

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia  
Área de Concentração Fruticultura de Clima Temperado



Dissertação

**Aspectos propagativos de espécies frutíferas com atividade  
antioxidante: romãzeira e mirtilheiro**

**Samila Silva Camargo**

Pelotas, fevereiro de 2015.

**SAMILA SILVA CAMARGO**

**Engenheira Agrônoma**

**Aspectos propagativos de espécies frutíferas com atividade  
antioxidante: romãzeira e mirtilheiro**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia (área do conhecimento: Fruticultura de Clima Temperado).

Comitê de orientação

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Márcia Wulff Schuch

Co-orientador: Pesq. Dr. André Luiz Kulkamp de Souza

Co-orientadora: Pesq<sup>a</sup>. Dra. Marcia Vizzotto

Pelotas, fevereiro de 2015.

**Banca examinadora**

---

Márcia Wulff Schuch, Dra, Universidade Federal de Pelotas (UFPel/FAEM)

---

Zeni Fonseca Pinto Tomaz, Dra, Universidade Federal de Pelotas UFPel/FAEM)

---

Marcelo Barbosa Malgarim, Dr, Universidade Federal de Pelotas (UFPel/FAEM)

---

Cláudia Simone Madruga Lima, Dra, Emater/RS - Ascar

***A minha mãe Claudia e irmã Estefânia,  
pelo cuidado, carinho e incentivo em todos  
os momentos da minha vida.***

***Ao meu noivo André,  
pelo amor, companheirismo e presença  
constante, independente da distância.***

***A vitória dessa conquista dedico  
unicamente a vocês!***

## **Agradecimentos**

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

A Universidade Federal de Pelotas e a Embrapa Clima Temperado pela possibilidade de execução dos experimentos.

A professora Dra Márcia Wulff Schuch pela amizade desde o período da graduação e orientação no desenvolvimento dos trabalhos. Sempre serei muito grata pela oportunidade e confiança durante todos esses anos.

A co-orientadora pesquisadora Dra Marcia Vizzotto pela atenção desde o primeiro contato, ajuda e oportunidade de aprendizado.

Aos colegas e amigos do LabAgro e estagiários, pela ajuda na condução dos experimentos. Em especial à Laura Sommer e Roseane Moreira pela ajuda em praticamente todas as etapas desse trabalho. Agradeço também, os conselhos das colegas Cari Fiss e Zeni Tomaz, sempre muito atenciosas, para acrescentar e esclarecer dúvidas.

As estagiárias da Embrapa: Elisa Pereira, Marina Schiavon, Daniela Coelho e Priscila Munhoz pela paciência e ajuda nas análises dos frutos.

Aos funcionários do Centro Agropecuário da Palma na manutenção do pomar.

Ao meu noivo e melhor amigo, André, além de um grande parceiro de trabalho, o meu maior companheiro de todos os momentos, quem sempre me apoia e me incentiva, tanto pessoalmente, quanto profissionalmente. A tua ajuda em todos os momentos, no desenvolvimento desse trabalho, foi essencial para concretizar mais esse sonho.

Aos meus grandes amores, Claudia e Estefânia, minha pequena família, que nunca deixaram de me dar carinho e incentivo e sempre estiveram ao meu lado, independente das circunstâncias.

A todos aqueles não citados que torceram pelo meu sucesso.

***“Se não houver frutos, valeu a beleza das flores;  
se não houver flores, valeu a sombra das folhas;  
se não houver folhas, valeu a intenção da semente.”***

***Henfil***

## RESUMO

CAMARGO, Samila Silva. **Aspectos propagativos de espécies frutíferas com atividade antioxidante: romãzeira e mirtilheiro.** 2015. 103f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas – RS.

Estudos sobre a propagação de espécies frutíferas com cultivo ainda não estabelecido em grande escala no Brasil, como o caso da romãzeira e do mirtilheiro, ainda são necessários para tornar os seus sistemas de produção mais eficientes e competitivos. Com base nisso, o estudo se divide em dois capítulos; o primeiro trata da propagação *in vitro* de romãzeira e o segundo, do manejo de mirtilheiros a campo, sob diferentes formas de propagação e intensidades de poda. No primeiro, buscou-se a obtenção de mudas *in vitro* de romãzeira, por meio de três etapas da micropropagação: estabelecimento, multiplicação e enraizamento dos explantes. No estabelecimento das sementes foram comparados diferentes meios de cultura (MS e WPM) com presença ou não de sacarose; durante a multiplicação, avaliou-se o uso de 2iP e dikegulac de sódio em diferentes concentrações; e por fim, verificou-se a ação da auxina AIB durante o enraizamento. Concluiu-se que o meio de cultivo MS + sacarose é mais favorável para a germinação *in vitro* das sementes; que o meio WPM + 1 mg.L<sup>-1</sup> de 2iP é o mais indicado para o crescimento das brotações; que o uso do dikegulac de sódio favorece o desenvolvimento de nós, folhas e raízes; e a adição de 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB favorece o desenvolvimento do sistema radicular em romãzeiras *in vitro*. Já no segundo capítulo, verificou-se a campo, a influência de duas formas de propagação (micropropagação e estaquia) e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica) de mirtilheiro de três cultivares distintas: Briteblue, Woodard e Bluegem. Como resultados foram obtidos que plantas das cultivares Briteblue, Woodard e Bluegem propagadas via cultivo *in vitro*, apresentam maior crescimento vegetativo quando comparadas com plantas oriundas por estaquia, assim como a poda drástica

proporciona o desenvolvimento de ramos vegetativos de maior comprimento. A produção de frutos de 'Briteblue', 'Woodard' e 'Bluegem' é maior em plantas oriundas de estaquia e podadas levemente. As plantas micropropagadas da cultivar Bluegem produziram frutos com maior teor de antocianinas, enquanto, frutos de 'Briteblue' apresentaram maiores níveis desses compostos em plantas oriundos da estaquia. E por fim, frutos colhidos em plantas sem poda ou com poda leve apresentaram maior atividade antioxidante, independente da cultivar estudada.

**Palavras-chave:** *Punica granatum*, *Vaccinium* sp., *in vitro*, propagação, poda.



## ABSTRACT

CAMARGO, Samila Silva. **Propagative aspects of fruit species with antioxidant activity: pomegranate and blueberry.** 2015. 103p. Dissertation (Master Course) – Graduate Program in Agronomy. Federal University of Pelotas, Pelotas – RS, Brazil.

Studies on the propagation of fruit species with cultivation not yet established on a large scale in Brazil, as the case of the pomegranate and blueberry, are still needed to make their more efficient and competitive production systems. Based on this, the study is divided into two chapters; the first deals with the *in vitro* propagation of pomegranate and the second, the blueberry field management under different forms of propagation and pruning intensities. In the first, we tried to obtain seedlings *in vitro* of pomegranate, through three stages of micropropagation: establishment, multiplication and rooting of explants. In establishing of seeds were compared different culture media (MS and WPM) in the presence or absence of sucrose; during the multiplication, we evaluated the use of 2iP and sodium dikegulac at different concentrations; and finally, it was found the action of auxin IBA for rooting. It was concluded that the culture medium MS + sucrose is more favorable for germination *in vitro* of seeds; that the WPM medium + 1 mg.L<sup>-1</sup> 2iP is the most suitable for the growth of shoots; the use of sodium dikegulac favors the development of nodes, leaves and roots; and the addition of 1,5 mg.L<sup>-1</sup> IBA favors the development of the root system *in vitro* pomegranates. In the second chapter, it was found in the field, the influence of two forms of propagation (micropropagation and cuttings) and different pruning intensities (control, low and drastic) of three different cultivars of blueberry: Briteblue, Woodard and Bluegem. As results were obtained that the plants 'Briteblue', 'Woodard' and 'Bluegem' propagated by *in vitro* culture, have a higher vegetative growth when compared with plants grown by cuttings, as well as drastic pruning provides the development of vegetative branches of greater length. Fruit production of 'Briteblue', 'Woodard' and 'Bluegem' is greater

in plants grown from cuttings and pruned lightly. The micropropagated plants of 'Bluegem' produced fruits with larger anthocyanin content while 'Briteblue' fruit showed higher levels of these compounds in plants originating from cuttings. Finally, fruits harvested in plants without pruning or low pruning had higher antioxidant activity, regardless of the cultivar studied.

**Key-Words:** *Punica granatum*, *Vaccinium* sp., *in vitro*, propagation, pruning.

## **Lista de Figuras**

### **CAPÍTULO 1**

- Figura 1.** Número de raízes em explantes de romãzeiras em diferentes concentrações de AIB. Pelotas - RS, 2015. ....45
- Figura 2.** Comprimento de raízes de explantes de romãzeira em diferentes concentrações de AIB. Pelotas – RS, 2015.....45

## Lista de Tabelas

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela 1.</b> Oxidação (OXID - %), contaminação fúngica (CF - %), contaminação bacteriana (CB - %) e germinação (GERM - %), durante o estabelecimento <i>in vitro</i> de sementes de romãzeira. Pelotas – RS, 2015. ....	37
<b>Tabela 2.</b> Presença de folhas (PF - %), número médio de brotações (NMB), número de explantes com brotações (NEB) e comprimento médio de brotações (CMB - cm) durante o estabelecimento <i>in vitro</i> de sementes de romãzeira. Pelotas – RS, 2015. ....	38
<b>Tabela 3.</b> Comprimento médio das radículas (CmR - cm) e comprimento da maior radícula (CMR - cm) de explantes de romãzeira estabelecidos <i>in vitro</i> . Pelotas, RS – 2015. ....	39
<b>Tabela 4.</b> Presença de radículas (PR - %) e comprimento médio de brotações (CmB - cm) de explantes de romãzeira estabelecidos <i>in vitro</i> . Pelotas, RS – 2015. ....	39
<b>Tabela 5.</b> Comprimento da maior brotação (CMB – cm) e da maior raiz (CMR - cm) de explantes de romãzeira <i>in vitro</i> . Pelotas, RS – 2015.....	40
<b>Tabela 6.</b> Número de folhas (NF), brotações (NB) e raízes (NR) e presença de calos (PC – %) em explantes de romãzeira <i>in vitro</i> . Pelotas, RS – 2015. ....	41
<b>Tabela 7.</b> Comprimento da parte aérea (CPA - cm), número de brotações (NB), número de folhas (NF), comprimento da maior raiz (CMR - cm) e número de raízes (NR) de explantes de romãzeira, no período de multiplicação <i>in vitro</i> . Pelotas, RS – 2015. ....	43
<b>Tabela 8.</b> Número de raízes (NR) e comprimento de raízes (CR - cm) em explantes de romãzeira sob diferentes concentrações de AIB. Pelotas – RS, 2015. ....	44

## CAPÍTULO 2

### Estudo 1. Cultivar Briteblue

**Tabela 1.** Peso de ramos em diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica), em mirtilheiros cv. Briteblue em diferentes formas de propagação (MP – micropropagação; EST - estaquia. Pelotas – RS, 2015.....53

**Tabela 2.** Área da folha (AF – cm<sup>2</sup>), altura de planta (AP – m) e índice de clorofila (IC - unidades SPAD) de plantas de mirtilheiro 'Briteblue' em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST) e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015. ....54

**Tabela 3.** Comprimento dos ramos (cm) de plantas de mirtilheiro 'Briteblue' em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST) e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica), nas safras 2013/14 e 2014/15. Pelotas – RS, 2015.....55

**Tabela 4.** Fenologia de mirtilheiros cv. Briteblue sob diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica), propagados de diferentes formas (MP – micropropagação; EST – estaquia). Pelotas – RS, 2015. ....56

**Tabela 5.** Diâmetro médio dos frutos (DMF – mm), número de frutos (NF) e produção (PROD - Kg.planta<sup>-1</sup>) de plantas de mirtilheiro 'Briteblue' em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST) e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015. ....57

**Tabela 6.** Peso médio dos frutos (PMF – g), cor dos frutos pelo equipamento Dameter (DAM), pH e acidez titulável (AT – meq.L<sup>-1</sup>) de plantas de mirtilheiro 'Briteblue' em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST) e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015. ....58

**Tabela 7.** Cor determinada por colorímetro ( $\Delta E$ ) e sólidos solúveis (SS - %) de frutos oriundos de plantas de mirtilheiro 'Briteblue' em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST) e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015. ....59

**Tabela 8.** Antocianinas totais (ANT - mg cianidina 3-glicosídeo/100g amostra) de frutos oriundos de plantas de mirtilheiro 'Briteblue' em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST) e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015. ....60

**Tabela 9.** Fenólicos totais (FT - mg ácido clorogênico equivalente/100g tecido) e atividade antioxidante (AA - µg trolox equivalente/g tecido) de frutos oriundos

de plantas de mirtilheiro 'Briteblue' em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST) e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015. ....61

## **Estudo 2. Cultivar Woodard**

**Tabela 1.** Peso de ramos em diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica), em mirtilheiros cv. Woodard, propagados de diferentes formas (MP – micropropagação; EST – estaquia). Pelotas – RS, 2015.....62

**Tabela 2.** Área da folha (AF – cm<sup>2</sup>), índice de clorofila (IC - unidades SPAD), comprimento de ramos (CR - cm) e altura de planta (AP – m) de plantas de mirtilheiro 'Woodard' em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST) e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015.....63

**Tabela 3.** Fenologia de mirtilheiros cv. Woodard sob diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica), propagados de diferentes formas (MP – micropropagação; EST – estaquia). Pelotas – RS, 2015. ....64

**Tabela 4.** Número de frutos (NF), peso médio dos frutos (PMF - g), diâmetro médio dos frutos (DMF – mm), cor dos frutos pelo colorímetro ( $\Delta E$ ), sólidos solúveis (SS - %) e pH de plantas de mirtilheiro 'Woodard' em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST) e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015. ....65

**Tabela 5.** Produção (PROD - Kg.planta<sup>-1</sup>), cor dos frutos pelo equipamento DAMeter (DAM) e acidez titulável (AT - meq.L<sup>-1</sup>) de plantas de mirtilheiro 'Woodard' em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST) e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015. ....66

**Tabela 6.** Fenólicos totais (FT - mg ácido clorogênico equivalente/100g tecido) de frutos de mirtilheiro 'Woodard' em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST) e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015. ....67

**Tabela 7.** Atividade antioxidante (AA - µg trolox equivalente/g tecido) e antocianinas totais (ANT - mg cianidina 3-glicosídeo/100g amostra) de frutos oriundos de plantas de mirtilheiro 'Briteblue' em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST) e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015. ....68

### Estudo 3. Cultivar Bluegem

**Tabela 1.** Peso de ramos em diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica), em mirtilheiros cv. Bluegem, propagados de diferentes formas (MP – micropropagação; EST – estaquia). Pelotas – RS, 2015.....69

**Tabela 2.** Área da folha (AF – cm<sup>2</sup>), comprimento de ramos (CR - cm) e altura de planta (AP – m) de mirtilheiro ‘Bluegem’ em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST), e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015. ....70

**Tabela 3.** Índice de clorofila (IC - unidades SPAD) de plantas de mirtilheiro ‘Bluegem’ em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST), e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica), nas safras 2013/14 e 2014/15. Pelotas – RS, 2015. ....71

**Tabela 4.** Fenologia de mirtilheiros cv. Bluegem sob diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica), propagados de diferentes formas (MP – micropropagação; EST – estaquia). Pelotas – RS, 2015. ....72

**Tabela 5.** Diâmetro médio dos frutos (DMF – mm) e produção (PROD - Kg.planta<sup>-1</sup>), de plantas de mirtilheiro ‘Bluegem’ em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST), e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas, RS – 2015. ....73

**Tabela 6.** Número de frutos (NF), peso médio dos frutos (PMF - g), cor dos frutos pelo colorímetro ( $\Delta E$ ) e cor dos frutos pelo equipamento DAMeter (DAM) de plantas de mirtilheiro ‘Bluegem’ em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST), e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015. ....74

**Tabela 7.** Sólidos solúveis (SS - %), pH e acidez titulável (AT - meq.L<sup>-1</sup>) de plantas de mirtilheiro ‘Bluegem’ em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST), e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015. ....75

**Tabela 8.** Fenólicos totais (FT - mg ácido clorogênico equivalente/100g tecido) de frutos de mirtilheiro ‘Woodard’ em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST), e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015. ....76

**Tabela 9.** Atividade antioxidante (AA -  $\mu\text{g}$  trolox equivalente/g tecido) e antocianinas totais (ANT - mg cianidina 3-glicosídeo/100g amostra) de frutos oriundos de plantas de mirtilheiro ‘Briteblue’ em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST), e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015. ....76

## Sumário

INTRODUÇÃO GERAL.....	17
REVISÃO DE LITERATURA.....	19
1. ROMÃZEIRA.....	19
2. MIRTILEIRO .....	25
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>32</b>
<b>Micropropagação de romãzeira .....</b>	<b>32</b>
Introdução .....	32
Material e métodos.....	33
Resultados e Discussão.....	36
Conclusões .....	46
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>47</b>
<b>Métodos de propagação e intensidades de poda na produção e qualidade de mirtilos .....</b>	<b>47</b>
Introdução .....	47
Material e métodos.....	48
Resultados e discussão .....	53
Estudo 1 – Cultivar Briteblue.....	53
Estudo 2 – Cultivar Woodard .....	61
Estudo 3 – Cultivar Bluegem.....	68
Conclusões .....	77
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	78
REFERÊNCIAS GERAIS.....	80
APÊNDICES .....	91
ANEXOS .....	101



## INTRODUÇÃO GERAL

O valor nutricional é um dos principais fatores que conduzem ao interesse crescente pelo consumo de frutos e suas polpas. Esses têm sido altamente recomendados, pela riqueza em carboidratos, fibras, minerais, vitamina C, carotenóides, substâncias fenólicas, substâncias sulfuradas, dentre outras, e pela ação antioxidante, que contribui para manter o equilíbrio entre a produção e a eliminação de espécies reativas de oxigênio e outros compostos relacionados, inibindo e reduzindo as lesões causadas pelos radicais livres nas células (MAIA, 2007).

Trabalhos recentes têm apontado alguns frutos como fontes de compostos fenólicos com ação antioxidante, sendo sequestradores de radicais livres, com ação protetora contra o surgimento e/ou desenvolvimento de processos degenerativos que conduzem a doenças crônicas não transmissíveis (VIEIRA et al., 2011).

A romã é uma fonte em potencial de compostos antioxidantes e possui expressiva quantidade de compostos fenólicos (JARDINI et al., 2010), assim como o mirtilo, onde são encontrados compostos bioativos, como exemplo as antocianinas, que conferem ao fruto atividade antioxidante, tanto *in vitro* como *in vivo* (YOUDIM et al., 2000).

Sendo assim, pela pequena importância no território nacional, trabalhos de pesquisas relacionados à produção de romã ainda são escassos, sobretudo no tema propagação, onde trabalhos com germinação de sementes são essenciais, tanto para fins de melhoramento genético da espécie como para a própria produção de mudas (TAKATA et al., 2014). No mesmo parâmetro, tem-se a cultura do mirtilheiro, que por ser uma atividade recente no país, apresenta deficiências na sua cadeia produtiva e está, aos poucos, se articulando para que o mirtilo se torne um produto ainda mais rentável para todos os elos desta cadeia (SOUZA, 2011).

Dessa forma, estudos mais específicos sobre propagação dessas culturas são necessários, já que um dos principais problemas observados nesses cultivos, no Brasil, é a produção de mudas, limitada pela dificuldade de propagação da maioria das cultivares (WAGNER JÚNIOR et al., 2004).

A propagação da romãzeira é tradicionalmente realizada por sementes ou estacas (ÖLMEZ et al., 2007). Já a cultura do mirtilheiro pode ser propagada por sementes, enxertia e estaquia, sendo essa última a mais utilizada, porém a dificuldade de enraizamento de algumas cultivares tem limitado sua propagação (PEÑA et al., 2012).

Como alternativa, uma das técnicas utilizadas com eficiência para disponibilizar mudas de romã e mirtilo no mercado, tem sido a micropropagação (MILLER et al., 2006; ALBERT et al., 2009; CHAUCHAN & KANWAR, 2012). Essa técnica engloba diferentes etapas que vão desde o estabelecimento da cultura *in vitro* até seu enraizamento, culminando com a aclimatização da microplanta (BASTOS et al., 2007).

O cultivo *in vitro* pode ser considerado um procedimento relevante na propagação dessas diferentes espécies (LEDO et al., 2007), já que permite aliar o uso de reguladores de crescimento para a sua adaptação e crescimento *in vitro*.

Aliado a isso, técnicas adequadas, desde a propagação até o manejo a campo, devem ser aplicadas visando uma maior sanidade das mudas. Com isso, proporcionando plantas adultas com as características desejáveis e que favorecem a produção de frutos de alta qualidade, principalmente quando se trata de espécies pouco dominadas, servindo de base e estímulo para futuras pesquisas.

Diante desse contexto, duas distintas temáticas foram estudadas e descritas nesse documento, sendo demonstrados em forma de dois capítulos.

### **Capítulo 1.** Micropropagação de romãzeira

**Capítulo 2.** Métodos de propagação e intensidades de poda na produção e qualidade de mirtilos.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. ROMÃZEIRA

A romãzeira é nativa da Ásia Central, mais especificamente do Irã, a partir de onde se espalhou para o resto do mundo (LEVIN, 2006; VERMA et al., 2010). Pertence a família Punicaceae, que apresenta um único gênero (*Punica*) com duas espécies (*P. granatum* e *P. protopunica*) (JBIR et al., 2008; CHAUHAN & KANWAR, 2012). Chandra et al. (2010a) fornecem uma descrição detalhada da história da romã, que foi uma das primeiras culturas de frutas a serem domesticados e foi plantada pela primeira vez durante 4000 e 3000 aC e está entre um dos mais antigos frutos comestíveis conhecidos.

O fruto da romãzeira (*Punica granatum* L.) é conhecido pela sua importância nutricional, medicinal e ornamental (CHAUHAN & KANWAR, 2012). Atualmente, existem muitos estudos sobre a utilidade das romãs para a humanidade, tais como a sua importância para o tratamento da obesidade (AL-MUAMMAR & KHAN, 2012; RAHIMI et al., 2012). A romã tem uma grande importância quanto ao seu valor nutricional, seja quando consumido *in natura* ou para elaboração de suco e cerca de 100 g de frutos fornecem 72 kcal de energia, 1,0 g de proteína, 16,6 g de hidratos de carbono, 1 mg de sódio, 379 mg de potássio, 13 mg de cálcio, 12 mg de magnésio, 0,7 mg de ferro, 0,17 mg de cobre, 0,3 mg de niacina e 7 mg de vitamina C (GROVE & GROVE, 2008).

Além disso, é conhecido pelo elevado conteúdo de fenólicos e propriedades antioxidantes (CHALFOUN-MOUNAYAR et al., 2012; JING et al., 2012; ORAK et al., 2012; ZAOUAY et al., 2012). As antocianinas do fruto da romãzeira têm revelado elevada atividade antioxidante, maior do que a vitamina E ( $\alpha$ -tocopherol), vitamina C (ácido ascórbico) e  $\beta$ -caroteno. Além

disso, o suco da romã possui atividade antioxidante três vezes maior do que o chá verde ou vinho vermelho, sendo usado contra úlceras, dores de ouvido, disenteria e lepra (JADON et al., 2012).

Doenças coronárias, câncer (de pele, mama e próstata), inflamação, diabetes, doenças cardíacas, isquemia, envelhecimento, distúrbios cerebrais, danos ao fígado e AIDS são os alvos potenciais da doença nos próximos anos para tratamentos com romã (JYOTSANA & MAITY, 2010; ADHAMI et al., 2012).

Além da importância na medicina, a romã é amplamente utilizada na indústria de alimentos, na fabricação de sucos, geleias, aromatizantes, corante e na indústria de cosméticos, na fabricação de sabonetes, hidratantes, shampoos, condicionadores, entre outros. Recentemente, a importância da espécie tem despertado o interesse de produtores no nordeste brasileiro e área cultivada vem se expandido, tendo em vista a demanda pelo produto por parte da indústria e a visão de ampliar o uso do fruto para comercialização na forma *in natura* além do uso no processamento (SILVA, 2013).

Atualmente a romãzeira é cultivada em todo o mundo, em áreas tropicais e subtropicais, sob condições climáticas variáveis, indicando a sua flexibilidade, adaptabilidade e ampla gama de diversidade genética. Países do Mediterrâneo são os principais centros de cultivo comercial de romã, seguido por países asiáticos e da ex-URSS (SILVA et al., 2013).

Não há dados exatos disponíveis sobre a área e produção no mundo, devido a rápida expansão de cultivo, embora estime-se que cerca de 1,5 milhões de toneladas de frutos são produzidos no mundo por ano (HOLLAND & BAR-YAAKOV, 2008). A Índia ocupa o primeiro lugar no que diz respeito à área de cultivo e produção (CHANDRA et al., 2010b) e em termos de produtividade, a Espanha ocupa o primeiro lugar (18,5 t.ha<sup>-1</sup>), seguido pelos EUA (18,3 t.ha<sup>-1</sup>). O Irã ocupa o primeiro lugar nas exportações (60.000 t.ano<sup>-1</sup>), seguida pela Índia (35.176 t) (HOLLAND & BAR-YAAKOV, 2008; CHANDRA & JADHAV, 2009). Apesar de a Espanha ter pouca área de produção (2000 ha), a sua quota de exportação é de 37,8% da produção total (37 mil t), seguido por Israel (23,5%) e os EUA (15,5%) (SILVA et al., 2013).

No Brasil os dados relativos ao seu plantio são escassos. Um dos maiores pomares instalados com a cultura da romã no país está localizado nas

várzeas de Sousa, Paraíba, com 44 ha manejados em campo sob sistema de cultivo orgânico. Atualmente o pomar se encontra em fase de produção e uma das maiores preocupações dos produtores é com a melhoria na qualidade dos frutos e a implantação de tecnologias para a conservação dos mesmos (SILVA, 2013). No entanto, de acordo com o mesmo autor, para o estabelecimento e manejo da cultura da romã em extensas áreas de produção, é necessário o conhecimento agrônômico do manejo da espécie, desde a instalação do pomar, incluindo o estabelecimento das técnicas ideais de propagação.

A romãzeira é tradicionalmente propagada por sementes ou estacas (ÖLMEZ et al., 2007), sendo que as estaquias herbáceas e lenhosas as mais utilizadas (CHAUHAN & KANWAR, 2012). A propagação convencional de romã foi revisada por Chandra & Babu (2010), porém a maioria dos estudos sobre têm se centrado na capacidade de enraizamento de estacas em resposta a hormônios de enraizamento (OWIS, 2010). No entanto, este método não é muito eficiente, uma vez que requer cerca de um ano para que as mudas sejam transplantadas (NAIK et al., 1999).

A aplicação de técnicas de melhoramento convencional para árvores frutíferas lenhosas é muitas vezes difícil, lento e demorado devido a elevados níveis de heterozigosidade, o longo tempo de geração entre sucessivos cruzamentos e a dificuldade em estabelecer estacas lenhosas (SINGH et al., 2007). Estas dificuldades exigem o desenvolvimento de protocolos de regeneração rápida e eficiente para a propagação *in vitro* de genótipos superiores (CHAUHAN & KANWAR, 2012).

Durante os últimos anos, técnicas de micropropagação têm sido amplamente utilizadas para a propagação de várias espécies de plantas (NAIK et al., 1999). A técnica da micropropagação de frutíferas ajuda a superar dificuldades de propagação vegetativa, proporcionando produção rápida e em massa de materiais de plantio (SAMIR et al., 2009) e permite ainda, propagação em massa de genótipos superiores de variedades selvagens e cultivadas. No entanto, a aplicação bem sucedida dessa técnica para a engenharia genética de romã ainda é limitada (CHAUHAN & KANWAR, 2012).

Por isso, vários estudos têm sido realizados sobre micropropagação de romãzeira ao longo dos últimos anos. Protocolos foram desenvolvidos para a regeneração de plântulas *in vitro* (SAMIR et al., 2009), através proliferação de

segmentos nodais e ápices (MURKUTE et al., 2004) e nós cotiledonares (SHARON & SINHA, 2000). A regeneração de mudas *in vitro* também é uma opção e pode ocorrer através de organogênese de calos derivados de segmentos foliares, entrenós, hipocótilos (DEEPIKA & KANWAR, 2010), cotilédones, embriões (KANWAR et al., 2010), anteras (MORIGUCHI et al., 1987), pétalas (NATARAJA & NEELAMBIKA, 1996) ou por meio de embriogênese de vários explantes de plântulas (JAIDKA & MEHRA, 1986).

De acordo com Silva et al. (2013), a micropropagação de romã é moderadamente difícil devido à exsudação de compostos fenólicos que resultam em escurecimento, necrose do explante, contaminação microbiana sistêmica ou latente e recalcitrância *in vitro* dos tecidos. A regeneração da recalcitrância *in vitro* é resultado de uma acumulação de etanol no explante e pode ser superado por adição de inibidores de etileno, como exemplo, o uso de nitrato de prata (KANWAR et al., 2010), ou ainda o uso de adsorventes, como o carvão ativado, adição de antioxidantes ao meio de cultura ou de imersão de explantes em solução antioxidante (MURKUTE et al., 2004; EL-AGAMY et al., 2009). As principais técnicas para reduzir contaminações fenólicas relacionadas ao estabelecimento *in vitro* de tecidos de romã são o subcultivo rápido de explantes em meio fresco, o uso de antioxidantes e o cultivo de partes de plantas juvenis (SILVA et al., 2013).

Segmentos nodais são os explantes ideais para propagar romãzeira (BHOJWANI & RAZDAN, 1983), apesar de ápices caulinares e gemas axilares serem mais amplamente empregados na literatura. Meristemas apicais podem ser cultivados com sucesso em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-benziladenina (BAP) e de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Em geral, o MS é o meio basal mais comumente utilizado para a micropropagação de romã, enquanto que a metade do MS, WPM (LLOYD & McCOWN, 1980) e B5 (GAMBORG et al., 1968) têm sido relatados como sendo úteis para algumas variedades (NAIK & CHAND, 2011).

Em romãzeira, uma combinação de citocinina e auxina geralmente têm sido empregadas para o estabelecimento e multiplicação da cultura, enquanto as auxinas geralmente são essenciais para um enraizamento adequado (SILVA et al., 2013). Segundo Naik et al. (1999), o desenvolvimento da parte aérea não é induzido a partir dos nós cotiledonares em meio MS sem a presença de

reguladores de crescimento, logo, concluíram que a incorporação de uma citocinina ao meio foi essencial para induzir a proliferação axilar brotos de nós cotiledonares.

Naik et al. (1999) testaram a proliferação de brotos da cultivar de romã 'Ganesh' usando segmentos nodais de caule retirados de uma planta adulta. Eles testaram três citocininas (BAP, zeatina e thidiazuron), e constataram maior número de brotos desenvolvidos em um meio contendo  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de zeatina. No entanto, as limitações desse protocolo foi o escurecimento do meio de cultura, seguido de necrose dos explantes e a produção de um número de rebentos por explante (NAIK et al., 1999). Um ano depois, Naik et al. (2000) obtiveram elevada proliferação de ramos e regeneração de plantas a partir dos nós cotiledonares estabelecidos, e com isso, diminuíram as contaminações. O desenvolvimento da parte aérea foi induzido em meio MS suplementado com 2,3- 23,0  $\mu\text{M}$  BAP ou Kin (cinetina) e ambos, tipo e concentração de citocinina, influenciaram significativamente a proliferação de ramos.

Singh & Khawale (2006) relataram que segmentos nodais semi-lenhosos de romãzeira 'Jyoti' tiveram maior taxa de estabelecimento quando cultivadas em metade do meio MS suplementado com  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  BAP +  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  Kin, juntamente com  $200 \text{ mg.L}^{-1}$  de carvão ativado. CHAUGULE et al. (2007) testaram a propagação *in vitro* de romãzeira 'Mridula' e os ápices caulinares e segmentos nodais coletados de árvore maduras foram cultivadas em meio MS suplementado com ANA e BAP em concentração e combinações diferentes. Segmentos nodais foram importantes para a regeneração de 'Bhagava' em meio baseado em MS na presença de  $0,2 - 2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP,  $0,1 - 1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de ANA e  $0,5 - 2,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) (PATIL et al., 2011).

A formulação de MS é a forma mais comumente utilizada para propagação *in vitro* de genótipos de romã, embora algum sucesso foi alcançado com WPM (KAJI et al., 2013). Em adição a isso, Samir et al. (2009) também constataram que WPM é melhor para o crescimento vegetativo em comparação com os meios MS e NNN.

Para os explantes nodais cultivadas em meio MS com diferentes concentrações de BAP ( $0,2$  a  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ), a mais alta resposta de crescimento médio (99%) foi registrada em meio MS contendo BAP ( $1,8 \text{ mg.L}^{-1}$ ), enquanto

4-6 brotos por explantes com maior comprimento da parte aérea (0,7 - 1,9 cm), foram encontrados na mesma concentração (PATIL et al., 2011).

Em relação ao enraizamento *in vitro*, vários fatores que favorecem a iniciação radicular foram testados, como o AIB e o AIA (SILVA et al., 2013). A auxina AIB foi a mais eficaz entre todos os tipos de auxina, em contraste, a AIA apesar de ser natural foi menos eficaz, pois ficou degradada devido à luz. Naik et al. (2000) relataram que a adição de auxina para o meio foi essencial para o enraizamento *in vitro* e que a iniciação radicular ocorreu dentro de 10-15 dias em meio meia MS suplementado com 0,54-5,4  $\mu\text{M}$  ANA e o maior número de raízes (10,33 raízes.parte aérea<sup>-1</sup>) ocorreu em meio contendo 0,54  $\mu\text{M}$  ANA (SINGH et al. 2012).

Kantharajah et al. (1998) mostraram que o nível de sal mais baixo em meio de cultura teve efeito benéfico sobre o enraizamento *in vitro*. Eles obtiveram tanto maior enraizamento, como maior número de raízes por explante em WPM suplementado com 2  $\text{mg.L}^{-1}$  ANA. Singh e Khawale (2006) sugeriram o uso de sacarose no meio de cultivo, já que favorece o enraizamento, ou seja, o meio contendo 2,0  $\text{mg.L}^{-1}$  AIB, 200  $\text{mg.L}^{-1}$  carvão ativado e 40  $\text{g.L}^{-1}$  de sacarose resultou a melhoria da qualidade de raiz.

Em contrapartida, Chaugule et al. (2007) sugeriram a suplementação de auxina em 0,5  $\text{mg.L}^{-1}$ , independentemente do seu tipo. Singh et al. (2007) atingiram bom enraizamento (70,37%) com fontes duplas auxina, ou seja, AIB e ANA, para o meio de enraizamento. No entanto, Damiano et al. (2008) constataram que o nível de auxina eficaz varia de 0,75 a 2,0  $\text{mg.L}^{-1}$  ou sintética ou natural (AIB ou AIA) para 'Mridula'.

Naik et al. (1999) relataram então, que a adição de uma auxina para o meio foi essencial para induzir o enraizamento nos brotos e que a iniciação radicular ocorreu dentro de  $10 \pm 15$  dias em meio MS suplementado com ANA, dessa forma, a análise de variância mostrou que o número de raízes foi significativamente influenciado pela concentração de ANA usada.

Tendo em vista o alto heterozigiosidade em plantas derivadas de sementes de árvores de fruto, em geral, um sistema de regeneração baseado em nós cotiledonares pode ser uma estratégia eficiente para obter variantes somaclonais de romã que possuem traços agronomicamente desejáveis (NAIK et al., 1999).



## 2. MIRTILEIRO

Membro da família *Ericaceae*, subfamília *Vaccinoideae* e gênero *Vaccinium* (TREHANE, 2004), o mirtileiro é uma fruteira nativa dos Estados Unidos e Canadá, sendo considerada uma cultura recentemente explorada economicamente pelo homem, já que até o início do século XX seu uso era apenas extrativo nas matas destes países (SANTOS, 2009).

Conforme Hoffmann & Antunes (2007), atualmente, a expansão da área está associada com o elevado valor agregado dos frutos, o aumento do interesse pelos mercados interno e externo, aos restritos problemas fitossanitários e à ampla possibilidade de industrialização na forma de geleias, sucos, frutas congeladas, polpas e licores.

Entretanto, apesar da grande importância comercial em outros países, é ainda incipiente no Brasil (RIGON, 2005; MONTEIRO, 2006), concentrando-se em algumas regiões do Sul e Sudeste (ANTUNES, 2005), com maior presença nos estados do Rio Grande de Sul, Santa Catarina, e também no Paraná, São Paulo e Minas Gerais (CANTUARIAS-AVILÉS et al., 2014). No Brasil, a cultura foi introduzida na década dos anos 80 no Rio Grande do Sul, embora a maior expansão do cultivo comercial de mirtilos na região Sul tenha-se iniciado apenas na década de 2000, motivada pela crescente demanda mundial e pelos atrativos preços da fruta fresca no mercado europeu (CANTUARIAS-AVILÉS et al., 2014).

No entanto, a área plantada ainda é pequena, principalmente devido à indisponibilidade, baixa qualidade e ao preço das mudas, situação decorrente da dificuldade de propagação da maioria das cultivares (TREVISAN et al., 2008).

O mirtileiro é uma planta perene de clima temperado e requer baixas temperaturas para superar o período de dormência (SOUZA, 2011), por isso, durante o inverno, o requerimento em frio deve ser satisfeito para que na

primavera os dias longos e altas temperaturas possam induzir novas brotações, tanto das gemas reprodutivas quanto vegetativas (LYRENE, 2006).

Segundo Darnell (2006), o crescimento e desenvolvimento da cultura são influenciados por fatores climáticos como intensidade luminosa, fotoperíodo, temperatura e disponibilidade de água. Além disso, a cultura necessita de solos ácidos, com pH entre 4,5 e 5,5 para seu adequado desenvolvimento, assim como, solos profundos e bem drenados.

A maior parte dos mirtilheiros plantados no Sul do Brasil ainda corresponde a variedades do tipo *Rabbiteye* ou olho-de-coelho, que são variedades antigas e de mediana exigência de frio hibernal, com bom desempenho para os fruticultores locais, no entanto, estas variedades não conseguem produzir adequadamente em regiões com menos de 200 horas de frio anual (CANTUARIAS-AVILES et al., 2014).

O estudo da fenologia em espécies frutíferas tem como objetivo caracterizar a duração das suas fases de desenvolvimento em relação ao clima, especialmente às variações estacionais, e é utilizado para interpretar como as culturas interagem com as diferentes regiões climáticas. Ela pode ser definida como uma abordagem baseada no início e na duração de alterações visíveis no ciclo de vida das plantas, correlacionadas com fatores climáticos (LARCHER, 2006).

Em mirtilheiro, as épocas de floração e maturação podem variar conforme o ano e local (SMOLARZ, 2006; HUMMER et al., 2007). Estudos demonstram ainda, que dependendo da cultivar, em diferentes locais e acúmulo de horas de frio, o período de florescimento pode variar em até 24 dias (NESMITH, 2006). Desta forma, entende-se que para essa cultura, há variação na fenologia, já que depende dos fenômenos climáticos e também, do acúmulo de horas de frio.

Por esse motivo, torna-se importante levar em consideração o padrão fenológico para a escolha das cultivares mais adaptadas às condições edafoclimáticas locais, proporcionando o aumento do período de oferta de frutos ao mercado, escalonamento de produção, além de adaptação das tecnologias àquelas condições (SILVA et al., 2006).

Alguns fatores dificultam a expansão do mirtilheiro no Brasil, tais como as condições de clima e solo, o crescimento lento da planta, as dificuldades no

manejo da colheita e a falta de mudas, devido a dificuldades de propagação em algumas cultivares e ainda, o pouco conhecimento técnico sobre a cultura (PEÑA et al., 2012). Entre os fatores limitantes à expansão da cultura, destaca-se a dificuldade de propagação da maioria das cultivares, o que reduz a disponibilidade de mudas para comercialização, agravado pela baixa qualidade e alto custo das mesmas (HOFFMANN, 1994; COUTINHO et al., 2007; TREVISAN et al., 2008).

O método de propagação é fundamental para garantir uma muda de qualidade, porém a resposta desta muda, quando colocada a campo, deve ser considerada, por esse motivo diversos estudos têm sido conduzidos em todo o mundo com diferentes fruteiras (SOUZA, 2011). Essa questão é de grande importância para a produção de mirtilos, pois de acordo com a literatura, o comportamento a campo de mudas propagadas de diferentes formas, varia de acordo com as cultivares e locais de plantio destas.

No Brasil, a produção comercial de mudas é realizada por meio de estaquia, através de estacas herbáceas, lenhosas e semilenhosas, mas os resultados práticos são insatisfatórios e bastante variáveis de acordo com a cultivar (FACHINELO, 2008; MARINO et al., 2014). Algumas práticas são necessárias para aumentar a eficiência deste método, como o uso de ácido indolbutírico (AIB), onde as bases das estacas são imersas, antes do plantio; corte ao meio da(s) folha(s) da estaca e controle de temperatura e umidade do ar, com um sistema nebulização no ambiente em que ficam acondicionadas, por exemplo.

Outra técnica que vem sendo utilizada em escala comercial e com resultados satisfatórios para a produção de mudas de mirtilo no Uruguai, é a micropropagação, em resposta à crescente demanda por parte de viveiristas e produtores (CASTILLO et al., 2004). O cultivo *in vitro* tem o potencial para produzir grande número de plantas mais rapidamente do que por meio de estacas enraizadas, e, além disso, a cultura de tecidos de plantas pode ser realizada ao longo de todo o ano (ISUTSA & PRITTS, 1994; MILLER et al., 2006).

De acordo com Schuch & Erig (2005), a aplicação desta técnica é importante devido à elevada qualidade fitossanitária e homogeneidade das plantas produzidas, porém o custo final desta muda é elevado, já que o

material vegetal utilizado para a propagação *in vitro* fica submetido às condições controladas de luz, fotoperíodo e temperatura, interagindo com substâncias orgânicas, como os hormônios, que desempenham importante função na regulação do crescimento. Albert et al. (2009) citam a micropropagação como uma alternativa quando tem-se um limitado número de plantas matrizes ou quando se necessita de grande número de plantas com uniformidade e qualidade.

As mudanças no hábito de crescimento das plantas micropropagadas da espécie *Vaccinium* e outros pequenos frutos têm sido relatados, porém, avaliações de desempenho a campo de plantas derivadas da cultura de tecidos são limitadas e os resultados são variáveis e contraditórios (DEBNATH, 2007).

Para a produção de frutas de qualidade nas regiões de clima temperado no Brasil são necessários, entre outros aspectos, estudos do manejo, para adaptá-las às condições de inverno ameno e com oscilação de temperatura, muito frequentes nas principais regiões produtoras (FACHINELLO et al., 2011).

Devido à escassez de estudos referentes ao manejo de poda de mirtilheiro específico para as condições do Sul do Brasil, o setor produtivo utiliza informações não validadas pela pesquisa nacional e o sistema de poda do mirtilheiro utilizado no país se fundamenta em estudos realizados em locais com condições edafoclimáticas distintas da nossa realidade (RADÜNZ et al., 2014).

A realização da poda é uma prática de manejo que visa manter a produção e a qualidade dos frutos estáveis ao longo dos anos; melhorar a circulação de ar; diminuir a incidência de doenças ou mesmo aumentar a qualidade funcional do fruto, pela maior penetração da radiação solar; além de manter os ramos mais grossos e vigorosos, tornando-os mais produtivos (PESCIE et al., 2011; YARBOROUGH, 2006).

Essa técnica é realizada com o objetivo de equilibrar a parte aérea da planta, com o desenvolvimento das raízes e a produção de frutos (SANTOS & RASEIRA, 2002). Uma grande quantidade de ramos resultará numa grande produção de frutos, porém com qualidade inferior. A poda tem, também, como objetivo, a abertura do centro da planta (SERRADO et al., 2010).

A intensidade da poda de frutificação determina como será o crescimento vegetativo durante a primavera e verão e, quanto mais drástica,

maior número de ramos vegetativos e menor quantidade de frutos serão formados (ALBERT et al., 2010).

Estudos recentes vêm sendo realizados com a cultura e estão relacionados principalmente com intensidades e épocas distintas de poda, a fim de estabelecer a forma mais adequada dessa técnica, para cada grupo ou cultivar de mirtilheiros (SOUZA et al., 2014; RADÜNZ et al., 2014; JORQUERA-FONTENA et al., 2014; ALBERT et al., 2010). Isso confirma que a intensidade de poda, por exemplo, tem uma grande influência sobre importantes atributos de qualidade de frutos de mirtilheiros (RETAMALES & HANCOCK, 2012) através do equilíbrio da relação entre frutos e copa da planta.

A fenologia da cultura é um aspecto muito importante a ser estudado também, visando o conhecimento das épocas de floração, frutificação e colheita dos frutos, já que essas fases fenológicas variam de acordo com a cultivar, devido as diferentes exigências em horas de frio acumuladas.

Os frutos devem ser colhidos em estágio de maturação completa, ou seja, quando as frutas apresentavam coloração violeta uniforme e presença de pruína (SOUZA et al., 2011). As determinações de pH, da acidez e do teor de sólidos solúveis, contribuem para a apreciação objetiva do sabor dos frutos. O pH, geralmente inferior a 4,5 aumenta no decorrer do amadurecimento e influencia as características organolépticas e a capacidade de conservação dos frutos.

O mirtilheiro produz frutos com diâmetro entre 8 e 22 mm, de sabor agridoce (CHILDERS & LYRENE, 2006), com diversas propriedades nutraceuticas e alto potencial antioxidante, em razão da presença de compostos fenólicos (KALT et al., 2007) e segundo Sellappan et al. (2002), a combinação das 11 antocianinas presentes no mirtilo respondem por 56,3% do valor total de capacidade antioxidante do fruto.

Estes pequenos frutos são conhecidos por suas propriedades nutraceuticas, atribuídas ao alto teor e grande diversidade de antioxidantes naturais e polifenóis, ultrapassando outros alimentos funcionais, além de serem ricos em vitaminas e minerais (CANTUARIAS-AVILÉS et al., 2014). Outras partes da planta também possuem propriedades medicinais, podendo ser utilizadas folhas, flores e raízes no preparo de chás e extratos, no entanto, os frutos são os órgãos que contêm mais antioxidantes. Nos últimos anos, os

mirtos têm-se popularizado tanto pelas suas propriedades medicinais quanto pela sua grande versatilidade culinária, passando a ser um ingrediente muito procurado em todo o mundo para elaboração de pratos de alta gastronomia, e utilizados também na fabricação de chás, tortas, bolos, pudins, biscoitos, sorvetes, geleias e compotas (CANTUARIAS-AVILÉS et al., 2010).

O mirtilo muito apreciado devido ao seu sabor exótico, seu valor econômico e seus poderes medicinais, sendo conhecido como o fruto da longevidade, característica conferida devido ao alto conteúdo de antocianidinas contidas nos pigmentos hidrossolúveis de cor azul-púrpura do fruto (VIZZOTTO, 2009). Do grupo das pequenas frutas, que abrange as culturas morango, framboesa, mirtilo e amora-preta, o mirtilo é classificado como a fruta mais rica em antocianinas, com teores que variam de 93 a 280 mg de cianidina.100 g<sup>-1</sup> de fruto fresco conforme a cultivar (CONNOR et al., 2002).

De acordo com Zheng & Wang (2003), o alto nível de capacidade antioxidante encontrado no mirtilo, ajuda a neutralizar os radicais livres, os quais são moléculas instáveis que estão ligadas ao aparecimento de um grande número de doenças degenerativas e crônicas não transmissíveis e condições que predis põem ao surgimento de doenças cardiovasculares, câncer, deficiência cognitiva, disfunção imunológica, e cataratas.

Em estudos semelhantes, realizados no Brasil, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) por Ramirez et al. (2005), observou-se que os polifenóis encontrados no mirtilo são capazes de reverter declínios na tradução de sinais neuronais, bem como déficits no sistema motor e cognitivo. Sendo assim, dietas que contenham mirtilo podem prevenir problemas relacionados a doenças neurodegenerativas que incluem o Mal de Alzheimer, Mal de Parkinson e esclerose lateral.

Zheng & Wang (2003) identificaram um grande número de compostos fenólicos presentes no mirtilo, nos quais compreendem ácidos fenólicos e flavonóides. Dentre os flavonóides, destaca-se a alta concentração de antocianinas presentes na casca, caracterizando este fruto como uma matéria-prima para produção de corante natural (SEVERO et al., 2009).

O teor de antocianinas pode apresentar-se como um critério de escolha de cultivares, além da produtividade, em razão dos benefícios à saúde. Além da variação do teor de antocianinas entre cultivares, o sistema de cultivo

também pode influenciar e estudos comprovam que além das cultivares, ocorrem diferenças entre os ambientes, bem como o sistema de cultivo, influenciando no teor de antocianos e flavonóides em frutas e hortaliças (CALVETE et al., 2008).

Entretanto, a composição fenólica do mirtilo, apresenta grande variação qualitativa e quantitativa. Vários trabalhos demonstraram que esta variação é dependente de fatores intrínsecos (gênero, espécie e cultivar) e extrínsecos (condições ambientais e de cultivo, manejo e condições de armazenamento) (GIOVANELLI & BURATTI, 2009). Além disso, fatores como a complexidade dos compostos fenólicos, métodos de extração e quantificação também podem afetar a composição deste grupo de compostos e a alteração no conteúdo fenólico tem como consequência direta uma grande variabilidade na atividade antioxidante apresentada por esta fruta (RODRIGUES, 2009).

## CAPÍTULO 1

### Micropropagação de romãzeira

#### Introdução

A romãzeira, *Punica granatum* L., é um arbusto lenhoso e ramificado, pertencente à família Punicaceae que tem sido plantada mundialmente em regiões de clima tropical e subtropical (PEREIRA et al., 2006).

A romã está sendo cada vez mais explorada devido ao seu valor nutricional e propriedades medicinais, além de ser utilizada como uma planta ornamental (JAYESH & KUMAR, 2004; JOHANNINGSMEIER & HARRIS, 2011). Acrescido a isso, é uma fruta rica em ácidos fenólicos, flavonóides e antioxidantes que lhe dão a cor avermelhada, é rica em vitaminas A, E ( $\alpha$ -tocopherol) e C (ácido ascórbico),  $\beta$ -caroteno, potássio, ácido fólico e polifenóis (JADON et al., 2012). De acordo com os mesmos autores, o suco da romã possui atividade antioxidante três vezes maior do que o chá verde ou vinho vermelho, podendo ser usado contra úlceras, dores de ouvido, disenteria e lepra.

Geralmente é propagada por sementes ou por estacas lenhosas, no entanto, a micropropagação é uma técnica que permite a obtenção de explantes com a mesma constituição genética e em um curto espaço de tempo, pois se tem um maior controle das condições de cultivo (ÖLMEZ et al., 2007; SAMIR et al., 2009). Essa técnica, durante os últimos anos, tem sido amplamente utilizada para a propagação de diversas espécies de plantas, principalmente aquelas com maior dificuldade na produção de mudas. Entretanto, de acordo com Dias et al. (2013), estudos sobre a propagação *in*



*vitro* de romãzeira ainda são escassos e necessários para a obtenção de mudas com qualidade genética.

A micropropagação de romã é moderadamente difícil devido à exsudação de compostos fenólicos que resultam em escurecimento, necrose do explante, contaminação microbiana sistêmica ou latente e recalcitrância *in vitro* dos tecidos (SILVA et al., 2013). As principais técnicas para resolver problemas fenólicos relacionados ao estabelecimento *in vitro* de tecidos de romã, são o subcultivo rápido de explantes em meio fresco, o uso de antioxidantes e o cultivo de partes de plantas juvenis. Explantes de nós cotiledonares excisados de plântulas axênicas podem ser usados com sucesso para o cultivo *in vitro* de romãzeira, diminuindo drasticamente a contaminação bacteriana (NAIK et al., 2000).

Logo, diante deste contexto, neste estudo se propôs avaliar o cultivo *in vitro* de plântulas de romãzeira (*Punica granatum* L.), em diferentes meios de cultura, com presença ou não de sacarose, da citocinina 2iP e do regulador de crescimento dikegulac de sódio, além da influência de auxina no enraizamento dos explantes.

## **Material e métodos**

O experimento foi realizado no Laboratório de Propagação de Plantas Frutíferas, da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), localizado em Pelotas – RS (31° 48' 11" S; 52° 24' 53" W).

Foi dividido em três partes: estabelecimento das sementes, multiplicação dos explantes – primeiramente com uso de da citocinina 2iP e posteriormente com o regulador de crescimento dikegulac de sódio – e enraizamento dos explantes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em todas as etapas. Nas duas primeiras (estabelecimento e multiplicação com 2iP) os tratamentos abrangeram dois meios de cultura (MS - MURASHIGE & SKOOG, 1962 e WPM - LLOYD & McCOWN, 1980) e nas duas últimas, multiplicação e enraizamento, o meio de cultura utilizado foi o WPM.

No primeiro experimento foi testada a presença e ausência de sacarose nos meios de cultura, sendo um fatorial 2 x 2, com cinco repetições de vinte

explantes cada, totalizando quatro tratamentos. No segundo estudo, diferentes concentrações de 2-isopenteniladenina (2iP – 0, 1, 2 e 3 mg.L<sup>-1</sup>) foram comparadas, caracterizando um fatorial 2 x 4, com cinco repetições compostas de cinco explantes cada. E por seguinte, ainda no processo de multiplicação, verificou-se a influência do regulador dikegulac de sódio (sodium salt of 2,3:4,6-bis-O-(1-methylethylidene)-α-L-xylo-2-hexulofuranosonic), em seis concentrações distintas: 0; 16,9; 33,8; 66,7; 100,5 e 133,4 μM, representando um monofatorial de seis tratamentos. Já no enraizamento, o único fator em estudo foi a concentração de ácido 3-indolbutírico (AIB – 0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg.L<sup>-1</sup>), com cinco repetições de cinco explantes cada.

Foram colhidos frutos de uma única planta, visando a redução de variabilidade genética, já que a romãzeira possui polinização cruzada e assim, as sementes foram retiradas, com auxílio de uma pinça e posteriormente, higienizadas com água destilada e mantidas em temperatura ambiente até secar. Dessa forma, em um primeiro momento, realizou-se a desinfestação das sementes em câmara de fluxo laminar, onde essas foram imersas em álcool 70% sob agitação por 30 segundos, para posterior imersão em hipoclorito de sódio na concentração de 2,5% de cloro ativo, com adição de duas gotas de Tween 20, durante 15 minutos. Na sequência, o material desinfestado passou por tríplice lavagem em água destilada e autoclavada.

Posteriormente, as sementes foram transferidas para tubos de ensaio, em dois tipos de meio de cultura: MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e WPM - Wood Plant Media (LLOYD & McCOWN, 1980). Além dos sais e vitaminas característicos de cada meio de cultivo, adicionou-se 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol e nos tratamentos que continham sacarose foi acrescido ao meio 30 g.L<sup>-1</sup> de fonte de açúcar. O pH foi ajustado para 5,8 antes da adição do ágar na concentração de 6,0 g.L<sup>-1</sup> e, em seguida, realizou-se a autoclavagem dos meios de cultura a 121°C e 1,5 atm de pressão, por 20 minutos.

Após a inoculação, as sementes foram mantidas no escuro, com temperatura de 25 ± 2°C, por um período de sete dias, visando à redução da oxidação fenólica. Em seguida, foram transferidas para sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2°C e intensidade luminosa de 27 μmol.m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>.

Após 180 dias, no estabelecimento das sementes, as variáveis analisadas foram: germinação; contaminações fúngica e bacteriana; oxidação; presença de folhas e radículas; número médio de brotações; comprimento da maior brotação e radícula; e comprimento médio das radículas e brotações.

Em um segundo momento, após o estabelecimento da cultura *in vitro*, os explantes de romãzeira foram transferidos para frascos de 250 mL contendo 30 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e WPM - Wood Plant Media (LLOYD & McCOWN, 1980), com a mesma metodologia já citada anteriormente, entretanto, diferiram também quanto a concentração da citocinina 2iP (0, 1, 2 e 3 mg.L<sup>-1</sup>), com cinco explantes por frasco e cinco repetições cada. Da mesma forma, os frascos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2°C e intensidade luminosa de 27 µmol.m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, por 180 dias. Após esse período, avaliou-se: presença de calos; número de folhas, brotações e raízes; e comprimento da maior brotação e raiz.

Na segunda parte do estudo de multiplicação dos explantes de romãzeira, adicionou-se ao meio de cultivo WPM (LLOYD & McCOWN, 1980) dikegulac de sódio em seis concentrações diferentes: 0; 16,9; 33,8; 66,7; 100,5 e 133,4 µM). Como já citado, os explantes foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2°C e intensidade luminosa de 27 µmol.m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> e após 180 dias, as variáveis avaliadas foram: comprimento das brotações e raízes, número de folhas, brotações e raízes.

Para a etapa de enraizamento dos explantes, o experimento foi delineado inteiramente ao acaso, com um único fator avaliado (doses de AIB - ácido 3-indolbutírico: 0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg.L<sup>-1</sup>), em meio de cultura Wood Plant Media (LLOYD & McCOWN, 1980), já citado e testado em etapas anteriores ao estudo. Para cada tratamento, foram utilizadas cinco repetições com cinco explantes em cada frasco. Após um período de 180 dias, onde os explantes ficaram em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, temperatura de 25 ± 2°C e intensidade luminosa de 27 µmol.m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, verificou-se o número de raízes presentes por explantes e também, o comprimento destas.

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

probabilidade de erro, através do programa estatístico WINSTAT (MACHADO & CONCEIÇÃO, 2007). Os dados em porcentagem foram transformados em arco seno da raiz quadrada de  $x/100$ , e os valores provenientes de contagem foram transformados na raiz quadrada de  $x+0,5$ , onde  $x$ , em ambos os casos, é o percentual obtido de cada variável. E as variáveis da etapa do enraizamento dos explantes, além da comparação pareada, foram submetidas à análise de regressão polinomial.

## Resultados e Discussão

No primeiro estudo houve efeito da interação entre os fatores para as variáveis: presença de radícula e comprimento médio de brotações, já as outras variáveis foram analisadas levando em conta os fatores principais.

Durante o processo de estabelecimento das sementes não ocorreram oxidação e contaminações fúngica e bacteriana das sementes (Tabela 1), contrapondo-se aos estudos obtidos por Chaves et al. (2005) e Chauhan & Kanwar (2012), que demonstram que um dos maiores entraves no cultivo *in vitro* é a dificuldade de obter tecidos livres de contaminação, principalmente de bactérias. De acordo com Silva et al. (2013) a micropropagação de romã utilizando explantes oriundos de segmentos nodais é dificultado devido à exsudação de compostos fenólicos que resultam em escurecimento, necrose do explante, contaminação microbiana e recalcitrância *in vitro* dos tecidos. No intuito de reduzir esse problema Naik et al. (2000) estabeleceram protocolo de regeneração de plantas *in vitro* de romã usando nós cotiledonares e com isso, eliminaram o problema com contaminações. Da mesma forma, Dias et al. (2013), constataram que as contaminações dos explantes da romãzeira, ao longo do período do cultivo, não constituíram impedimento ao estabelecimento *in vitro* da cultura.

**Tabela 1.** Oxidação (OXID - %), contaminação fúngica (CF - %), contaminação bacteriana (CB - %) e germinação (GERM - %), durante o estabelecimento *in vitro* de sementes de romãzeira. Pelotas – RS, 2015.

	OXID		CF		CB		GERM	
<b>MS</b>	1,21	ns	1,00	ns	1,00	ns	2,52	a*
<b>WPM</b>	1,23	ns	1,00	ns	1,01	ns	2,43	b
<b>Sem sacarose</b>	1,24	ns	1,00	ns	1,00	ns	2,46	ns
<b>Com sacarose</b>	1,20	ns	1,00	ns	1,01	ns	2,50	ns
<b>CV (%)</b>	7,82		0,27		1,19		3,04	

\* Significativo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

<sup>ns</sup> não significativo.

Em relação a variável germinação de sementes demonstrada na tabela 1, verifica-se que não houve interação entre ambos os fatores, em contrapartida o meio de cultura no qual proporcionou maior porcentagem de germinação de sementes foi o MS, com germinação de aproximadamente 99%.

De acordo com a Tabela 2, o meio de cultura MS proporcionou um maior comprimento das brotações, provavelmente pela maior concentração de sais presentes neste, porém, para as variáveis número médio de brotações e de explantes com brotação e presença de folhas, não diferiram estatisticamente entre os dois meios de cultura. De acordo com Chauhan & Kanwar (2012), a formulação de MS é a forma mais comumente utilizada para propagação *in vitro* de genótipos de romã, embora algum sucesso foi alcançado com WPM. Em geral, o MS é o meio de cultura mais comumente utilizado para a micropropagação de romã, entretanto os meios de cultivo metade de MS e WPM também têm sido mostrados como sendo favoráveis para a propagação da cultura (SILVA et al., 2013).

**Tabela 2.** Presença de folhas (PF - %), número médio de brotações (NMB), número de explantes com brotações (NEB) e comprimento médio de brotações (CMB - cm) durante o estabelecimento *in vitro* de sementes de romãzeira. Pelotas – RS, 2015.

	PF		NMB		NEB		CMB	
<b>MS</b>	1,52	ns	1,60	ns	2,80	ns	3,59	a
<b>WPM</b>	1,59	ns	1,50	ns	2,59	ns	3,06	b
<b>Sem sacarose</b>	1,36	ns	1,24	b*	2,42	b	3,05	b
<b>Com sacarose</b>	1,75	ns	1,86	a	2,98	a	3,59	a
CV (%)	12,87		13,54		12,14		14,13	

\*Significativo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

<sup>ns</sup> não significativo

No que diz respeito à presença de sacarose no meio de cultura, as variáveis presença de folhas verdadeiras, número de explantes com brotações, número médio de brotações e comprimento da maior brotação apresentaram valores superiores no meio de cultura com sacarose. Respostas semelhantes foram obtidas com *Passiflora giberti*, onde Faria et al. (2006) observaram maior crescimento *in vitro* na presença de sacarose. Isso ocorre, já que esse açúcar favorece o desenvolvimento das brotações *in vitro* por ser uma fonte de carbono prontamente disponível. A necessidade de adição de sacarose no meio de cultura tem sido estudada em diferentes espécies por vários autores, como por exemplo, em helicônias, onde Torres et al. (2005) observaram que em meio suplementado com sacarose, nas concentrações de 1%, 2% e 3% houve crescimento e desenvolvimento da parte aérea e de raízes adventícias, diferente dos tratamentos sem suplementação de açúcar no meio de cultivo.

Na Tabela 3, que trata da fase de enraizamento *in vitro*, verifica-se que para o comprimento médio das radículas não houve diferença estatística entre os meios e presença de sacarose. Em contrapartida, levando em consideração o comprimento da maior radícula, o meio de cultivo com sacarose foi mais favorável para o desenvolvimento radicular. Entretanto, deve-se salientar que o excesso de sacarose pode ser prejudicial, pois inibe a síntese de clorofila, reduzindo a capacidade fotossintética das culturas (YAMADA & SATO, 1978) e a redução de sua concentração pode ser economicamente favorável, especialmente para a produção comercial de mudas (HOFFMANN, 1999).

**Tabela 3.** Comprimento médio das radículas (CmR - cm) e comprimento da maior radícula (CMR - cm) de explantes de romãzeira estabelecidos *in vitro*. Pelotas, RS – 2015.

	CmR		CMR	
<b>MS</b>	2,22	ns	2,34	ns
<b>WPM</b>	2,00	ns	2,10	ns
<b>Sem sacarose</b>	1,95	ns	1,95	b*
<b>Com sacarose</b>	2,27	ns	2,49	a
CV (%)	17,57		19,39	

\*Significativo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

<sup>ns</sup> não significativo

Como pode ser visualizado na Tabela 4, em ambos meios de cultura, houve maior emissão de radículas com a presença de sacarose. Entretanto, com uso de sacarose, obteve-se maior número de radículas no meio de cultivo WPM. Resultados semelhantes foram encontrados em 2002 por Pio et al., onde concluíram que a adição de sacarose ao meio de cultura atua como substrato para o processo de respiração celular, fornecendo energia para o processo de rizogênese. Além disso, a concentração de sacarose promove o aumento da biomassa, devido a incorporação de carbono, mas também afeta a produção de metabólitos secundários e a composição da parede celular, por isso, a concentração de sacarose utilizada é um fator determinante no crescimento e é dependente do tipo de explante (PASQUAL, 2001).

**Tabela 4.** Presença de radículas (PR - %) e comprimento médio de brotações (CmB - cm) de explantes de romãzeira estabelecidos *in vitro*. Pelotas, RS – 2015.

PR				
Sacarose				
	Sem		Com	
<b>MS</b>	1,06	Ab	1,22	Ba
<b>WPM</b>	1,04	Ab	1,42	Aa
CV (%)	5,42			

CmB				
Sacarose				
	Sem		Com	
<b>MS</b>	2,83	Ab	3,47	Aa
<b>WPM</b>	2,67	Aa	2,65	Ba
CV (%)	11,35			

\*Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas, dentro de cada tratamento, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Já na segunda etapa do experimento, no período de multiplicação dos explantes de romãzeira, ocorreu interação entre os tratamentos (meio de cultura e uso do hormônio 2iP), apenas para as variáveis comprimento da maior brotação e raiz (Tabela 5).

**Tabela 5.** Comprimento da maior brotação (CMB – cm) e da maior raiz (CMR – cm) de explantes de romãzeira *in vitro*. Pelotas, RS – 2015.

CMB						CMR					
Meio de cultura						Meio de cultura					
MSWPM						MSWPM					
2iP	0 mg.L <sup>-1</sup>	1,00	Bb	3,38	Ab	2iP	0 mg.L <sup>-1</sup>	1,00	Ba	1,34	Aab
	1 mg.L <sup>-1</sup>	2,41	Ba	5,14	Aa		1 mg.L <sup>-1</sup>	1,00	Ba	1,46	Aa
	2 mg.L <sup>-1</sup>	1,00	Bb	4,42	Aa		2 mg.L <sup>-1</sup>	1,00	Ba	1,17	Abc
	3 mg.L <sup>-1</sup>	1,00	Bb	2,90	Ab		3 mg.L <sup>-1</sup>	1,00	Aa	1,00	Ac
	CV (%)	19,06					CV (%)	11,05			

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas, dentro de cada tratamento, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Para a variável comprimento da maior brotação, o meio WPM acrescido de 1 ou 2 mg.L<sup>-1</sup> de 2iP foi o mais indicado, entretanto, considerando o meio MS, a adição de 1 mg.L<sup>-1</sup> de 2iP foi a mais adequada. O meio WPM com 1 mg.L<sup>-1</sup> de 2iP, possibilitou um maior crescimento das raízes, porém, não diferindo estatisticamente do meio sem o acréscimo da citocinina. Acompanhando esses resultados, em estudos também com romãzeira, Naik et al. (1999), constataram que a adição de uma citocinina ao meio foi essencial para induzir a brotação e a formação de brotos múltiplos nos explantes. Um ano depois, Naik et al. (2000), obtiveram elevada proliferação de ramos a partir dos nós cotiledonares estabelecidos em meio MS suplementado com dois tipos de citocinina, em diferentes concentrações, e verificaram que estes influenciaram significativamente a proliferação de ramos de explantes de romãzeira, e conforme se aumentou a concentração de citocinina, ocorreu um maior desenvolvimento das brotações. Além disso, Silva et al. (2013) constataram que diferentes tipos e concentrações de citocinina, influenciaram significativamente a multiplicação de explantes de romãzeira.



Comparando os meios e o uso de citocinina nos mesmos, em trabalhos com amoreira e framboeseira, Leitzke et al. (2010), também concluíram que no meio WPM, ocorreu um aumento do comprimento das brotações até a concentração de 15,5  $\mu\text{M}$  de 2iP; já com adição no meio MS, o comportamento foi linear descendente, indicando que houve uma queda no comprimento das brotações, o que demonstra as diferentes ações do hormônio adicionados aos diferentes meios de cultivo.

Na Tabela 6, percebe-se que WPM foi o meio de cultivo que proporcionou maiores números de folhas, brotações e raízes, sendo assim, a composição de sais deste foi mais favorável para o crescimento dos explantes, quando comparado ao MS. Isso pode ser explicado, pelo fato do meio WPM possuir 25% das concentrações de íons nitrato e amônia a mais do que o meio MS, além de maiores teores de potássio e de íons sulfato (PASQUAL, 2001), o que pode ter resultado em melhores condições para a multiplicação e formação do sistema radicular nos explantes de romãzeira. Em contraste com esses resultados, Patil et al. (2011) mostraram que a maior média de crescimento e regeneração por explantes de romãzeira foi registrado em meio MS em comparação com o WPM. No entanto, Samir et al. (2009) e Valizadeh Kaji et al. (2013) também constataram que o WPM é melhor para o crescimento vegetativo em comparação com o meio de cultivo MS.

**Tabela 6.** Número de folhas (NF), brotações (NB) e raízes (NR) e presença de calos (PC – %) em explantes de romãzeira *in vitro*. Pelotas, RS – 2015.

	NF		NB		NR		PC	
<b>MS</b>	1,22	b*	1,25	b	1,22	b	1,12	ns
<b>WPM</b>	2,87	a	1,53	a	1,39	a	1,23	ns
2iP	<b>0 mg.L<sup>-1</sup></b>	2,05	ns	1,35	ns	1,32	ns	0,36 b
	<b>1 mg.L<sup>-1</sup></b>	2,21	ns	1,42	ns	1,35	ns	1,30 a
	<b>2 mg.L<sup>-1</sup></b>	2,10	ns	1,37	ns	1,33	ns	1,50 a
	<b>3 mg.L<sup>-1</sup></b>	1,83	ns	1,42	ns	1,22	ns	1,55 a
	<b>CV (%)</b>	22,4		10,91		10,54		18,16

\*Significativo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

ns não significativo

Já para a presença de calos, não houve diferença estatística entre os tratamentos, logo, os dois meios de cultura e as diferentes concentrações de 2iP não influenciaram a formação de calos nos explantes de romãzeira, resultado positivo no estabelecimento e multiplicação *in vitro*. Entretanto, outros estudos apresentaram dados distintos a este, onde Golle et al. (2012), no estabelecimento e desenvolvimento de *Eugenia involucrata*, verificaram que a maior porcentagem de calogênese na base dos explantes ocorreu quando foram cultivados no meio WPM (66,66%), a qual não diferiu daquela observada no meio ½ MS (45%), diferentemente do meio MS, responsável por apenas 20% de calos.

Ainda na mesma tabela verifica-se que na presença de citocinina no meio de cultura não ocorreu diferença estatística para as variáveis: número de folhas, brotações e raízes. O tratamento com ausência de 2iP proporcionou menores índices de calo, o que é desejado, já que pretendeu-se a multiplicação direta dos explantes. Da mesma forma, Radmann et al. (2009), comparando fontes de citocinina, observaram que os tratamentos com 2iP não responderam à formação de brotações adventícias, mesmo na concentração mais alta estudada. Além disso, outros autores, como Naik et al. (1999), concluíram que em concentrações muito altas de benziladenina ou zeatina, ocorreu um efeito inibitório sobre o desenvolvimento de brotos de romãzeira *in vitro*. Esse resultado além de proporcionar maior desenvolvimento dos explantes, pode ainda, reduzir os custos de produção da muda, devido ao alto custo dos hormônios normalmente utilizados.

De acordo com a tabela 7, para as variáveis comprimento da parte aérea e número de brotações, não ocorreram diferenças estatísticas significativas. Em estudos com calas, Ebrahim (2004) obteve resultados contrários e verificou que para essas flores, o dikegulac de sódio aumentou a taxa de multiplicação e em geral, o comprimento da parte aérea foi maior.

**Tabela 7.** Comprimento da parte aérea (CPA - cm), número de brotações (NB), número de folhas (NF), comprimento da maior raiz (CMR - cm) e número de raízes (NR) de explantes de romãzeira no período de multiplicação *in vitro*. Pelotas, RS – 2015.

DIKEGULAC ( $\mu\text{M}$ )	CPA		NB		NF		CMR		NR	
0	4,28	ns	2,46	ns	3,55	abc*	1,22	ab	1,14	ab
16,9	4,38	ns	2,40	ns	3,14	c	0,46	b	0,95	b
33,8	5,41	ns	2,41	ns	3,28	bc	0,89	ab	1,06	ab
66,7	5,20	ns	2,48	ns	3,66	ab	0,88	ab	1,11	ab
100,5	4,34	ns	2,44	ns	3,66	ab	1,36	ab	1,10	ab
133,4	4,48	ns	2,53	ns	3,88	a	1,46	a	1,31	ab
CV (%)	38,07		8,62		16,31		6,91		34,12	

\*Significativo pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Entretanto, para as variáveis número de folhas e raízes e comprimento das raízes, houve diferença significativa entre as diferentes concentrações de dikegulac. A utilização de 133,4  $\mu\text{M}$  do regulador de crescimento proporcionou uma maior quantidade de folhas, porém, não diferindo estatisticamente das concentrações 0; 66,7 e 100,5  $\mu\text{M}$ , assim como para o comprimento de raízes, onde a concentração mais alta foi melhor, porém sem diferença estatística dos níveis: 0; 33,8; 66,7; 100,5  $\mu\text{M}$ . Essa característica se torna muito favorável, já que as folhas oriundas das plântulas germinadas *in vitro* podem ser uma fonte para utilização na organogênese, técnica essa, comumente usada na micropropagação de romãzeira (CHAUCHAN & KANWAR, 2012). Acrescido a isso, outros estudos concluíram que grande parte do sucesso alcançado na micropropagação de genótipos superiores de romã, é por meio de organogênese (SILVA et al., 2013).

Para a variável número de raízes, exceto a concentração 16,9  $\mu\text{M}$  de dikegulac, todas as outras apresentaram resultado satisfatório, com a presença de raízes nos explantes de romãzeira. Esse resultado contradiz os encontrados por Gyves et al. (2008), onde a porcentagem de enraizamento e número de raízes por explante, em oliveira *in vitro*, não tiveram diferença significativa, enquanto que o comprimento das raízes com uso de dikegulac foram ligeiramente maiores do que o controle, sem o uso do regulador. Similarmente, Gyves et al. (2008), constataram que a concentração de 133,4  $\mu\text{M}$  de dikegulac de sódio também foi a melhor para o desenvolvimento radicular de oliveiras

‘Canino’, ‘Frantoio’ e ‘Moraiolo’, entretanto, diferentemente do presente estudo, os autores não verificaram diferenças estatísticas no número de raízes quanto as concentrações usadas do regulador de crescimento.

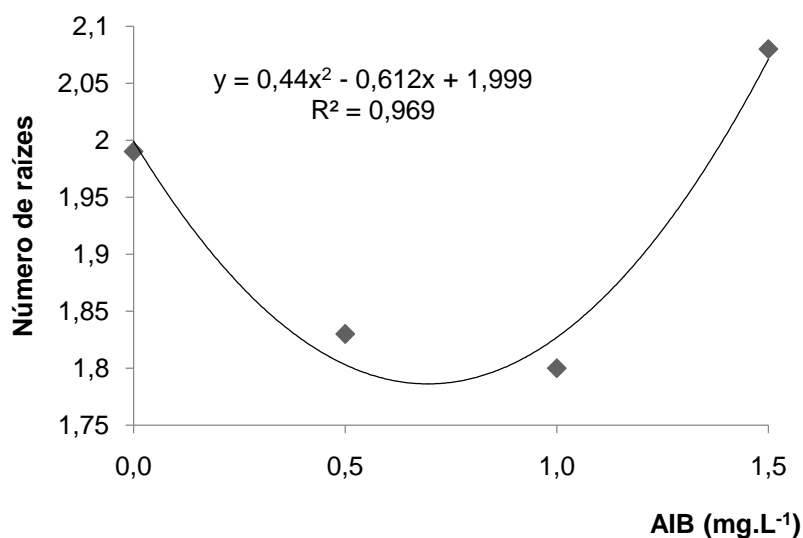
Na última etapa da micropropagação, enraizamento dos explantes (Tabela 8), foi obtido maior número e comprimento de raízes em meio de cultivo com a concentração de AIB mais elevada ( $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), diferindo estatisticamente das outras doses da auxina. Resultados semelhantes foram encontrados por Zhu et al. (2003), Murkute et al. (2004) e Deepika & Kanwar (2010) na indução de raízes em microestacas de romã, onde verificaram que o AIB favorece o desenvolvimento radicular, além do alongamento das raízes. Além disso, Silva et al. (2013), testaram diferentes fatores que favorecem a iniciação radicular e a auxina AIB foi a mais eficaz entre todos os tipos de auxina avaliados no enraizamento *in vitro* de explantes de romãzeira. Em contrapartida, Chaugule et al. (2007) sugeriram a suplementação de auxina em  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , independentemente do seu tipo.

**Tabela 8.** Número de raízes (NR) e comprimento de raízes (CR - cm) em explantes de romãzeira sob diferentes concentrações de AIB. Pelotas – RS, 2015.

		NR		CR	
AIB ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	0,0	1,99	b*	1,75	c
	0,5	1,83	c	2,22	bc
	1,0	1,80	c	2,46	b
	1,5	2,08	a	3,30	a
	CV (%)	2,38		13,01	

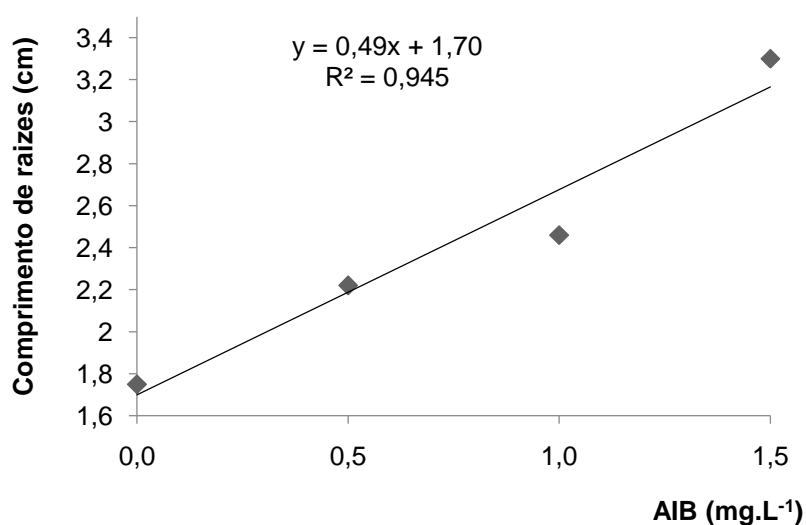
\*Significativo pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Na figura 1 verifica-se que houve um decréscimo no número de raízes nas concentrações de 0,5 e  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB, diferentemente das concentrações 0 e  $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , onde, segundo a curva quadrática, resultaram no aumento desse parâmetro. Em estudos com enraizamento de romãzeira, Naik et al. (2000) relataram que a adição de uma auxina ao meio foi essencial para induzir o enraizamento de explantes de romãzeira. No entanto, neste, a presença da fonte enraizadora não foi imprescindível, porém teve suma importância para o maior desenvolvimento de raízes.



**Figura 1.** Número de raízes em explantes de romãzeiras em diferentes concentrações de AIB. Pelotas - RS, 2015.

Entretanto, para a variável comprimento de raízes dos explantes, conforme aumentou a concentração de auxina, obteve-se raízes de maior tamanho, como é demonstrado no gráfico linear na figura 2. Os resultados obtidos nesse estudo, corroboram aos encontrados por Naik et al. (2000), que relataram que a adição de auxina ao meio, foi essencial para o enraizamento *in vitro* dos explantes de romãzeira micropropagados.



**Figura 2.** Comprimento de raízes de explantes de romãzeira em diferentes concentrações de AIB. Pelotas – RS, 2015.

De acordo com os resultados encontrados neste estudo, são necessários protocolos específicos para cada etapa do cultivo *in vitro* de romãzeira, onde para o estabelecimento de sementes indica-se a utilização do meio de cultura MS com sacarose, pois proporcionou o maior desenvolvimento das brotações e das raízes. Para o período de multiplicação dos explantes o meio de cultivo WPM, acrescido de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2iP, é o mais adequado, visando a obtenção de propágulos mais desenvolvidos, entretanto, a não utilização da citocinina 2iP resultou menores índices de calogênese em explantes de romãzeira. Além disso, o uso do regulador de crescimento dikegulac de sódio favoreceu o desenvolvimento da parte aérea e radicular dos explantes. E por fim, na etapa de enraizamento, o meio WPM com  $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB favorece a emissão e crescimento de raízes em explantes de romãzeira.

## Conclusões

1. O meio de cultura MS com sacarose é mais favorável para a germinação *in vitro* de sementes de romãzeira.
2. O meio WPM, acrescido de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2iP é o mais indicado para o crescimento das brotações e raízes de explantes de romãzeira.
3. A não utilização da citocinina 2iP proporciona menores índices de calogênese em explantes de romãzeira.
4. O uso do dikegulac de sódio, no cultivo *in vitro* de explantes de romãzeira favorece o desenvolvimento de nós, folhas e raízes.
5. O meio WPM com  $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB favorece o desenvolvimento do sistema radicular em romãzeira *in vitro*.

## **CAPÍTULO 2**

### **Métodos de propagação e intensidades de poda na produção e qualidade de mirtilos**

#### **Introdução**

No Brasil, a área plantada de mirtilheiro ainda é pequena, principalmente devido à indisponibilidade, qualidade e preço das mudas, situação decorrente da dificuldade de propagação da maioria das cultivares (TREVISAN et al., 2008).

Sendo assim, os estudos realizados com a cultura estão relacionados principalmente com métodos de propagação, a fim de estabelecer a técnica mais adequada para cada grupo ou cultivar (SCHUCH et al., 2007; FISCHER et al., 2008; TREVISAN et al., 2008; DAMIANI & SCHUCH et al., 2009), e de pós-colheita e análise fitoquímica dos frutos (BRACKMANN et al., 2010; MORAES et al., 2007), já que o mirtilo é conhecido mundialmente por suas propriedades nutracêuticas.

De acordo com Vizzotto (2012), estudos que correlacionam o consumo das pequenas frutas e seus benefícios para a saúde estão se intensificando consideravelmente nos últimos anos. Nesse sentido, o mirtilo é uma dessas frutas de maior destaque, devido a sua capacidade antioxidante e presença de compostos fenólicos e antociânicos e por isso, desperta a atenção tanto dos consumidores, quanto dos próprios produtores, pois a cultura pode ser uma nova alternativa para geração de renda nas propriedades.

Trabalhos a campo e de manejo de pomar são, ainda, escassos, deixando aberta uma lacuna para o sucesso da cultura no país (SOUZA, 2011). Logo, torna-se necessário o estudo do manejo do pomar e principalmente, da

poda de mirtilheiros nas condições da região Sul do Brasil, haja vista que para essa prática os produtores utilizam critérios validados em outros países, o que não é adequado, já que nossas condições edafoclimáticas são bastante distintas.

Os objetivos deste trabalho são a obtenção de dados de comportamento fenológico a campo, produção e qualidade de frutos de mirtilheiro, com destaque as propriedades funcionais, em função de diferentes métodos de propagação, cultivares e intensidades de poda na região de Pelotas – RS.

Com base nas problemáticas descritas, têm-se como hipótese que diferentes formas de propagação e intensidades de poda influenciam a produção e características físico-químicas de mirtilos 'Briteblue', 'Woodard' e 'Bluegem'.

## **Material e métodos**

O experimento foi realizado na Fazenda Agropecuária da Palma, pertencente à Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas, com características de latitude e longitude de 31°48'12,48" S 52°30'34,08" O, respectivamente.

Segundo classificação de Köppen, a cidade de Pelotas apresenta clima do tipo Cfa, com temperatura média anual de 17,8°C, umidade relativa média anual de 80,7%, precipitação pluviométrica média anual de 1366,9 milímetros (UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, 2013).

O desenvolvimento do trabalho foi realizado em um pomar de mirtilheiros, instalado em agosto de 2009, com um espaçamento de 1,3 m x 4,0 m entre plantas e entre linhas, respectivamente. No local contém plantas oriundas de diferentes métodos de propagação – estaquia e micropropagação – e cultivares: Bluegem, Briteblue e Woodard, todas pertencentes ao grupo *rabbiteye*.

O experimento foi instalado seguindo um delineamento inteiramente casualizado, já que as plantas foram escolhidas ao acaso em um pomar já estabelecido, em um local com condições uniformes para o desenvolvimento dos mirtilheiros. O mesmo foi planejado com um arranjo fatorial 2 x 3, sendo:



dois métodos de propagação (micropropagação e estaquia) e três intensidades de poda (testemunha, leve e drástica), separados em três estudos, de acordo com as cultivares: Briteblue, Woodard e Bluegem, com três repetições cada.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas estatisticamente pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade de erro, através do programa estatístico WINSTAT (MACHADO et al., 2007) e os valores provenientes de contagem foram transformados na raiz quadrada de  $x+0,5$ , onde 'x' é o percentual obtido de cada variável.

No início de agosto dos anos 2013 e 2014, foram realizadas diferentes intensidades de poda (APÊNDICE V): sem poda (testemunha), poda leve e poda drástica no pomar. A testemunha foi o tratamento no qual não foi realizada poda de inverno, e a planta permaneceu com os ramos do ano anterior, mesmo os secos, responsáveis pela produção da safra passada; a poda leve tratou-se de uma limpeza, onde foram retirados aproximadamente 25% dos ramos da planta, como por exemplo: finos, que produziram na última safra, mal posicionados, secos e doentes; e a poda drástica caracterizou-se por ser uma poda de forma bastante rigorosa, onde foram retirados cerca de 75% dos ramos. Neste caso, foi mantida somente a estrutura principal da planta e ramos com maior diâmetro e algumas hastes foram podadas 50 cm do solo para estimular brotações mais baixas, no intuito de facilitar no momento da colheita dos frutos.

A seguir serão descritas as variáveis analisadas neste estudo.

Peso dos ramos podados (g) - Todos os ramos retirados das plantas foram pesados, em balança de precisão, com objetivo de caracterizar a diferença e volume de poda fresca, nos diferentes tratamentos.

Crescimento de brotações (cm) - Foi mensurado, no período vegetativo, a partir da altura da planta e comprimento dos ramos novos, com auxílio de uma fita métrica.

Área da folha (cm<sup>2</sup>) - Foram coletadas 20 folhas por plantas, retiradas dos dois lados das plantas, a fim de avaliar o comprimento e a largura das folhas, através de uma régua milimetrada. A área da folha foi determinada a partir da média das medições e posteriormente, do produto do comprimento

pela largura, que foram multiplicados por um fator de correção (f) de 0,6433 (DAROZ, et al., 2008).

Índice de clorofila (unidades SPAD) - O teor de clorofila foi determinado a partir do medidor de clorofila portátil: SPAD-502-PLUS, da Minolta, que realiza uma medição de absorbância da folha em duas regiões de comprimento de onda - nas regiões vermelhas e próximas do infravermelho. Utilizando essas duas transmitâncias, o equipamento calcula o valor SPAD proporcional à quantidade de clorofila presente na folha, como por exemplo: 35,5 a 46,5 unidades SPAD.

Estádios fenológicos - No início da floração, foram marcados dois ramos por planta e foi realizada a avaliação fenológica, duas vezes por semana. Através da escala fenológica proposta por Childers & Lyrene (2006), que possui estádios fenológicos variando de um a nove (ANEXO 1), foram determinadas as datas de início da floração (quando mais de 5% das flores estavam abertas), plena floração (50% das flores abertas), fim da floração (90% das flores abertas), início de brotação e início e final da colheita.

Produção ( $\text{Kg.planta}^{-1}$ ) - Após a colheita de todo o pomar, foi determinada a produção em cada um dos tratamentos, através da contagem do número de frutos, visando identificar os métodos que proporcionam maior produção, nas condições do experimento.

Análises pós-colheita - Os frutos foram colhidos quando apresentavam coloração violeta e presença de pruína, ou seja, quando estavam em estágio de maturação completa. Posteriormente, foram separados e homogeneizados em lotes diferentes, em embalagens apropriadas, com amostras de aproximadamente 500 g de frutos por tratamento, para posteriormente fazer as análises pós-colheitas.

As avaliações foram realizadas no Laboratório de Fruticultura do Departamento de Fitotecnia, da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e no Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pertencente a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Clima Temperado).

Número e peso dos frutos (g) - Logo após a colheita, todos os frutos foram contados e pesados em balança digital de precisão.

Diâmetro médio dos frutos (mm) - Foi utilizada uma amostra de 100 frutos por repetição, para a obtenção do diâmetro médio. Em cada fruto foram

realizadas duas medições, no seu sentido equatorial e longitudinal, através de paquímetro digital marca Digimess e posteriormente, feito uma média entre os dois valores.

Cor - Para determinação da cor dos frutos, foram utilizados dois equipamentos distintos: colorímetro digital (marca Konica Minolta®) e D.A. Meter® (marca Sintéleia, Turoni - Itália).

O primeiro, através do colorímetro digital, a cor dos frutos foi determinada pelo método definido pela Comissão Internacional de Iluminação (CIE), criado em 1976. Neste, consideram-se os parâmetros  $L^*$   $a^*$   $b^*$ , onde:  $L^*$  (luminosidade/luminância, expressa em percentagem – de 0 para o preto a 100 para o branco),  $a^*$  (tendência para o vermelho ou verde) e  $b^*$  (tendência para o amarelo ou azul), sendo  $a^*$  e  $b^*$ , valores que vão de -120 a +120. Após a obtenção desses parâmetros, a coloração dos frutos foi calculada pela diferença de cor ( $\Delta E$ ) pela fórmula:  $[(L^* - \mu L^*)^2 + (a^* - \mu a^*)^2 + (b^* - \mu b^*)^2]^{0,5}$ .

Já a estimativa de cor, pelo espectrofotômetro portátil DA meter®, é obtido um índice DA, que pode ser estimado como a diferença entre os valores de absorbância medidos em 670 nm (visível) e 720 nm (infravermelho) (NOFERINI et al., 2009), sendo este índice, uma patente pertencente a Universidade de Bolonha – Itália.

pH - A medição direta do pH foi determinada a partir de um pHmetro digital, marca PHTEK, modelo PHS-3B.

Sólidos solúveis totais (°Brix) - Foram determinados com auxílio de refratômetro manual digital (marca Atago PAL<sup>-1</sup>), através do suco das frutas.

Acidez titulável total (meq.100 mL<sup>-1</sup>)- Foi determinada por titulometria de neutralização, com hidróxido de sódio 0,1 N, utilizando 10 mL de suco diluído em 90 mL de água destilada, titulando-se até pH 8,1, com a utilização do mesmo pHmetro digital (marca PHTEK, modelo PHS-3B).

Fenólicos totais (mg ácido clorogênico equivalente/100g tecido) - Pesaram-se cinco gramas de frutos, com duplicatas de cada repetição, para todos os tratamentos, e homogeneizados em ultra-turrax com 20 mL de solvente (metanol), e posteriormente, levados para centrifuga, marca Jouan, em velocidade de 5 rpm, à 0°C, por 15 minutos. O sobrenadante foi pipetado para um tubo ependorf e conservado à -20°C, até o momento da leitura. Uma alíquota de 50 µL do sobrenadante da amostra foi diluída em 4 mL de água

destilada, 200  $\mu\text{L}$  de metanol e 250  $\mu\text{L}$  do reagente Folin-Ciocalteu (SWAIN & HILLIS, 1959) 0,25 N e reagiram por quatro minutos antes de adicionar 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1N. Em seguida, as misturas foram mantidas por duas horas, em repouso, à temperatura ambiente e no escuro. Em espectrofotômetro, marca Genesys 10uv, leram-se as amostras em uma absorbância de 725 nm, em cubeta de quartzo. Nos casos onde a absorbância foi superior a 0,6 unidades de absorbância (UA), as amostras foram diluídas e reanalisadas. Uma curva padrão para o ácido clorogênico foi construída.

Antocianinas totais (mg cianidina 3-glicosídeo/100g amostra) - A quantificação de antocianinas totais foi realizada através da metodologia adaptada de Fuleki & Francis (1968). Para cada repetição, fizeram-se duplicatas, com cinco gramas de cada amostra, que foram homogeneizados em ultra-turrax com 15 mL de solvente (metanol), e posteriormente, levados para centrifuga, marca Jouan, em velocidade de 5 rpm, à 0°C, por 15 minutos. O sobrenadante foi pipetado para um tubo ependorf e conservado à -20°C, até o momento da leitura. Para a análise, foi utilizado 1 mL da extração e 24 mL de etanol acidificado com HCl 1,5 N e a amostra ficou em repouso, por 30 minutos, no escuro e em temperatura ambiente. Posteriormente, em espectrofotômetro, marca Genesys 10uv, as antocianinas foram lidas, com absorbância de 535 nm, em cubeta de quartzo. Quando a absorbância foi superior a 0,7, as amostras foram diluídas e as leituras repetidas e assim, uma curva padrão para cianidina-3-glicosídeo foi construída.

Atividade antioxidante ( $\mu\text{g}$  trolox equivalente/g tecido) - Para a extração, foi pesado cinco gramas de amostra, com duplicatas para cada repetição, e posteriormente triturada em ultra-turrax com 20 mL de metanol e centrifugados por 15 minutos a 5 rpm, a 0°C em centrífuga refrigerada (marca Jouan). Uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  do sobrenadante da amostra foi combinada com 150  $\mu\text{L}$  de metanol e 3800  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). Essas amostras e um branco (controle) reagiram por 24 horas, para assim, fazer a leitura em cubeta de quartzo, em espectrofotômetro (marca Genesys 10uv) que foi zerado com metanol. A absorbância utilizada foi de 515 nm e quando a absorbância foi menor que 0,2 UA, as amostras foram diluídas em metanol e reanalisadas. Uma curva padrão foi construída para o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico.

## Resultados e discussão

### Estudo 1 – Cultivar Briteblue

De acordo com a tabela 1, verifica-se que nas duas safras de cultivo (2013/14 e 2014/15), as plantas ‘Briteblue’ micropropagadas podadas drasticamente se diferenciaram dos outros tratamentos, ou seja, as oriundas da técnica de micropropagação exigiram uma maior intensidade de poda do que as originadas por estaquia, devido ao maior crescimento vegetativo destas plantas estimulado pelo rejuvenescimento ocorrido *in vitro*. Esse fato também foi verificado por outros autores, onde à campo, mirtilheiros propagados *in vitro* apresentam maior número de brotações do que as propagadas por estaquia (READ et al., 1989; JAMIESON & NICKERSON, 2003; SOUZA et al., 2011). Em estudos com mirtilheiros do grupo *highbush*, cultivar ‘Herbert’, as plantas derivadas da cultura de tecidos também cresceram com maior vigor e uniformidade do que plantas oriundas da estaquia durante os primeiros três anos no campo (LITWIŃCZUK et al., 2005).

**Tabela 1.** Peso de ramos em diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica), em mirtilheiros cv. Woodard, propagados de diferentes formas (MP – micropropagação; EST – estaquia). Pelotas – RS, 2015.

	MP		EST	
2013/14				
Test	0,00	Ac	0,00	Ab
Leve	608,67	Ab	586,00	Aa
Drás	1494,00	Aa	813,33	Ba
CV (%)	23,28			
2014/15				
Test	0,00	Ab	0,00	Ab
Leve	478,67	Ab	445,33	Ab
Drás	2401,33	Aa	1492,67	Ba
CV (%)	29,25			

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha ou maiúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

Para as variáveis área da folha, altura de planta e índice de clorofila não ocorreu interação entre os dois fatores nos dois anos de cultivo (Tabela 2). O método de propagação, assim como a intensidade de poda não influenciaram a área da folha das plantas. As plantas micropropagadas se desenvolveram mais, em altura, nas duas safras, comparada com as propagadas por estaquia e resultados semelhantes foram encontrados por SOUZA et al. (2011), onde verificaram que a propagação *in vitro* foi a que induziu maior crescimento vegetativo inicial, representada pela maior altura de planta.

**Tabela 2.** Área da folha (AF – cm<sup>2</sup>), altura de planta (AP – m) e índice de clorofila (IC - unidades SPAD) de plantas de mirtilheiro ‘Briteblue’ em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST) e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015.

	AF		AP		IC	
2013/14						
MP	6,70	ns	1,44	a*	35,60	ns
EST	7,00	ns	1,22	b	38,90	ns
TEST	6,85	ns	1,23	ns	37,25	b
LEVE	5,98	ns	1,23	ns	37,20	b
DRÁS	6,87	ns	1,54	ns	42,45	a
CV (%)	20,17		16,28		5,00	
2014/15						
MP	8,06	ns	1,44	a	46,28	ns
EST	7,52	ns	1,20	b	44,52	ns
TEST	7,60	ns	1,30	ns	44,98	ns
LEVE	7,70	ns	1,27	ns	45,48	ns
DRÁS	7,60	ns	1,39	ns	45,73	ns
CV (%)	22,53		14,69		9,46	

\*Significativo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

<sup>ns</sup> não significativo

No primeiro e segundo anos de avaliações, o método de propagação não alterou o índice de clorofila das folhas, apenas na segunda safra, a intensidade de poda. Kadir (2003) relata que a prática de poda alterou essa característica e as folhas apresentaram maiores taxas de clorofila nas plantas com poda drástica na safra 2013/14, já que a retirada das folhas e ramos



Dessa forma, no segundo ano de estudo, as técnicas de propagação não diferiram estatisticamente entre si, porém, mais uma vez, as plantas podadas drasticamente favoreceram o desenvolvimento dos ramos novos. Esse resultado difere dos estudados por Marino et al. (2014), onde desde o plantio e após o primeiro e segundo anos de crescimento, as plantas oriundas da cultura de tecidos de três cultivares tiveram ramos de maior comprimento, comparadas com as por estaquia.

Na tabela 4 verifica-se que o período de florescimento iniciou em geral, na primeira semana de agosto e o final ocorreu entre o final de agosto e o de setembro e nos dois ciclos de produção, as brotações novas iniciaram a partir da segunda quinzena de agosto. Já o período completo de colheita, foi realizado apenas na primeira safra (2013/14), que se estendeu do fim de novembro, até a primeira semana de janeiro. No segundo ciclo (2014/15), não foram coletados dados de produção pois ocorreu no pomar problemas de frutificação efetiva e abortamento dos frutos, provavelmente devido as variações anuais de acúmulo de frio, distintos nas duas safras (Anexo 2).

**Tabela 4.** Fenologia de mirtilheiros cv. Briteblue sob diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica), propagados de diferentes formas (MP – micropropagação; EST – estaquia). Pelotas – RS, 2015.

Propagação	Poda	Floração		Brotação		Colheita	
		Início	Plena	Final	Início	Início	Final
2013/14							
MP	Testemunha	02/ago	26/ago	09/out	23/ago	25/nov	27/dez
MP	Leve	04/ago	08/set	12/out	27/ago	25/nov	07/jan
MP	Drástica	03/ago	06/set	20/out	27/ago	25/nov	27/dez
EST	Testemunha	06/ago	01/out	08/nov	22/ago	04/dez	07/jan
EST	Leve	07/ago	28/set	05/nov	22/ago	04/dez	11/jan
EST	Drástica	07/ago	05/out	07/nov	26/ago	02/dez	07/jan
2014/15							
MP	Testemunha	01/ago	29/ago	03/out	17/ago	09/dez	*
MP	Leve	05/ago	09/set	29/set	20/ago	09/dez	*
MP	Drástica	02/ago	10/set	05/out	19/ago	09/dez	*
EST	Testemunha	09/ago	29/set	21/out	15/ago	09/dez	*
EST	Leve	06/ago	27/set	20/out	17/ago	09/dez	*
EST	Drástica	03/ago	01/out	15/out	20/ago	09/dez	*

\*Dados indisponíveis devido a não realização da colheita da safra 2014/15.



Ambos, métodos de propagação e intensidades de poda, em plantas de mirtilheiro cv. Briteblue, tiveram diferenças para as variáveis diâmetro médio e número de frutos, assim como para a produção de mirtilos (Tabela 5), diferentemente dos resultados encontrados por Souza et al. (2011), onde não foi constatada diferença significativa entre os métodos de propagação para as variáveis produção por planta e por hectare, diâmetro dos frutos e número de frutos colhidos por planta. Verifica-se que o diâmetro dos frutos está diretamente relacionado com a intensidade de poda e que as plantas testemunhas (sem poda) nos dois métodos de propagação, produziram frutos de menor calibre, quando comparadas com as podadas.

**Tabela 5.** Diâmetro médio dos frutos (DMF – mm), número de frutos (NF) e produção (PROD - Kg.planta<sup>-1</sup>) de plantas de mirtilheiro 'Briteblue' em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST) e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015.

	DMF				NF				PROD			
	MP		EST		MP		EST		MP		EST	
<b>TEST</b>	15,45	Ab	12,84	Bb	37,13	Aa	16,69	Ba	1,42	Aa	0,26	Ba
<b>LEVE</b>	15,21	Bb	17,29	Aa	24,00	Ab	19,94	Aa	0,72	Ab	0,36	Aa
<b>DRAS</b>	18,00	Aa	17,48	Aa	25,61	Ab	21,36	Aa	0,69	Ab	0,50	Ba
<b>CV (%)</b>	4,91				12,98				32,43			

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha ou maiúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

Entretanto, na mesma tabela, o número de frutos e a produção por planta foram maiores em plantas micropropagadas sem poda, porém, não diferindo estatisticamente das obtidas por estaquia (podas leve e drástica) e poda leve, respectivamente. Estudos semelhantes com mirtilheiros mostraram que as plantas submetidas à poda leve foram mais produtivas, fato que provavelmente esteja associado à permanência de maior número de ramos na planta, convergindo para o maior número de gemas floríferas, consequentemente apresentando o maior número de frutos (RADÜNZ et al. 2014). Jorquera-Fontena et al. (2014) constataram que a poda em plantas de mirtilo 'Brigitta' estimulou uma maior produtividade e também, um maior número de frutos por planta.

Em relação às variáveis apresentadas na tabela 6, a intensidade de poda influenciou apenas a acidez titulável de mirtilheiros 'Briteblue', onde as plantas sem poda produziram frutos de maior acidez, comparadas às podadas. Souza et al. (2014) verificaram que a acidez titulável foi influenciada pela prática da poda no ciclo 2011/2012. A micropropagação foi o método que conferiu cor mais significativa nos frutos, comparado com a estaquia, pelo equipamento DAMeter. Essa característica, muitas vezes, é considerada um dos indicadores do ponto de maturação, associando-se também à maior presença de compostos fenólicos e antocianinas nos frutos, conforme observado por Ligarreto et al. (2011).

**Tabela 6.** Peso médio dos frutos (PMF – g), cor dos frutos pelo equipamento Dameter (DAM), pH e acidez titulável (AT – meq.L<sup>-1</sup>) de plantas de mirtilheiro 'Briteblue' em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST) e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015.

	PMF		DAM		pH		AT	
<b>MP</b>	0,99	ns	1,67	a*	2,10	ns	10,60	ns
<b>EST</b>	0,98	ns	1,34	b	1,97	ns	14,93	ns
<b>Test</b>	0,98	ns	1,47	ns	1,95	ns	14,02	a
<b>Leve</b>	0,92	ns	1,54	ns	2,06	ns	12,38	b
<b>Drás</b>	1,06	ns	1,50	ns	2,10	ns	11,90	b
CV (%)	18,43		13,82		9,20		3,29	

\*Significativo pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

ns não significativo

Nesse estudo, não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto ao pH dos frutos, em contrapartida, Souza et al. (2011) notaram diferença entre os métodos de propagação para a mesma cultivar, em que foi possível constatar menor valor nos frutos de plantas micropropagadas. Essa resposta pode ser explicada pela existência de maior proporção de casca em relação à polpa, como característica da variedade (GIOVANELLI & BURATTI, 2009). A diferença estatística também não ocorreu no peso médio de frutos, tanto para o método de propagação, quanto para a intensidade de poda, contrariando resultados obtidos por Jorquera-Fontena et al. (2014), onde o

peso dos frutos variou significativamente com a intensidade de poda nas plantas e as podadas levemente, tiveram frutos 40% menores do que as plantas podadas drasticamente.

A cor e os sólidos solúveis dos frutos 'Briteblue' foram influenciados pelos dois fatores estudados (Tabela 7), diferentemente do encontrado por Souza et al. (2014), que verificaram que a prática de poda teve pouca influência sobre a qualidade dos frutos avaliados, onde o teor de sólidos solúveis não foi alterado nas condições do experimento. Outro estudo que também pode ser comparado, é o de Jorquera-Fontena et al. (2014), onde a concentração total de sólidos solúveis nos frutos aumentou aproximadamente 9% em plantas podadas drasticamente. Porém, Machado et al. (2004) verificaram em trabalhos realizados em diferentes safras, que o teor de sólidos solúveis totais apresenta grande variação, uma das explicações é a oscilação climática que ocorre entre os anos.

**Tabela 7.** Cor determinada por colorímetro ( $\Delta E$ ) e sólidos solúveis (SS - %) de frutos oriundos de plantas de mirtilheiro 'Briteblue' em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST) e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015.

	$\Delta E$				SS			
	MP		EST		MP		EST	
<b>TEST</b>	1,18	Aa	1,52	Aa	14,07	Bb	16,33	Aa
<b>LEVE</b>	1,13	Aa	0,49	Bb	14,20	Ab	14,53	Aab
<b>DRAS</b>	0,65	Bb	1,11	Aa	16,60	Aa	12,57	Bb
CV (%)	19,4				6,99			

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha ou maiúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

Verifica-se que a cor dos frutos foi mais intensa em plantas micropropagadas sem poda e com poda leve, assim como obtidas por estaquia sem poda e com poda drástica. Verifica-se então, que em ambos os métodos de propagação, as plantas sem poda produziram frutos com maior coloração, provavelmente pela menor emissão de novos ramos, e consequentemente, maior luminosidade no interior da copa. Resultados opostos foram obtidos em relação aos sólidos solúveis dos frutos, onde plantas propagadas *in vitro* e

podadas drasticamente, assim como, as obtidas por estaquia, sem poda, geraram valores mais expressivos, o que demonstra a diferença no desenvolvimento das plantas, de acordo com a forma que as mesmas foram propagadas.

Na tabela 8 é demonstrada a influência dos tratamentos em estudo para os valores de antocianinas totais nos frutos de mirtilheiro cv. Briteblue, onde a intensidade de poda não influenciou no acúmulo desses compostos. Essa constatação se difere do esperado, já que há tendência de maiores concentrações de antocianinas em plantas com maior intensidade de poda, devido a maior exposição solar e ainda, devido a maior condição de estresse ocasionada por essa prática. Resultado esse que contraria os encontrados por Radünz et al. (2014), que verificaram que a intensidade de poda influenciou os teores de antocianinas.

**Tabela 8.** Antocianinas totais (ANT - mg cianidina 3-glicosídeo/100g amostra) de frutos oriundos de plantas de mirtilheiro 'Briteblue' em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST) e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015.

	ANT	
<b>MP</b>	527,20	a*
<b>EST</b>	412,07	b
<b>TEST</b>	430,31	ns
<b>LEVE</b>	489,40	ns
<b>DRÁS</b>	489,20	ns
<b>CV (%)</b>	13,85	

\*Significativo pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.  
 ns não significativo

Na mesma tabela verifica-se que para essa cultivar, a técnica de micropropagação favoreceu a obtenção de frutos com maior concentração de antocianinas totais, quando comparada com a estaquia. As culturas de células de plantas podem sintetizar grandes quantidades de metabólitos secundários dentro de um período de cultivo de duas semanas. Esse fato pode ser explicado pelo fato da culturas de tecidos de plantas favorecer a síntese de grandes quantidades de metabólitos secundários dentro de um curto período de tempo (FUMAGALI et al., 2008).

No entanto, houve interação entre os fatores para as variáveis fenólicos totais e atividade antioxidante dos frutos (Tabela 9). Para ambas, plantas micropropagadas sem poda e plantas obtidas por estaquia com podas leve e drástica, produziram frutos com maior teor de fenóis e antioxidantes. A maior presença desses compostos nas plantas propagadas *in vitro* e sem poda, pode ser justificada pois nas podadas drasticamente, ocorreu uma grande emissão de ramificações vegetativas e que conseqüentemente, conferem um maior sombreamento no interior da planta e, provavelmente por essa razão, não ocorreu diferenças no teor de antocianinas. O mesmo foi constatado por Riihinen et al. (2008), onde o menor dossel vegetativo permitiu maior incidência da luz solar sobre a superfície do fruto, visto que maiores níveis de radiação solar estão relacionados ao acréscimo de compostos fenólicos, principalmente antocianinas.

**Tabela 9.** Fenólicos totais (FT - mg ácido clorogênico equivalente/100g tecido) e atividade antioxidante (AA - µg trolox equivalente/g tecido) de frutos oriundos de plantas de mirtilheiro 'Briteblue' em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST) e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015.

	FT				AA			
	MP		EST		MP		EST	
<b>Test</b>	819,76	Aa	651,83	Ba	9635,30	Aa	7667,89	Bb
<b>Leve</b>	644,09	Ab	695,41	Aa	7937,2	Bb	9033,6	Aa
<b>Drás</b>	671,09	Ab	677,09	Aa	7760,2	Bb	9504,43	Aa
CV (%)	8,92				7,03			

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha ou maiúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

## Estudo 2 – Cultivar Woodard

O peso dos ramos da poda das plantas de mirtilheiros 'Woodard' teve influência tanto das intensidades de poda, quanto dos dois métodos de propagação (Tabela 1). E como já esperado, a técnica que propiciou um maior desenvolvimento de ramos vegetativos e uma planta de maior porte, foi a micropropagação, na poda de maior intensidade (drástica). Resultados

semelhantes, quanto ao maior vigor de plantas micropropagadas, foram encontrados por Litwińczuk et al. (2005) e em consequência disso, maior necessidade de práticas de poda mais intensas, com objetivo de renovação da planta. Marino et al. (2014) também concluíram em diferentes variedades de mirtilheiros 'Jewel' e 'Esmerald', que o peso seco dos ramos foi maior em plantas micropropagadas, do que em plantas derivadas da estaquia.

**Tabela 1.** Peso de ramos em diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica), em mirtilheiros cv. Woodard, propagados de diferentes formas (MP – micropropagação; EST – estaquia). Pelotas – RS, 2015.

	MP		EST	
	2013/14			
Test	0,00	Ac	0,00	Ac
Leve	548,67	Ab	458,00	Bb
Drás	1223,33	Aa	561,33	Ba
CV (%)	7,12			
	2014/15			
Test	0,00	Ac	0,00	Ac
Leve	1746,00	Ab	905,33	Bb
Drás	2588,00	Aa	1800,67	Ba
CV (%)	14,81			

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha ou maiúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

Na safra 2013/14, não houveram diferenças estatísticas nas variáveis área foliar, índice de clorofila e altura de plantas, assim como Smolarz & Chlebowska (1997), onde método de propagação não teve efeito significativo no número de brotações e altura de planta de mirtilheiro 'Bluecrop'. Houve influência apenas do método de propagação, onde as plantas oriundas da micropropagação se diferiram das obtidas por estaca, no comprimento de ramos novos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Área da folha (AF – cm<sup>2</sup>), índice de clorofila (IC - unidades SPAD), comprimento de ramos (CR - cm) e altura de planta (AP – m) de plantas de mirtilheiro ‘Woodard’ em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST) e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015.

	AF		IC		CR		AP	
2013/14								
MP	7,31	ns	37,23	ns	26,94	a*	1,41	ns
EST	7,72	ns	36,41	ns	17,94	b	1,29	ns
TEST	7,38	ns	38,75	ns	21,50	ns	1,27	ns
LEVE	7,41	ns	36,35	ns	22,29	ns	1,43	ns
DRÁS	7,74	ns	35,37	ns	23,54	ns	1,36	ns
CV (%)	14,51		12,55		30,34		23,59	
2014/15								
MP	7,40	ns	40,59	ns	28,74	ns	1,42	ns
EST	7,81	ns	38,93	ns	24,63	ns	1,40	ns
TEST	6,57	b*	37,23	ns	20,50	b*	1,33	ns
LEVE	7,42	ab	40,65	ns	25,83	ab	1,50	ns
DRÁS	8,83	a	41,40	ns	33,72	a	1,39	ns
CV (%)	18,14		8,71		21,35		24,14	

\*Significativo pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

<sup>ns</sup> não significativo

Já na safra seguinte, os métodos de propagação não influenciaram nenhuma das variáveis da tabela 2, entretanto, as plantas com folhas de maior área, e, além disso, com ramos de maior comprimento, ocorreram em condições de poda drástica, porém, sem diferir estatisticamente das de poda leve. Similar a este resultado, Jorquera-Fontena et al. (2014) constataram que a poda drástica afetou significativamente a área das folhas do dossel, aumentando cerca de 60%, comparando-as com as plantas levemente. Nesse sentido, a intensidade da poda de frutificação determina como será o crescimento vegetativo durante a primavera e verão e, quanto mais drástica, maior número de ramos vegetativos e menor quantidade de frutos serão formados (ALBERT et al., 2010).

Na tabela 3 há a comparação dos tratamentos quanto a fenologia das plantas ‘Woodard’. A floração teve início no final de agosto/início de setembro e

se estendeu até início de novembro, com plena floração entre a última semana de agosto e primeira de setembro. As brotações novas, em todos os tratamentos, iniciaram na segunda quinzena de agosto. O período de colheita na safra 2013/14, iniciou na última semana de novembro (dia 27) e foi finalizada no dia 07 de janeiro. Entretanto, a segunda safra foi prejudicada devido a fatores adversos, como o acúmulo de horas de frio no período hibernar (ANEXO 2) e consequentemente, queda dos frutos antes do amadurecimento, portanto, não foi possível a colheita dos mesmos.

**Tabela 3.** Fenologia de mirtilheiros cv. Woodard sob diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica), propagados de diferentes formas (MP – micropropagação; EST – estaquia). Pelotas – RS, 2015.

Propagação	Poda	Floração		Brotação		Colheita	
		Início	Plena	Final	Início	Início	Final
2013/14							
MP	Testemunha	01/ago	29/ago	02/nov	23/ago	02/dez	07/jan
MP	Leve	02/ago	07/set	10/nov	27/ago	02/dez	07/jan
MP	Drástica	04/ago	08/set	07/nov	24/ago	02/dez	02/jan
EST	Testemunha	29/jul	23/ago	09/out	17/ago	27/nov	27/dez
EST	Leve	25/jul	24/ago	12/out	17/ago	27/nov	07/jan
EST	Drástica	02/ago	22/ago	20/out	20/ago	27/nov	07/jan
2014/15							
MP	Testemunha	01/ago	01/set	20/out	19/ago	09/dez	*
MP	Leve	03/ago	03/set	27/out	17/ago	09/dez	*
MP	Drástica	03/ago	05/set	18/out	20/ago	09/dez	*
EST	Testemunha	29/jul	20/ago	25/set	10/ago	11/dez	*
EST	Leve	29/jul	25/ago	28/set	11/ago	11/dez	*
EST	Drástica	30/jul	20/ago	08/out	14/ago	11/dez	*

\*Dados indisponíveis devido a não realização da colheita da safra 2014/15.

As únicas variáveis influenciadas pelos métodos de propagação foram número, peso médio e sólidos solúveis dos frutos, diferentemente do encontrado por Radünz et al. (2014), onde constataram que a intensidade de poda teve efeito positivo e distinto, sobre os sólidos solúveis, entre cultivares de mirtilheiro (Tabela 4). Em plantas oriundas da estaquia foram colhidos um maior número de frutos e estes, com maior teor de açúcar, entretanto, a micropropagação conferiu produção de frutos de maior peso médio quando comparados com os colhidos em plantas oriundas da estaquia. Estudos



semelhantes com mirtilheiros a campo, Souza et al. (2011) concluíram que houve menor massa de matéria fresca e maior teor de sólidos solúveis nos frutos de plantas micropropagadas, diferentemente dos demonstrados neste. Em relação a poda e distintamente ao encontrado nesse trabalho, onde a prática de poda não influenciou o peso médio e sólidos solúveis de frutos 'Woodard', Jorquera-Fontena et al. (2014) verificaram que a poda leve pode fornecer menor peso e teor de açúcar nos frutos.

**Tabela 4.** Número de frutos (NF), peso médio dos frutos (PMF - g), diâmetro médio dos frutos (DMF – mm), cor dos frutos pelo colorímetro ( $\Delta E$ ), sólidos solúveis (SS - %) e pH de plantas de mirtilheiro 'Woodard' em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST) e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015.

	NF		PMF		DMF		$\Delta E$		SS		pH	
<b>MP</b>	20,7	b*	1,20	a	17,5	ns	1,03	ns	13,4	b	2,32	ns
<b>EST</b>	23,9	a	0,90	b	16,6	ns	1,10	ns	15,2	a	2,29	ns
<b>TEST</b>	19,2	b	1,01	ns	16,1	b	1,33	a	14,7	ns	2,32	ns
<b>LEVE</b>	27,3	a	1,01	ns	17,1	ab	1,33	a	14,3	ns	2,29	ns
<b>DRÁS</b>	20,4	b	1,15	ns	17,9	a	0,54	b	13,8	ns	2,31	ns
<b>CV (%)</b>	5,93		19,7		6,17		35,98		7,50		2,04	

\* Significativo pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

ns não significativo

Em relação a intensidade de poda demonstrada na tabela anterior, a colheita de um maior número de frutos ocorreu em plantas podadas levemente, frutos de maior diâmetro em poda drástica, porém sem diferir estatisticamente da poda leve, e em contrapartida, frutos com maior coloração, em plantas sem poda e podadas levemente. Em estudos semelhantes com mirtilheiros, Jorquera-Fontena et al. (2014), verificaram que o número de frutos por planta aumentou 3,5 vezes e 4,3 vezes, a partir de plantas drasticamente a levemente podadas, respectivamente.

As variáveis da tabela 5 foram influenciadas por ambos os fatores de tratamento. A produção por planta de mirtilos 'Woodard' foi maior em plantas micropropagadas com poda drástica e da mesma forma, em plantas obtidas por estaquia, com poda leve, distintamente do encontrado por Souza et al.

(2011), que verificaram que não ocorreu diferença significativa entre os métodos de propagação para a produção por planta. Os mesmos autores concluíram então, que esse comportamento indica que, nas condições do experimento, o rejuvenescimento oriundo da micropropagação não impediu a formação de gemas de flor e a consequente produção de frutos.

**Tabela 5.** Produção (PROD - Kg.planta<sup>-1</sup>), cor dos frutos pelo equipamento DAMeter (DAM) e acidez titulável (AT - meq.L<sup>-1</sup>) de plantas de mirtilheiro 'Woodard' em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST) e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015.

	PROD				DAM				AT			
	MP		EST		MP		EST		MP		EST	
<b>Test</b>	0,40	Ab	0,36	Ab	1,57	Aa	1,42	Aa	9,90	Bb	12,33	Ac
<b>Leve</b>	0,67	Ba	0,83	Aa	1,25	Ba	1,84	Aa	10,93	Ba	15,63	Aa
<b>Drás</b>	0,55	Aa	0,50	Ab	1,47	Aa	1,65	Aa	11,63	Ba	13,47	Ab
CV (%)	13,28				14,12				3,59			

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha ou maiúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

Da mesma maneira, a cor dos frutos analisada pelo equipamento DAMeter, também alterou de acordo com a interação dos tratamentos. Plantas micropropagadas sem poda ou com poda drástica, e ainda, plantas obtidas por estaquia, independente da intensidade de poda, conferem aos frutos maior intensidade de cor violeta. E a maior acidez titulável dos frutos ocorreu naqueles oriundos de plantas obtidas por estaca e com poda leve, assim como encontrado por Radünz et al. (2014), que verificaram que a cultivar Clímax apresentou diferença dos valores de AT entre as intensidades de poda.

O teor de fenólicos totais não diferiu estatisticamente entre os fatores, logo não foi influenciado nem pelas formas de propagação nem pela prática de poda (Tabela 6).

**Tabela 6.** Fenólicos totais (FT - mg ácido clorogênico equivalente/100g tecido) de frutos de mirtilleiro 'Woodard' em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST) e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015.

	FT	
<b>MP</b>	629,57	ns
<b>EST</b>	675,01	ns
<b>TEST</b>	736,54	ns
<b>LEVE</b>	600,97	ns
<b>DRÁS</b>	619,36	ns
<b>CV (%)</b>	18,45	

\*Significativo pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

<sup>ns</sup> não significativo

A atividade antioxidante e o teor de antocianinas nos frutos de mirtilo 'Woodard' também foram influenciados pelos métodos de propagação e intensidades de poda (Tabela 7). Para a primeira variável, as maiores concentrações de antioxidantes foram encontradas em plantas micropropagadas com poda leve e por estaquia sem poda. Já os níveis de antocianinas totais foram superiores em plantas micropropagadas com podas leve e drástica, assim como em plantas obtidas por estaca, sem poda novamente. Radünz et al. (2014), observaram que o maior potencial antioxidante foi observado nas cultivares Clímax e Powderblue, e quanto ao efeito de intensidade de poda, constatou-se que as cultivares Bluegem e Powderblue apresentaram maior potencial antioxidante quando submetidas à poda leve. Essa variação nos resultados, corrobora com Kalt et al. (2003), que relata que a atividade antioxidante do mirtilo é influenciada pelos teores de antocianinas e fenóis totais, pelo genótipo, pelas variações ambientais e pelas condições de conservação pós-colheita.

**Tabela 7.** Atividade antioxidante (AA -  $\mu\text{g}$  trolox equivalente/g tecido) e antocianinas totais (ANT - mg cianidina 3-glicosídeo/100g amostra) de frutos oriundos de plantas de mirtilheiro 'Woodard' em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST) e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015.

	AA				ANT			
	MP		EST		MP		EST	
<b>TEST</b>	6005,52	Bb	9560,45	Aa	501,10	Ba	719,46	Aa
<b>LEVE</b>	7482,77	Aa	6576,44	Ab	529,77	Aa	612,98	Ab
<b>DRÁS</b>	5984,48	Ab	5660,22	Ab	575,43	Aa	498,72	Ac
CV (%)	9,58				8,35			

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha ou maiúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

### Estudo 3 – Cultivar Bluegem

Assim como nos outros dois estudos, o método de propagação no qual exigiu maior intensidade de poda foi a micropropagação (Tabela 1). Para a cultivar Bluegem, também foi retirada uma maior quantidade de ramos nas plantas oriundas do cultivo *in vitro*, já que essa técnica propicia maior brotação de ramos vegetativos. Esse atributo também foi notado por Smagula, (2006), o qual constatou diferenças no hábito de crescimento das plantas propagadas *in vitro*, com maior número de hastes principais e taxa de crescimento. Em contrapartida, Marino et al. (2014) verificaram que não houve diferenças significativas no peso de ramos de mirtilheiros 'Primadonna', derivadas da estaquia e micropropagação em qualquer momento durante o estudo.

**Tabela 1.** Peso de ramos em diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica), em mirtilheiros cv. Bluegem, propagados de diferentes formas (MP – micropropagação; EST – estaquia). Pelotas – RS, 2015.

	MP		EST	
	2013/14			
Test	0,00	Ac	0,00	Ac
Leve	735,67	Ab	726,67	Ab
Drás	1228,00	Aa	946,33	Ba
CV (%)	8,85			
	2014/15			
Test	0,00	Ac	0,00	Ac
Leve	1788,00	Ab	472,67	Bb
Drás	2516,67	Aa	964,67	Ba
CV (%)	20,99			

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha ou maiúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

No primeiro ano de avaliação (safra 2013/14), os tratamentos não influenciaram a área da folha, comprimento dos ramos novos e altura de planta, assim como na segunda safra (2014/15), para a última variável citada (Tabela 2). Em estudos com diferentes cultivares de mirtilheiros, Marino et al. (2014), verificaram que depois do segundo ano no campo, a altura de planta também não foi significativamente afetada pelo método de propagação.

**Tabela 2.** Área da folha (AF – cm<sup>2</sup>), comprimento de ramos (CR - cm) e altura de planta (AP – m) de mirtilheiro ‘Bluegem’ em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST), e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015.

	AF		CR		AP	
2013/14						
MP	7,14	ns	18,78	ns	1,30	ns
EST	6,14	ns	14,28	ns	1,11	ns
TEST	6,98	ns	17,62	ns	1,22	ns
LEVE	6,00	ns	14,54	ns	1,06	ns
DRÁS	6,95	ns	17,42	ns	1,34	ns
CV (%)	16,97		35,48		29,59	
2014/15						
MP	7,40	ns	28,74	ns	1,42	ns
EST	7,81	ns	24,63	ns	1,40	ns
TEST	6,57	b*	20,50	b	1,33	ns
LEVE	7,43	ab	25,83	ab	1,50	ns
DRÁS	8,83	a	33,72	a	1,39	ns
CV (%)	18,14		21,35		24,14	

\*Significativo pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

ns não significativo

Entretanto, no segundo ciclo (2014/15), mais uma vez, o método de propagação não alterou o crescimento das plantas, o que contradiz aos resultados publicados por Morrison et al. (2000), que concluíram que o período de um ano é suficiente para constatar maior vigor nas plantas micropropagadas, em comparação às provenientes de estaquia. Nesse estudo, as variáveis área foliar e comprimento dos ramos mostraram diferenças significativas apenas para o fator intensidade de poda, onde a poda drástica, que não diferiu estatisticamente da poda leve, resultaram em área das folhas e emissão de ramos novos maiores. Essa característica nem sempre é desejada, pois a grande quantidade de ramos no interior da planta e a presença de ramos excessivamente altos e/ou baixos podem dificultar a colheita e comprometer a arquitetura das plantas (SOUZA et al., 2014).

Na tabela 3 verifica-se que o comportamento do índice de clorofila nas folhas foi distinto nas duas safras. No primeiro ciclo, ocorreu interação entre os

fatores e o único tratamento inferior aos outros foram as plantas propagadas por estaquia, com poda drástica. Esse resultado pode ser justificado, pelo fato da poda drástica favorecer o crescimento vegetativo excessivo e poucos frutos, causando desbalanço entre a porção vegetativa e produtiva da planta (BAÑADOS, 2005) e com isso, causar um maior sombreamento no interior da planta, reduzindo assim, o índice de clorofila nas folhas, em consequência da redução de fotossíntese total da planta (LARCHER, 2000).

**Tabela 3.** Índice de clorofila (IC - unidades SPAD) de plantas de mirtilheiro 'Bluegem' em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST), e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica), nas safras 2013/14 e 2014/15. Pelotas – RS, 2015.

		IC			
		2013/14		2014/15	
		MP	EST	MP	
<b>TEST</b>	38,30 Aa	42,90 Aa		<b>EST</b>	40,59 ns
<b>LEVE</b>	37,23 Aa	38,20 Aa		<b>TEST</b>	38,93 ns
<b>DRÁS</b>	42,47 Aa	36,73 Ba		<b>LEVE</b>	37,23 ns
<b>CV (%)</b>	8,02			<b>DRÁS</b>	40,65 ns
				<b>CV (%)</b>	41,40 ns
					8,71

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha ou maiúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

\*Significativo pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

<sup>ns</sup> não significativo

Já no segundo ano de avaliação (2014/15), os fatores não alteraram o desenvolvimento das plantas, não havendo diferenças significativas entre os mesmos. De acordo com Viña et al. (1999) e Moreira et al. (1999), a taxa fotossintética em plantas micropropagadas ocorre em menor magnitude do que em plantas crescidas em condições normais, pois existem fatores que contribuem para a redução do desempenho fotossintético e entre estes fatores pode-se incluir a baixa quantidade de radiação fotossinteticamente ativa, alta concentração de CO<sub>2</sub> e adição de fonte de carbono no meio de cultura. Entretanto esta afirmação não ocorreu nas condições desse estudo, já que as plantas micropropagadas tiveram um índice de absorção de clorofila similar as oriundas por estaquia. Estudos relatam ainda, que a presença de clorofila nas

folhas diminui com o aumento da intensidade de poda, indicando uma limitação da fotossíntese (JORQUERA-FONTENA et al., 2014), entretanto, fato este que não ocorreu no segundo ano de avaliação.

A fenologia de mirtilheiros ‘Bluegem’ se caracterizou em geral, pelo início da floração na primeira semana de agosto e fim a partir última semana de setembro, se estendendo o fim do mês de outubro e as brotações iniciaram a surgir nas plantas na segunda quinzena de agosto (Tabela 4).

**Tabela 4.** Fenologia de mirtilheiros cv. Bluegem sob diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica), propagados de diferentes formas (MP – micropropagação; EST – estaquia). Pelotas – RS, 2015.

Propagação	Poda	Floração		Brotação		Colheita	
		Início	Plena	Final	Início	Início	Final
2013/14							
MP	Testemunha	03/ago	29/ago	12/out	20/ago	02/dez	02/jan
MP	Leve	09/ago	24/ago	28/out	20/ago	02/dez	10/jan
MP	Drástica	02/ago	07/set	12/out	20/ago	02/dez	07/jan
EST	Testemunha	01/ago	24/ago	09/out	17/ago	27/nov	27/dez
EST	Leve	04/ago	08/set	09/out	19/ago	27/nov	27/dez
EST	Drástica	01/ago	24/ago	09/out	19/ago	02/dez	07/jan
2014/15							
MP	Testemunha	06/ago	25/ago	05/out	18/ago	02/dez	*
MP	Leve	08/ago	25/ago	15/out	18/ago	02/dez	*
MP	Drástica	02/ago	28/ago	06/out	17/ago	02/dez	*
EST	Testemunha	29/jul	26/ago	08/out	12/ago	09/dez	*
EST	Leve	02/ago	29/ago	28/set	15/ago	09/dez	*
EST	Drástica	05/ago	28/ago	22/set	10/ago	09/dez	*

\*Dados indisponíveis devido a não realização da colheita da safra 2014/15.

O início do período de colheita no primeiro ano de estudo foi dia 27 de novembro, e na safra seguinte, no segundo dia de dezembro. Na safra 2013/14 o fim da colheita foi em geral, na primeira semana de janeiro, entretanto, no segundo ciclo (2014/15), o período de fim de colheita não foi avaliado pois ocorreu queda dos frutos, antes do amadurecimento. Esta alteração no padrão da colheita pode ter ocorrido em razão da variação anual no acúmulo em horas de frio, como das oscilações de temperatura e consequentemente, da necessidade de temperaturas baixas (CHILDERS & LYRENE, 2006; ANEXO 2).



O diâmetro médio dos frutos (Tabela 5) foi superior em plantas obtidas pelos dois métodos de propagação, entretanto, os frutos de maior tamanho foram colhidos em plantas micropropagadas com poda drástica e por estaquia, sem poda. O mesmo ocorreu para a variável produção por planta, porém, adicionalmente, o tratamento estaquia acrescido de poda leve também acarretou em mais frutos colhidos na planta. Nesse caso, verifica-se que tanto o método de propagação, quanto a prática de poda influenciam essas variáveis, diferentemente dos resultados obtidos por Souza et al. (2011), onde o método de propagação não teve ação sobre a produção e a qualidade dos frutos de mirtilo de três cultivares distintas. Yarborough (2006) relata que há diminuição no tamanho dos frutos com o aumento da carga produtiva e este, é um fato conhecido em mirtilos.

**Tabela 5.** Diâmetro médio dos frutos (DMF – mm) e produção (PROD - Kg.planta<sup>-1</sup>), de plantas de mirtilo 'Bluegem' em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST), e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas, RS – 2015.

	DMF				PROD			
	MP		EST		MP		EST	
<b>TEST</b>	13,99	Ab	13,91	Aa	0,53	Ab	0,59	Aa
<b>LEVE</b>	14,96	Aab	13,63	Ba	0,58	Ab	0,47	Aa
<b>DRÁS</b>	15,62	Aa	13,76	Ba	0,95	Aa	0,59	Ba
CV (%)	3,91				22,60			

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha ou maiúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

Na tabela 6, são demonstrados dados referentes ao número, peso médio e cor dos frutos 'Bluegem' pelo equipamento DAmeter, nos quais não sofreram influência dos tratamentos, diferentemente do verificado por Souza et al. (2011), que concluíram que há tendência de aumento do tamanho dos frutos quanto maior a intensidade de poda. Entretanto, a cor dos frutos verificada pelo colorímetro, caracteriza que os frutos colhidos de plantas submetidas a poda leve apresentaram cor mais intensa, comparado com as sem poda e com poda drástica, já que as plantas em condições naturais, sem sofrer a poda, apresentam uma copa volumosa, e seu interior é denso e sombreado

(SCARPARE FILHO, 2013), assim como aquelas podadas drasticamente, que emitem muitos ramos no interior da planta, causando sombreamento sobre os frutos.

**Tabela 6.** Número de frutos (NF), peso médio dos frutos (PMF - g), cor dos frutos pelo colorímetro ( $\Delta E$ ) e cor dos frutos pelo equipamento DAmeter (DAM) de plantas de mirtilheiro 'Bluegem' em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST), e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015.

	NF		PMF		$\Delta E$		DAM	
<b>MP</b>	24,54	ns	0,93	ns	0,70	ns	1,59	ns
<b>EST</b>	23,45	ns	0,99	ns	0,80	ns	1,57	ns
<b>TEST</b>	22,55	ns	0,9	ns	0,46	c*	1,65	ns
<b>LEVE</b>	24,02	ns	0,83	ns	1,01	a	1,49	ns
<b>DRÁS</b>	25,42	ns	1,15	ns	0,78	b	1,60	ns
CV (%)	13,59		28,4		17,4		11,63	

\*Significativo pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

ns não significativo

Na mesma tabela, a variável número de frutos por planta não apresentou resultados significativos, diferentemente aos encontrados por Jorquera-Fontena et al. (2014), onde o número de frutos por planta aumentou significativamente com a diminuição da gravidade poda.

Os sólidos solúveis e pH dos frutos de mirtilheiro cv. Bluegem não tiveram influência significativa em relação aos métodos de propagação e intensidades de poda (Tabela 7). Esses resultados contrariam os obtidos por Radünz et al. (2014), onde houve aumento dos sólidos solúveis nos frutos de mirtilheiros submetidos a poda normal, o que pode também estar associado à menor produção das plantas, bem como pela exposição dos frutos a radiação solar. Em contrapartida, a acidez titulável variou conforme o método de propagação, com maior acidez nos frutos oriundos de plantas micropropagadas. Marín et al. (2003) verificaram que, de modo geral, o método de propagação não influencia o desempenho em campo de mudas de pessegueiro, propagadas *in vitro* e por estaquia, uma vez que não foram observadas diferenças significativas quanto aos sólidos solúveis, resultados

similares aos encontrados nessa pesquisa. Além disso, resultados de Lobos et al. (2013), mostram que a intensidade de poda não alterou a acidez total em frutos das cultivares O'Neal e Duke, houve diferença apenas entre as plantas podadas e o tratamento testemunha (não podadas), diferentemente do encontrado no presente estudo.

**Tabela 7.** Sólidos solúveis (SS - %), pH e acidez titulável (AT - meq.L<sup>-1</sup>) de plantas de mirtilheiro 'Bluegem' em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST), e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015.

	SS		pH		AT	
<b>MP</b>	14,02	ns	2,24	ns	10,02	a*
<b>EST</b>	13,21	ns	2,26	ns	9,51	b
<b>TEST</b>	13,46	ns	2,28	ns	9,97	ns
<b>LEVE</b>	13,88	ns	2,17	ns	9,50	ns
<b>DRÁS</b>	13,50	ns	2,32	ns	9,83	ns
CV (%)	7,03		6,78		4,28	

\*Significativo pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

<sup>ns</sup> não significativo

Ocorreu interação entre ambos fatores estudados para fenólicos totais (Tabela 8). As plantas oriundas da técnica *in vitro* submetidas a poda média, assim como, as oriundas da estaquia, sem poda e com poda drástica, favorecem a presença de uma maior quantidade de fenólicos totais nos frutos. Trabalhando com a mesma cultivar, Radünz et al. (2014) verificaram as maiores concentrações destes compostos foram observadas quando aplicada a poda leve e a poda média, respectivamente.

**Tabela 8.** Fenólicos totais (FT - mg ácido clorogênico equivalente/100g tecido) de frutos de mirtilheiro 'Bluegem' em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST), e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015.

	FT			
	MP		EST	
<b>TEST</b>	706,28	Ab	688,31	Aa
<b>LEVE</b>	852,15	Aa	729,09	Ba
<b>DRÁS</b>	617,85	Ab	680,20	Aa
CV (%)	6,92			

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha ou maiúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

Não houve interação dos fatores para as variáveis: atividade antioxidante e antocianinas totais em mirtilos 'Bluegem' (Tabela 9). A atividade antioxidante presente nos frutos foi influenciada apenas pela intensidade de poda, onde os frutos sem essa prática e com poda leve foram as que ocasionaram a maior presença desse composto nos frutos. Outros estudos observaram que quanto ao efeito de intensidade de poda, que as cultivares Bluegem e Powderblue apresentaram maior potencial antioxidante quando submetidas à poda média (RADÜNZ et al., 2014).

**Tabela 9.** Atividade antioxidante (AA - µg trolox equivalente/g tecido) e antocianinas totais (ANT - mg cianidina 3-glicosídeo/100g amostra) de frutos oriundos de plantas de mirtilheiro 'Bluegem' em diferentes formas de propagação, micropropagadas (MP) e por estaquia (EST), e diferentes intensidades de poda (testemunha, leve e drástica). Pelotas – RS, 2015.

	AA		ANT	
<b>MP</b>	9444,54	<sup>ns</sup>	566,08	b*
<b>EST</b>	8697,38	<sup>ns</sup>	698,14	a
<b>TEST</b>	9832,85	a	649,73	<sup>ns</sup>
<b>LEVE</b>	9784,69	a	637,89	<sup>ns</sup>
<b>DRÁS</b>	7595,34	b	608,72	<sup>ns</sup>
CV (%)	6,92		7,87	

\*Significativo pelo teste de tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

<sup>ns</sup> não significativo

Distintamente, a composição de antocianinas foi maior em frutos colhidos de plantas oriundas de estaquia e não tiveram o efeito dos tratamentos equivalentes a intensidade de poda. Este resultado se diferencia aos de Radünz et al. (2014) nos quais a intensidade de poda influenciou os teores de antocianinas, sendo que, na cultivar Bluegem, observou-se redução significativa do teor de antocianinas nos frutos de mirtilheiro submetidos a podas média e leve, quando comparadas à poda normal. Entretanto, outras variáveis podem influenciar no teor de antocianinas dos frutos, entre elas a temperatura, níveis de nitrogênio na planta ou, ainda, o pH que influencia nas formas de equilíbrio das antocianinas dissolvidas e, consequentemente, sua cor e estabilidade (KATO et al., 2012).

## **Conclusões**

1. Plantas das cultivares Briteblue, Woodard e Bluegem micropropagadas apresentam maior crescimento vegetativo quando comparadas com plantas oriundas por estaquia.

2. A poda drástica em mirtilheiros 'Briteblue', 'Woodard' e 'Bluegem' favorece o desenvolvimento de ramos vegetativos de maior comprimento.

3. A produção de frutos 'Briteblue', 'Woodard' e 'Bluegem' é maior em plantas oriundas de estaquia e podadas levemente.

4. Plantas micropropagadas da cultivar Bluegem produzem frutos com maior teor de antocianinas, enquanto, frutos de 'Briteblue' apresentam mais esses compostos em plantas oriundos da estaquia.

5. Frutos colhidos em plantas sem poda ou com poda leve possuem maior atividade antioxidante, independente da cultivar estudada.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Muitas pesquisas em relação às técnicas de propagação de plantas frutíferas vêm contribuindo para obtenção de mudas e frutos de maior qualidade. Isso se torna ainda mais interessante, quando trata da propagação de culturas com alta capacidade antioxidante, já que frutos com essa característica, atualmente, são ainda mais apreciados pelos consumidores. Logo, estes estudos buscam melhorar nosso conhecimento sobre os fatores agrônômicos e fisiológicos que controlam rendimento de mirtilheiros e a qualidade dos frutos.

Os dados obtidos nesse trabalho buscam responder alguns questionamentos quanto diferentes métodos de propagação e práticas no campo, entretanto ainda necessitam de mais embasamento para obter melhores conclusões. Principalmente, no caso do capítulo 2, do desenvolvimento de mirtilheiros a campo, onde não foi possível concluí-lo, no período da colheita dos frutos, pois ocorreu queda precoce dos frutos, antes do amadurecimento, não gerando resultados válidos para a segunda safra deste estudo.

Como sequência dos dois estudos, indica-se que com as romãzeiras trabalhadas no capítulo 1, após o processo de enraizamento *in vitro*, sejam enraizadas *ex vitro* e aclimatadas, com o objetivo de acompanhar o desenvolvimento dessas mudas, em estufa e a campo, posteriormente. Inclusive, em função do curto tempo do curso de mestrado, não foi realizado, porém pretendia-se colocar essas mudas no sistema de cultivo sem solo e avaliar seu comportamento no sistema semi-hidropônico, no qual vem sendo muito estudado com outras espécies frutíferas. E referente ao capítulo 2, estudo de mirtilheiros a campo, indica-se a repetição do experimento, em pelo menos mais um ano, já que na segunda safra a parte produtiva não foi

avaliada, a fim de verificar e confirmar os resultados já obtidos no presente estudo.

Sendo assim, ambos os estudos, com as culturas da romãzeira e mirtileiro, terão continuidade nos próximos anos, a fim de verificar e confirmar os resultados já obtidos até este trabalho e, além disso, aperfeiçoá-los, visando uma maior contribuição no meio científico.

## REFERÊNCIAS GERAIS

- ADHAMI, V. M. Oral infusion of pomegranate fruit extract inhibits prostrate carcinogenesis in the TRAMP model. **Journal of Carcinogenesis**, v. 33, p. 644–651, 2012.
- ALBERT, T. et al. The effect of mulching and pruning on the vegetative growth and yield of the half-high blueberry. **Agronomy Research**, v. 8, n. 1, p. 759-769, 2010.
- ALBERT, T. et al. The influence of propagation method on growth of the half highbush blueberry 'Northblue'. **Acta Horticulturae**, v. 812, p. 141- 146, 2009.
- AL-MUAMMAR, M. N., KHAN, F. Obesity: the preventive role of the pomegranate (*Punica granatum*). **Nutrition**, v. 28, p. 595–604, 2012.
- ANTUNES, L. E. C. Potencial de produção de pequenas frutas em diferentes regiões do Sul do Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 8., 2005, Fraiburgo. **Anais...** Caçador: Epagri, 2005. p.61-62.
- BAÑADOS, P. O. Claves para la poda de arándanos. **Revista Agronomía y Forestal UC**, v. 7, p. 28-31, 2005.
- BASTOS, L. P. et al. Cultivo *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa*). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 1122-1124, 2007.
- BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. **Plant Tissue Culture: Theory and Practice**. Elsevier Science Publishers BV, The Netherlands, 1983. 502 p.
- BRACKMANN, A. et al. Armazenamento de mirtilo 'Bluegem' em atmosfera controlada e refrigerada com absorção e inibição de etileno. **Revista Ceres**, v. 57, n. 1, p. 06-11, 2010.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- CALVETE, E. O. et al. Fenologia, produção e teor de antocianinas de cultivares de morangueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 396-401, 2008.
- CANTUARIAS-AVILÉS, T. **Cultivo do mirtilheiro (*Vaccinium sp.*)**. Piracicaba: ESALQ, 2010. 38 p.
- 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.



CASTILLO, A. et al. Investigación en arandanos en Uruguay: propagación *in vitro* y evaluación de variedades por INIA. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 2.; ENCONTRO DE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS, 2004, Pelotas, RS. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. p. 225-228.

CHALFOUN-MOUNAYAR, A. et al. Antioxidant and weight loss effect of pomegranate molasses. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.2, p. 45–50, 2012.

CHANDRA, R.; BABU, D. K. Propagation of pomegranate: a review. **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 51–55, 2010a.

CHANDRA, R.; JADHAV, V. T. **Pomegranate research and development in India and future thrusts**. In: Dhole, S. (Ed.), Preparation for the Sources of the 2nd Green Revolution in Indian Agriculture, Vol. II, 1st Ed. Magnum Foundation, Nagpur, Maharashtra, 2009, pp. 39–44.

CHANDRA, R.; JADHAV, V. T.; SHARMA, J. Global scenario of pomegranate (*Punica granatum* L.) culture with special reference to India. **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**, vol. 4, n. 2, p. 7–18, 2010b.

CHANDRA, R.; MESHRAM, D. T. Pomegranate culture in Deccan plateau of India. In: Chandra, R. (Ed.), Pomegranate. **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 113–119, 2010.

CHAUGULE, R. R. et al. Studies on micropropagation in pomegranate (*Punica granatum* L.). In: Recent Trends in Horticultural Biotechnology (Vol I) and II- ICAE National Symposium on Biotechnological Interventions for Improvement of Horticultural Crops: Issues and Strategies, Vellanikkara, **Anais...** Kerala, 2007, p. 195–199.

CHAUHAN, R. D., KANWAR, K. Biotechnological advances in pomegranate (*Punica granatum* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 48, p. 579–594, 2012.

CHAVES, A. C.; SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 6, p. 1281-1287, 2005.

CHILDERS, N. F.; LYRENE, P. M. **Blueberries for growers, gardeners, promoters**. Florida: E. O. Painter Printing Company, 2006. 266p.

CONNOR, A. M. et al. Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold temperature storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 893-898, 2002.

COUTINHO, E. F. et al. **Propagação de mirtilo do tipo Rabbiteye por estaquia e alporquia**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. 34 p.

DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Diferentes substratos e ambientes no enraizamento *in vitro* de mirtilo. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 563-566, 2009.

DAMIANO, C.; PADRO, M. D. A.; FRATTARELLI, A. Propagation and establishment *in vitro* of myrtle (*Myrtus communis* L.), pomegranate (*Punica granatum* L.) and mulberry (*Morus alba* L.). **Propagation of Ornamental Plants**, v.8, p. 3–8, 2008.

- DARNELL, R. L. **Blueberry botany/envoronmental physiology**. In: CHILDERS, N.F.; LYRENE, P.M. (eds.) *Blueberries for growers, gardeners, promoters*. Florida: E.O. Painter Printing Company, 2006. p. 5-13.
- DAROZ, T. H. da C.; VIUDES A. M.; DELGADO, B. D. **Parâmetros fitométricos para estimativa da área foliar do pessegueiro**. In: 12º Simpósio de Iniciação Científica da USP, 2008.
- DEBNATH, S. C. Propagation of *Vaccinium in vitro*. **International Journal of Fruit Science**, v. 6, p. 47–71, 2007.
- DEEPIKA, R.; KANWAR K. *In vitro* regeneration of *Punica granatum* L. plants from different juvenile explants. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, v. 18, n. 1, p. 5-22, 2010.
- DIAS, M. M; NIETSCHKE, S.; PEREIRA, M. C. T. Carvão ativado e estiolamento no estabelecimento *in vitro* de romãzeira. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 7, n. 1, p. 1-5, 2013.
- EBRAHIM M. K. H. Comparison, determination and optimizing the conditions required for rhizome and shoot formation, and flowering of *in vitro* cultured calla explants. **Science Horticulture**, v. 101, p. 305–313, 2004.
- EL-AGAMY, S. Z. et al. *In vitro* propagation of Manfalouty and Nab El-gamal pomegranate cultivars. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 5, p. 1169–1175, 2009.
- FACHINELLO, J. C. et al. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 109-120, 2011.
- FACHINELLO, J. C. Mirtilo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 285-289, 2008.
- FARIA, G. A. et al. Efeito da sacarose e do sorbitol na conservação *in vitro* de *Plassiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 267-270, 2006.
- FISCHER, D. L. O. et al. Enraizamento de estacas semilenhosas de mirtilo sob o efeito de diferentes concentrações de ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 557-559, 2008.
- FULEKI, T.; FRANCIS, F. J. Quantitative methods for anthocyanins extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. **Journal of Food Science**, v. 33, p. 72-77, 1968.
- FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.
- GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. I. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151–158, 1968.
- GIOVANELLI, G.; BURATTI, S. Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. **Food Chesmistry**, v. 112, p. 903 – 908, 2009.

- GOLLE, D. P. et al. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 1, p. 207-214, 2012.
- GROVE, P.; GROVE, C. Curry, Spice and All Things Nice – The What, Where and When. Grove Publications, Surrey, UK. Disponível em: <<http://www.menumagazine.co.uk/book/azpomegranate.htm>>. Acesso em: 18 novembro 2014.
- GYVES, E. M. et al. Stimulation of node and lateral shoot formation in micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) by using dikegulac. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 92, p. 233-238, 2008.
- HOFFMANN, A. **Enraizamento e aclimatização de mudas micropropagadas dos portaenxertos de maceira ‘Marubakaido’ e ‘M-26’**. 1999. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.
- HOFFMANN, A. **Propagação de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) através de estacas**. 1994. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1994.
- HOFFMANN, A.; ANTUNES, L. E. C. **Grande potencial**. 2007. Disponível em: <[http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/como\\_cultivar\\_mirtilo.pdf](http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/como_cultivar_mirtilo.pdf)>. Acesso em: 30 junho 2014.
- HOLLAND, D.; BAR-YAAKOV, I. The pomegranate: new interest in an ancient fruit. **Chronica Horticultural**, v. 48, p. 12–15, 2008.
- HUMMER, K. et al. Evergreen production of Southern highbush blueberries in Hawaii. **Journal of the American Pomological Society**, v. 61, p. 188-195, 2007.
- ISUTSA, D. K.; PRITTS, M. P. Rapid propagation of blueberry plants using *ex vitro* rooting and controlled acclimatization of micropropagules. **HortScience**, v. 29, p. 1124–1126, 1994.
- JADON, G. et al. Antioxidant activity of various parts of *Punica granatum*: a review. **Journal of Drug & Therapeutics**, v. 6, n. 2, p. 138-141, 2012.
- JAIDKA, K.; MEHRA, P. N. Morphogenesis in *Punica granatum* (pomegranate). **Canadian Journal of Botany**, v. 64, n. 1644–1653, 1986.
- JAMIESON, A. R.; NICKERSON, N. L. Field performance of the lowbush blueberry propagated by seed, stem cuttings and micropropagation. **Acta Horticulturae**, v. 626, p. 431-436, 2003.
- JARDINI, F. A. et al. Compostos fenólicos da polpa e sementes de Romã (*Punica granatum*, L.): atividade antioxidante e protetora em células MDCK\*. **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 4, p. 509-517, 2010.
- JAYESH K. C., KUMAR R. Crossability in pomegranate (*Punica granatum* L.). **Indian Journal of Horticulture**, v.61, n. 3, p. 209-210, 2004.
- JBIR, R. et al. Characterization of Tunisian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars using amplified fragment length polymorphism analysis. **Scientia Horticulturae**, v. 115, p.231–237, 2008.
- JING, P. et al. Antioxidant properties and phytochemical composition of China-grown pomegranate seeds. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1457–1464, 2012.

- JOHANNINGSMEIER, S. D.; HARRIS, G. K. Pomegranate as a functional food and nutraceutical source. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 2, p. 181-201, 2011.
- JORQUERA-FONTENA, E.; ALBERDI, M.; FRANCK, N. Pruning severity affects yield, fruit load and fruit and leaf traits of 'Brigitta' blueberry. **Journal of soil science and plant nutrition**, print, p. 0-0, 2014.
- JYOTSANA, S.; MAITY, A. Pomegranate phytochemicals: nutraceutical and therapeutical values. In: Chandra, R. (Ed.), Pomegranate. **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 56–76, 2010.
- KADIR, S. **Why fruit trees fail to bear**. Kansas: Kansas State University, 2003. 4p.
- KAJI, B. V.; AHMAD, E.; MASOUD T. *In vitro* propagation of pomegranate (*Punica granatum* L.) Cv. 'Males Yazdi'. **Albanian Journal of Agricultural Sciences**, v. 19, n. 4, p. 597-604, 2013.
- KALT, W. et al. Oxygen radical absorbing capacity, anthocyanin and phenolic content of highbush bluberries (*Vaccinium corymbosum* L.) during ripening and storage. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 128, n. 6, p. 917-923, 2003.
- KALT, W.; JOSEPH, J. A.; SHUKITT-HALE, B. Blueberries and human health: a review of current research. **Journal of the American Pomological Society**, v. 61, p. 151-160, 2007.
- KANTHARAJAH, A. S.; DEWITZ, I.; JABBARI, S. The effect of media, plant growth regulators and source of explants on *in vitro* culture of pomegranate (*Punica granatum* L.). **Erwerbsobstbau**, v. 40, n. 2, p. 54–58, 1998.
- KANWAR, K.; JOSEPH, J.; DEEPIKA, R. Comparison of *in vitro* regeneration pathways in *Punica granatum* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 100, p. 199–207, 2010.
- KATO, C. G.; TONHI, C. D.; CLEMENTE, E. Anthocyanins in grapes (*Vitis vinífera* L.) grown in conventional systems. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 6, n. 2, p. 809-821, 2012.
- LARCHER, W. **Ecologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2006. 532p.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000. 531p.
- LEITZKE, L. N.; DAMIANI, C. R.; SCHUCH, M. W. Influência do meio de cultura, tipo e concentração de citocininas na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta e framboeseira. **Ciência agrotécnica**, v. 34, n. 2, p. 352-360, 2010.
- LEVIN, G. M. **Pomegranate Roads: A Soviet Botanist's Exile from Eden**, 1<sup>st</sup> Ed. Floreant Press, Forestville, California, 2006, p. 15–183.
- LIGARRETO, G. A.; PATINO, M. P.; MAGNITSKIY, S. V. Phenotypic plasticity of *Vaccinium meridionale* (Ericaceae) in wild populations of mountain forests in Colombia. **Revista Biologia Tropical**, v. 59, p. 569-583, 2011.
- LITWIŃCZUK, W.; SZCZERBA, G.; WRONA, D. Field performance of highbush blueberries (*Vaccinium x corymbosum* L.) cv. 'Herbert' propagated by cuttings and tissue culture. **Scientia Horticulturae**, v. 106, p. 162-169, 2005.

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

LOBOS, G. A. et al. Efectos de la poda invernal de arándanos sobre rendimientos y calidad de fruta. In: CONGRESO CHILENO DE BERRIES, **Anais...** Talca, 2013.

LYRENE, P. M. **Weather, climate and blueberry production**. In: CHILDERS, N.F.; LYRENE, P.M. (eds.). Blueberries for growers, gardeners, promoters. Florida: E. O. Painter Printing Company, 2006. p. 14-20.

MACHADO, A. A.; CONCEIÇÃO, A. R. **Sistema de análise estatística para Windows**. Winstat. Versão 2.0. UFPel, 2007.

MACHADO, N. P. et al. Conservação pós-colheita de mirtilos Flórida, Woodard e Bluegem em atmosfera com oxigênio ionizado. II Simpósio Nacional do Morango e I Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul. In: **Anais...** p. 300-304. 2004.

MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M. S.; LIMA, A. S. **Processamento de sucos de frutas tropicais**. Fortaleza: Editora UFC, 2007. p. 320.

MARÍN, J. A. et al. Field performance of grafted fruit-tree rootstocks was not affected by micropropagation. **Acta Horticulturae**, v. 616, p. 295-299, 2003.

MARINO, S. R. et al. Vegetative growth of three southern highbush blueberry cultivars obtained from micropropagation and softwood cuttings in two Florida locations. **HortScience**, v. 49, n. 5, p. 556-561, 2014.

MILLER, S. et al. A comparison of blueberry propagation techniques used in New Zealand. **Acta Horticulturae**, v. 715, p. 397- 402, 2006.

MONTEIRO, C. Producción de arándanos en Sudamérica. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 3., ENCONTRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS E FRUTAS NATIVAS DO MERCOSUL, 2., 2006, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Embrapa, 2006. p.145.

MORAES, J. O. Estudo do mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) no processamento de produtos alimentícios. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 18-22, 2007.

MOREIRA, F. M. et al. Teor de clorofila em porta-enxertos de videira in vitro e em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, p. 30, 1999.

MORIGUCHI, T. et al. *In vitro* adventitious shoot formation from anthers of pomegranate. **Horticulturae Science**, v. 22, p. 947–948, 1987.

MORRISON, S.; SMAGULA, J.M.; LITTEN, W. Morphology, growth, and rhizome development of *Vaccinium angustifolium* Ait. seedlings, rooted softwood cuttings, and micropropagated plantlets. **HortScience**, v. 35, p. 738-741, 2000.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

- MURKUTE, A. A.; PATIL, S.; SINGH, S. K. *In vitro* regeneration in pomegranate cv. Ganesh from mature trees. **Indian Journal of Horticulture**, v. 61, n. 3, p. 206-208, 2004.
- NAIK, S. K., PATTNAIK, S., CHAND, P. K., High frequency axillary shoot proliferation and plant regeneration from cotyledonary nodes of pomegranate (*Punica granatum* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 85, p. 261–270, 2000.
- NAIK, S. K.; CHAND, P.K. Tissue culture-mediated biotechnological intervention in pomegranate: a review. **Plant Cell Reports**, v. 30, p. 707–721, 2011.
- NAIK, S. K.; PATTNAIK, S.; CHAND, P. K. *In vitro* propagation of pomegranate (*Punica granatum* L. cv. Ganesh) through axillary shoot proliferation from nodal segments of mature tree. **Scientia Horticulturae**, v. 79, p. 175-183, 1999.
- NATARAJA, K.; NEELAMBIKA, G. K. Somatic embryogenesis and plantlet formation from petal cultures of pomegranate (*Punica granatum* L.). **Indian Journal of Experimental Biology**, v.34, n. 7, p. 719–721, 1996.
- NESMITH, D. S. Fruit development period of several rabbiteye blueberry cultivars. **Acta Horticulturae**, v. 715, p. 137-142, 2006.
- NIEUWENHUIS, J. C. Pruning systems in highbush blueberries. **Acta Horticulturae**, v. 346, p. 173-177, 1993.
- NOFERINI, M. et al. **Impiego di um índice non distruttivo per determinare la corretta época di raccolta Del fruto di actinidia chinensis**. In: MACFRUT, 2009.
- OLMEZ, Z. et al. Effect of sulphuric acid and cold stratification pretreatments on germination of pomegranate (*Punica granatum* L.) seeds, **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. 2, p. 427 - 430, 2007.
- ORAK, H. H.; YAGAR, H.; ISBILIR, S. S. Comparison of antioxidant activities of juice, peel, and seed of pomegranate (*Punica granatum* L.) and inter-relationships with total phenolic, tannin, anthocyanin, and flavonoid contents. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, p. 373–387, 2012.
- OWIS, S. J. Rooting response of five pomegranate varieties to Indole Butyric Acid (IBA). **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 13, p. 51-58, 2010.
- PASQUAL, M. **Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações, meios de cultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001, 74 p.
- PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127 p.
- PATIL, V. M. et al. Micropropagation of pomegranate (*Punica granatum* L.) 'Bhagava' cultivar from nodal explant. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 18130–18136, 2011.
- PEÑA, M. L. P. et al. Concentrações e formas de aplicação do ácido indolbutírico na propagação por estaquia dos mirtilheiros cvs. Flórida e Clímax. **Semina**, v. 33, p. 57-64, 2012.
- PEREIRA, J. V. et al. Efeito antibacteriano e antiaderente *in vitro* do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 88-93, 2006.

- PESCIE, M. et al. Effect of time and intensity of pruning on the yield and fruit quality of southern highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum*) var. O'neal in Buenos Aires province. **Revista de Investigaciones Agropecuarias**, v. 37, p. 268-274, 2011.
- PIO, R. et al. Enraizamento *in vitro* de brotações do porta-enxerto de citros Tangerina sunki x Trifoliata com o uso de sacarose e ácido indolbutírico. **Ciência agrotécnica**, v. 26, n. 1, p. 66-70, 2002.
- RADMANN, E. B. et al. Multiplicação *in vitro* e alongamento das brotações micropropagadas do porta-enxerto 'Tsukuba 1' (*Prunus persica* L.). **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 31, n. 3, p. 656-663, 2009.
- RADÜNZ, A. L. et al. Intensidade de poda na produção e na qualidade dos frutos de mirtilheiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 186-191, 2014.
- RAHIMI, H. R.; ARASTOO, M.; OSTAD, S. N. A comprehensive review of *Punica granatum* (pomegranate) properties in toxicological, pharmacological, cellular and molecular biology researches. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, p. 385-400, 2012.
- RAMIREZ, M. R. et al. Effect of lyophilised vaccinium Berries on memory, anxiety and locomotion in adult rats. **Pharmacological Research**, v. 52, p. 457-462, 2005.
- READ, P. E.; WILDUNG, D. K.; HARTLEY, C. A. Field performance of in vitro propagated 'Northblue' blueberries. **Acta Horticulturae**, v. 241, p. 191-194, 1989.
- RETAMALES, J. B.; HANCOCK, J. F. **Blueberries**. CABI, Wallingford, UK, 2012, 336p.
- RIGON, L. Prazer em conhecer. In: \_\_\_\_\_. **Anuário brasileiro da fruticultura**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2005. p. 94-95.
- RIIHINEN, K. et al. Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and 'northblue' blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*). **Food Chemistry**, v. 110, p. 156-160, 2008.
- RODRIGUES, E. **Atividade antioxidante *in vitro* e perfil fenólico de cultivares de mirtilo (*Vaccinium* sp.) produzidas no Brasil**. 85p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.
- SAMIR Z. et al. *In vitro* propagation of manfalouty and nab elgamal pomegranate cultivars research. **Journal of Agricultural and Biological Science**, v. 5, n. 6, p. 1169-1175, 2009.
- SANTOS, A. M. dos; RASEIRA, M. C. B. **O cultivo do mirtilo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2002. 17p.
- SANTOS, C. E. M. et al. Raleio de frutos em lichieira 'Bengal'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, p. 588-592, 2009.
- SCARPARE FILHO, J. A. Poda de Frutíferas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 3, p. 1-3, 2013.

- SCHUCH, M. W. et al. AIB e substrato na produção de mudas de mirtilo cv. "Climax" através de microestaquia. **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, 2007.
- SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. Micropropagação de Plantas Frutíferas. In: FACHINELLO, J.C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J.C.(eds.). **Propagação de Plantas Frutíferas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005, p. 155-173.
- SELLAPPAN, S.; AKOH, C. C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2432-2438, 2002.
- SERRADO, F.; PEREIRA, M.; FREITAS, S.; MARTINS, S.; DIAS, T. **Mirtilo guia de boas práticas para produção, promoção e comercialização**. 3ed. Adrimag, Gráficas M. Vide, 2010, 79 p.
- SEVERO, J. et al. Avaliação de compostos fenólicos, antocianinas, vitamina C e capacidade antioxidante em mirtilo armazenado em atmosfera controlada. **Brazilian Journal of Food Technology**, II SSA, 2009.
- SHARON, M.; SINHA, S. Plant regeneration from cotyledonary node of *Punica granatum* L. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 5, n. 4, p. 344–348, 2000.
- SILVA, I. M. B. Q. **Biometria e qualidade da romã orgânica durante o armazenamento**. 36f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais). Centro de Ciência e Tecnologia Agroalimentar, Universidade Federal De Campina Grande, 2013.
- SILVA, J. A. T. da et al. Pomegranate biology and biotechnology: A review. **Scientia Horticulturae**, v. 160, p. 85–107, 2013.
- SILVA, R. P. da et al. Comportamento fenológico de Videira, cultivar Patrícia em diferentes épocas de poda de frutificação em Goiás. **Bragantia**, v. 65, p. 399-406, 2006.
- SINGH, N. V. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) induced hardening of micropropagated pomegranate (*Punica granatum* L.) plantlets. **Scientia Horticulturae**, v. 136, p. 122–127, 2012.
- SINGH, N. V. SINGH, S.K.; PATEL, V. B. *In vitro* axillary shoot proliferation and clonal propagation of 'G-137' pomegranate (*Punica granatum*). **The Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 77, n. 8, p. 505–508, 2007.
- SINGH, S. K.; KHAWALE, R. N. **Plantlet regeneration from the nodal segments of pomegranate (*Punica granatum* L.) cv. Jyoti**. In: Kumar, A., Roy, S., Sopory, S.K. (Eds.), *Plant Biotechnology and its Applications in Tissue Culture*. I.K. International Pvt. Ltd, New Delhi, 2006, pp. 105–113.
- SMAGULA, J. M. J. Tissue culture propagation. In: CHILDERS, N.F.; LYRENE, P.M. (Ed.). **Blueberries: for growers, gardeners, promoters**. Florida: E.O. Painter Printing Company, 2006. p. 55-58.
- SMOLARZ, K. Evaluation of four blueberry cultivars growing in Central Poland. **Acta Horticulturae**, v. 715, p. 81-84, 2006.
- SMOLARZ, K.; CHLEBOWSKA, D. Growth, vigour and yielding of highbush blueberry cv. Bluecrop propagated from semi-woody cuttings and *in vitro*. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, v. 5, p. 53-60, 1997.



- SOUZA, A. L. K. de. **Diferentes formas de propagação e intensidades de poda no desempenho a campo de mirtilheiros do grupo *rabbiteye***. 109f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Área de concentração Fruticultura de Clima Temperado). Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2011.
- SOUZA, A. L. K. et al. Desempenho de mudas de mirtilo obtidas por micropropagação ou estaquia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, p. 868-874, 2011.
- SOUZA, A. L. K. S. et al. Produção e qualidade de frutos de mirtilheiros sob diferentes intensidades de poda. **Ciência Rural**, vol. 44, n. 12, 2014.
- SPIERS, J. M. et al. Effects of pruning on 'Climax' Rabbiteye Blueberry. **Acta Horticulturae**, v. 574, p. 133-237, 2002.
- SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L. - The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 10, p. 63-68, 1959.
- TAKATA, W. et al. Germinação de sementes de romãzeiras (*Punica granatum* L.) de acordo com a concentração de giberelina. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 254-260, 2014.
- TORRES, A. C. et al. Efeito da sacarose, cinetina, isopentenil adenina e zeatina no desenvolvimento de embriões de *Heliconia rostrata in vitro*. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 789-792, 2005.
- TREHANE, J. **Blueberries, cranberries and other vacciniums**. Cambridge: Timber Press, 2004. 256p.
- TREVISAN, R. et al. Enraizamento de estacas herbáceas de mirtilo: influência da lesão na base e do ácido indolbutírico. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 2, p. 402-406, 2008.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS. **Estação Agroclimatológica**. Disponível em: <<http://www.ufpel.edu.br/faem/agrometeorologia/normais.htm>>. Acesso em: 13 jan. 2014.
- VALIZADEHKAJI, B.; ERSHADI, E.; TOHIDFAR, M. *In vitro* propagation of two Iranian commercial pomegranates (*Punica granatum* L.) cvs. 'Malas Saveh' and 'Yusef Khani'. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, n. 19, v. 4, p. 597-603, 2013.
- VERMA, N.; MOHANTY, A.; LAL, A. Pomegranate genetic resources and germplasm conservation: a review. In: Chandra, R. (Ed.), Pomegranate. **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 120-125, 2010.
- VIEIRA, L. M. et al. Fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* de polpas de frutos tropicais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 888 - 897, 2011.
- VIÑA, G. de la. et al. Effects of CO<sub>2</sub> and sugars on photosynthesis and composition of avocado leaves grown in vitro. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 7/8, p. 587- 595, 1999.

VIZZOTTO, M. **Mirtilo: a fruta da longevidade**. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2009. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 25 dez. 2014.

VIZZOTTO, M. Propriedades funcionais das pequenas frutas. **Informe Agropecuário**, v. 33, n. 268, p. 84-88, 2012.

WAGNER JÚNIOR, A. et al. Efeito da lesão basal e do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas herbáceas de quatro cultivares de mirtilo. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 10, p. 251- 253, 2004.

YAMADA, Y.; SATO, F. The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. *Plant and Cell Physiology*, v.19, p.691-699, 1978. YEO, P. F. **Kew Bull**, v. 45, p. 101-20, 1989.

YARBOROUGH, D. E. **Blueberry pruning and pollination**. In: CHILDERS, N.F. (Ed.). *Blueberries for growers, gardeners, promoters*. Horticultural Publications, 2006. p. 75-83.

YOUDIM, K. A. et al. Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress: *in vitro* and *in vivo*. **Biochimica et Biophysica Acta: general subjects**, v. 1523, n. 1, p. 117 - 122, 2000.

ZAOUAY, F. et al. Antioxidant activity and physico-chemical properties of Tunisian grown pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 81–89, 2012.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 502-509, 2003.

ZHU, L. W. et al. Regeneration system of pomegranate by *in vitro* culture. **Acta Horticulturae**, v. 430, n. 2, p. 207-208, 2003.

## APÊNDICES

**Apêndice I.** Quadro de análise da variância das variáveis: germinação (GERM - %), oxidação (OXID - %), contaminação fúngica (CF - %), contaminação bacteriana (CB - %), presença de folhas (PF - %), presença de radículas (PR - %), número de explantes com brotações (NEB), número médio de brotações (NmB), comprimento da maior brotação (CMB – cm), comprimento médio de brotações (CmB – cm), comprimento da maior raiz (CMR – cm), comprimento médio de raiz (CmR – cm), em função de diferentes meios de cultura (MS e WPM) e presença e ausência de sacarose. Pelotas – RS, 2015.

Fonte de variação	Quadrado médio												
	GL	GERM	OXID	CF	CB	PF	PR	NEB	NmB	CMB	CmB	CMR	CmR
<b>Meio de cultura</b>	1	0,04*	0,001 <sup>ns</sup>	0,000002 <sup>ns</sup>	4,51 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>	0,04**	0,05 <sup>ns</sup>	0,22 <sup>ns</sup>	1,40*	1,22**	0,29 <sup>ns</sup>	0,24 <sup>ns</sup>
<b>Sacarose</b>	1	0,009 <sup>ns</sup>	0,006 <sup>ns</sup>	0,000002 <sup>ns</sup>	0,0001 <sup>ns</sup>	0,74**	0,37**	1,94**	1,47**	1,46*	0,50*	1,46*	0,52 <sup>ns</sup>
<b>MC x SAC</b>	1	0,02 <sup>ns</sup>	0,0001 <sup>ns</sup>	0,000002 <sup>ns</sup>	0,000001 <sup>ns</sup>	0,009 <sup>ns</sup>	0,06**	0,0001 <sup>ns</sup>	0,05 <sup>ns</sup>	0,31 <sup>ns</sup>	0,54*	0,08 <sup>ns</sup>	0,10 <sup>ns</sup>
Resíduo	16	0,006	0,009	0,0000007	0,0001	0,04	0,00	0,04	0,11	0,22	0,11	0,18	0,14
Média geral	-	2,48	1,22	1,00	1,00	1,55	1,19	1,55	2,70	3,32	2,90	2,21	2,11
CV (%)	-	3,044	7,82	0,27	1,19	12,87	5,42	13,54	12,14	14,13	11,35	19,39	17,57

\*\*\* Valor de F significativo a 5% e a 1% de probabilidade de erro, respectivamente.

<sup>ns</sup> não significativo

**Apêndice II.** Quadro de análise da variância das variáveis: presença de calos (PC - %), número de folhas (NF), número de brotações (NB), comprimento da maior brotação (CMB – cm), número de raízes (NR) e comprimento da maior raiz (CMR – cm), em função de diferentes meios de cultura (MS e WPM) e presença e da citocinina 2iP. Pelotas – RS, 2015.

Fonte de variação	Quadrado médio						
	GL	PC	NF	NB	CMB	NR	CMR
<b>Meio de cultura</b>	1	0,10 <sup>ns</sup>	27,39**	0,81**	67,96**	0,27**	0,59*
<b>2iP</b>	3	3,09**	026 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	6,58**	0,03 <sup>ns</sup>	0,10 <sup>ns</sup>
<b>MC x 2iP</b>	3	0,10 <sup>ns</sup>	0,29 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>	1,02 <sup>ns</sup>	0,03 <sup>ns</sup>	0,10 <sup>ns</sup>
Resíduo	32	0,04	0,21	0,02	0,26	0,02	0,09
Média geral	-	1,18	2,05	1,39	2,66	1,31	0,01
CV (%)	-	18,16	22,40	10,91	19,05	10,54	11,05

\*\*\* Valor de F significativo a 5% e a 1% de probabilidade de erro, respectivamente.

<sup>ns</sup> não significativo

**Apêndice III.** Quadro de análise da variância das variáveis: comprimento da parte aérea (CPA – cm), número de folhas (NF), número de brotações (NB), comprimento da maior raiz (CMR – cm) e número de raízes (NR), em função de diferentes concentrações do regulador de crescimento Dikegulac de sódio. Pelotas – RS, 2015.

Fonte de variação	Quadrado médio					
	GL	CPA	NF	NB	CMR	NR
<b>Dikegulac</b>	5	6,04 <sup>ns</sup>	1,73**	0,06 <sup>ns</sup>	3,47*	0,34*
Resíduo	144	3,17	0,32	0,04	1,25	0,14
Média geral	-	4,68	3,50	2,45	1,04	1,11
CV (%)	-	38,07	16,31	8,62	6,91	34,12

\* \*\* Valor de F significativo a 5% e a 1% de probabilidade de erro, respectivamente.

<sup>ns</sup> não significativo

**Apêndice IV.** Quadro de análise da variância das variáveis: comprimento da maior raiz (CMR – cm) e número de raízes (NR), em função de diferentes concentrações da auxina AIB. Pelotas – RS, 2015.

Fonte de variação	Quadrado médio		
	GL	CMR	NR
<b>AIB</b>	3	2,10**	0,09**
Resíduo	16	0,10	0,002
Média geral	-	2,43	1,93
CV (%)	-	13,01	2,38

\* \*\* Valor de F significativo a 5% e a 1% de probabilidade de erro, respectivamente.

<sup>ns</sup> não significativo

**Apêndice V.** Diferentes intensidades de poda realizadas em mirtilheiro das cultivares Briteblue, Woodard e Bluegem: 1. Testemunha (sem poda); 2. Poda leve; 3. Poda drástica. Pelotas – RS, 2015.



**Apêndice VI.** Quadro de análise da variância das variáveis vegetativas: peso de poda (PP – g), altura de planta (AP – m), comprimento dos ramos (CR – cm), área da folha (AF – cm<sup>2</sup>) e índice de clorofila (IC – unidade de SPAD), da cultivar Briteblue. Pelotas – RS, 2015.

Fonte de variação	Quadrado médio					
	GL	PP	AP	CR	AF	IC
<b>2013/14</b>						
<b>Propagação</b>	1	228312,80**	0,23*	21,94 <sup>ns</sup>	9,12*	54,77**
<b>Poda</b>	2	1788396**	0,19*	84,01*	1,54 <sup>ns</sup>	54,60**
<b>PR x PO</b>	2	192195,70**	0,09 <sup>ns</sup>	79,93*	3,22 <sup>ns</sup>	0,44 <sup>ns</sup>
Resíduo	12	15235,39	0,05	12,47	1,76	3,80
Média geral	-	530,12	1,33	18,45	6,57	38,97
CV (%)	-	23,28	16,28	19,14	20,17	5,00
<b>2014/15</b>						
<b>Propagação</b>	1	443682*	0,27*	48,89 <sup>ns</sup>	1,32 <sup>ns</sup>	13,87 <sup>ns</sup>
<b>Poda</b>	2	6209478**	0,02 <sup>ns</sup>	446,75**	0,35 <sup>ns</sup>	0,87 <sup>ns</sup>
<b>PR x PO</b>	2	398248,7**	0,09 <sup>ns</sup>	46,15 <sup>ns</sup>	1,44 <sup>ns</sup>	2,18 <sup>ns</sup>
Resíduo	12	55162,22	0,04	20,34	3,08	18,44
Média geral	-	803,00	1,32	28,09	7,79	45,40
CV (%)	-	29,25	14,69	16,05	22,54	9,46

\* \*\* Valor de F significativo a 5% e a 1% de probabilidade de erro, respectivamente.

<sup>ns</sup> não significativo

**Apêndice VII.** Quadro de análise da variância das variáveis produtivas: produção (PR – Kg.planta<sup>-1</sup>), peso médio dos frutos (PMF – g), número de frutos (NF), diâmetro médio dos frutos (DMF – mm), sólidos solúveis totais (SS - %), acidez titulável (AT - meq.100 mL<sup>-1</sup>), pH, cor ( $\Delta E$  – colorímetro e DAM – D.A. meter), fenólicos totais (FT – mg ácido clorogênico equivalente/100g tecido), atividade antioxidante (AA –  $\mu$ g trolox equivalente/g tecido) e antocianinas (ANT – mg cianidina 3-glicosídeo/100g amostra), da cultivar Briteblue. Pelotas – RS, 2015.

Fonte de variação	Quadrado médio												
	GL	PR	PMF	NF	DMF	SS	AT	pH	$\Delta E$	DAM	FT	AA	ANT
<b>Propagação</b>	1	1,47**	0,000005 <sup>ns</sup>	413,28**	0,56 <sup>ns</sup>	1,03 <sup>ns</sup>	84,50**	0,08 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,49**	6068,88 <sup>ns</sup>	381191,4 <sup>ns</sup>	59641,30**
<b>Poda</b>	2	0,15 <sup>ns</sup>	0,03 <sup>ns</sup>	38,42*	19,58**	1,12 <sup>ns</sup>	7,38**	0,03 <sup>ns</sup>	0,51**	0,008 <sup>ns</sup>	8163,29 <sup>ns</sup>	49581,58 <sup>ns</sup>	6957,42 <sup>ns</sup>
<b>PR x PO</b>	2	0,39**	0,003 <sup>ns</sup>	132,50**	8,27**	15,62**	0,58 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,53**	0,007 <sup>ns</sup>	20120,10*	5895613**	6397,99 <sup>ns</sup>
Resíduo	12	0,04	0,03	9,80	0,62	1,06	0,18	0,03	0,04	0,04	3828,05	364684,30	4233,37
Média geral	-	0,66	0,99	24,12	16,04	14,72	12,77	2,04	1,01	1,51	693,28	8589,77	469,64
CV (%)	-	32,43	18,43	12,98	4,91	6,99	3,29	9,20	19,40	13,82	8,92	7,03	13,85

\* \*\* Valor de F significativo a 5% e a 1% de probabilidade de erro, respectivamente.

<sup>ns</sup> não significativo



**Apêndice VIII.**Quadro de análise da variância das variáveis vegetativas: peso de poda (PP – g), altura de planta (AP – m), comprimento dos ramos (CR – cm), área da folha (AF – cm<sup>2</sup>), índice de clorofila (IC – unidade de SPAD), da cultivar Woodard. Pelotas – RS, 2015.

Fonte de variação	Quadrado médio					
	GL	PP	AP	CR	AF	IC
<b>2013/14</b>						
<b>Propagação</b>	1	283253,60**	0,06 <sup>ns</sup>	364,5*	0,76 <sup>ns</sup>	3,04 <sup>ns</sup>
<b>Poda</b>	2	1200924**	0,03 <sup>ns</sup>	6,36 <sup>ns</sup>	0,24 <sup>ns</sup>	18,17 <sup>ns</sup>
<b>PR x PO</b>	2	193221,60**	0,02 <sup>ns</sup>	33,32 <sup>ns</sup>	0,56 <sup>ns</sup>	15,82 <sup>ns</sup>
Resíduo	12	1096,67	0,10	46,38	1,19	21,37
Média geral	-	465,22	1,35	22,44	7,51	36,82
CV (%)	-	7,12	23,59	30,34	14,51	12,55
<b>2014/15</b>						
<b>Propagação</b>	1	1325192**	0,002 <sup>ns</sup>	76,05 <sup>ns</sup>	0,74 <sup>ns</sup>	12,33 <sup>ns</sup>
<b>Poda</b>	2	7327073**	0,04 <sup>ns</sup>	265,51**	7,80*	29,60 <sup>ns</sup>
<b>PR x PO</b>	2	32364,70**	0,02 <sup>ns</sup>	9,85 <sup>ns</sup>	5,60 <sup>ns</sup>	36,22 <sup>ns</sup>
Resíduo	12	30180,44	0,11	32,46	1,90	11,98
Média geral	-	1173,33	1,41	26,68	7,61	39,76
CV (%)	-	14,81	24,14	21,35	18,14	8,71

\* \*\* Valor de F significativo a 5% e a 1% de probabilidade de erro, respectivamente.

<sup>ns</sup> não significativo

**Apêndice IX.** Quadro de análise da variância das variáveis produtivas: produção (PR – Kg.planta<sup>-1</sup>), peso médio dos frutos (PMF – g), número de frutos (NF), diâmetro médio dos frutos (DMF – mm), sólidos solúveis totais (SS - %), acidez titulável (AT - meq.100 mL<sup>-1</sup>), pH, cor ( $\Delta E$  – colorímetro e DAM – D.A. meter), fenólicos totais (FT – mg ácido clorogênico equivalente/100g tecido), atividade antioxidante (AA –  $\mu$ g trolox equivalente/g tecido) e antocianinas (ANT – mg cianidina 3-glicosídeo/100g amostra), da cultivar Woodard. Pelotas – RS, 2015.

Fonte de variação	Quadrado médio												
	GL	PR	PMF	NF	DMF	SS	AT	pH	$\Delta E$	DAM	FT	AA	ANT
<b>Propagação</b>	1	0,0007 <sup>ns</sup>	0,42*	46,77**	2,97 <sup>ns</sup>	14,94**	40,20**	0,005 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>	0,19 <sup>ns</sup>	9294,49 <sup>ns</sup>	2701230*	25281,16**
<b>Poda</b>	2	0,22**	0,04 <sup>ns</sup>	113,95**	4,76*	1,06 <sup>ns</sup>	7,29**	0,001 <sup>ns</sup>	1,26**	0,006 <sup>ns</sup>	32445,93 <sup>ns</sup>	5869145**	8048,88 <sup>ns</sup>
<b>PR x PO</b>	2	0,02*	0,06 <sup>ns</sup>	3,58 <sup>ns</sup>	2,64 <sup>ns</sup>	2,03 <sup>ns</sup>	3,43**	0,002 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,20*	21943,86 <sup>ns</sup>	8822383**	32728,95**
Resíduo	12	0,005	0,04	1,75	1,11	1,14	0,20	0,002	0,15	0,05	14477,61	434538,70	2286,75
Média geral	-	0,55	1,05	22,33	17,04	14,27	12,32	2,31	1,07	1,53	652,29	6878,31	572,91
CV (%)	-	13,28	19,67	5,93	6,17	7,50	3,59	2,04	35,98	14,12	18,45	9,58	8,35

\* \*\* Valor de F significativo a 5% e a 1% de probabilidade de erro, respectivamente.

<sup>ns</sup> não significativo

**Apêndice X.** Quadro de análise da variância das variáveis vegetativas: peso de poda (PP – g), altura de planta (AP – m), comprimento dos ramos (CR – cm), área da folha (AF – cm<sup>2</sup>), índice de clorofila (IC – unidade de SPAD), da cultivar Bluegem. Pelotas – RS, 2015.

Fonte de variação	Quadrado médio					
	GL	PP	AP	CR	AF	IC
<b>2013/14</b>						
<b>Propagação</b>	1	42243,56**	0,17 <sup>ns</sup>	91,12 <sup>ns</sup>	4,54 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>
<b>Poda</b>	2	1843272**	0,12 <sup>ns</sup>	17,81 <sup>ns</sup>	1,87 <sup>ns</sup>	12,86 <sup>ns</sup>
<b>PR x PO</b>	2	38441,06**	0,14 <sup>ns</sup>	63,65 <sup>ns</sup>	1,70 <sup>ns</sup>	41,22*
Resíduo	12	2875,33	0,13	34,39	1,27	9,93
Média geral	-	606,11	1,21	16,52	6,64	39,30
CV (%)	-	8,85	29,59	35,48	16,97	8,02
<b>2014/15</b>						
<b>Propagação</b>	1	4110800**	0,15 <sup>ns</sup>	104,32 <sup>ns</sup>	7,62*	2,00 <sup>ns</sup>
<b>Poda</b>	2	4680081**	0,03 <sup>ns</sup>	235,95*	2,03 <sup>ns</sup>	4,51 <sup>ns</sup>
<b>PR x PO</b>	2	1048704**	0,08 <sup>ns</sup>	36,32 <sup>ns</sup>	2,26 <sup>ns</sup>	24,71 <sup>ns</sup>
Resíduo	12	40340	0,11	36,33	1,60	23,10
Média geral	-	957,00	1,27	26,04	7,95	40,14
CV (%)	-	20,99	26,62	23,15	15,89	11,97

\* \*\* Valor de F significativo a 5% e a 1% de probabilidade de erro, respectivamente.

<sup>ns</sup> não significativo

**Apêndice XI.** Quadro de análise da variância das variáveis produtivas: produção (PR – Kg.planta<sup>-1</sup>), peso médio dos frutos (PMF – g), número de frutos (NF), diâmetro médio dos frutos (DMF – mm), sólidos solúveis totais (SS - %), acidez titulável (AT - meq.100 mL<sup>-1</sup>), pH, cor ( $\Delta E$  – colorímetro e DAM – D.A. meter), fenólicos totais (FT – mg ácido clorogênico equivalente/100g tecido), atividade antioxidante (AA –  $\mu$ g trolox equivalente/g tecido) e antocianinas (ANT – mg cianidina 3-glicosídeo/100g amostra), da cultivar Bluegem. Pelotas – RS, 2015.

Fonte de variação	Quadrado médio												
	GL	PR	PMF	NF	DMF	SS	AT	pH	$\Delta E$	DAM	FT	AA	ANT
<b>Propagação</b>	1	0,08 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	5,37 <sup>ns</sup>	5,36 <sup>**</sup>	2,96 <sup>ns</sup>	1,17 <sup>*</sup>	0,003 <sup>ns</sup>	0,05 <sup>ns</sup>	0,002 <sup>ns</sup>	3094,25 <sup>ns</sup>	2512052 <sup>ns</sup>	78481,46 <sup>**</sup>
<b>Poda</b>	2	0,11 <sup>*</sup>	0,17 <sup>ns</sup>	12,29 <sup>ns</sup>	0,82 <sup>ns</sup>	0,32 <sup>ns</sup>	0,35 <sup>ns</sup>	0,04 <sup>ns</sup>	0,45 <sup>**</sup>	0,04 <sup>ns</sup>	31087,29 <sup>**</sup>	9801986 <sup>**</sup>	2672,49 <sup>ns</sup>
<b>PR x PO</b>	2	0,07 <sup>ns</sup>	0,05 <sup>ns</sup>	25,16 <sup>ns</sup>	1,25 <sup>*</sup>	1,02 <sup>ns</sup>	0,35 <sup>ns</sup>	0,03 <sup>ns</sup>	0,003 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>	12968,41 <sup>*</sup>	1458564 <sup>ns</sup>	7563,51 <sup>ns</sup>
Resíduo	12	0,02	0,07	10,63	0,31	0,92	0,17	0,02	0,02	0,03	2433,018	818881,4	2476,22
Média geral	-	0,62	0,96	23,99	14,31	13,62	9,77	2,25	0,75	1,58	71,31	9070,96	632,11
CV (%)	-	22,60	28,40	13,59	3,91	7,03	4,28	6,78	17,40	11,63	6,92	9,98	7,87

\* \*\* Valor de F significativo a 5% e a 1% de probabilidade de erro, respectivamente.

<sup>ns</sup> não significativo

## **ANEXOS**

**Anexo 1.** Escala fenológica para mirtileiros proposta por Lyrene (2006). Pelotas – RS, 2015.



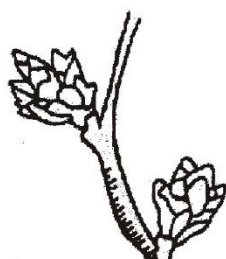
**Estádio 1**



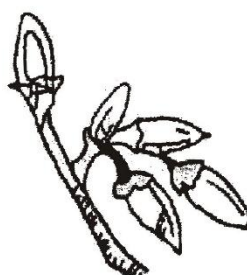
**Estádio 2**



**Estádio 3**



**Estádio 6**



**Estádio 7**



**Descrição dos estádios de desenvolvimento da gema.**

**Estádio 1:** não se observa inchamento de gemas, as brácteas cobrem completamente a inflorescência.

**Estádio 2:** gema inchada, escamas se separando, inflorescência ainda fechada.

**Estádio 3:** brácteas separadas, ápices florais visíveis.

**Estádio 4:** flores separadas, escamas caídas.

**Estádio 5:** flores individuais, corolas não expandidas e fechadas.

**Estádio 6:** corolas completamente expandidas e abertas.

**Estádio 7:** corolas caídas.

**Anexo 2.** Temperatura média (TM), Temperatura média das mínimas (Tmm), Temperatura mínima absoluta (Tma), Temperatura média das máximas (TmM), Temperatura máxima absoluta (TMa), Precipitação pluviométrica (PP) e quantidade de horas de frio (HF) obtidos pela estação agrometeorológica do Capão do Leão, pertencente a Embrapa Clima Temperado e Universidade Federal de Pelotas. Pelotas - RS, 2015.

Ano	Mês	TM (°C)	Tmm (°C)	Tma (°C)	TmM (°C)	TMa (°C)	PP (mm)
<b>2013</b>	Jan	22,3	17,5	10,8	27,5	31,8	69,2
	Fev	22,8	19,1	11,8	28,0	33,3	177,3
	Mar	19,8	15,2	9,6	25,8	32,2	27,6
	Abr	18,3	13,8	7,3	24,5	29,2	147,4
	Mai	14,6	10,5	2,5	20,6	26,2	84,1
	Jun	12,5	8,0	3,8	18,4	24,6	75,8
	Jul	11,6	7,2	-1,0	17,8	27,4	56,6
	Ago	4,2	7,0	0,6	17,1	25,8	95,3
	Set	15,7	11,2	0,2	21,1	34,7	133,7
	Out	17,5	13,5	7,0	22,1	30,2	214,0
	Nov	20,5	16,9	10,6	24,9	30,0	136,3
	Dez	23,5	18,9	10,5	29,2	36,8	78,4
<b>2014</b>	Jan	24,8	20,6	14,6	30,5	37,1	179,6
	Fev	24,1	20,9	15,3	29,0	38,0	225,4
	Mar	21,1	17,2	8,7	26,2	31,4	148,1
	Abr	18,9	15,1	8,5	24,2	32,2	99,8
	Mai	14,8	10,8	2,7	20,4	25,6	62,3
	Jun	13,3	9,6	0,8	18,2	24,6	144,7
	Jul	13,9	10,5	1,4	18,9	23,8	203,7
	Ago	13,9	9,5	1,9	20,0	32,1	82,9
	Set	16,7	12,9	7,7	21,1	30,6	143,7
	Out	19,4	15,8	9,3	23,9	36,1	246,2
	Nov	21,2	16,8	9,9	26,4	33,4	104,0
	Dez	22,8	18,9	11,2	27,9	36,5	138,2
<b>2015</b>	Jan	*	*	*	*	*	*

\* Dados não disponíveis.

Fonte: Estação Agroclimatológica de Pelotas.

<<http://www.cpact.embrapa.br/agromet/estacao/boletim.php>>