela Batista dos Santos


Aprovado em 26 de junho, 2025.

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


Prof. Dra. Daniela Batista dos Santos – Orientadora

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

Prof. Dra. Suzana Ferreira da Rosa

Documento assinado digitalmente
 **PAMELA ORUOSKI**
Data: 08/07/2025 22:15:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Eng. Agrônoma Pâmela Oruoski

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

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

RESUMO

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

ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES DE DOIS CULTIVARES DE MIRTILO SUBMETIDOS A TÉCNICAS DE ASSEPSIA

AUTORA: KAREN NAYARA DURIGON
ORIENTADORA: PROF^a DRA DANIELA BATISTA DOS SANTOS
Ibirubá/RS, 26 de junho de 2025

A disponibilidade de mudas de qualidade é um fator que dificulta o cultivo do mirtilo, principalmente devido ao fato de que: i) a propagação por sementes não é difundida pelo tamanho diminuto das sementes e baixos índices germinativos; e ii) na propagação vegetativa por estacas, estas apresentam crescimento inicial lento, baixo índice de sobrevivência e enraizamento. Neste cenário, a propagação *in vitro* destaca-se por possibilitar, em curto período de tempo, produzir, de forma massal, plantas com características desejáveis, saudáveis e de alta qualidade. Entretanto, no cultivo *in vitro*, o estabelecimento dos explantes pode ser prejudicado pela contaminação microbiológica, seja por fungos ou bactérias. A contaminação pode ser desenvolvida por meio das condições endógenas dos explantes, onde há presença de microrganismos, ou pela contaminação laboratorial, através de equipamentos e materiais contaminados. Assim, o objetivo deste trabalho foi propagar dois cultivares de mirtilo (Bluegem e Clímax) de forma vegetativa, por meio da micropropagação, comparando dois tratamentos de assepsia dos explantes: Tratamento 1 (álcool 70%; Hipoclorito de Sódio; água destilada e autoclavada) e Tratamento 2 (álcool 70%; Hipoclorito de Sódio + Tween 20; água destilada e autoclavada). Devido a alta presença de contaminação fúngica em ambos os cultivares, realizou-se também o isolamento dos patógenos em placas de Petri e posterior visualização microscópica. Após 60 dias foram avaliados número de brotos, número de folhas, contaminação microbiológica, oxidação e reatividade. O cultivar Bluegem obteve melhor desempenho em relação à cultivar Clímax, destacando-se com a adição de Tween 20, presente no Tratamento 2, apresentando um maior número de brotos e folhas, maior reatividade e menor taxa de oxidação e contaminação. Também, constatou-se a presença de quatro fungos de origem endógena da planta matriz: *Phomopsis/Diaporthe* spp., *Fusicoccum/Botryosphaeria* spp., *Rhizopus* spp. e *Alternaria* spp.

Palavras-chave: Micropropagação. Cultura de tecidos. Contaminação. Fungos.

ABSTRACT

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

IN VITRO ESTABLISHMENT OF EXPLANTS OF TWO BLUEBERRY CULTIVARS SUBJECTED TO ASEPTIC TECHNIQUES

AUTHOR: KAREN NAYARA DURIGON
ADVISOR: PROF^a DRA DANIELA BATISTA DOS SANTOS
Ibirubá/RS, junho, 26, 2025

The availability of high-quality seedlings is a limiting factor for blueberry cultivation, mainly due to the following reasons: (i) propagation by seeds is not widespread because of the small size of the seeds and their low germination rates; and (ii) in vegetative propagation by cuttings, the cuttings exhibit slow initial growth, low survival rate, and poor rooting. In this context, in vitro propagation stands out by enabling the mass production of healthy, high-quality plants with desirable traits in a short period of time. However, in vitro cultivation, explant establishment can be compromised by microbiological contamination, either from fungi or bacteria. Contamination may arise from the endogenous conditions of the explants, where microorganisms are present, or from laboratory contamination through contaminated equipment and materials. Thus, this study aimed to vegetatively propagate two blueberry cultivars through micropropagation, evaluating two explant disinfection treatments: Treatment 1 (70% alcohol; sodium hypochlorite diluted 50% in water; distilled and autoclaved water) and Treatment 2 (70% alcohol; sodium hypochlorite diluted 50% in water + Tween 20; distilled and autoclaved water). After 60 days, the following were evaluated: number of shoots, number of leaves, contamination, oxidation, and reactivity. The results showed that the Bluegem cultivar performed better under Treatment 2, exhibiting a higher number of shoots and leaves, greater reactivity, and lower oxidation and contamination rates. Due to the high presence of fungal contamination in both cultivars, pathogens were also seeded on Petri dishes and later observed under a microscope. The analysis confirmed the presence of four fungi of endogenous origin from the mother plant: *Phomopsis/Diaporthes* spp., *Fusicoccum/Botryosphaeria* spp., *Rhizopus* spp., and *Alternaria* spp.

Keywords: Micropropagation. Tissue culture. Contamination. Fungi.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Laboratório de Biotecnologia e Propagação Vegetal no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS), Campus Ibirubá.....	27
Figura 2 - Montagem da sala de crescimento (A); Sala de crescimento finalizada (B); Interior da sala de crescimento (C).....	28
Figura 3 - Prateleiras com sistema de iluminação e fotoperíodo para a sala de crescimento do Laboratório de Biotecnologia e Propagação Vegetal.....	29
Figura 4 - Pomar de mirtilos do IFRS - Campus Ibirubá.....	31
Figura 5 - Etapas do estabelecimento in vitro: Retirada dos explantes da planta-mãe de mirtilo (A); Meio de cultivo WPM (B); Processo de toailete e retirada das folhas (C); Passagem do meio de cultivo para os tubos de ensaio autoclavados (D); Assepsia dos explantes (E); Inoculação dos explantes no meio de cultivo, dentro dos tubos de ensaio (F); Fechamento dos tubos de ensaio (G); Alocação dos explantes na sala de crescimento (H).....	32
Figura 6 - Aspecto dos explantes de mirtilo aos 60 dias após estabelecimento in vitro: Explante recém inoculado (A); Explante reativo (B); Explante contaminado por fungos (C); Explante oxidado (D); Explante não reativo (E).....	34
Figura 7 - Isolamento dos fungos contaminantes: Separação dos fungos semelhantes visualmente (A); Meio BDA vertido nas placas de Petri (B); Retirada do explante contaminado (C); Semeadura do explante contaminado (D); Identificação das placas de Petri (E); Alocação das placas de Petri em Incubadora B.O.D (F).....	35
Figura 8 - Preparação da lâmina de observação microscópica: Separação dos fungos semelhantes visualmente (A); Coleta da amostra fúngica com fita adesiva (B); Colagem da fita adesiva na lâmina de observação (C); Observação das estruturas fúngicas no microscópio (D); Estruturas fúngicas visíveis (E).....	36
Figura 9 - Porcentagem de oxidação (Oxi) (A) e escala de reatividade (Reat) (B) dos explantes dos cultivares de mirtilo Bluegem e Clímax estabelecidos in vitro.....	39
Figura 10 - Médias de Número de brotos (NB) e Número de folhas (NF) para os cultivares de mirtilo Bluegem e Clímax, 60 dias após o estabelecimento in vitro.....	41
Figura 11 - Patógeno <i>Phomopsis/Diaporthe</i> spp.: Colonização do fungo na placa de petri (A); Colonização do fungo no tubo de ensaio em conjunto ao explante de mirtilo (B); Observação no microscópio das estruturas do patógeno (C).....	45
Figura 12 - Patógeno <i>Fusicoccum/Botryosphaeria</i> spp.: Colonização do fungo na placa de petri (A); Colonização do fungo no tubo de ensaio em conjunto ao explante de mirtilo (B); Observação no microscópio das estruturas do patógeno (C).....	46
Figura 13 - Patógeno <i>Rhizopus</i> spp.: Colonização do fungo na placa de petri (A); Colonização do	

fungo no tubo de ensaio em conjunto ao explante de mirtilo (B); Observação no microscópio das estruturas do patógeno (C).....47

Figura 14 - Patógeno *Alternaria* spp.: Colonização do fungo na placa de petri (A); Colonização do fungo no tubo de ensaio em conjunto ao explante de mirtilo (B); Observação no microscópio das estruturas do patógeno (C).....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fungicidas registrados para a cultura do mirtilo e sua indicação de controle.....	19
Tabela 1 - Fungicidas registrados para a cultura do mirtilo e sua indicação de controle (continua).....	20
Tabela 2 - Resumo da análise de variância (valor-p) referente às variáveis número de brotos (NB), contaminação (Cont), oxidação (Oxi), número de folhas (NF) e reatividade (Reat) em função dos cultivares de mirtilo e técnicas de assepsia.....	38
Tabela 3 - Médias de porcentagem de oxidação (Oxi), reatividade (Reat), número de brotos (NB) e número de folhas (NF) dos cultivares Bluegem e Clímax.....	39
Tabela 4 - Porcentagem de contaminação dos explantes de mirtilo dos cultivares Bluegem e Clímax em função dos tratamentos de assepsia.....	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 DESENVOLVIMENTO.....	13
2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1.1 Características botânicas do Mirtilo.....	13
2.1.2 Cultivares.....	15
2.1.3 Doenças que atacam a cultura.....	17
2.1.4 Propagação do mirtilo.....	21
2.1.4.1 <i>Micropropagação</i>	22
2.1.4.1.1 Contaminação.....	24
2.1.4.1.2 Oxidação.....	26
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.2.1 Construção do Laboratório de Biotecnologia e Propagação Vegetal.....	27
2.2.2 Implantação do experimento.....	31
2.2.3 Avaliações do experimento.....	34
2.2.4 Análise estatística.....	37
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	38
4 CONCLUSÕES.....	39
REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

A fruticultura é uma atividade agrícola na qual o País se destaca por ocupar o terceiro lugar no ranking mundial de maiores produtores de frutas, de acordo com a FAO 2022. Dada a dimensão e localização no globo terrestre, o Brasil produz mais de 300 variedades de frutas, tanto de clima tropical quanto temperado, além de diversas espécies estrangeiras que adaptaram-se ao país (Júnior *et al.*, 2010). Assim, a fruticultura exerce importante papel econômico, social, cultural e tem se apresentado, de acordo com Medeiros (2006), como uma das atividades mais importantes da cadeia de alimentos, tanto na oferta de fruta *in natura* como processados.

Entre a diversidade de frutas produzidas, o grupo de “pequenas frutas”, também denominadas “frutas vermelhas” vem ganhando espaço na cadeia produtiva da fruticultura e, por sua vez, demandando de técnicas de manejo específicas para estas espécies. Isso se deve ao grande interesse por parte do consumidor, que cada vez mais busca por alimentos saudáveis, já que estas apresentam grande quantidade de compostos antioxidantes e fenólicos, capazes de prevenir doenças e combater a ação de radicais livres.

Incluso no grupo de pequenas frutas encontra-se o mirtilo (*Vaccinium spp.*), que é originário do hemisfério norte, e passou a ser difundido em outras regiões, com condições semelhantes à de sua origem, incentivando a produção e consumo em locais não tradicionais. Por ser rico em vitaminas e minerais (Chu *et al.*, 2011) e pela concentração de substâncias de alto poder antioxidante (Conçenso *et al.*, 2015), o consumo regular especialmente como produto fresco, bem como uma maior disponibilidade de material genético, ampliou as zonas geográficas em que esta cultura é cultivada comercialmente (Retamales *et al.*, 2015).

Mundialmente, o mirtilo é produzido em 39 países, com uma área cultivada de 126.144 hectares, resultando em uma produção de 850.886 toneladas de mirtilo (FAOSTAT 2022, *apud* Antunes *et al.*, 2022). Além de principais produtores mundiais, os Estados Unidos e Canadá são também os maiores consumidores, mas suas produções não suprem a demanda interna. Desta forma, para ofertar fruta fresca no mercado durante o ano todo é necessário importá-la no período de entressafra, surgindo uma atrativa oportunidade de negócio, principalmente para os países da América do Sul (Fachinello, 2008; Antunes e Madail, 2007).

No Brasil, o mirtilo foi introduzido no ano de 1983 pela Embrapa Clima Temperado, no estado do Rio Grande do Sul, com cultivares oriundas da Flórida, passando por um processo lento de adoção da cultura, iniciando os cultivos comerciais a partir de 1990 no município de Vacaria, RS (Radünz, 2014).

Conforme o Levantamento Frutícola 2023, realizado entre a Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural (SEAPDR) e a Associação Riograndense de Empreendimentos de Assistência Técnica e Extensão Rural e a Associação Sulina de Crédito e Assistência Rural (EMATER/RS-ASCAR, 2023), no Rio Grande do Sul a área total de cultivo de mirtilo consta em 74,41 hectares, a partir de 69 unidades produtivas, com produção estimada em 356,80 toneladas obtidas no ano de 2023. Os municípios maiores produtores de mirtilo são: Vacaria, Jaguarão, Pelotas, Caxias do Sul, Encruzilhada do Sul, São Francisco de Paula, Erval Grande, Capão Bonito do Sul, Farroupilha e Ipê, respectivamente (EMATER/RS - ASCAR, 2023).

Diante disso, a cultura do mirtilo é uma nova possibilidade na área de fruticultura nas regiões sul e sudeste do Brasil. Isso ocorre devido à sua alta rentabilidade, baixa utilização de insumos e facilidade de produção limpa (preservação do meio ambiente e segurança alimentar) (Arruda *et al.*, 2017). O mirtilo é uma ótima opção para pequenas propriedades rurais que praticam a Agricultura Familiar, já que possibilita a obtenção de alto retorno econômico em pequenas áreas de cultivo, diversificando as propriedades, podendo ser inserido em modelos de produção de base ecológica, agroecológica, e sistema orgânico.

O alto valor comercial dos frutos de mirtilo é um fato que atrai produtores. Na Central de Abastecimento do Rio Grande do Sul a cotação do mirtilo no dia 05 de junho de 2025 atingiu o valor de R\$116.67/kg, o que pode representar alta rentabilidade para os produtores.

O mirtilo, pertencente à família Ericaceae e ao gênero *Vaccinium*, cresce naturalmente em algumas regiões de clima temperado e com prevalência de solos ácidos, da Europa e América do Norte, onde é cultivado em grande escala (Madail e Santos, 2004). O Brasil encontra-se atualmente numa fase de consolidação do sistema de produção e expansão das áreas de cultivo. Porém existem alguns fatores que limitam a expansão da cultura do mirtilo, e entre estes, está a dificuldade de propagação, que reduz a disponibilidade de plantas para a comercialização

(Hoffmann, 1994), quer seja de plantas micropropagadas ou por enraizamento de estacas, o que cria alta demanda e oferta reduzida de mudas (Monteiro, 2004).

Na busca de um sistema de produção eficiente e competitivo que garanta a qualidade e sanidade das mudas, e sendo o mirtilo uma das poucas espécies frutíferas que responde com grande êxito à cultura de tecidos, esta técnica surge como alternativa de propagação (Almeida *et al.*, 1997).

Através de técnicas como a micropropagação, o setor de mudas frutíferas tem obtido bons resultados, possibilitando além do controle sobre a produção de mudas, um grande número de indivíduos de elevada qualidade sanitária. Dessa forma, a micropropagação torna-se uma ferramenta importante no setor de produção de mudas frutíferas, devido a necessidade de melhorar a tecnologia de produção de mudas de mirtilo, para possibilitar o aumento da área de plantio da fruteira, a fim de suprir a demanda crescente desta fruta no mercado interno e externo (Silva, 2006).

Pasqualini (2013) ressalta que definir as melhores condições de cultivo *in vitro* e desenvolver protocolos específicos para as diferentes cultivares são ações importantes para viabilizar a micropropagação em escala comercial.

Diante do exposto, neste trabalho objetivou-se propagar mudas de mirtilo por meio da micropropagação, estudando alguns fatores envolvidos durante o estabelecimento das microestacas, com base na avaliação do efeito de duas técnicas de assepsia, utilizando dois cultivares do grupo Rabbiteye: Bluegem e Clímax. Deste modo, espera-se divulgar os conhecimentos obtidos sobre a micropropagação desta espécie, contribuindo para a produção de mudas de qualidade.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 Características botânicas do Mirtilo

O mirtilo trata-se de uma frutífera de clima temperado, nativa de regiões dos Estados Unidos e Europa. É membro da família Ericaceae, subfamília Vaccinoideae e gênero *Vaccinium* (Sharpe, 1980).

A planta possui porte arbustivo, podendo ser de hábito ereto ou rasteiro, dependendo dos cultivares, sendo que todos apresentam hábito caducifólio. As folhas do mirtilo são dispostas de forma alternada ao longo dos galhos, variando de acordo com a espécie, podendo apresentar-se de forma elíptica, espatulada ou ovada (Retamales; Hancock, 2012).

De acordo com Fonseca, 2007, na planta do mirtilo o sistema vascular das raízes e da parte aérea não se encontra totalmente interligado. Vários estudos comprovam que se a água e os nutrientes forem distribuídos de um dos lados da planta, só esse lado se desenvolverá, sendo necessária uma distribuição uniforme da água e nutrientes em torno da planta.

O sistema radicular do mirtilo é muito superficial e compacto, sendo constituído por dois tipos distintos de raízes: raízes finas com diâmetro inferior a 2 mm e raízes de suporte com diâmetro entre 2 e 11 mm. As raízes finas e fibrosas distribuem-se nos primeiros 30 a 40 cm de profundidade e asseguram a absorção de água e nutrientes. As raízes mais grossas, que podem alcançar profundidades de cerca de 1 metro, são responsáveis pela fixação da planta ao solo (Associação dos Jovens Agricultores de Portugal, 2017).

Grande parte dos cultivares de mirtilo possuem sistema radicular com ausência de pelos radiculares (Darnell, 2006). Para superar a carência nutricional, realizam simbiose com fungos micorrízicos (Bowling, 2005), estes asseguram a absorção de água e nutrientes do solo em troca de fotoassimilados (Associação dos Jovens Agricultores de Portugal, 2017).

O mirtilo tem preferência por solos arenosos ou franco arenosos, ácidos, com pH entre 4 e 5,5, arejados, bem drenados, ricos em matéria orgânica e permeáveis,

não suportando solos encharcados. Os solos arenosos ou franco arenosos permitem não só a penetração das raízes finas e fibrosas dos mirtilos no solo, como também a presença dos fungos que vivem em simbiose com as raízes, facilitando a absorção de água pelas raízes (Associação dos Jovens Agricultores de Portugal, 2017).

A floração do mirtilo é consideravelmente longa, durando de 7 a 14 dias, dependendo das condições ambientais como temperatura e características genéticas de cada cultivar (Associação dos Jovens Agricultores de Portugal, 2017). As flores podem possuir forma campanulada, de sino ou de urna (Silveira *et al.*, 2009) e reúnem-se em inflorescências compostas por 6 a 14 flores, sendo que o número de flores por gema floral é dependente da posição da gema no ramo. Além disso, as suas características desfavorecem a autopolinização e facilitam a polinização cruzada, já que as pétalas protegem os estames do vento, evitando que o pólen caia sobre o seu próprio estigma.

As flores são aromáticas e possuem glândulas nectaríferas, por isso a visita por insetos polinizadores que conseguem adentrar na corola é favorecida, além de outros insetos como as abelhas e as vespas, no entanto, estes podem danificar as flores. Cada óvulo fertilizado irá dar origem a uma semente e quanto maior for o número de sementes que se desenvolvem, maior será a dimensão e o peso do fruto (Associação dos Jovens Agricultores de Portugal, 2017).

De acordo com Fachinello, 2008, na produção comercial, é fundamental a presença de abelhas para a realização da polinização, pois algumas cultivares não são autoférteis e necessitam de polinização cruzada, devido a sua incompatibilidade, sendo aconselhável o plantio de mais de uma cultivar (Silveira *et al.*, 2009).

O fruto do mirtilheiro é uma baga de cor azul-escura, de formato achatado, coroada pelos lóbulos persistentes do cálice e com aproximadamente 1 a 2,5 cm de diâmetro e 1,5 a 4 gramas de peso. Apresenta em seu interior muitas sementes e possui sabor doce-ácido a ácido (Fachinello, 2008).

A dimensão dos frutos depende principalmente da sua localização, ramos grossos produzem frutos maiores devido a maior capacidade de fornecimento de água e nutrientes ao fruto, já que estes possuem mais folhas e conseqüentemente maior capacidade fotossintética. A superfície do fruto é influenciada pela presença de pruína, uma cera que reveste a camada externa da cutícula e forma uma barreira à perda de água, impedindo o murchamento das bagas (Associação dos Jovens Agricultores de Portugal, 2017). A coloração azul-escuro ocorre em função da

concentração de um pigmento denominado antocianina. Tal pigmento, relaciona-se com a ação antioxidante que o consumo de mirtilo promove no corpo humano (Kuck *et al.*, 2011).

Devido ao fato de ser originária de clima temperado, o mirtilo necessita acumular um somatório mínimo de horas frio (HF), com temperaturas abaixo ou igual a 7,2 °C (Cantuarias-Avilés, 2010) para sua plena produtividade. Conseqüentemente, necessita de um período de dormência ativado pelo frio no outono, exigindo o acúmulo de HF para produzir compostos bioquímicos e sair do repouso hibernal. O novo ciclo produtivo inicia na primavera, em setembro, com brotações uniformes e florações. Quando a quantidade de horas frio requeridas pela planta não é atingida, ocorre desuniformidade das brotações, afetando o tamanho e quantidade de frutos, além de promover a antecipação da floração (Hoffman, 2012).

As necessidades de horas frio variam de acordo com os grupos de cultivares (Highbush, Lowbush e Rabbiteye), onde o requerimento de HF varia de 150 a valores superiores a 1.000 horas frio. Se a planta cumpre antecipadamente a exigência em frio, a floração inicia-se no final do inverno, tornando-se suscetível aos efeitos negativos causados pelas geadas (Associação dos Jovens Agricultores de Portugal, 2017; Cantuarias-Avilés, 2010).

2.1.2 Cultivares

O gênero *Vaccinium* compreende 450 espécies de mirtilos (Cantuarias-Avilés, 2010), entretanto, a maior parte da produção origina-se de cultivares derivadas de quatro grupos: highbush (northern e southern), lowbush, rabbiteye e de seus híbridos (Rowland *et al.*, 2012). Estes grupos diferem-se por genótipo, hábito de crescimento, tipo de fruto produzido e outras características. As práticas de manejo são diferenciadas para cada um dos grupos, desde a produção de mudas até a colheita e utilização dos frutos (Fachinello, 2008).

No Brasil, especialmente no Rio Grande do Sul, é recomendável o plantio de cultivares do grupo Rabbiteye por apresentarem menor exigência de horas frio (entre 300 e 400 horas) (Raseira e Antunes, 2004).

O grupo Rabbiteye ou olho de coelho (*Vaccinium ashei* Reade), originário do sul da América do Norte (Fachinello, 2008), é o principal cultivado no Brasil, já que as cultivares deste grupo brotam e florescem bem com apenas 360 horas de frio

(HF), condição esta encontrada em grande parte dos municípios do sul do Brasil (Herter e Wrege, 2006). O grupo destaca-se por apresentar, maior produção por planta, vigor, longevidade, produtividade, baixa necessidade em frio, produzindo frutos firmes e de longa duração pós-colheita (Ehlenfeldt *et al.*, 2007). As cultivares mais plantadas do grupo são Aliceblue, Bluebelle, Bluegem, Briteblue, Clímax, Delite, Powderblue e Woodard (Cantuarias-Avilés, 2010).

Dentre o grupo Rabbiteye, a cultivar Bluegem é originária da Flórida, e necessita de polinização cruzada. Os frutos possuem sabor bem aceito e a película apresenta bastante pruína. Já a cultivar Clímax, originária da Geórgia, possui frutos considerados de tamanho médio com película de coloração azul escura e polpa com sabor doce-ácido. Amadurecem de maneira relativamente uniforme e possuem película coberta por bastante pruína dando um aspecto bem azulado (Raseira e Antunes, 2004).

Em condições normais, no Rio Grande do Sul, as cultivares do grupo Rabbiteye florescem entre os meses de agosto e outubro, com colheita estendendo-se entre dezembro e janeiro (Antunes, *et al.*, 2008). Estima-se que no estado sejam cultivados 74,41 hectares, em 69 unidades produtivas (EMATER/RS-ASCAR, 2023). Esse número reflete que o cultivo do mirtilo ainda é baixo comparado à outras culturas, entretanto, seu cultivo deve ser incentivado, já que apresenta um cenário promissor, principalmente em pequenas propriedades com mão de obra familiar, com grande potencial para expansão no mercado da fruta e pela busca por diversificação das culturas na propriedade. Em conjunto, a contínua pesquisa e o desenvolvimento de novas tecnologias de manejo, principalmente para controle de pragas, doenças e produção de mudas, associados com o apoio técnico aos produtores, são fundamentais para o sucesso e a expansão dessa cultura no estado.

2.1.3 Doenças que atacam a cultura

A cultura do mirtilo, apesar de ser relativamente resistente, está sujeita a uma variedade de doenças que podem comprometer a produção e a manutenção das plantas. Tais doenças são causadas principalmente por fungos, vírus e bactérias, e

se manifestam de diversas formas, desde manchas nas folhas e frutos até o apodrecimento das raízes.

Ainda que possa ser cultivado em sistema agroecológico, algumas doenças, sobretudo fúngicas, podem limitar a produção, quer pela redução do desenvolvimento das plantas ou pela redução da qualidade dos frutos. Dessa forma, o efetivo controle das doenças é obtido não somente com o uso de defensivos, mas conjugado com práticas preventivas e de manejo cultural (Amorim *et al.*, 2016).

As principais doenças causadoras de danos econômicos na cultura são de origem fúngica, dentre elas destacam-se a requeima de flores e podridão cinzenta (*Botrytis cinerea*), cancro dos ramos (*Botryosphaeria* spp.), requeima dos ramos (*Phomopsis vaccinii*), antracnose (*Colletotrichum* spp.), ferrugem das folhas (*Pucciniastrum vaccinii*), podridão das raízes (*Phytophthora cinnamomi*) e mancha das folhas (*Alternaria tenuissima*).

A requeima de flores e podridão cinzenta causada pelo patógeno *Botrytis cinerea*, ocasiona lesões de cor marrom em ramos novos e requeima de flores e folhas recém formadas. Nos frutos a podridão inicia com manchas encharcadas de cor marrom, próximas à região do cálice, o que leva à sua queda prematura. A sobrevivência do patógeno é na forma de escleródio ou micélio em tecidos sintomáticos e restos vegetais de poda, raleio e colheita que permanecem nos pomares. A doença é mais intensa em regiões de clima mais ameno, e nas variedades do grupo Rabbiteye. Epidemias severas podem ocorrer na presença de neblina ou chuviscos com temperatura entre 15 e 20 °C (Amorim *et al.*, 2016).

A fertilização da cultura com excesso de nitrogênio pode favorecer o aumento da incidência dessa doença. Para controle devem ser eliminadas as fontes de inóculo, também, em condições favoráveis para infecção por *B. cinerea* recomenda-se o uso de fungicidas protetores recomendados pelo MAPA para a cultura (Amorim *et al.*, 2016).

A doença cancro dos ramos ocasionada por *Botryosphaeria* spp., caracteriza-se por manchas avermelhadas nos ramos que evolui para lesões deprimidas que podem afetar toda a circunferência do ramo, o que leva à desfolha e morte. Nas lesões há a formação de picnídios que contém conídios, os quais são disseminados a curtas distâncias pela ação da água da chuva. A infecção frequentemente se inicia em ferimentos que ocorrem na poda, permanecendo em ramos sintomáticos que ficam no pomar. A doença causa danos principalmente em

regiões quentes e chuvosas. Recomenda-se para controle eliminar ramos sintomáticos com sinais de cancro e eliminar restos vegetais do pomar. Além disso, a aplicação de pasta cúprica nos cortes após as podas desfavorece a penetração do patógeno nas plantas, podendo ser uma medida de controle importante (Amorim *et al.*, 2016).

A requeima dos ramos causada pelo fungo *Phomopsis vaccinii* forma picnídios nas lesões, sendo os esporos dispersos por água da chuva ou irrigação, a sobrevivência do patógeno ocorre nos ramos novos sintomáticos. Os sintomas incluem gemas infectadas que tornam-se marrom e morrem. Nos ramos, lesões necróticas de cor marrom são formadas ao redor das gemas mortas, e progridem aumentando a área podendo resultar no anelamento dos ramos, levando-os à morte. Também, pode-se aparecer lesões em folhas, sendo essas caracterizadas por manchas irregulares de coloração marrom. Ramos infectados podem exibir murcha foliar durante o período de verão, as folhas desses ramos adquirem prematuramente cor vermelha ou marrom. Em frutos, os sintomas de podridão podem ocorrer próximo ao período de colheita, diminuindo severamente a produtividade (Amorim *et al.*, 2016).

Para controle, recomenda-se a eliminação dos ramos doentes e pulverização com fungicidas em gemas inchadas até plena floração, e durante a maturação dos frutos, com a utilização de fungicidas recomendados pelo MAPA para a cultura (Amorim *et al.*, 2016).

A antracnose, ocasionada por *Colletotrichum* spp. pode causar sintomas em folhas, ramos, flores e frutos. Nos ramos ocorrem lesões de cor marrom escura com anéis concêntricos de coloração alaranjada. Em flores ocorre requeima e em frutos ocorre podridões no período de maturação plena e na pós-colheita. O patógeno sobrevive na forma de micélio em ramos novos. As práticas de controle associam a eliminação de tecidos doentes, fungicidas recomendados pelo MAPA para a cultura em pós colheita, variedades resistentes e resfriamento rápido dos frutos colhidos (Amorim *et al.*, 2016).

A ferrugem das folhas, causada por *Pucciniastrum vaccini*, trata-se de uma ferrugem heteroécia macrocíclica que ocorre em hospedeiros da família ericácea. Em regiões com invernos amenos os urediniosporos sobrevivem no hospedeiro e são disseminados para outras ericáceas pelo vento. Os sintomas incluem formação de pústulas amarelo-alaranjadas na face abaxial das folhas. Já na face adaxial, na

área correspondente às pústulas, aparecem manchas amarelas que depois escurecem e tornam-se avermelhadas ou pretas. Em áreas com alta intensidade da doença podem ocorrer necrose e queda precoce de folhas. Não há fungicidas registrados para o controle dessa doença e em mirtilo no Brasil (Amorim *et al.*, 2016).

A podridão das raízes (patógeno *Phytophthora cinnamomi*), é uma doença caracterizada pela formação de lesões e necrose no sistema radicular e colo das plantas. Os sintomas reflexos são observados na parte aérea com amarelecimento e avermelhamento das folhas e desfolha. Cultivares do grupo Rabbiteye são menos suscetíveis à doença. O patógeno se dissemina na forma de zoósporos e clamidósporos a curtas distâncias pela água ou a longas distâncias por mudas e solo. O controle desta doença envolve o uso de mudas saudáveis, solos com drenagem adequada e eliminação de tecidos ou plantas doentes (Amorim *et al.*, 2016).

A mancha das folhas causada por *Alternaria tenuissima* é uma doença que ocorre nas folhas e se caracteriza por pequenas manchas circulares com centro claro e bordas avermelhadas. Nos frutos podem ocorrer lesões deprimidas escuras próximas ao ponto da colheita. A doença ocorre em temperatura baixa e umidade na primavera, causando desfolha precoce e podridão de frutos maduros. O controle pode ser feito eliminando restos de tecidos doentes, e através de fungicidas recomendados pelo MAPA, na floração e próximo do período de colheita (Amorim *et al.*, 2016).

Outras doenças de ocorrência na cultura do mirtilo são o oídio (*Microsphaera vaccinii*), fusarioses (*Fusarium* spp.) e doenças que atacam principalmente os frutos como a mumificação dos frutos (*Monilinia vaccinii-corymbosi*), e podridão dos frutos (*Rhizopus* spp.). Além disso, podem ocorrer doenças de origem bacteriana causadas por *Agrobacterium* sp. e *Xylella fastidiosa*.

Através dos avanços tecnológicos, tem-se cerca de 18 fungicidas registrados pelo MAPA para a cultura do mirtilo, estes e seus respectivos controles estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Fungicidas registrados para a cultura do mirtilo e sua indicação de controle

NOME DO PRODUTO	EMPRESA REGISTRANTE	INDICAÇÃO DE CONTROLE
Airone	Gowan ®	<i>Colletotrichum acutatum</i> (Flor preta) <i>Phomopsis obscurans</i> (Mancha de Dendrophoma)
Amistar Top	Syngenta ®	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Antracnose)
Approve	Iharabras ®	<i>Pucciniastrum vaccinii</i> (Ferrugem)
Asgard 500 SC	Crystal Agro ®	<i>Mycosphaerella fragariae</i> (Mancha foliar)
Cantus	Basf ®	<i>Alternaria tenuissima</i> (Mancha de Alternária) <i>Alternaria tenuissima</i> (Tombamento) <i>Botrytis cinerea</i> (Mofo cinzento)
Collis	Basf ®	<i>Alternaria tenuissima</i> (Tombamento) <i>Botrytis cinerea</i> (Mofo cinzento) <i>Cercospora</i> spp. (Cercosporiose)
Curado	Sumitomo Chemical Brasil ®	<i>Mycosphaerella fragariae</i> (Mancha foliar)
Fitter	Syngenta ®	<i>Botrytis cinerea</i> (Mofo cinzento) <i>Colletotrichum acutatum</i> (Flor preta)
Fluazinam 500 SC	Nortox ®	<i>Mycosphaerella fragariae</i> (Mancha foliar)
Iprodione	Nortox ®	<i>Botrytis cinerea</i> (Mofo cinzento)
Mythos	Bayer ®	<i>Botrytis cinerea</i> (Mofo cinzento)
Nativo	Bayer ®	<i>Cercospora</i> spp. (Cercosporiose) <i>Pucciniastrum vaccinii</i> (Ferrugem)

Tabela 1 - Fungicidas registrados para a cultura do mirtilo e sua indicação de controle

(continua)

NOME DO PRODUTO	EMPRESA REGISTRANTE	INDICAÇÃO DE CONTROLE PARA
Orkestra SC	Basf ®	<i>Cercospora</i> spp. (Cercosporiose) <i>Pucciniastrum vaccinii</i> (Ferrugem) <i>Colletotrichum acutatum</i> (Flor preta) <i>Armillaria</i> spp. (Podridão-radicular)
Prev-AM (óleo de casca de laranja)	Oro ®	<i>Botrytis cinerea</i> (Mofo cinzento)
Score	Syngenta ®	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Antracnose)
Switch	Syngenta ®	<i>Colletotrichum acutatum</i> (Flor preta) <i>Botrytis cinerea</i> (Mofo cinzento)
Tutor	Basf ®	<i>Phomopsis obscurans</i> (Mancha de Dendrophoma) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Antracnose)
Unix 750 WG	Syngenta ®	<i>Botrytis cinerea</i> (Mofo cinzento)

Fonte: Adaptado de Agrolinkfito (2025)

2.1.4 Propagação do mirtilo

Entre os principais fatores que restringem a expansão da cultura do mirtilo estão as dificuldades relacionadas às técnicas de propagação, que têm limitado a disponibilidade de mudas (Hoffman *et al.*, 1995; Wagner Júnior *et al.*, 2004).

O mirtilo pode ser propagado por sementes para fins de melhoramento genético; estacas lenhosas, semilenhosas e herbáceas, ou utilizando técnicas de micropropagação *in vitro*. A propagação por estacas, que aparentemente pode ser relativamente fácil, tem uma série de complicações que se traduzem em uma baixa porcentagem de enraizamento ou a propagação de doenças indesejáveis para o cultivo (Buzeta, 1997). Já a propagação por sementes não é utilizada em nível

comercial, em razão da segregação genética, que origina descendentes com caracteres distintos aos da planta-mãe (Hoffman *et al.*, 1995).

Uma boa muda é produzida através de técnicas de propagação que visam, não apenas multiplicar os indivíduos, mas também garantir a manutenção das características agronômicas desejáveis nas espécies (Trevisan, 2004). A micropropagação trata-se de cultivo asséptico de parte do vegetal (explante), em meio nutritivo artificial e juntamente com o uso de reguladores de crescimento, podendo ser caracterizada como o método preferido de propagação (Caldwell, 1984). Devido à adição de reguladores de crescimento no meio de cultivo *in vitro* as plantas reverterem ao seu estado de juvenilidade, portanto adquirem uma melhor capacidade de enraizamento. Por essa razão o enraizamento é de quase 100% se for usado material *in vitro* (Buzeta, 1997). Além de assegurar a uniformidade dos pomares e a alta sanidade das mudas (Souza *et al.*, 2008).

2.1.4.1 Micropropagação

De acordo com Carvalho (1999), a micropropagação ou propagação vegetativa *in vitro* é utilizada principalmente naquelas plantas de difícil propagação pelos métodos convencionais, permitindo a obtenção de grande número de plantas saudáveis e geneticamente uniformes, em curto período de tempo.

Por cultivo *in vitro* entende-se o conjunto de técnicas e de metodologias que permitem o crescimento e a multiplicação de células, tecidos, órgãos ou partes de órgãos de uma planta (explante) sobre um meio nutritivo e em condições assépticas. Utilizam-se recipientes herméticos e o cultivo se realiza sob condições ambientais de iluminação e temperatura controladas. Essa técnica se baseia principalmente no aproveitamento da totipotência das células vegetais, ou seja, na capacidade de produzir órgãos, como brotos e/ou raízes (organogênese) ou embriões somáticos que regeneram uma planta completa (embriogênese somática) num meio de cultivo favorável (Carvalho, 1999).

Entre as vantagens da micropropagação pode-se citar: não requer um grande número de plantas matrizes, uma vez que o processo pode ser iniciado com poucas gemas vegetativas; as plantas se desenvolvem em ambiente asséptico, livre de doenças; a propagação pode ocorrer o ano todo, independente da estação do ano;

um grande número de plantas uniformes são produzidas em um período relativamente curto de tempo (Smagula, 2006).

Durante o processo de micropropagação, vários fatores podem influenciar no potencial regenerativo de uma espécie, como o genótipo utilizado, os tipos e dosagens de reguladores vegetais, os tipos e tamanhos de explantes, os meios de cultura utilizados e as condições de cultivo (Bered, *et al.*, 1998).

A escolha do explante ideal é de suma importância para o sucesso da micropropagação. Silva, *et al.* (2008) observou que explantes obtidos de brotações laterais novas de aproximadamente 15 cm, originados de ramos lenhosos dentro da sala de crescimento, são adequados para o estabelecimento *in vitro* de *Vaccinium ashei* Reade. Também, de acordo com Silva, 2006, a micropropagação de *Vaccinium ashei* Reade através de ramos herbáceos forneceram maior número de brotações.

Na micropropagação de uma espécie, a primeira etapa é o estabelecimento *in vitro* de plantas, o que se inicia com a seleção dos explantes mais adequados para micropropagação e termina com a obtenção de uma cultura livre de contaminantes visíveis, e suficientemente adaptadas às condições *in vitro*, de modo que apresente reação à aplicação de fitorreguladores na fase seguinte de multiplicação (Grattapaglia e Machado, 1998). Esta etapa pode ser realizada a partir de segmentos nodais, com uma gema (Gonzales *et al.*, 2000), passando por um processo de assepsia para então ser introduzido no meio de cultivo, por meio de álcool 70%, hipoclorito de sódio e água destilada e autoclavada, levando cerca de 60 dias para se concretizar.

Uma planta *in vitro* é heterotrófica, sendo assim, pode-se dizer que no cultivo *in vitro* necessita-se: água, macro e micronutrientes e açúcar como fonte de carbono (Pierik, 1988). De acordo com Tetsumura *et al.* (2008) o meio de cultura mais usual na propagação *in vitro* do mirtilheiro tem sido o WPM (Wood Plant Media) por possuir todos compostos essenciais para plantas lenhosas, como macro e micronutrientes, vitaminas e aminoácidos.

Consequente ao estabelecimento *in vitro*, ocorre a fase de multiplicação, onde o objetivo principal é produzir o maior número possível de plantas, no menor espaço de tempo, embora alguns aspectos importantes como qualidade e homogeneidade das partes aéreas produzidas devem ser considerados (Chaves *et al.*, 2005). Um dos objetivos da micropropagação é a maximização da multiplicação de gemas (Erig *et al.*, 2002), podendo ser alcançado na fase de multiplicação *in vitro*. Fatores como

meio de cultura, tipo e concentração de citocininas são importantes de serem observados nesta fase (Grattapaglia e Machado, 1998).

O uso de citocininas na fase de estabelecimento e multiplicação tem como principal objetivo suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes, que se encontram isolados das regiões produtoras da planta matriz (Silva *et al.*, 2006). A citocinina desempenha papel importante, sendo o tipo e sua concentração os principais fatores que influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*, elas são indispensáveis para auxiliar a superação da dominância apical e indução de proliferação de gemas axilares (Grattapaglia e Machado, 1998). Segundo Schuch e Erig (2005), as concentrações de citocininas para a multiplicação estão entre 0,1 e 5,0 mg L⁻¹. Concentrações altas de citocininas induzem a iniciação de brotos e suprimem o enraizamento (Ferri, 2008).

Após a fase de multiplicação, que dura em torno de 60 dias, a etapa seguinte é a de formação de raízes com o propósito de formar raízes adventícias nas partes aéreas obtidas no estágio de multiplicação obtendo assim plantas completas, com a utilização de hormônios auxínicos. Esta etapa pode ser realizada em ambiente *ex vitro* com o propósito de diminuir custos, utilizando-se substratos comerciais.

No ambiente *in vitro*, deve-se utilizar juntamente ao meio de cultura WPM, hormônios auxínicos. Os tipos mais utilizados são o AIB (ácido indolbutírico), o ANA (ácido naftalenoacético) e o AIA (ácido indolacético). Estes auxiliam no equilíbrio hormonal, proporcionando um enraizamento rápido e com taxas mais elevadas, principalmente o ácido indolacético. Nesta fase, há a substituição do meio de cultivo de multiplicação pelo meio de cultivo enraizador, com presença auxina, hormônio estimulador de raiz.

Em relação aos meios de propagação do mirtileiro, Camargo *et al.* (2018), observaram que plantas micropropagadas de mirtileiro Bluegem apresentam maior crescimento vegetativo quando comparadas com plantas oriundas por estaquia. Em relação aos atributos físico-químicos, as plantas micropropagadas produzem frutos com maior teor de antocianinas e, além disso, aqueles colhidos em plantas sem poda ou com poda leve apresentam maior atividade antioxidante. Já Ferri (2008), expôs que para o grupo rabbiteye a cultivar Clímax foi a que apresentou maior desenvolvimento vegetativo em mudas micropropagadas, comparada à cultivar O'Neal.

2.1.4.1.1 Contaminação

A micropropagação de plantas é uma técnica que possibilita a propagação massal de genótipos selecionados, no entanto, a contaminação por microrganismos continua sendo um dos principais problemas para a aplicação dessa técnica podendo chegar, inclusive, a ser um fator limitante para o estabelecimento de cultivo *in vitro* de certos explantes (Ribas *et al.*, 2003).

Um dos maiores problemas na micropropagação diz respeito à contaminação bacteriana e fúngica; além dessas contaminações superficiais, é frequente se deparar com contaminações presentes no interior dos tecidos, conhecida como contaminação endógena, mais frequente em explantes derivados de plantas cultivadas no campo (Carvalho *et al.*, (2006). Entretanto, a desinfestação apenas permite a limpeza superficial do explante, sem eliminar patógenos que estejam localizados internamente nos tecidos (Fior, 2007).

A condição fitossanitária da planta-matriz determina o grau de facilidade do processo de eliminação de microrganismos contaminantes existentes no explante, durante a fase de estabelecimento *in vitro* (Montarroyos (2000). A manutenção das plantas-matrizes em ambiente asséptico e protegido como casa de vegetação, segundo Grattapaglia e Machado (1998) é uma medida preventiva contra a contaminação dos explantes.

Quando se utilizam explantes de plantas crescidas no campo, deve-se dar preferência aos ramos novos em crescimento ativo, cuja coleta deve ser feita no início do período de brotação. Órgãos e tecidos com contaminação endógena são de difícil desinfestação. Quando se detecta a presença de fungos ou bactérias endógenas deve-se preferir outras fontes de explantes, sobretudo aquelas derivadas de plantas cultivadas em ambientes controlados (Teixeira, 2005).

A desinfestação do explante é uma etapa essencial na qual podem ser utilizadas diversas substâncias de ação germicida, dentre os quais os mais utilizados estão o álcool, o hipoclorito de sódio, além dos habituais detergentes de cozinha ou Tween 20, que podem ser aplicados na solução desinfestante, com o objetivo de facilitar o contato dos agentes esterilizantes com o tecido, reduzindo a tensão superficial (Willadino e Câmara, 2005).

O Tween 20 é um polisorbato que age como emulsificante, estabilizante e umectante, com a função de aumentar o contato da solução desinfestante com o material, sendo misturado à solução de hipoclorito de sódio, com isso, diminui-se a tensão superficial do tecido, o que aumenta a penetração do cloro e, conseqüentemente a eliminação de propágulos de microrganismos (Fior, 2007).

Além disso, o controle da contaminação deve ser realizado em todas as etapas da micropropagação, desde a desinfecção do material vegetal, até a esterilização dos instrumentos e recipientes utilizados na manipulação do explante. Os instrumentos (pinças, bisturis etc) devem ser submersos em álcool 96%; flambados e colocados sobre um suporte limpo, dentro da câmara de fluxo laminar (Carvalho, *et al.*, 2006).

Com todos esses cuidados, ainda podem permanecer propágulos de microrganismos viáveis, o que será percebido com alguns dias de incubação. Em geral, a contaminação por fungos se manifesta nos primeiros dias após o estabelecimento. Contaminações bacterianas, entretanto, surgem mais tardiamente, em cerca de 1 a 3 semanas após. Contudo, em alguns casos, principalmente em tecidos de plantas lenhosas, colônias bacterianas surgem após 30 a 40 dias desde a inoculação (Fior, 2007).

Problemas crônicos de contaminação podem ser amenizados adicionando fungicidas e/ou bactericidas ao meio de cultivo. Porém, esta prática nem sempre dá bons resultados, principalmente quando não são adotados critérios técnicos para a escolha dos antibióticos, em função do tipo de organismo a ser controlado. Manejos adequados durante o tratamento da planta matriz oferecem melhores resultados e diminuem o risco ao manipulador (Fior, 2007).

2.1.4.1.2 Oxidação

A oxidação fenólica é um dos sérios problemas que podem dificultar o estabelecimento inicial dos explantes (Flores *et al.* (1998). Este tipo de oxidação que gera o escurecimento do tecido está associado ao ferimento que resulta na liberação e oxidação de compostos fenólicos que inibem o crescimento do explante (Fior, 2007).

A oxidação fenólica é altamente dependente da espécie e do genótipo. Ela depende igualmente do tipo de explante utilizado. Em geral, explantes jovens

oxidam menos que os velhos. Essa oxidação representa um dos mais sérios problemas, especialmente na fase de estabelecimento da cultura *in vitro* de explantes de espécies lenhosas por ocasionar a perda do explante. Menores danos físicos e químicos no momento da excisão e desinfestação podem contribuir para minimizar o impasse (Teixeira, 2005).

A oxidação ocorre devido a liberação de compostos fenólicos *in vitro*, muito presentes na cultura do mirtilo, tais compostos acabam inibindo o crescimento *in vitro* através da produção de substâncias tóxicas, ocasionando a morte dos explantes. A atividade das enzimas no que diz respeito à biossíntese e oxidação de fenóis é aumentada pela luz, portanto, o escurecimento dos tecidos poderá ser reduzido e até mesmo impedido, caso os explantes sejam cultivados no escuro por até 14 dias (Monaco *et al.*, 1977).

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Construção do Laboratório de Biotecnologia e Propagação Vegetal

Para alcançar os objetivos propostos, foi preciso estruturar fisicamente o Laboratório de Biotecnologia e Propagação Vegetal no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS), Campus Ibirubá, visando um local correto para condução do experimento. Assim, foi construída uma sala com condições ambientais controladas (iluminação e temperatura), fechada e com acesso limitado para manutenção dos explantes (Figura 1).

Figura 1 - Laboratório de Biotecnologia e Propagação Vegetal no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS), Campus Ibirubá

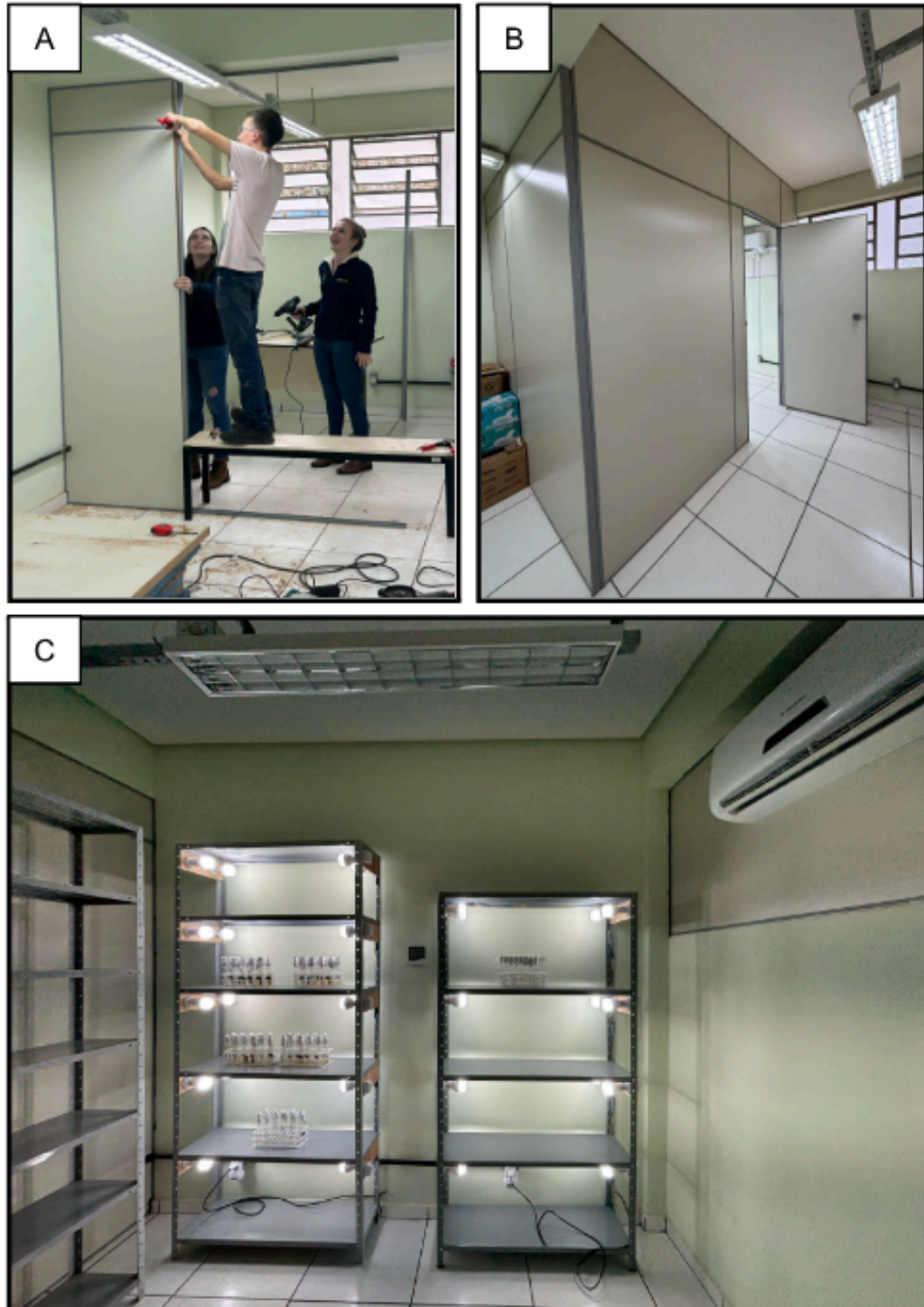


Fonte: Elaborado pela autora (2025)

A construção da sala de crescimento iniciou-se com a medição do local e demarcação do espaço. De modo que suas dimensões foram de 2,91 metros de comprimento e 1,95 metros de largura, totalizando 5,67 m², sendo que a área total do laboratório é de 36,07 m².

Posteriormente, iniciou-se a colocação de painéis divisórios modulares, a fim de separar a sala de crescimento do restante do laboratório, juntamente com a instalação de uma porta de acesso e vedação de possíveis entradas de luz (Figura 2).

Figura 2 - Montagem da sala de crescimento (A); Sala de crescimento finalizada (B); Interior da sala de crescimento (C)



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

Devido a necessidade de controle de luz e temperatura, importante para permitir crescimento vegetal, foi instalado um ar-condicionado para manter a temperatura constante próxima de 25 °C, com variação de cerca de ± 1 a 2 °C.

No local, foram dispostas três estantes de metal desmontáveis, sendo duas com seis prateleiras e uma com cinco prateleiras, distantes entre si aproximadamente 40 a 50 cm, onde instalou-se o sistema de iluminação composto por quatro lâmpadas de LED de 20W, duas de cada lado (Figura 3). Além disso, em cada prateleira foi colocado um interruptor para ligar ou desligar o sistema. Já o fotoperíodo é controlado por timers digitais, os quais são dispostos uma unidade em cada estante, regulado para a sala ficar 16 horas com luz. Também fez-se a instalação de tomadas e de um termo-higrômetro para controlar a temperatura e umidade do ambiente.

Figura 3 - Estantes de metal com sistema de iluminação e fotoperíodo para a sala de crescimento do Laboratório de Biotecnologia e Propagação Vegetal



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

A sala de crescimento é um local indispensável para a prática da micropropagação e sua entrada é restrita para que não ocorram mudanças indesejadas no ambiente, bem como, a entrada de contaminantes.

Em suma, a construção da sala de crescimento em anexo ao Laboratório de Biotecnologia e Propagação Vegetal, representou um avanço significativo para o IFRS Campus Ibirubá. A infraestrutura desenvolvida permitiu a realização do experimento de micropropagação de mirtilo em condições ideais, superando a

inexistência de um local adequado. A sala de crescimento, com seu controle de luz e temperatura, demonstrou ser um ambiente essencial para o sucesso do cultivo *in vitro* dos explantes, possibilitando a prática da micropropagação. A expectativa é de que o laboratório e a sala de crescimento impulsionem futuras pesquisas e projetos na área de biotecnologia vegetal, beneficiando a comunidade acadêmica e regional por meio da produção de mudas de diversas espécies de difícil propagação.

Para o preparo das soluções estoques, meios de cultivo e operações em câmara de fluxo laminar utilizou-se da estrutura do Laboratório de Fitossanidade, que fica ao lado do Laboratório de Biotecnologia e Propagação Vegetal, já que esse possui toda a infraestrutura e equipamentos necessários, como autoclave, balança analítica, pHmetro, agitador, entre outros.

2.2.2 Implantação do experimento

Após a concretização do Laboratório de Biotecnologia e Propagação Vegetal e sala de crescimento nas dependências do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS), Campus Ibirubá, deu-se início à produção de mudas de mirtilo por meio da técnica de micropropagação.

As plantas matrizes, onde foram retirados os explantes, estão cultivadas no pomar de mirtilos da instituição, localizado na área agrícola do Campus Ibirubá, sob as coordenadas geográficas 28°39'11"S 53°06'41"W, e possuem cerca de seis anos e meio de idade. O pomar de mirtilos foi instalado no Campus no ano de 2020 com o total de 48 plantas, sendo 24 da cultivar Bluegem e 24 da cultivar Climax, ambas pertencentes ao grupo Rabbiteye, dispostas por meio de um delineamento experimental inteiramente casualizado.

Um projeto de pesquisa (submetido no ano de 2020), envolvendo quatro lâminas de irrigação (Figura 4), foi a motivação inicial para a implantação da espécie no Campus. Após o término desse projeto, todas as plantas que compõem o pomar recebem, igualmente, os tratamentos culturais necessários para a condução da cultura, como irrigação, poda e controle de plantas daninhas.

Figura 4 - Pomar de mirtilos do IFRS - Campus Ibirubá



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

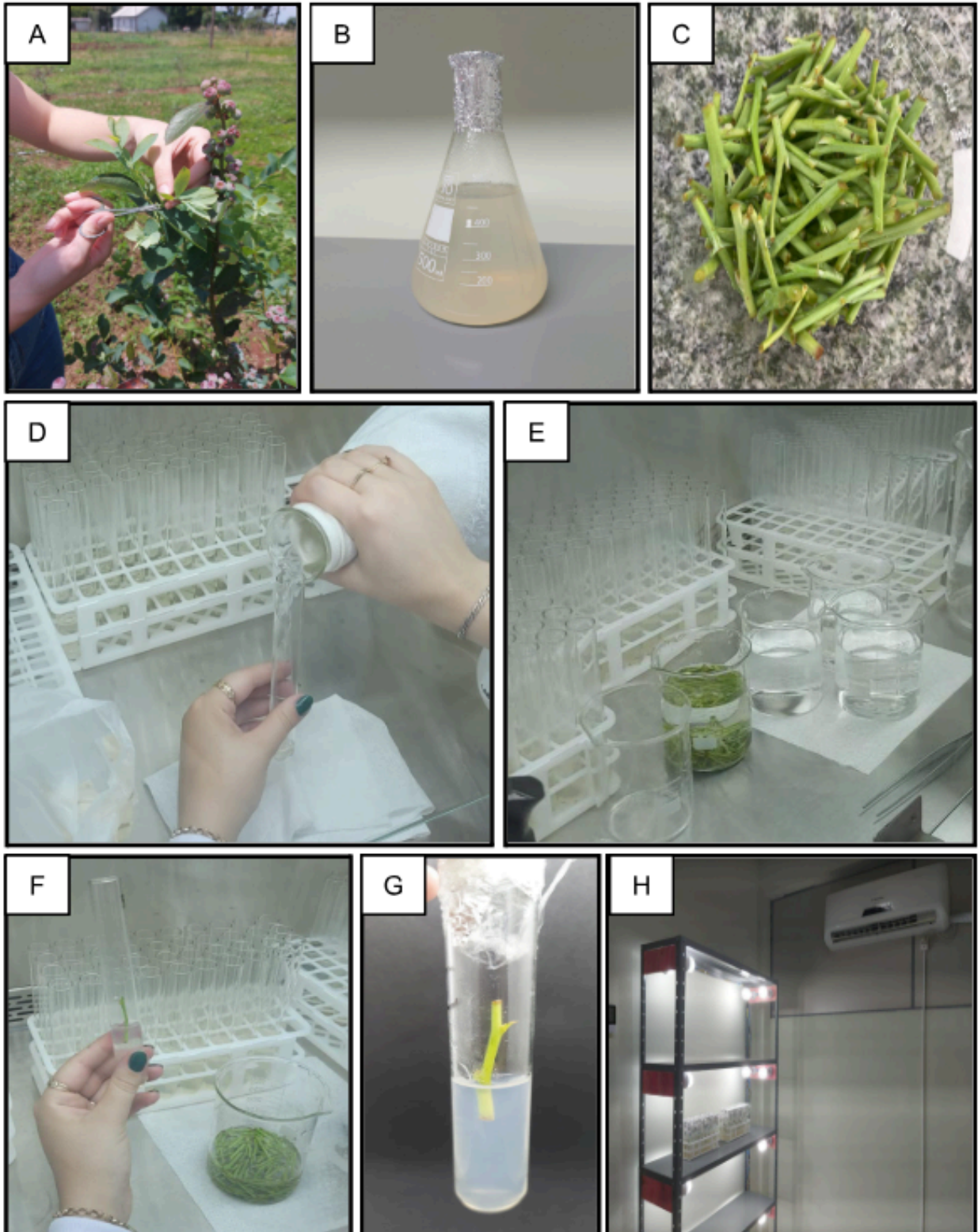
A primeira etapa da micropropagação ocorreu com a retirada dos explantes da planta mãe, denominados de microestacas (Figura 5A). No presente trabalho, foram coletados explantes dos dois cultivares do grupo Rabbiteye: Bluegem e Clímax. Os explantes foram provenientes das brotações apicais e herbáceas da planta, com presença de gemas vegetativas (Figura 5C), e foram mantidos em caixas térmicas com água destilada para evitar desidratação.

Para o estabelecimento das plantas *in vitro*, utilizaram-se tubos de ensaio (150 x 20 mm) autoclavados, completos com dois dedos de meio de cultura para nutrir as microestacas (Figura 5D).

Para o mirtilo, o principal meio de cultura utilizado é o WPM (planta de madeira média), da marca Himedia, que possui em sua composição 6 macronutrientes, 7 micronutrientes, 4 vitaminas e 1 aminoácido, e mio-inositol (para captação de glicose), acrescido de 1 mg/L de citocinina 6-Benzilaminopurina (hormônio vegetal promotor de divisão celular), 30 g/L de sacarose e 8 g/L de ágar para solidificar o meio líquido. O pH do meio de cultivo foi ajustado próximo a 5,0 antes da adição do ágar, através de titulação com ácido clorídrico (HCl) ou Hidróxido de Sódio (NaOH) para diminuir ou aumentar o pH do meio, respectivamente. Após a dissolução do ágar, o meio foi autoclavado a uma temperatura de 120 °C, sob pressão de 1,5 atm por 20 minutos.

Todo o processo metodológico realizado para micropropagação de mirtilo visando analisar duas técnicas de assepsia está demonstrado na Figura 5.

Figura 5 - Etapas do estabelecimento *in vitro*: Retirada dos explantes da planta-mãe de mirtilo (A); Meio de cultivo WPM (B); Processo de toalete e retirada das folhas (C); Passagem do meio de cultivo para os tubos de ensaio autoclavados (D); Assepsia dos explantes (E); Colocação dos explantes no meio de cultivo, dentro dos tubos de ensaio (F); Fechamento dos tubos de ensaio (G); Alocação dos explantes na sala de crescimento (H)



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Os explantes coletados foram transportados até o laboratório e no mesmo dia passaram por um processo de toailete, que consistiu em retirar as folhas na altura do pecíolo e deixar do tamanho aproximado de dois a três centímetros, contendo duas a três gemas (Figura 5C).

Sob a câmara de fluxo laminar desinfetada com álcool 70% iniciou-se o processo de estabelecimento dos explantes *in vitro*. Previamente, verteu-se cerca de dois dedos do meio de cultivo nos tubos de ensaio autoclavados, aguardando sua solidificação (Figura 5D).

As microestacas passaram por um processo de desinfecção, essencial para eliminar possíveis contaminantes presentes nos tecidos das plantas, como fungos e bactérias. Sendo assim, o presente trabalho baseou-se em dois tratamentos: Tratamento 1 (álcool 70%; Hipoclorito de Sódio, proporção 50% diluído em água; água destilada e autoclavada) e Tratamento 2 (álcool 70%; Hipoclorito de Sódio, proporção 50% diluído em água + Tween 20; água destilada e autoclavada) (Figura 5E).

Ambos os tratamentos consistiram em mergulhar os explantes em duas soluções: a primeira de álcool 70% por cerca de 10 segundos, e a segunda solução de Hipoclorito de Sódio, proporção 50% diluído em água, permanecendo por cerca de 10 minutos. No Tratamento 2, fez-se a adição de 3 gotas de Tween 20 a cada 100 mL da solução de Hipoclorito de Sódio, agindo como detergente e emulsificante, com o objetivo de facilitar o contato dos agentes esterilizantes com o tecido, reduzindo a tensão superficial. Em seguida, os explantes foram enxaguados com água destilada e autoclavada durante três vezes para retirar demais resíduos, esperando-se a obtenção de uma cultura livre de contaminantes.

Os instrumentos como pinças e tesouras foram, no momento do uso esterilizados com álcool 96%, sendo periodicamente flambados durante os processos. Além disso, para o manuseio dos explantes e desinfecção, foram utilizadas placas de Petri e Becker de vidro autoclavados.

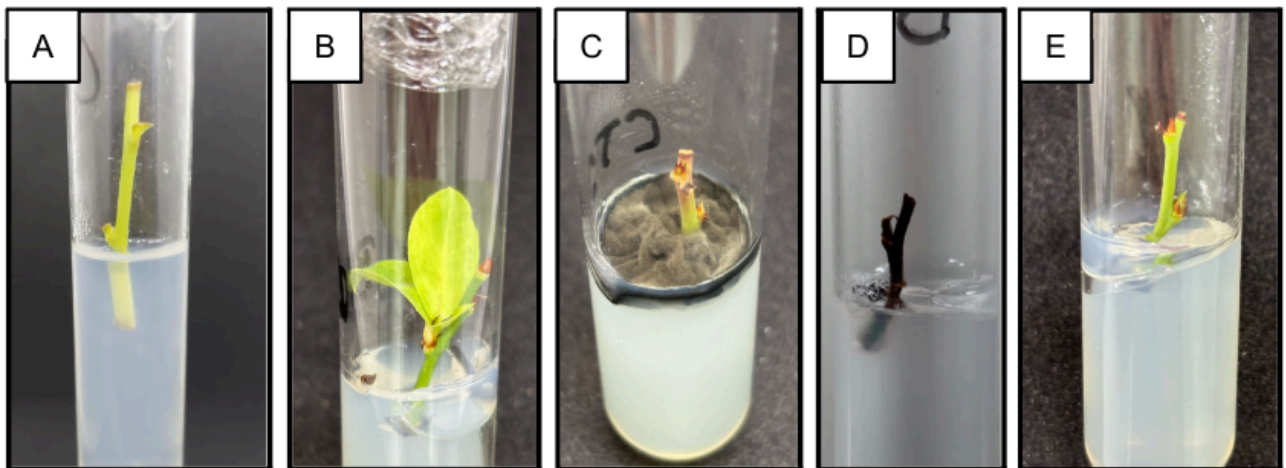
Após o processo de assepsia, foi alocado um explante para cada tubo de ensaio, na posição vertical (Figura 5F). Os tubos de ensaio tiveram o bocal selado com papel alumínio e filme plástico PVC (Figura 5G). Cada tubo de ensaio, com um explante, compôs uma unidade experimental.

Os tubos de ensaio foram dispostos em suporte de tubos de ensaio, distribuídos aleatoriamente nas estantes dentro da sala de crescimento (Figura 5H), sob delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2 (2 cultivares x 2 tratamentos) com 15 repetições, totalizando 60 unidades experimentais.

2.2.3 Avaliações do experimento

Nos primeiros sete dias de cultivo, os explantes permaneceram no escuro, a fim de reduzir o processo de oxidação. Aos 60 dias de cultivo *in vitro*, os explantes de cada tratamento testado foram avaliadas quanto: i) à porcentagem de contaminação fúngica e/ou bacteriana; ii) porcentagem de explantes oxidados, a qual foi determinada pela coloração verde do tecido vegetal; iii) número de brotações e número de folhas, através da contagem e análise visual; iv) reatividade dos explantes, definido pelo desenvolvimento das brotações no explante, para o qual adotou-se uma escala numérica, onde o explante reativo: 100, explante não reativo: 10; e explante sem vida: 0 (Figura 6).

Figura 6 - Aspecto dos explantes de mirtilo aos 60 dias após estabelecimento *in vitro*: Explante recém estabelecido (A); Explante reativo (B); Explante contaminado por fungos (C); Explante oxidado (D); Explante não reativo (E)

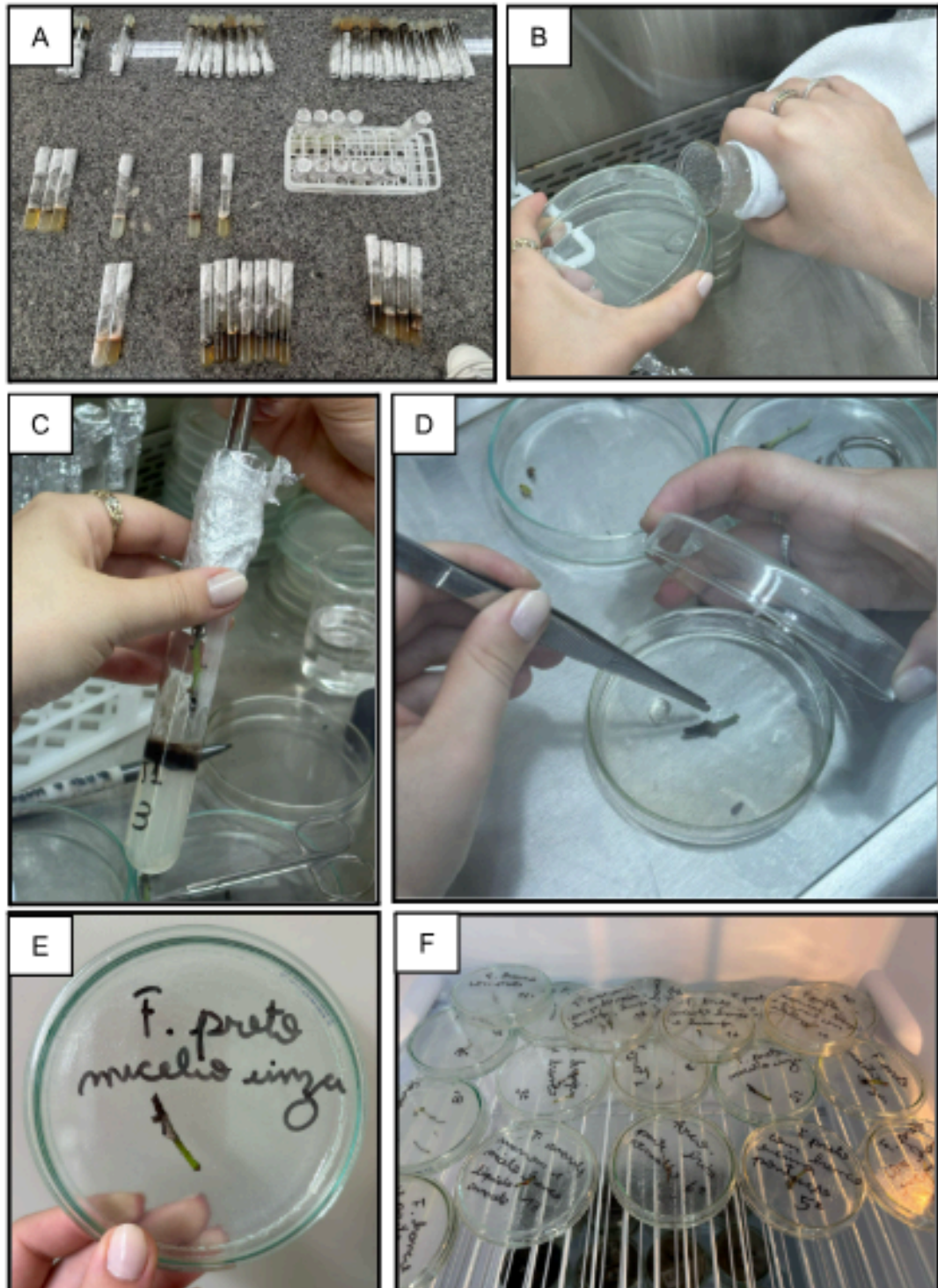


Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Quando completados os 60 dias, procedeu-se a técnica de isolamento dos microrganismos contaminantes presentes nos tubos de ensaio/explantes. Para tal, fragmentos do explantes foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata dextrose ágar) e mantidos em incubadora B.O.D., a 25°C, com o

objetivo de multiplicar o patógeno em colônia pura para posterior identificação desses (Figura 7).

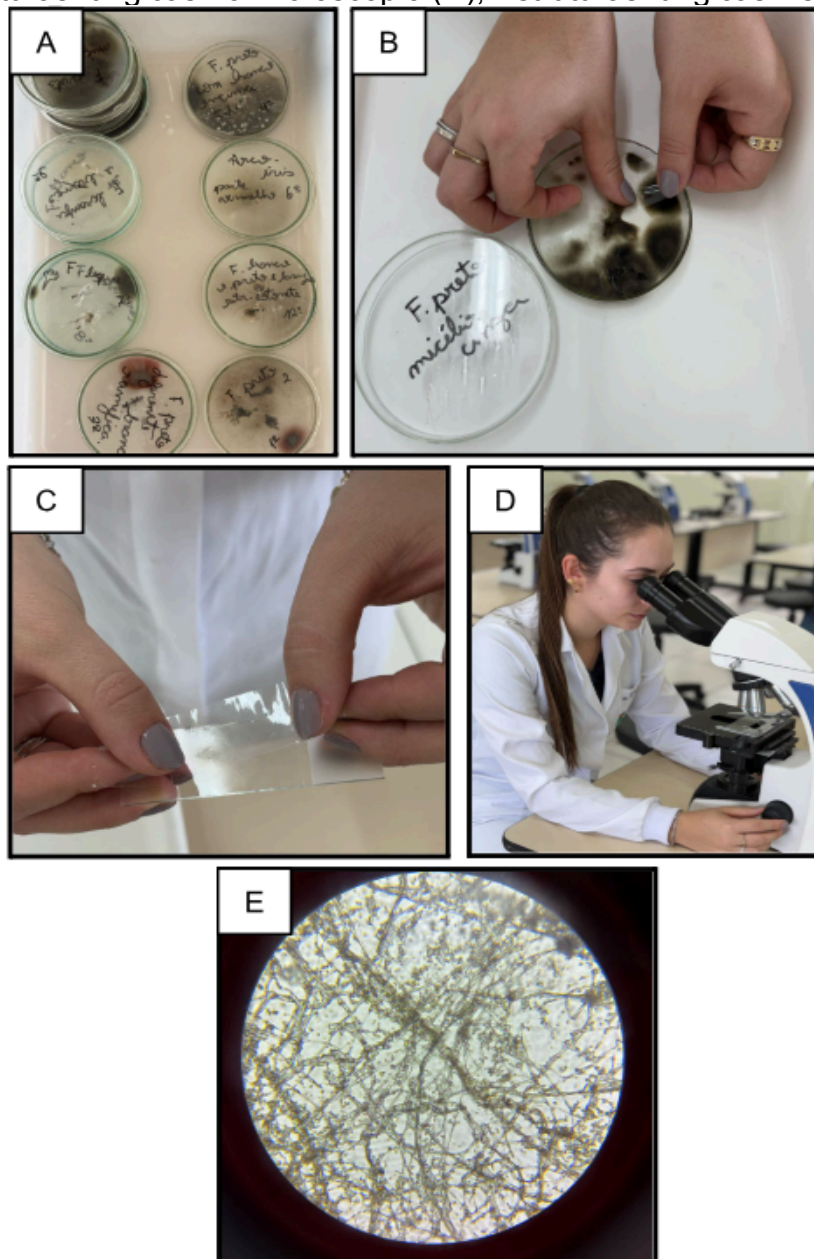
Figura 7 - Isolamento dos fungos contaminantes: Separação dos fungos semelhantes visualmente (A); Meio BDA vertido nas placas de Petri (B); Retirada do explante contaminado (C); Semeadura do explante contaminado (D); Identificação das placas de Petri (E); Alocação das placas de Petri em Incubadora B.O.D (F)



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Após 7 dias de plaqueamento e isolamento dos patógenos nas placas de Petri, houve crescimento microbiano e a partir da estrutura microbiana realizou-se o preparo de lâminas de observação microscópica. Desse modo, as estruturas fúngicas como micélios, estruturas de frutificação e esporos foram observadas e confrontadas com a literatura, buscando realizar a identificação do patógeno (Figura 8).

Figura 8 - Preparação da lâmina de observação microscópica: Separação dos fungos semelhantes visualmente (A); Coleta da amostra fúngica com fita adesiva (B); Colagem da fita adesiva na lâmina de observação (C); Observação das estruturas fúngicas no microscópio (D); Estruturas fúngicas visíveis (E)



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

2.2.4 Análise estatística

Os resultados das avaliações (porcentagem de contaminação fúngica e/ou bacteriana; porcentagem de explantes oxidados; número de brotações; número de folhas e reatividade dos explantes) foram submetidos à análise de variância, a 5% de probabilidade de erro através do software Sisvar. Quando a análise de variância demonstrou significância das causas de variação sobre as variáveis, as médias foram comparadas utilizando-se Teste T, a 5% de probabilidade de erro. Não foi realizada análise estatística sobre a identificação dos patógenos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análise de variância (ANOVA) elaborou-se um quadro resumo, que está apresentado na Tabela 2, para o valor-p de acordo com a variável analisada e as causas de variação.

Tabela 2 - Resumo da análise de variância (valor-p) referente às variáveis número de brotos (NB), contaminação (Cont), oxidação (Oxi), número de folhas (NF) e reatividade (Reat) em função dos cultivares de mirtilo e técnicas de assepsia.

Fonte de variação	GL	Valor-p				
		NB	Cont	Oxi	NF	Reat
Cultivar (Fator A)	1	0,0026*	0,7296	0,0033*	0,0089*	0,0026*
Técnica de assepsia (Fator B)	1	0,7273	0,0879	0,1687	0,5898	0,8499
A x B	1	0,7273	0,0182*	0,4063	0,8572	0,5707
CV (%)		200,94	45,50	111,10	225,55	162,98

*Significativo a 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Conforme resumo da ANOVA (Tabela 2), observou-se efeito significativo ($p < 0,05$) do fator cultivar sobre o número de brotos, porcentagem de oxidação, número de folhas e reatividade. A técnica de assepsia não influenciou nenhuma das variáveis analisadas. A interação entre cultivar e técnica de assepsia influenciou na porcentagem de contaminação.

A influência dos cultivares sobre o número de brotos, porcentagem de oxidação, número de folhas e reatividade (Tabela 3), pode ser explicada pela variabilidade genética entre os cultivares Bluegem e Clímax. A genética pode conferir maior ou menor susceptibilidade a contaminantes e ao estresse oxidativo em condições *in vitro*, bem como capacidade de se estabelecer e emitir brotações. Conforme apresentado na Tabela 3, melhores resultados foram obtidos na cultivar Bluegem.

Tabela 3 - Médias de porcentagem de oxidação (Oxi), reatividade (Reat), número de brotos (NB) e número de folhas (NF) dos cultivares Bluegem e Clímax.

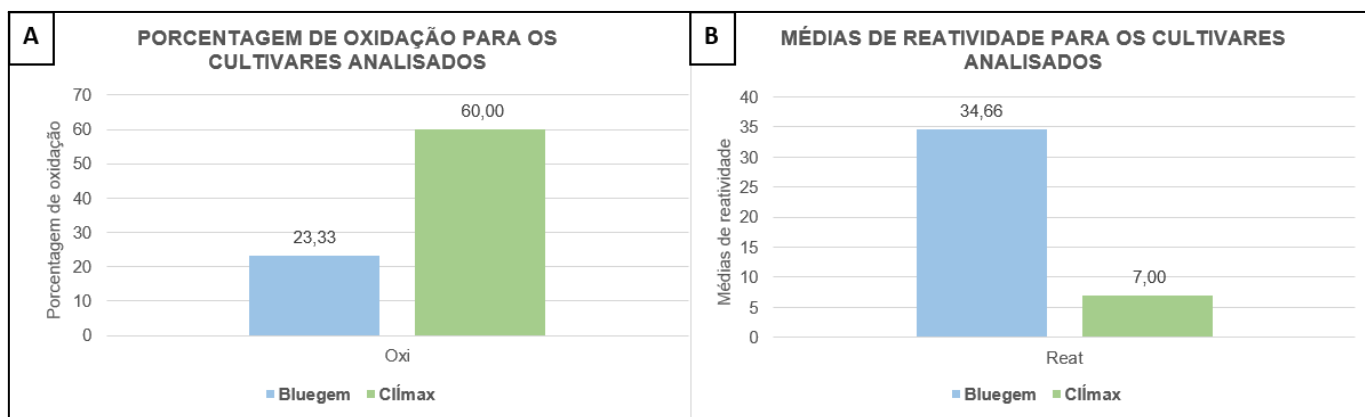
Cultivar	Oxi	Reat	NB	NF
Bluegem	23,33%*	34,66*	0,33*	1,13*
Clímax	60,00%	7,00	0,03	0,13

*Diferem-se pelo Teste T, a 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

A oxidação e a reatividade dos explantes são fatores que determinam sua sobrevivência *in vitro* e, conseqüentemente, o sucesso da micropropagação. Altas taxas de oxidação e não reatividade dos explantes resultam em perdas de material propagativo e diminuição da capacidade de propagação massal de plantas (Carvalho, 2006). Na figura 9 estão apresentadas a porcentagem de oxidação e escala de reatividade para os cultivares Bluegem e Clímax.

Figura 9 - Porcentagem de oxidação (Oxi) (A) e escala de reatividade (Reat) (B) dos explantes dos cultivares de mirtilo Bluegem e Clímax estabelecidos *in vitro*.



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Algumas cultivares tendem a produzir maior quantidade de compostos fenólicos, o que aumenta o processo oxidativo (que causa morte do tecido do explante), principalmente após cortes dos tecidos das plantas. No presente estudo, a maior de porcentagem de oxidação (60,00%) ocorreu na cultivar Clímax, em comparação à cultivar Bluegem (23,33%), não sendo uma característica favorável à cultivar Clímax pois a oxidação acarreta em perda de material do cultivo *in vitro*. De

acordo com Flores et al. (1998), a oxidação fenólica é um entrave que pode dificultar o estabelecimento inicial dos explantes.

O processo oxidativo dos explantes vegetais também por ser influenciado por características da planta mãe, luz, temperatura e pelos métodos de assepsia. Silva et al. (2006) trabalhando com estabelecimento *in vitro* de mirtilo, observaram maior porcentagem de oxidação nos explantes provenientes de material vegetal do campo (12%), comparado aos explantes isolados de plantas da casa de vegetação (0,08%). Também, Jaakola et al. (2001) afirmam que os explantes podem oxidar e morrer dependendo da intensidade de esterilização utilizada para evitar a contaminação.

Segundo Grattapaglia e Machado (1998), a oxidação é um problema particularmente sério no isolamento de explantes de espécies lenhosas, cujos tecidos são mais ricos em compostos fenólicos, precursores da síntese de lignina. Alternativamente, a acomodação dos explantes na ausência de luz nos sete primeiros dias de estabelecimento *in vitro* ajuda a evitar a oxidação fenólica (Dutra; Wendling; Brondani, 2009).

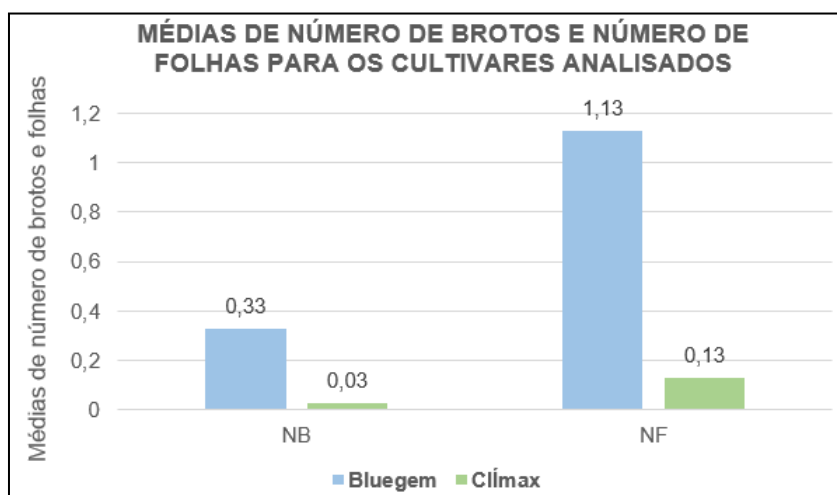
A cultivar Clímax, além de maior oxidação, obteve menor reatividade dos explantes (7,00), em comparação a cultivar Bluegem (34,66), conforme Figura 9. A reatividade dos explantes é determinada pela existência de brotações, conseqüentemente, refere-se ao estabelecimento completo do explante. Quando o explante permanece na coloração verde, porém não são observadas brotações à medida em que os dias de cultivo avançam, o explante é considerado não reativo, devendo ser descartado. Apesar dos explantes se manterem vivos, observado pela manutenção da coloração verde (Erig e Schuch, 2005), essa ausência de resposta não é desejável durante a fase de estabelecimento *in vitro*, uma vez que as brotações são necessárias ao prosseguimento do processo de micropropagação.

Dados referentes à reatividade de explantes de mirtilos são escassos na literatura. Na cultura de eucalipto, Borges (2009) realizando micropropagação com clones híbridos de *Eucalyptus globulus*, obteve altas taxas (até 80%) de explantes sem resposta à indução de brotações, ou seja, não reativos.

Para o sucesso da micropropagação, é essencial a formação de brotos e, conseqüentemente, folhas. Estes fatores indicam o pleno estabelecimento do explante, estando este adequado às condições *in vitro* e preparado para as próximas fases da micropropagação. A Figura 10 apresenta as médias de número de brotos e

número de folhas observados nos cultivares Bluegem e Clímax, 60 dias após estabelecimento *in vitro*.

Figura 10 - Médias de Número de brotos (NB) e Número de folhas (NF) para os cultivares de mirtilo Bluegem e Clímax, 60 dias após o estabelecimento *in vitro*.



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Em relação ao número de brotos, a cultivar Bluegem obteve média superior (0,33) à cultivar Clímax (0,03), sendo possível observar grande diferença entre os cultivares neste quesito. O número de brotações é uma importante resposta quando se pensa em produção comercial, já que reflete na quantidade de explantes que poderão ser retirados e multiplicados a partir de um único explante, possibilitando multiplicação em grande escala e em curto espaço de tempo (Ferri, 2008).

Em trabalho realizado por Ferri (2008), estudando as posições de colocação dos explantes no meio, a cultivar Bluegem apresentou maior número médio de brotações (1,8), aos 60 dias, em comparação com as cultivares Woodard (1,0) e Bluebelle (1,6), que apresentaram menor número médio de brotações quando estabelecidas na posição vertical. Quando a posição do explante foi horizontal a cultivar Bluegem também apresentou maior número médio de brotações (2,8) quando comparadas com as cultivares Bluebelle e Woodard (1,5 e 0,8 respectivamente). No presente estudo, a posição de estabelecimento dos explantes foi vertical.

Gomes e Canhoto (2003) obtiveram média de 10% de explantes com brotações para segmentos nodais de *Eucalyptus nitens*. Os autores atribuíram a baixa indução de brotações ao alto nível de contaminação, que foi superior a 50%.

Do mesmo modo, para a variável número de folhas, a cultivar Bluegem destacou-se com média 1,13, obtendo vantagem expressiva sobre a cultivar Clímax, com média 0,13 (Figura 10).

Em relação à contaminação, houve interação entre os fatores cultivar e técnica de assepsia (Tabela 2). Com a utilização da técnica de assepsia referente ao tratamento 2 (álcool 70%; Hipoclorito de Sódio, proporção 50% diluído em água + Tween 20; água destilada e autoclavada), acrescido de Tween 20, houve menor incidência de contaminação para a cultivar Bluegem, obtendo uma média de 60%, inferior ao Tratamento 1, onde ocorreu 100% de contaminação, conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4 - Porcentagem de contaminação dos explantes de mirtilo das cultivares Bluegem e Clímax em função dos tratamentos de assepsia.

Cultivar	Técnica de assepsia		Média
	Tratamento 1	Tratamento 2	
Bluegem	100,0 Ba*	60,0 Aa	80,0
Clímax	80,0 Aa	86,6 Aa	83,3
Média	90,0	73,3	

*Valores médios com letras maiúsculas equivalentes na linha e letras minúsculas equivalentes na coluna não diferem significativamente entre si pelo Teste T em nível de 5%.

Tratamento 1: álcool 70%; Hipoclorito de Sódio, proporção 50% diluído em água; água destilada e autoclavada

Tratamento 2: álcool 70%; Hipoclorito de Sódio, proporção 50% diluído em água + Tween 20; água destilada e autoclavada

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Com o objetivo de facilitar o contato dos agentes esterilizantes com o tecido vegetal, o Tween 20, por meio da redução da tensão superficial, se mostrou eficaz quando em conjunto com os produtos desinfetantes para a assepsia da cultivar Bluegem, apresentando resultados satisfatórios.

A interação significativa entre cultivar e técnica de assepsia, observada para a variável porcentagem de contaminação, sugere que a eficácia de cada técnica de assepsia pode variar dependendo do genótipo da cultura. Isso implica que a escolha da técnica de assepsia ideal pode ser cultivar-específica, demandando uma avaliação mais detalhada para cada material genético. Entretanto, a ausência de efeito significativo das técnicas de assepsia isoladamente para a maioria das variáveis pode indicar que as técnicas avaliadas possuem uma eficácia geral similar,

ou que seu efeito manifesta-se de forma diferenciada em função do cultivar, como observado na interação para contaminação. Ainda, a susceptibilidade dos materiais genéticos às doenças e, conseqüentemente, a sanidade do pomar das plantas matrizes também é um fator a ser considerado na escolha da técnica de assepsia e nos resultados obtidos referentes à contaminação dos explantes *in vitro*.

Devido à alta taxa de contaminação observada em ambas as cultivares (Tabela 4), qualquer fator que interfira e diminua a possibilidade de contaminação torna-se satisfatório para os estudos acerca da micropropagação.

Borges (2009) realizando micropropagação com *Eucalyptus globulus*, obteve uma contaminação por bactérias chegando a 72,5%, sendo superior a 30% para a maioria dos explantes. Na terceira introdução *in vitro*, todos os explantes apresentaram contaminação por fungos. Destaca-se que neste trabalho, fez-se aplicação com fungicidas nas plantas matrizes dois dias antes da coleta. Também, os explantes coletados foram imersos em solução fungicida, além de passarem pelas técnicas de desinfecção.

Por outro lado, Ferri (2008) concluiu que a contaminação dos explantes não representaram obstáculos para o estabelecimento *in vitro* das cultivares de mirtilo Florida e Powderblue, com uma porcentagem de contaminação fúngica de 5,3%, em média, e contaminação bacteriana praticamente nula, ocorrendo, em média, em apenas 0,6 % dos explantes. A autora realizou a esterilização superficial dos explantes com álcool 70% por 10 segundo, seguido da desinfestação em solução de hipoclorito de sódio por 5 min e posteriormente os explantes foram lavados em água estéril. Os ramos doadores foram retirados de plantas matrizes provenientes do pomar.

De acordo com Sharma e Ramamurthy (2000) para o sucesso da micropropagação é necessário que os explantes emitam brotações livres de contaminação. Do mesmo modo, Montarroyos (2000) ressalta que a condição fitossanitária da planta-matriz determina o grau de facilidade do processo de eliminação de microrganismos contaminantes existentes no explante, ou seja, quando as plantas matrizes são cultivadas em ambiente protegido espera-se que haja baixa contaminação durante a fase de estabelecimento *in vitro* (Ferri, 2008).

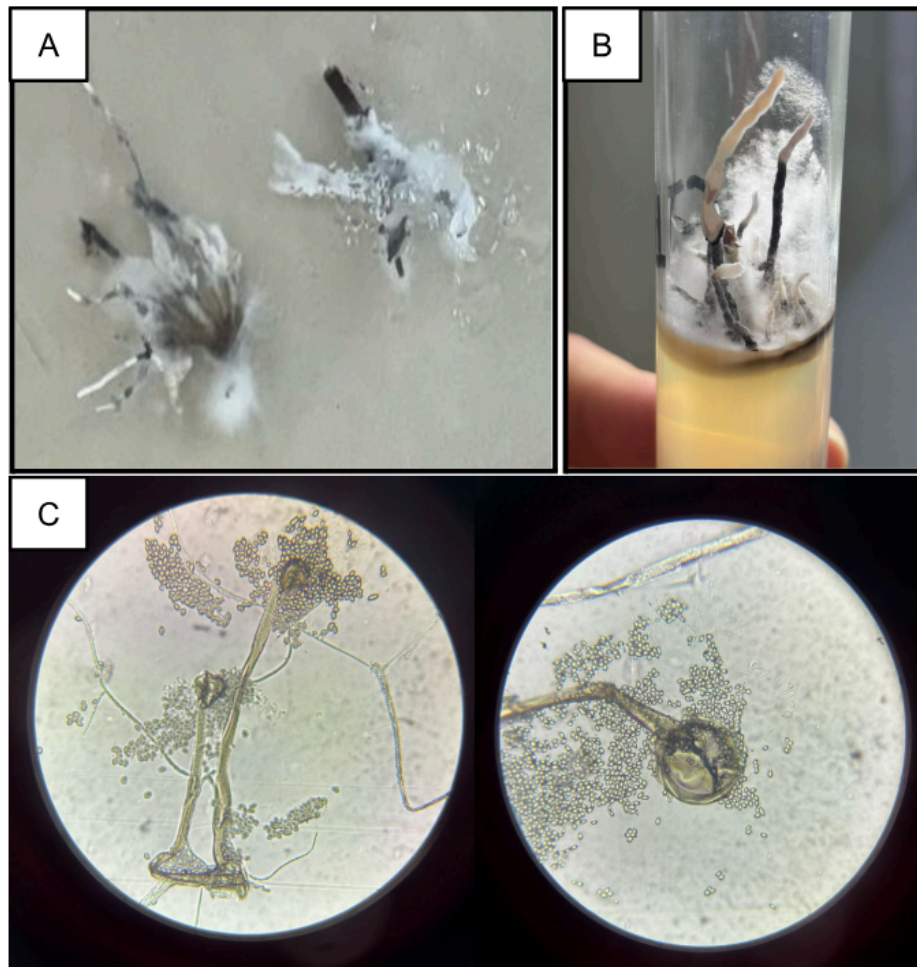
Sendo assim, a manutenção das plantas-matrizes em ambiente asséptico e protegido como casa de vegetação, segundo Grattapaglia e Machado (1998) é uma medida preventiva contra a contaminação dos explantes. Entretanto, no presente

trabalho as plantas matrizes são cultivadas no campo. Desse modo, as plantas ficam sujeitas à infecção por microrganismos, o que pode ter interferido na contaminação dos explantes. Apesar de não haver sintomas de doenças nas plantas do pomar, os microrganismos estão presentes de maneira endógena.

No presente estudo foi possível constatar apenas a presença de contaminação fúngica. Deste modo, após proceder técnica de isolamento dos fitopatógenos em placas de Petri, preparação de lâminas com suas estruturas, mediante a observação microscópica e confronto com informações de literatura, identificou-se a ocorrência de quatro fungos de origem endógena da planta matriz: *Phomopsis/Diaporthe* spp., *Fusicoccum/Botryosphaeria* spp., *Rhizopus* spp. e *Alternaria* spp. (Hilário et al., 2021; Zimowska et al, 2014; Paiva, 2020; Xiaozhe et al., 2023)

O fungo *Phomopsis* spp. (fase sexuada) ou *Diaporthe* spp. (fase assexuada) é causador da chamada requeima dos ramos em mirtilo, e pertence ao filo Ascomycota. A espécie identificada na cultura do mirtilo é a *Phomopsis vaccinii* (Cruz, 2019). Através do isolamento do patógeno nas placas de Petri, observou-se a presença de um micélio felpudo branco (massa colonial) com a presença de pescoços periteciais, ou seja, estruturas que fazem parte do peritécio ou picnídio (corpo frutificante) que permite a saída dos ascósporos (esporos sexuais) ou conídios (esporos assexuais). No microscópio observou-se a presença dos esporos do patógeno dentro e em torno dos ascos. Os ascos encontram-se contidos em estruturas maiores chamadas peritécios, que são estruturas globosas que liberam os esporos (Figura 11).

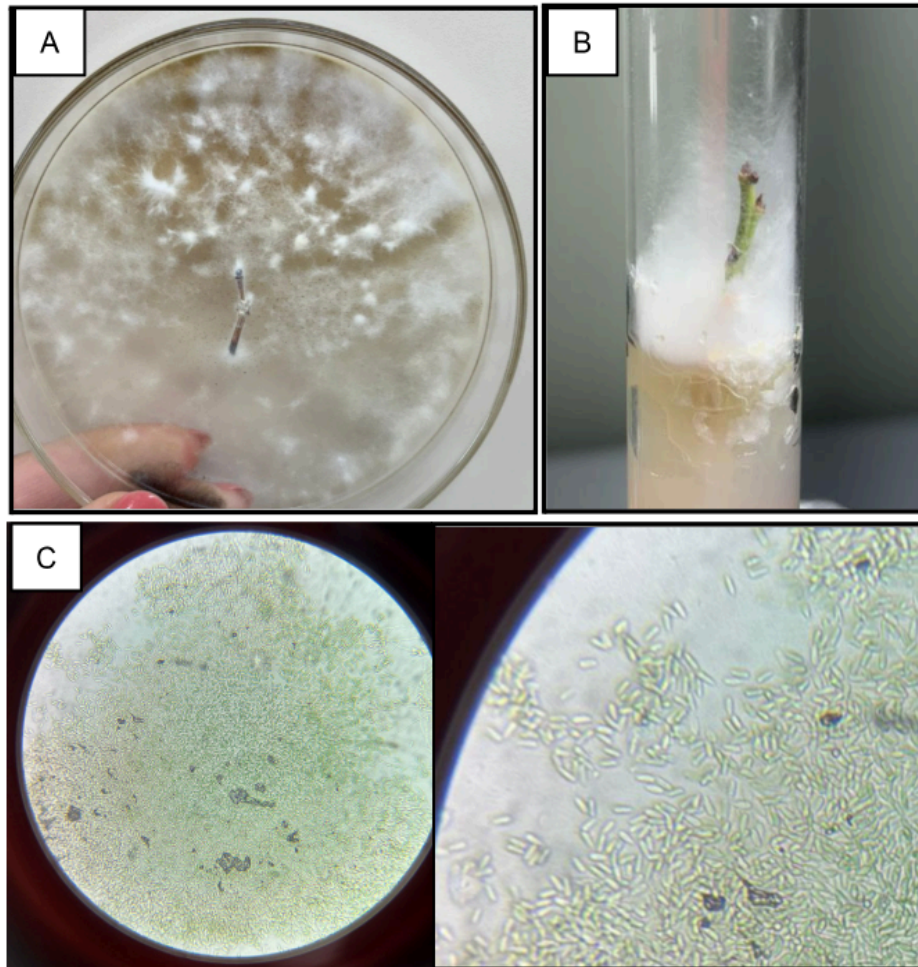
Figura 11 - Patógeno *Phomopsis/Diaporthe* spp.: Colonização do fungo na placa de petri (A); Colonização do fungo no tubo de ensaio em conjunto ao explante de mirtilo (B); Observação no microscópio das estruturas do patógeno (C)



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Outra visualização foi do fungo *Fusicoccum* spp. (fase assexual) ou *Botryosphaeria* spp. (fase sexual), sendo este causador da doença cancro do colo do mirtilo. O fungo faz parte do filo Ascomycota e possui característica de apresentar micélio esparso e moderadamente denso com coloração branco-creme. No microscópio constatou-se a presença de conídios típicos de *Fusicoccum*, ou seja, lisos, hialinos, fusiformes e unicelulares (Figura 12).

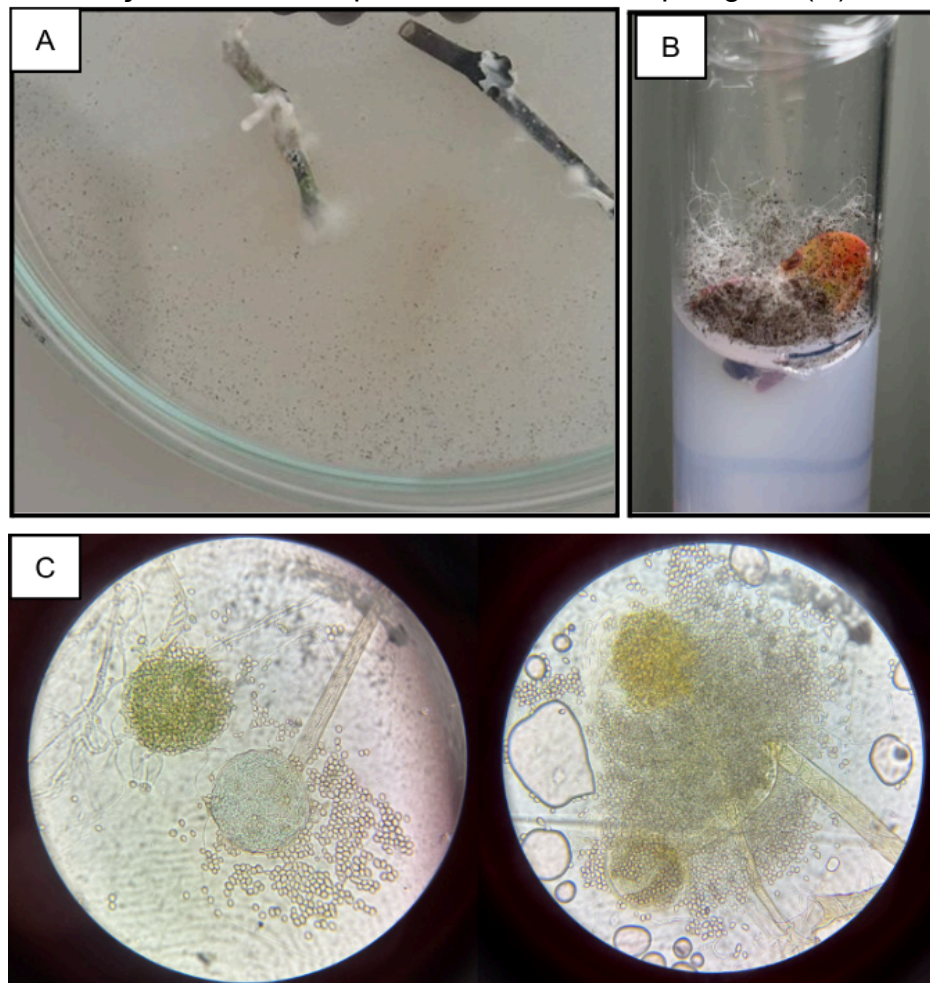
Figura 12 - Patógeno *Fusicoccum/Botryosphaeria* spp.: Colonização do fungo na placa de petri (A); Colonização do fungo no tubo de ensaio em conjunto ao explante de mirtilo (B); Observação no microscópio das estruturas do patógeno (C)



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

O patógeno *Rhizopus* spp., causador de podridão dos frutos principalmente na pós colheita, também foi identificado como contaminante dos explantes. Este pertence ao filo Zygomycota, apresentando micélio filamentososo de cor branca-acinzentada, com colônias de textura algodoadas. Tanto nos tubos de ensaio quanto nas placas de petri observou-se a presença de pontuações pretas a olho nu, denominadas esporangióforos, que são hifas especializadas que armazenam os esporângios (estruturas onde são formados os esporos). No microscópio visualizou-se ambas as estruturas, bem como os esporangiósporos (esporos assexuados) (Figura 13).

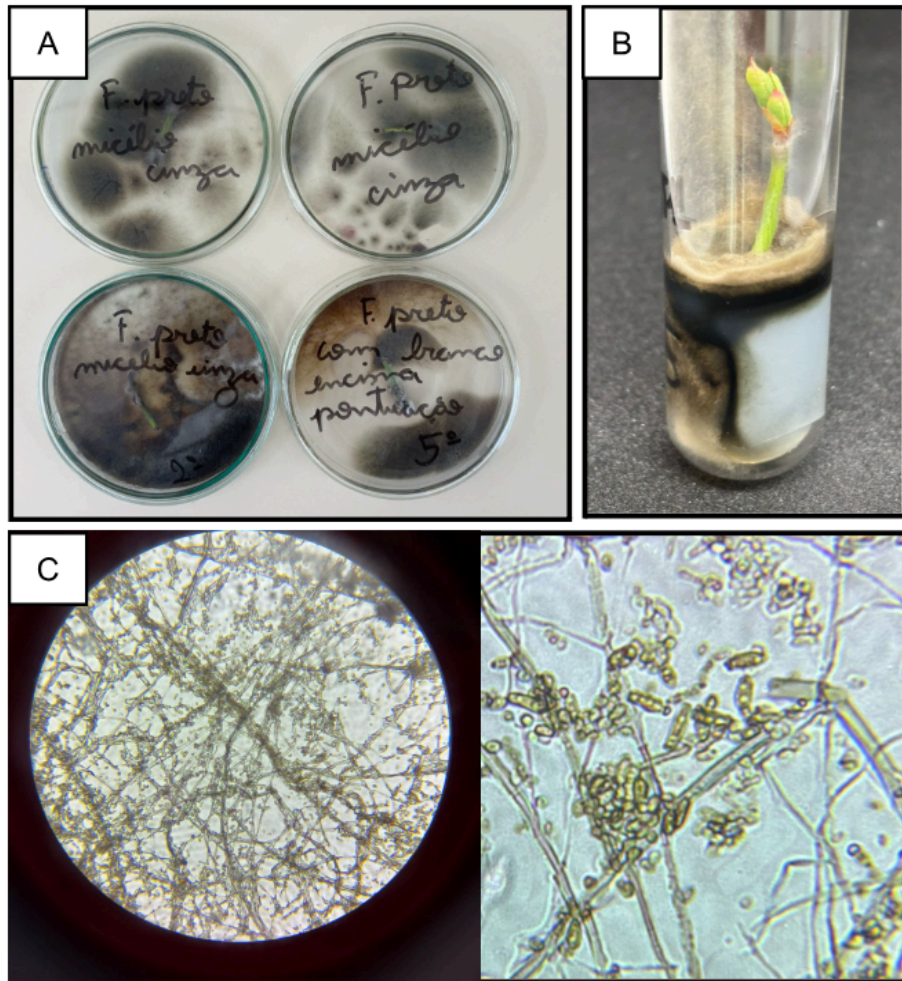
Figura 13 - Patógeno *Rhizopus* spp.: Colonização do fungo na placa de petri (A); Colonização do fungo no tubo de ensaio em conjunto ao explante de mirtilo (B); Observação no microscópio das estruturas do patógeno (C)



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Alternaria spp. foi o fungo de maior ocorrência de contaminação dos explantes do presente experimento. A campo, o patógeno é causador de podridão dos frutos e manchas foliares. Na cultura do mirtilo foi assinalada a espécie *Alternaria tenuissima* (Cruz, 2019), pertencente ao filo Ascomycota. Nas placas de petri observou-se a colonização do fungo com padrão de crescimento em anéis concêntricos, coloração variando de marrom, cinza e preto com massa micelial felpuda e lanosa. No microscópio visualizou-se um emaranhado de hifas septadas de coloração marrom, com conídios ovoides, também septados, formados individualmente e em cadeias, características distintivas do patógeno (Figura 14).

Figura 14 - Patógeno *Alternaria* spp.: Colonização do fungo na placa de petri (A); Colonização do fungo no tubo de ensaio em conjunto ao explante de mirtilo (B); Observação no microscópio das estruturas do patógeno (C)



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Em relação à quantificação dos patógenos nas unidades experimentais dos explantes dos dois cultivares, o fungo *Phomopsis/Diaporthe* spp. apresentou-se em 4 explantes da cultivar Clímax, assim como o patógeno *Fusicoccum/Botryosphaeria* spp. que também teve evidência em 4 explantes do cultivar Clímax. Já o fungo *Rhizopus* spp. ocorreu em 3 explantes de Bluegem e 4 explantes de Clímax. Em maior quantidade, o patógeno *Alternaria* spp. ocorreu em 22 explantes do cultivar Bluegem e 12 explantes do cultivar Clímax.

Apesar do grande foco de contaminação, para alguns explantes a presença do fungo não afetou seu desenvolvimento, permitindo a formação de brotos. No caso do cultivar Bluegem, 5 explantes contaminados com *Alternaria* spp. desenvolveram brotações viáveis. Entretanto, com o inóculo já instalado no explante, este segue sendo transferido juntamente com a parte vegetal para as próximas fases da

micropropagação, não sendo algo benéfico e preferível. Ainda, obteve-se 11 explantes sem contaminação, destes 4 Bluegem e 1 Clímax emitiram brotações viáveis, e 2 Bluegem e 4 Clímax não manifestaram reatividade.

4 CONCLUSÕES

Considerando as condições experimentais e com base nos resultados obtidos no estudo de micropropagação de mirtilo com os cultivares Clímax e Bluegem, avaliando duas técnicas de assepsia, foi possível concluir que:

- A instalação de um laboratório de Biotecnologia e Propagação Vegetal, bem como sala de crescimento, foi de suma importância para o IFRS Campus Ibirubá, para condução deste experimento.
- A identificação de cultivares com menor taxa de contaminação e oxidação é crucial para o sucesso do estabelecimento *in vitro* e para a propagação eficiente da espécie.
- Não se visualizou contaminação por bactérias em ambos cultivares.
- O cultivar Bluegem apresentou maior número de brotos e folhas, teve menos oxidação de explantes e maior reatividade em comparação à cultivar Clímax.
- O cultivar Bluegem apresentou melhor estabelecimento e desenvolvimento em ambos os tratamentos, apresentando menor oxidação, maior reatividade e número de brotos e folhas, destacando-se no Tratamento 2, com o uso de Tween 20, onde houve menor contaminação.
- O Tween 20 é eficiente no processo de assepsia, diminuindo a incidência de contaminação dos explantes para o cultivar Bluegem.
- Em termos gerais, o Tratamento 2 foi satisfatório para o estabelecimento do cultivar Bluegem.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E.P. et al. Efeito do tipo de explante e de reguladores de crescimento no desenvolvimento in vitro de cultivares de mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. Cruz das Almas, n.2, v.19, p.213-219, 1997.
- AMORIM, L. et al. **Manual de Fitopatologia : Doenças das Plantas Cultivadas**. Vol. 2., 5. ed. Ceres : Ouro Fino - MG, 2016. 810 p.
- ANDRADE, Wirifran Fernandes de; ALMEIDA, Marcílio de; GONÇALVES, Antônio Natal. Multiplicação in vitro de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 1715-1719, 2006.
- ANTUNES, Luis Eduardo Corrêa et al. Fenologia, produção e qualidade de frutos de mirtilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1011-1015, 2008.
- ANTUNES, Luis Eduardo Corrêa et al. **Produção brasileira de pequenas frutas: situação atual e perspectivas**. Congresso Brasileiro de Fruticultura. Encontro Nacional sobre fruticultura de clima temperado. Florianópolis. SBF: Epagri: UDESC: UFSC: Embrapa, 2022.
- ANTUNES, Luís Eduardo Corrêa; MADAIL, João Carlos Medeiros. Mirtilo: uma oportunidade de negócios. **Toda Fruta**, v. 27, p. 04-07, 2007.
- ARAGÃO, Ana Katarina Oliveira; ALOUFA, Magdi Ahmed Ibrahim; COSTA, Igor do Amaral. O efeito do BAP (6-benzilaminopurina) sobre a indução de brotos em explantes de pau-brasil. **Cerne**, v. 17, p. 339-345, 2011.
- ARRUDA, Ana Luiza et al. Posição dos explantes na multiplicação in vitro de mirtilo cultivar O'neal. **Revista da Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa-Congrega Urcamp**, Bagé, v. 14, p. 18, 2017.
- BERED, F. et al. Regeneração de plantas de aveia a partir de calos embriogênicos e organogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, p.1827- 1833, 1998.
- BORGES, Silvano Rodrigues. **Micropropagação e enraizamento de miniestacas de clones híbridos de Eucalyptus globulus**. 2009.
- BOWLING, B.L. **The Berry Grower's Companion**. Portland: Timber Press, 2005. 284 p.
- BUZETA, Andrés. Chile: **Berries para el 2000**. Departamento Agroindustrial. Fundación Chile, Santiago, 1997. 134p.
- CALDWELL, J.D. Blackberry propagation. **HortScience**, Alexandria, v.19, n.2, p.13-15, 1984.
- CAMARGO, Samila et al. Métodos de propagação e intensidades de poda na produção e qualidade de mirtilos cv. Bluegem. **Revista da Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa-Congrega Urcamp**, p. 1281-1292, 2018.

CANTUARIAS-AVILÉS, T. **Cultivo do mirtilo (*Vaccinium sp.*)**. Piracicaba: ESALQ, 2010. 38 p. (Série Produtor Rural, 48).

CANTUARIAS-AVILÉS, T. et al. Cultivo do mirtilo: atualizações e desempenho inicial de variedades de baixa exigência em frio no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, n.1, p.139-147, 2014.

CARVALHO et al. **Fatores inerentes à Micropropagação**. Embrapa Algodão. Documentos 148. Campina Grande, 2006. 28 p.

CARVALHO, J. M. F. C. **Técnicas de micropropagação**. 1999.

CHAVES, Anderson da Costa; SCHUCH, Márcia Wulff; ERIG, Alan Cristiano. Estabelecimento e multiplicação in vitro de *Physalis peruviana* L. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 1281-1287, 2005.

COTAÇÃO **05/06/2025**. Centrais De Abastecimento Do Rio Grande Do Sul. Disponível em: <<https://ceasa.rs.gov.br/cotacao-05-07-2024/>>. Acesso em: 05 de junho de 2025.

CHU, Wing-kwan et al. Mirtilo (*Vaccinium myrtillus* L.). **Fitoterapia**, v. 20115386, p. 55-71, 2011.

CONCENÇO, Fernanda Izabel Garcia da Rocha et al. Caracterização e avaliação das propriedades físico-químicas da polpa, casca e extrato de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*). **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 8, n. 1, 2014.

CRUZ, Nuno Alexandre Videira. **Implementação do sistema GlobalG. AP, numa exploração agrícola de Mirtilos**. 2019. Tese de Doutorado.

CULTURA: mirtilo; Classe: Fungos. AGROLINKFITO. Disponível em: <<https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/busca-simples-produto>>. Acesso em: 03 de abril de 2025.

DARNELL, R. L. **Blueberry botany/environmental physiology. Blueberries for growers, gardeners, promoters**. Florida: E. O. Painter Printing Company, 2006, p. 5-13.

DE PAULA QUEIROGA, Vicente et al. **Mirtilo (*Vaccinium spp.*) tecnologias de plantio em típicas regiões serranas**. Embrapa. Campina Grande: AREPB, 2021. 236 p.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A micropropagação de Eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 58, p. 49-59, jan-jun, 2009.

EHLLENFELDT, M. K. et al. Floral bud cold hardiness of *Vaccinium ashei*, *V. constablaei*, and hybrid derivatives and the potencial for producing Northern-adapted rabbiteye cultivars. **HortScience**, v.42, p.1131-1134, 2007.

ERIG, Alan Cristiano; DE ROSSI, Andrea; FORTES, Gerson Renan de Lucas. 6-benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira-preta (*Rubus idaeus* L.), cv. Tupy. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.5, p.765-770, 2002.

ERIG, Alan Cristiano; SCHUCH, Márcia Wulff. Estabelecimento *in vitro* de mirtilo a partir de segmentos nodais. **Scientia Agraria**, v. 6, n. 1-2, p. 91-96, 2005.

ESPÉCIES de Alternaria. Doctor Fungus Corporation. Disponível em: <https://drfungus-org.translate.google.com/knowledge-base/alternaria-species/?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=pt&_x_tr_hl=pt&_x_tr_pto=sge>. Acesso em: 23 de abril de 2025.

FACHINELLO, J. C. Mirtilo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 285-288, 2008.

CULTURAS e produtos pecuários. FAOSTAT. Disponível em: <www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Acesso em 19 de abril de 2024.

FERRI, Juçara. **Micropropagação e desenvolvimento vegetativo do mirtilo**. Universidade Federal de Pelotas (UFPel), 2008. Dissertação (Mestre em Ciências).

FIOR, Claudimar S. **Propagação de plantas *in vitro*: teoria à prática**. DHS - Faculdade de Agronomia. UFRGS. 2007.

FLORES, R. et al. Regeneração *in vitro* de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, n.3, v.4, p.201-205, 1998.

FONSECA, L. L. da; OLIVEIRA, P. B. de. A planta de mirtilo: Morfologia e fisiologia. **Divulgação Agro**, v. 556, n. 2, 2007.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p.183-260.

GOMES, F.; CANHOTO, J. M. Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (Shining gum). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 39, p. 316-321, 2003.

GONZALEZ, M.V. et al. Micropropagation of berry fruit species using nodal segments from field-grown plants. **Association of Applied Biologists**, Edinburgo, v.137, n.1, p.73-78, 2000.

HERTER, F.G.; WREGGE, M.S. **Cultivo do mirtilo (*Vaccinium* spp)**. Sistemas de produção 8 - Embrapa. Versão eletrônica Novembro de 2006. Disponível em: <<http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/sistemas/sistemas-08.pdf>>. Acesso em: 23 de abril de 2024.

HILÁRIO, S.; SANTOS, L.; ALVES, A. Diversity and Pathogenicity of *Diaporthe* Species Revealed from a Survey of Blueberry Orchards in Portugal. **Agriculture**. 11, n.º 12: 1271. 2021.

HOFFMANN, Alexandre et al. Enraizamento de estacas de duas cultivares de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) em diferentes substratos. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 1, n. 1, 1995.

HOFFMANN, Alexandre et al. **Pequenas frutas: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. 194 p.

HOFFMANN, Alexandre. **Propagação de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) através de estacas**. 1994 85p. Dissertação (Mestrado fruticultura de Clima Temperado)-Faculdade de Agronomia Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

HU, C.Y.; WANG, P.J. **Meristem, shoot tip and bud culture. Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding**. New York: Macmillan, 1983. p.117-227.

IDENTIFICAÇÃO de Fungos Filamentosos. UFRGS. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/aulaspraticasdempip/?page_id=90>. Acesso em: 23 de abril de 2025.

JAAKOLA, L. et al. Effect of N6- isopentenyladenosine concentration on growth initiation in vitro and rooting of bilberry and lingonberry microshoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v.66, p.73-77, 2001.

JESUS JUNIOR, Celso de; RODRIGUES, Luiza Sidonio; MORAES, Victor Emanuel Gomes de. **Fruticultura: convergências e divergências**. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n.32 , p. 371-396, set. 2010.

JUNIOR, Américo Wagner et al. Efeito da lesão basal e do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas herbáceas de quatro cultivares de mirtilo. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 10, n. 2, 2004.

KUCK, L. S. et al. 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**. V. 7 2011.

LEITZKE, Luciene Nolasco; DAMIANI, Claudia Roberta; SCHUCH, Márcia Wulff. Influência do meio de cultura, tipo e concentração de citocininas na multiplicação in vitro de amoreira-preta e framboeseira. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 352-360, 2010.

LEVANTAMENTO a Fruticultura Comercial do Rio Grande do Sul. Associação Riograndense De Empreendimentos De Assistência Técnica E Extensão Rural – Emater/Rs; Associação Sulina De Crédito E Assistência Rural – Ascar. 2023. Disponível em:<https://www.emater.tche.br/site/arquivos_pdf/safra/safraTabela_12032024.pdf>. Acesso em: 21 de abril de 2024.

MADAIL, J.C.M.; SANTOS, A.M. **A cultura do mirtilo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, Documentos, 121. 2004. 69p.

MEDEIROS, J. G. S. **Aspectos fenológicos, desempenho produtivo, qualidade e compostos bioativos de frutos de cultivares de mirtilheiros no Paraná.** 117 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, 2006.

MONACO, L.C. et al. Applications of tissue culture in the improvement of coffee. **Applied And Fundamental Aspects Of Plant Cell, tissue and organ culture.** Berlin:Springer-Verlag, 1977. p.109-129.

MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação in vitro. **ABCTP Notícias**, Brasília, n.36/37, p.5-10, 2000.

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

PAIVA, J. R. **Estudo do potencial biocatalítico do fungo *Rhizopus stolonifer* na biotransformação de produtos naturais.** 2014. 74 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

PASQUALINI, Ana Paula de Azevedo. **Germinação de sementes e micropropagação de mirtilheiro.** 2013. 75 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2013.

PIERIK, R.L.M. **Cultivo in vitro de plantas superiores.** Madrid: Mundiprensa, 1988.

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. da S. **Manual de procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental.** Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008. 44 p.

RADUNZ, André Luiz. **Hábito de frutificação, manejo da poda e qualidade do fruto de mirtilo .** 2014. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas.

RASEIRA, M.C.B.; ANTUNES, L.E.C. **A cultura do mirtilo.** Pelotas: Embrapa Clima temperado, 2004. 69 p.

RETAMALES, J.B.; HANCOCK J.F. **Blueberries.** CABI, Cambridge, USA. 2012.

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

RETAMALES, J.B.; MENA, C.; LOBOS, G.; MORALES, Y. A regression analysis on factors affecting yield of highbush blueberries. **Scientia Horticulturae**, v.186 p.7-14. 2015.

RIBAS, L.L.F. et al. Estabelecimento de culturas assépticas de *Aspidosperma polineurom*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.13, n.1, p.115-122, jun. 2003.

RHIZOPUS. The University of Adelaide. Disponível em: <<https://www-adelaide-edu-au./mycology/rhizopus>>. Acesso em: 23 de abril de 2025.

RHIZOPUS stolonifer – Ciclo de vida, habitat, nutrição, doença, importância. Biology Notes Online. Disponível em: <https://biologynotesonline.com/rhizopus-stolonifer-life-cycle-habitat-nutrition-disease-importance/>. Acesso em: 04 de junho de 2025.

ROWLAND, Lisa J. et al. Geração e análise de sequências de transcriptoma de mirtilo a partir de folhas, frutos em desenvolvimento e botões florais da aclimação ao frio até a desaclimação. **BMC plant biology**, v. 12, p. 1-18, 2012.

SHARMA, S. K.; RAMAMURTHY, V. Micropropagation of 4-year-old elite *Eucalyptus tereticornis* trees. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 511-518, 2000.

SILVA, Jéssica Paloma et al. Efeito da citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) sobre o estabelecimento in vitro de segmentos nodais de *Rosa* sp. **Revista Agroecossistemas**, v. 9, n. 2, p. 370-380, 2017.

SILVA, Luciane Couto da. **Estabelecimento in vitro de cultivares de mirtilo (vaccinium ashei Reade), para início da micropropagação**. 2006.59 f. Dissertação. (Mestrado em Agronomia)- Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2006.

SILVA, L. C. da et al. Meio nutritivo, reguladores de crescimento e frio no estabelecimento in vitro de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cv. Delite. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 4, p. 405-408, 2006.

SILVEIRA, Tiago Madruga Telesca da et al. Influência do dano da abelha-irapuá em flores de mirtilo sobre a frutificação efetiva e as frutas produzidas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 303-307, 2009.

SMAGULA, John M. Avaliação de padrões de folhas de cobre e ferro de *Vaccinium angustifolium* Ait. **XXVII Congresso Internacional de Horticultura-IHC2006: Simpósio Internacional sobre Melhoria Econômica e Ambiental 772**. 2006. p. 351-354.

SOUZA, Joseane Almeida de et al. Tipos e concentrações de citocinina na multiplicação in vitro de pitangueira. **Ciência Rural**, v. 38, p. 2046-2048, 2008.

TEIXEIRA, J. B. **Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas**. Brasília: Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília. 2005.

TETSUMURA, Takuya et al. Avaliação de meios basais para micropropagação de quatro cultivares de mirtilo highbush. **Scientia Horticulturae**, v. 119, n. 1, p. 72-74, 2008.

TREVISAN, R.; ANTUNES, L. E. C.; GONÇALVES, D. G. **Propagação de plantas frutíferas nativas. Espécies frutíferas nativas do sul do Brasil**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, documento n.129, 2004. p.47- 70.

WILLADINO, L.; CÂMARA, T. **Cultura de tecidos vegetais**. Disponível em: <<http://www.ufrpe.br/quimica/culttec.htm>>. Acesso em: 10 de março de 2025.

XIAOZHE, Sol. et al. Caracterização de espécies de *Alternaria* associadas à mancha preta do morango em Dandong, China. **Agronomy** 2023 , 13 , 1014.

ZIMOWSKA, B. et al. Phylogenetic Characterization of *Botryosphaeria* Strains Associated with *Asphondylia* Galls on Species of Lamiaceae. **Diversity**. 12, no. 2: 41. 2020.