

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Enraizamento *in vitro* de microestacas de mirtilo “Highbush” cv.  
Jewel sob diferentes espectros de luz e desempenho de  
aclimatização**

**Mariana Trevisan Florêncio**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestra em Ciências. Área de concentração:  
Fitotecnia

**Piracicaba  
2023**

**Mariana Trevisan Florêncio**  
**Engenheira Agrônoma**

**Enraizamento *in vitro* de microestacas de mirtilo “Highbush” cv. Jewel  
sob diferentes espectros de luz e desempenho de aclimatização**

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:

Prof. Dr. **PAULO HERCÍLIO VIEGAS RODRIGUES**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestra em Ciências. Área de concentração:  
Fitotecnia

**Piracicaba**  
**2023**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Florêncio, Mariana Trevisan

Enraizamento *in vitro* de microestacas de mirtilo “Highbush” cv. Jewel sob diferentes espectros de luz e desempenho de aclimatização / Mariana Trevisan Florêncio. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.

68 p.

Dissertação (Mestrado) - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Cultura de tecidos 2. Fotomorfogênese 3. LED 4. Micropropagação I.  
Título

## DEDICATÓRIA

Aos meu pais, Antônio e Sônia, que me apoiaram e me inspiraram nesta jornada.

À minha irmã “predileta”, Giovanna, que me encoraja a sempre seguir meus sonhos e me inspira a ser um exemplo de vida e de mulher.

**Dedico e ofereço.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por permitir minha chegada até aqui e à minha família, especialmente ao meu tio Ênio e tia Selma, por todo carinho, suporte e amor incondicional.

Ao Programa de Pós Graduação em Fitotecnia por proporcionar a realiação do curso de Mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Hercílio Viegas Rodrigues, pela dedicação, orientação e amizade ao longo do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo que possibilitou a realização desta pesquisa.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Ornamentais (LCTPO), Christian, Patrícia, Jéssica, Laura, Lília e Enrico, por todo o apoio, carinho e momentos de descontração durante a pesquisa.

Aos meus amigos de outros Programas de Pós Graduação da ESALQ/USP e aos meus amigos da Orquestra ESALQ, Jadiel Aguiar e Gabriel Souza, pelos ótimos momentos de lazer e conversas sobre música, religião e arte.

E finalmente, à joia rara de fino lavor e flor da montanha, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” / Universidade de São Paulo.

**Muito obrigada!**

*“I think the biggest innovations of the 21st century will be at the intersection of biology and technology. A new era is beginning.”*

**Steve Jobs**

*“Penso que as maiores inovações do século XXI estarão na intersecção da biologia e tecnologia. Uma nova era está começando.”*

**Steve Jobs**

## SUMÁRIO

RESUMO .....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	11
2.1. Mirtilo ( <i>Vaccinium</i> spp.).....	11
2.2. A variedade “highbush” cv. Jewel.....	11
2.3. Propriedades nutracêuticas .....	15
2.4. Produção mundial de mirtilo.....	11
2.5. Produção nacional de mirtilo.....	18
2.5.1 Produção na entressafra.....	19
2.6. Progamação de mudas de mirtilo.....	21
2.6.1 Cultura de tecidos em mirtilo: propagação <i>in vitro</i> .....	22
2.7. Efeito dos espectros de luz de LED nas plantas.....	24
2.7.1 Uso de LED no cultivo <i>in vitro</i> .....	26
2.8. Aclimatização de plântulas lenhosas .....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	31
3.1. Material vegetal .....	32
3.2. Enraizamento <i>in vitro</i> de microestacas de mirtilo.....	32
3.3. Quantificação de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> e total.....	35
3.4. Processo de aclimatização .....	35
3.5. Análise estatística .....	36
4. RESULTADOS .....	37
4.1 Enraizamento <i>in vitro</i> de microestacas de mirtilo.....	37
4.2 Quantificação de clorofia <i>a</i> , <i>b</i> e total.....	38
4.3 Processo de aclimatização .....	42
5. DISCUSSÃO.....	50
5.1 Enraizamento <i>in vitro</i> de microestacas de mirtilo.....	50
5.2 Quantificação de clorofia <i>a</i> , <i>b</i> e total.....	52
5.3 Processo de aclimatização .....	53
6 CONCLUSÃO .....	55
REFERÊNCIAS.....	57

## RESUMO

### Enraizamento *in vitro* de microestacas de mirtilo “Highbush” cv. Jewel sob diferentes espectros de luz e desempenho de aclimatização

O mirtilo, *Vaccinium corymbosum* cv. Jewel, possui excelentes propriedades nutracêuticas, potencial ornamental e alto valor agregado que justifica os investimentos nas instalações de pomares no hemisfério Sul e também no Brasil. Dessa forma, a fruta vem sendo cada vez mais procurada pelos produtores para suprir a demanda nacional e da entressafra do hemisfério Norte. Existe uma limitação do cultivo dessa planta que é a pouca disponibilidade de mudas, pois sua propagação é feita por estaquia, método convencional que produz baixa quantidade de ramos, além das mudas apresentarem dificuldade no enraizamento. Com isso, a muda precisa de mais tempo para alcançar a idade adulta e conseqüentemente a produtividade. Desse modo, a propagação *in vitro* é uma alternativa na cultura de tecidos vegetais para aumentar a disponibilidade da muda de mirtilo para o produtor. A fase de transição entre a microestaca propagada *in vitro* no laboratório e na casa de vegetação deve ser eficiente a fim de reduzir o tempo de produção e o custo final. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito na fotomorfogênese *in vitro*, sem o uso de reguladores de crescimento, de microestacas de mirtilo sob diferentes espectros de luz de LEDs e a performance na aclimatização. Após o período de incubação de 45 dias em sala de crescimento a 25°C, fotoperíodo de 16 horas, as microestacas de mirtilo “Highbush” cv. Jewel de aproximadamente 1,5 cm foram distribuídas sob quatro espectros de luz LED sendo as seguintes combinações: 100% vermelho = 100R, 70% vermelho/30% azul: 70R30B, 100% azul: 100B e o controle (CW) de LED branca (4000K) com o Photosyntetic densidade de fluxo de photons (PDFF) ajustado, para todos os tratamentos, em 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Os parâmetros analisados na fase de enraizamento *in vitro* foram: altura (cm), número de folhas (un.), entrenós (un.), área foliar ( $\text{cm}^2$ ), comprimento de raiz (cm), massa fresca (g), clorofila *a* ( $\text{mg.g}^{-1}$ ), clorofila *b* ( $\text{mg.g}^{-1}$ ) e clorofila total ( $\text{mg.g}^{-1}$ ). Na etapa de aclimatização, as plântulas foram transferidas em bandejas com o substrato BASE® Floresta e BASE® Holambra Ornamentais, transferidas para casa de vegetação e submetidas à nebulização tipo fog umidade relativa de 90% coberta com uma película de polietileno de difusão (150 $\mu\text{m}$ ) e Aluminet® (Polisack) 50%, por um período de 45 dias. Nessa fase foram avaliados a altura (cm), brotação (un.), número de folhas (un.), área foliar ( $\text{cm}^2$ ), massa fresca parte aérea (g), massa seca parte aérea (g), comprimento raiz (cm), massa fresca raiz (g) e massa seca raiz (g). Todos os dados obtidos foram submetidos à análise estatística (ANOVA). As plântulas sob os espectros 100R e 70R30B apresentaram maior desempenho tanto na rizogênese *in vitro* quanto *ex vitro* da cv. Jewel e, independente do uso dos substratos houve 100% de sobrevivência e enraizamento.

Palavras-chave: Cultura de tecidos, Fotomorfogênese, LED, Micropropagação

## ABSTRACT

### ***In vitro* rooting of “Highbush” blueberry microcuttings cv. Jewel under different light spectra and acclimatization performance**

The blueberry, *Vaccinium corymbosum* cv. Jewel, has excellent nutraceutical properties, ornamental potential and high added value that justifies investments in orchard installations in the southern hemisphere and also in Brazil. In this way, the fruit has been increasingly sought after by producers to meet the national and off-season demand in the northern hemisphere. There is a limitation in the cultivation of this plant, which is the limited availability of seedlings, since its propagation is done by cuttings, a conventional method that produces a low number of branches, in addition to the fact that the seedlings have difficulty in rooting. As a result, the seedling needs more time to reach adulthood and consequently productivity, with *in vitro* micropropagation being an alternative to increase the availability of blueberry seedlings for the producer market. The transition phase between the microcutting propagated *in vitro* in the laboratory and in the greenhouse must be efficient in order to reduce the production time and the final cost. And, with the development of a more efficient root system, they have a higher physiological quality and a better survival rate during the acclimatization phase. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effect on *in vitro* photomorphogenesis, without the use of growth regulators, of blueberry microcuttings under different light spectra of LEDs and the performance in acclimatization. After an incubation period of 45 days in a growth room at 25°C, photoperiod of 16 hours, microcuttings of “Highbush” blueberry cv. Jewel of approximately 1.5 cm were distributed under four LED light spectra being the following combinations: 100% red = 100R, 70% red/30% blue: 70R30B, 100% blue: 100B and white LED control (CW) (4000K) with the Photosynthetic photon flux density (PPFD) set, for all treatments, to 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . The characters analyzed in the *in vitro* rooting phase were: height (cm), number of leaves (un.), internodes (un.), leaf area (cm<sup>2</sup>), root length (cm), fresh mass, chlorophyll *a* (mg.g<sup>-1</sup>), chlorophyll *b* (mg.g<sup>-1</sup>) and total chlorophyll (mg.g<sup>-1</sup>). In the acclimatization stage, the microcuttings were transferred into trays with the substrate BASE® forest and BASE® Holambra Ornamentals, taken to a greenhouse and subjected to fog fogging at 90% relative humidity covered with a diffusion polyethylene film (150 $\mu\text{m}$ ) and Aluminet® (Polisack) 50%, for a period of 45 days. Height (cm), sprouting (un.) leaf number (un.), leaf area (cm<sup>2</sup>), fresh mass aerial part (g), dry mass aerial part (g), root length (cm), root fresh mass (g) and root dry mass (g) were evaluated. All data obtained were submitted to statistical analysis (ANOVA). The seedlings under the 100R and 70R30B spectra showed greater performance in both *in vitro* and *ex vitro* rhizogenesis of cv. Jewel and, regardless of the use of substrates, there was 100% survival and rooting.

Keywords: Tissue culture, Photomorphogenesis, LED, Micropropagation

## 1. INTRODUÇÃO

O *Vaccinium* spp. do grupo “Southern Highbush”, híbridos interespecíficos com *Vaccinium corymbosum*, apresenta baixa exigência de frio e foi introduzido no Brasil em 2010 com estudos pioneiros em cultivo semiprotegido na região de Piracicaba no estado de São Paulo com as cultivares ‘Jewel’, ‘Emerald’, ‘Star’ e ‘Showchaser’ (Cunha et al., 2015). Em regiões subtropicais, as cultivares mencionadas crescem ininterruptamente durante todo o ano. O mirtilheiro possui significativa importância econômica devido à crescente demanda global impulsionada pelos seus benefícios à saúde e versatilidade de uso. Seu cultivo e comercialização contribuem para a economia ao gerar empregos, estimular o agronegócio e impulsionar a indústria alimentícia. Além disso, o mirtilo a fruta é valorizada no mercado de produtos frescos, congelados, processados, como sucos e suplementos, ampliando suas oportunidades de negócio e impacto econômico positivo. Entretanto, a propagação dessas plantas é afetada por mudanças na temperatura e umidade, o que exige instalações mais sofisticadas para o enraizamento, como ambientes com controle de temperatura, umidade e sombreamento, além de câmaras com nebulização intermitente.

A utilização de mudas provenientes de micropropagação, aliada a práticas adequadas de cultivo, é fundamental para assegurar tanto a produtividade quanto a longevidade dos pomares de mirtilo (Cruz et al., 2019). Apesar disso, é importante destacar que o investimento necessário para a produção dessas mudas é considerado alto e pode sofrer variações de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta. Isso reforça a necessidade de um planejamento cuidadoso e de uma gestão financeira adequada para garantir o sucesso da produção dessa fruta.

O custo das mudas micropropagadas de mirtilo pode variar em função do tempo que o explante permanece em cultura *in vitro* e do período que elas levam para estar aptas a serem comercializadas em casa de vegetação. Porém, durante a fase de aclimatização das plântulas, há um risco elevado de perdas devido à imaturidade do material, o que pode tornar inviável a retirada precoce das mudas sem o estágio de enraizamento. Maiores estudos nessa fase são necessários e é importante que as mudas passem pela etapa de enraizamento adequado antes de

serem transferidas para a aclimatização, a fim de minimizar os prejuízos e garantir a sobrevivência das plântulas (Gouvêa et al., 2019).

Posto isto, a falta de raízes viáveis, a ausência de cera epicuticular nas folhas e o tamanho reduzido dos explantes podem dificultar o sucesso na fase de aclimatização de plantas lenhosas. Ademais, mesmo dentro da mesma espécie, a eficiência de sobrevivência na aclimatização pode variar, indicando que esse processo é dependente do genótipo (Almeida et al., 2016).

Conforme mencionado por Silva et al. (2018), a luz é um dos fatores fundamentais para o sucesso da propagação *in vitro*, influenciando diretamente o desenvolvimento dos explantes. Uma das vantagens desse método é a possibilidade de utilizar diferentes espectros de luz, a fim de maximizar o crescimento e a qualidade das mudas produzidas. Com o intuito de aprimorar a produção e a qualidade das mudas, estudos têm sido realizados em diversas culturas, como *Saccharum officinarum*, *Anthurium* spp. e *Cunninghamia lanceolata*, utilizando LEDs para proporcionar diferentes espectros de luz (Lima, 2010; Murillo-Gómez et al., 2014; Miler et al., 2019).

De acordo com Miler et al. (2014), embora a iluminação seja indispensável para o crescimento e desenvolvimento das plantas, ainda há uma lacuna no conhecimento sobre o papel específico da qualidade da luz durante o processo de enraizamento *in vitro*. Além disso, avaliar o efeito da qualidade da luz durante o enraizamento *in vitro* no desempenho de crescimento das plântulas na aclimatização é fundamental para aprimorar as técnicas de propagação e melhorar a qualidade das plantas produzidas na cultura do mirtilo. Assim, é importante realizar estudos mais aprofundados sobre esse assunto para fornecer informações valiosas aos produtores e pesquisadores.

Com o intuito de aprimorar as técnicas de propagação *in vitro* e *ex vitro* de mirtilo, o presente estudo tem como objetivo investigar o efeito de diferentes espectros de luz de LEDs na rizogênese *in vitro* sem a utilização de reguladores de crescimento. Além disso, também buscou-se avaliar a performance dessas microestacas na aclimatização, com ênfase na persistência do efeito da qualidade da luz no crescimento *in vivo* das plântulas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Mirtilo (*Vaccinium* spp.)

O mirtilo é uma fruta membro da família *Ericaceae*, subfamília *Vaccinoideae* e gênero *Vaccinium* (Trehane, 2004). A planta de mirtilo (*Vaccinium* spp.) é uma frutífera lenhosa de porte arbustivo ou rasteiro e com hábito caducifólio. É originário dos bosques da América do Norte, especificamente nos Estados Unidos e Norte da Europa sendo consumido pelo homem desde a pré-história (Cantuarias-Avilés et al., 2014). “Blueberry” é o nome em inglês utilizado para se referir ao mirtilo, uma fruta de origem norte-americana que ganhou popularidade em todo o mundo devido às suas propriedades nutricionais e sabor agradável. Já em espanhol, o mirtilo é conhecido como arándano, uma palavra que deriva do latim "vaccinium", nome científico do gênero ao qual o mirtilo pertence. Essa nomenclatura é comumente utilizada em diversos países onde o mirtilo é cultivado, como nos Estados Unidos, no Canadá e em países da Europa e Ásia, que são grandes produtores da fruta.

Segundo Fachinello et al., (2013), o mirtilo é uma baga de formato achatado e cor azul-escura, coroada pelos lóbulos persistentes do cálice, com diâmetro variando entre 1 a 2,5 cm e peso de 1,5 a 4 g. Além disso, a fruta possui um sabor que pode variar doce-ácido a ácido e é caracterizada por apresentar diversas sementes em seu interior. A planta possui um sistema radicular raso e fibroso, com raízes superficiais e algumas raízes mais profundas e pode crescer de 30 cm a 4 m de altura, dependendo da variedade e das condições de cultivo. As folhas são pequenas, ovaladas e verde-escuras, com margens serrilhadas. As flores do mirtilo são pequenas, brancas ou rosa pálido, e aparecem na primavera, antes do aparecimento dos frutos. Os frutos variam de cor e diâmetro também dependendo da cultivar escolhida (Della Rosa et al., 2018). Além disso, Shimizu et al. (2019) afirmam que a presença de insetos, principalmente abelhas, é essencial para a polinização em muitas cultivares de mirtilo, pois algumas não são autoférteis e dependem da polinização cruzada para produzir frutos de qualidade.

Esta fruta é muito apreciada em todo o mundo e existem diferentes tipos de cultivares comerciais. Entre eles, destacam-se os de arbustos baixos, também conhecidos como "Lowbush", os de arbustos altos, denominados "Highbush", e os do tipo olho-de-coelho, ou "Rabbiteye" (Childers & Lyrene, 2006; Strik, 2007).

Existem cerca de 450 espécies de mirtilheiros no gênero *Vaccinium*, mas somente algumas são relevantes comercialmente (Gough, 1991; Catuarias-Avilés, 2010). Os mirtilos do grupo “Lowbush”, da espécie *V. angustifolium*, são arbustos rasteiro cultivados principalmente na América do Norte, em regiões de clima frio, alcançando cerca de 30 cm de altura. Eles são mais utilizados para a produção de mirtilos selvagens e para a produção de xaropes e geleias. A variedade de mirtilo “Lowbush” é caracterizada por ser uma planta menor e mais resistente, apesar de produzir frutos em menor quantidade, é reconhecida por sua qualidade superior e sabor intenso (Rasera; Antunes, 2014).

Já os mirtilos “Highbush”, arbusto gigante, são mais cultivados em regiões de clima temperado, como a Europa, a América do Norte e a Ásia, e apresentam um porte maior chegando a atingir 2,5 m de altura e são da espécie *V. corymbosum* (Pinto, 2015). A variedade de mirtilo “Highbush” é amplamente cultivada e é conhecida por sua altura, alta produção de frutos e habilidade em se adaptar a diferentes condições climáticas. Essa variedade é a mais comum e é cultivada em vários países, como Estados Unidos, Canadá, Europa e América do Sul. Eles são geralmente cultivados em grandes plantações e são conhecidos por suas bagas grandes e saborosas (Cantuarias-Avilés et al., 2010).

Por fim, os mirtilos do tipo “Rabbiteye” conhecidos como olho-de-coelho da espécie *Vaccinium virgatum* (sinônima de *V. ashei*) são mais comuns em regiões de clima quente, como o sul dos Estados Unidos, e são menos cultivados em outras partes do mundo (Gough, 1991; Catuarias-Avilés, 2010). Eles apresentam um porte intermediário, podendo atingir de 1 a 2 metros de altura, e suas bagas são um pouco menores em comparação com os “Highbush” (Gough, 1991). Embora as cultivares de mirtilheiro em regiões subtropicais e tropicais produzam frutos de menor tamanho e qualidade inferior, elas compensam isso com uma maior produtividade por planta. Além disso, os frutos dessas cultivares possuem uma melhor capacidade de conservação após a colheita (COUTINHO et al. 2007).

A cultura do mirtilheiro é conhecida por ser exigente em horas de frio anuais para que ocorra o florescimento e a produção de frutos de qualidade. De acordo com Pires et al. (2019), o cultivo de mirtilo no Brasil é um desafio, principalmente em regiões com clima tropical, onde a ocorrência de horas de frio é baixa. A falta de frio suficiente pode afetar a produção de frutos, reduzindo a qualidade e a quantidade da colheita. Em regiões com clima tropical, o cultivo do mirtilheiro é um desafio que tem

sido abordado por diversos estudos sendo necessário desenvolver técnicas específicas para adaptar a planta às condições climáticas locais, a fim de obter uma produção de qualidade. A introdução recente de novas variedades de mirtilheiro com menor exigência de frio, especialmente aquelas pertencentes ao grupo "Southern Highbush", oferece uma perspectiva promissora para a expansão do cultivo de mirtilos em regiões não tradicionais.

No ano de 2010, variedades de mirtilo desenvolvidas pela Universidade da Flórida do grupo Southern Highbush, com requerimentos de frio hibernal baixos a muito baixos, variando de 100 a 400 horas, foram introduzidas no Brasil (Lyrene, 2008). Essa incorporação de novas cultivares abre oportunidades para o estabelecimento de plantações de mirtilos em climas mais quentes, onde anteriormente não era viável (Medina, 2016). A expansão da produção de mirtilheiros em regiões subtropicais e tropicais tem levado a um aumento significativo na área de cultivo em todo o mundo. (Fang et al., 2020).

Existem muitas variedades de mirtilo disponíveis para cultivo em diferentes partes do mundo, cada uma com características próprias e únicas. Ressalta-se que a escolha do tipo de cultivar de mirtilo depende das condições climáticas e das preferências dos produtores e consumidores (Childers & Lyrene, 2006; Strik, 2007).

É fundamental que os produtores escolham o cultivar adequado às condições de clima e solo da região, garantindo assim uma produção satisfatória de frutos de alta qualidade. A escolha cuidadosa da variedade pode ajudar a garantir a resistência da planta, melhorar o rendimento e aumentar a lucratividade do cultivo de mirtilo.

## **2.2 A variedade “Highbush” cv. Jewel**

O grupo dos mirtilos altos – “Southern Highbush” - é o mais cultivado no mundo, incluindo no Brasil, onde variedades como ‘Misty’, ‘O’neil’, ‘Jewel’, ‘Santa Fé’, ‘Bluecrisp’, ‘Millenia’ e ‘Star’ estão sendo plantadas devido às excelentes características de seus frutos e pela exigência do consumidor (Pereira et al., 2013).

Segundo Kender e Brightwell (1966), as cultivares do grupo “Highbush” requerem entre 650 a 800 horas de frio para um bom desenvolvimento. Essas cultivares são mais adaptadas a regiões com ciclos vegetativos de até 160 dias. Essas variedades são adaptáveis às condições de clima presentes no Sul e em algumas áreas do Sudeste do Brasil, exigindo de 150 a 400 horas de frio (Pereira et

al., 2017). A insuficiência de horas de frio pode prejudicar o surgimento e desenvolvimento adequados das brotações e flores, levando a uma baixa produção.

Essas cultivares são conhecidas como “Southern Highbush” e foram obtidas a partir de híbridos. A cultivar ‘Jewel’ é o resultado de cruzamentos entre *V. corymbosum* L. e *V. darrowi* Camp. Essa cultivar requer um período de frio entre 100 e 150 horas a uma temperatura  $\leq 7,2$  °C, considerado um requisito baixo (Williamson e Lyrene, 2004).

Esse material caracteriza-se por apresentar bagas de tamanho médio de 15 mm e peso médio de 1,7 a 2,5 g, sendo firmes e com excelente cicatriz, destacando-se facilmente da haste na colheita. Segundo os descritores da patente US PP11807 P2, publicada em 13 de março de 2001, as bagas têm sabor com notas mais ácidas nas primeiras colheitas (Lyrene & Balligton, 2006).

Existem várias cultivares de mirtilo conhecidas de acordo com a Florida Blueberry Growers (2009) incluindo ‘Star’, ‘Jewel’, ‘Emerald’, ‘Southern Bell’, ‘Millenia’, ‘Primadonna’, ‘Snowchaser’, ‘Spring Wide’, ‘Spring High’ e ‘Sweet Crisp’. Cada uma dessas cultivares possui características únicas em relação ao tamanho, sabor e época de maturação dos frutos, além de adaptabilidade a diferentes condições de clima e solo. A escolha da cultivar adequada para cada região é importante para garantir a produção de frutos de alta qualidade. A pesquisa também destaca que as cultivares “Southern Highbush” são as mais apropriadas para o cultivo na região sul sudeste do Brasil e que a variedade de mirtilo “Highbush” cv. Jewel é considerada uma das opções mais adequadas para o cultivo no Brasil, devido à sua alta produtividade e qualidade dos frutos, além de apresentar boa resistência a doenças e pragas.

A introdução dessa cultivar deu-se com o viveiro Sunnridge, uma empresa chile-norte americana e, em 2010 os plantios se iniciaram no estado de São Paulo e na região do polo Petrolina-Juazeiro. A Chácara Catavento, na região de Piracicaba, foi responsável por introduzir tais cultivares que apresentam boa adaptação às condições climáticas do Brasil, além de serem produtivas e apresentarem frutos de qualidade. De acordo com informações disponíveis no site oficial da Chácara Catavento, situada em Piracicaba, SP, o sítio tem sido líder no cultivo de mirtilos para climas quentes no Brasil e é uma referência na produção de mirtilos desde 2011. A empresa utiliza técnicas inovadoras, como o cultivo em vasos com sistema de gotejamento, para produzir frutas em um ambiente limpo e saudável. As

cultivares produzidas são 'Emerald', 'Jewel', 'Primadonna' e 'Snowchaser' (Silva, 2018; Medina et al., 2018; Cantuarias-Avilés et al., 2014).

Em um estudo sobre a performance de 'Emerald' e 'Jewel' cultivares de mirtilo sem incidência de frio realizado por Medina et al. (2018) visou avaliar o desempenho dessas cultivares através da avaliação das fases de crescimento vegetativo, brotação, florescimento, frutificação e produção de frutos. Verificou-se que estas variedades apresentaram produção satisfatória de frutos em Piracicaba, onde as condições climáticas são favoráveis para a cultura do mirtilo. E, em área protegida e sob condições subtropicais, as plantas de mirtilo da variedade 'Esmerald' demonstram um potencial de produção superior quando comparadas às plantas da variedade 'Jewel'. Os resultados deste estudo indicam que estas variedades são uma opção viável para a produção de frutos no país, e pode ser uma alternativa interessante para os produtores que buscam diversificar sua produção agrícola.

De acordo com Medina et al. (2018), em Piracicaba, estado de São Paulo, a cultivar 'Jewel' concentrou sua produção de frutas no período de outubro a janeiro, apresentando um peso médio de 1,53 g e uma produção de 170 g por planta. Entretanto, devido ao excesso de calor na região em fevereiro, não houve um segundo pico de produção.

### **2.3 Propriedades nutraceuticas**

Os nutrientes presentes no mirtilo trazem benefícios para a saúde, graças aos compostos ativos responsáveis por suas propriedades nutraceuticas, como antocianinas, ácido ascórbico, compostos fenólicos e anti-inflamatórios. Entre eles, as antocianinas são destacadas por serem responsáveis pela cor roxa característica do fruto e por apresentarem efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios relevantes e podem ser úteis no tratamento de doenças inflamatórias, como a artrite e a doença inflamatória intestinal (Wu et al., 2018).

Lee et al. (2019) afirmam que as antocianinas, incluindo seu aglicone cianidina, apresentam atividade antioxidante *in vitro*. Esse efeito antioxidante pode ser benéfico para a saúde humana, ajudando a proteger contra o dano oxidativo celular e, assim, prevenindo diversas doenças relacionadas ao envelhecimento e inflamação crônica. Estudos indicam que os compostos antioxidantes presentes no mirtilo podem ajudar a prevenir o dano oxidativo celular, relacionado a doenças

crônicas como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Seeram, 2008; Subash et al., 2014).

O mirtilo é reconhecido como uma importante fonte de antioxidantes devido ao seu alto teor de compostos fenólicos, incluindo antocianinas, e à presença do ácido ascórbico, também conhecido como vitamina C. De acordo com Kalt et al. (1999), o mirtilo é capaz de alterar a produção de antocianinas em resposta à mudança na intensidade de luz, o que pode ser uma estratégia usada pela planta para se proteger de danos oxidativos.

Conforme indicado por Medina et al., (2022), ao longo do período de armazenamento, verificou-se um incremento nos níveis de antocianinas, quercetinas e compostos fenólicos totais, assim como na atividade antioxidante dos frutos. Em condições subtropicais no Brasil, os frutos demonstraram uma boa durabilidade pós-colheita, mantendo níveis de qualidade satisfatórios por até 12 dias em temperatura ambiente.

Os compostos fenólicos também são importantes para a saúde, pois atuam como antioxidantes e anti-inflamatórios. Além disso, estes compostos têm sido estudados por sua capacidade de melhorar a função cognitiva e a saúde do cérebro. Segundo Krikorian et al. (2010), o consumo regular de mirtilo pode ajudar a melhorar a memória e a concentração. Os compostos anti-inflamatórios presentes no mirtilo podem ajudar a reduzir a inflamação e prevenir doenças crônicas, como doenças cardíacas e diabetes. Estes compostos também podem fortalecer o sistema imunológico e prevenir infecções.

O estudo de Krikorian et al. (2010) foi realizado com participantes de idade avançada com comprometimento cognitivo leve. Durante o estudo, um grupo consumiu mirtilos liofilizados diariamente, enquanto o outro grupo recebeu placebo. Os resultados mostraram que o grupo que consumiu mirtilos apresentou melhora significativa na memória e na função cognitiva em comparação com o grupo placebo. Os pesquisadores sugerem que os compostos bioativos presentes no mirtilo, como as antocianinas, podem ser responsáveis pelos efeitos benéficos na função cognitiva.

Outros estudos também confirmaram os efeitos positivos do consumo de mirtilo na função cognitiva. Um estudo realizado por Bowtell et al. (2017) com participantes jovens e saudáveis mostrou que o consumo de mirtilos frescos melhorou a memória de curto prazo em comparação com um grupo controle que

consumiu um placebo. Já um estudo de Khalid et al. (2017) mostrou que o consumo de um suco de mirtilo diariamente durante seis semanas melhorou a função cognitiva em adultos com sobrepeso ou obesidade. Portanto, o consumo regular de mirtilos pode ser uma estratégia importante para melhorar a memória e a concentração, especialmente em idosos ou com comprometimento cognitivo leve. Além disso, o mirtilo também é uma fonte importante de fibras, vitaminas e minerais, como vitamina C e manganês, que são importantes para a saúde geral do corpo (Kalt, 2010).

Atualmente, o mirtilo é considerado uma fruta versátil, sendo valorizada não apenas por suas propriedades medicinais, mas também por sua ampla utilização na gastronomia. Pesquisas indicam que o mirtilo pode ser utilizado na confecção de pratos sofisticados e diversificados, como sobremesas, molhos, bebidas e até mesmo em pratos salgados (Albuquerque et al., 2020). Além disso, o mirtilo é utilizado na fabricação de chás, pudins, biscoitos, compotas e outros produtos alimentícios (Cantuarias-Avilés, 2010).

#### **2.4 Produção mundial de mirtilo**

O cultivo e produção de mirtilo tem apresentado um crescimento constante em todo o mundo, devido à sua popularidade e às suas propriedades nutricionais e gustativas. O interesse na produção de mirtilos continua a crescer globalmente, devido às descobertas científicas sobre suas propriedades nutracêuticas e funcionais, bem como à demanda do consumidor por alimentos saudáveis. Além disso, o aumento da conscientização sobre os benefícios dos mirtilos para a saúde tem impulsionado sua produção em países como Chile e Peru (Pérez et al., 2020; Rodríguez-Rodríguez et al., 2021).

De acordo com a FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2020) a produção mundial mais do que dobrou entre 2010 e 2019, subindo de 439 mil toneladas métricas para quase 1 milhão. Durante esse período, o número de países com produção relatável expandiu de 26 para pelo menos 30, com 27 países apresentando crescimento. Em 2010, apenas quatro países produziram mais de 10.000 toneladas: Estados Unidos (224.000 toneladas), Canadá (84.000 toneladas), Chile (76.000 toneladas) e França (11.000 toneladas). O número de países que produzem pelo menos 10.000 toneladas começou a aumentar em 2012 e não diminuiu desde então. Em 2019, pelo menos 11 países estavam acima do limite

de 10.000 toneladas. O Peru teve a expansão mais dramática, passando de menos de 50 toneladas para quase 125.000 e se tornando o quarto maior produtor atrás dos Estados Unidos, Canadá e Chile. O Peru é agora o maior exportador do mundo em valor (USDA, 2022).

A produção de mirtilos é altamente influenciada por uma série de fatores, como clima, solo, tecnologia de produção e disponibilidade de mão de obra, o que leva a uma variação significativa entre os países produtores. Países como os EUA e o Chile apresentam grandes produções, graças ao clima temperado e solos férteis favoráveis ao cultivo dessa fruta. Em contraste, outros países com condições climáticas desfavoráveis têm produções limitadas (DeVetter et al., 2022). Por meio da renovação das variedades pode-se aprimorar a adaptação às atuais condições de solo e clima, permitindo a exploração de novas áreas para cultivo e nesse contexto, a disseminação da genética por meio de viveiros desempenha um papel fundamental.

De modo geral, a produção global de mirtilos tem se expandido rapidamente devido à crescente demanda por seus benefícios nutricionais e sabor agradável. Espera-se que a produção e a área de cultivo continuem a crescer nos próximos anos, de acordo com as tendências recentes.

## **2.5 Produção nacional de mirtilo**

A produção de mirtilos no Brasil tem despertado o interesse de produtores, uma vez que o mercado consumidor tem demandado cada vez mais por frutas frescas e saudáveis. Portanto, é vista como uma oportunidade promissora para os produtores que desejam atender a essa crescente demanda.

A introdução do cultivo de mirtilo no Brasil ocorreu em 1983 na região Sul, especificamente no Estado do Rio Grande do Sul, através da Embrapa Clima Temperado (cidade de Pelotas) e do pesquisador Alverides Machado dos Santos (Rasera et al., 2004). Atualmente, muitos produtores de pequeno porte têm investido no cultivo da fruta como forma de diversificar suas plantações e aumentar sua renda, contribuindo para a sustentabilidade de suas propriedades (Retamales et al., 2018).

O cultivo de mirtilos no Brasil tem ocorrido em sua maioria em pequenas propriedades rurais, com poucos empreendimentos em larga escala. Como se trata de uma cultura relativamente nova no país, o pacote tecnológico utilizado pelos produtores tem sido adaptado de experiências internacionais e ajustado às

condições climáticas e de solo locais. Embora não haja dados oficiais atualizados, é calculado que a área destinada ao cultivo de mirtilos no Brasil seja de cerca de 2.000 hectares, de terras localizadas desde o extremo sul do Rio Grande do Sul até a Bahia, passando por Santa Catarina, São Paulo, Minas Gerais e Distrito Federal. O estado de São Paulo lidera a produção de mirtilo no Brasil, seguido por Minas Gerais e Paraná, de acordo com a Associação Nacional de Produtores de Mirtilo (ANPM, 2020). A produção anual no país vem crescendo constantemente e a tendência é que continue em ascensão com a crescente demanda pelo fruto.

No Brasil, os mirtilheiros são plantados principalmente em solos que são arenosos e úmidos, o que é ideal para o desenvolvimento da planta. Embora exista uma produção limitada para a exportação, a maioria da produção é destinada ao mercado interno. A produtividade da planta é alta, permitindo uma colheita média de 20 a 25 toneladas por hectare anualmente (Antunes & Raseira, 2006).

De acordo com Cruz et al. (2017), a aplicação de técnicas avançadas de cultivo e aprimoramento genético têm possibilitado o aumento da eficiência produtiva e da qualidade dos frutos. Os mirtilheiros do tipo “Highbush” têm sido responsáveis pelos maiores incrementos em área plantada e produção em todo o mundo. A América do Norte é o principal produtor desse tipo de mirtilo, respondendo por 66% da produção mundial, seguida pela América do Sul (21%) e Europa (11%) (Villata, 2012). Essa tendência sugere que a produção de mirtilos do tipo Highbush pode ter um grande potencial de crescimento no Brasil e em outras regiões com clima adequado para o cultivo dessa variedade.

### **2.5.1 Produção na entressafra**

O cultivo de mirtilo durante a entressafra em países do hemisfério sul pode ser uma oportunidade para o desenvolvimento econômico dessas nações, uma vez que a fruta tem uma alta demanda no mercado e uma disponibilidade sazonal limitada. Dessa forma, a produção de mirtilo fora da estação principal pode representar uma alternativa para atender à demanda dos consumidores e aumentar a rentabilidade dos produtores, gerando empregos e renda.

Em virtude da entressafra do Hemisfério Norte, o Brasil pode se destacar na produção e exportação de mirtilos frescos. Além disso, a localização geográfica do Brasil favorece a exportação para mercados europeus, onde há grande demanda pelo fruto. Cantuarias-Avilés (2010) ressalta que, além da vantagem competitiva de

produzir e exportar mirtilos frescos durante a entressafra do Hemisfério Norte, a disponibilidade de água e terras adequadas também são fatores fundamentais para o cultivo do mirtilo no Brasil. Dessa forma, esses fatores podem contribuir para o aumento das exportações de mirtilos frescos brasileiros.

A safra de mirtilo no Chile é exportada no período entre novembro e início de abril. De acordo com especialistas, o país possui diversas condições agrícolas propícias para o cultivo de mirtilos. Nos últimos dez anos, a área plantada aumentou em 4.000 hectares, o que representa um acréscimo de 30%. Além disso, as exportações de mirtilos frescos também tiveram um aumento significativo, chegando a 117.000 toneladas na temporada 2020/2021, o que representa um aumento de 23%. (Chilean Blueberry Committee, 2022).

A Proarándanos, associação de comércio e exportação de mirtilos do Peru, em 2022 o país passou de exportar um total de 12.951 toneladas métricas no encerramento da safra 2015-2016 para 220 mil toneladas na safra 2021-2022, consolidando-se pelo terceiro ano consecutivo como o principal exportador mundial de mirtilos frescos.

Atualmente, na Argentina, existem aproximadamente 1.400 hectares na região mais ao norte (Tucumán, Salta), 1.100 hectares na região Nordeste (Entre Ríos-Corrientes) e 300 hectares em Buenos Aires, que produzem cerca de 20 a 22.000 toneladas de mirtilos. Desse total, 70% são exportados in natura, 20% são congelados e 10% são destinados ao mercado local (Blueberries Consulting, 2022).

Em 2021, a África do Sul exportou cerca de 20.000 toneladas de mirtilos e teve um total de exportações de cerca de 25.000 toneladas na safra. Já as condições climáticas adversas na Austrália, como chuvas fortes e inundações, tiveram um impacto significativo nos produtores no norte de Nova Gales do Sul, que são responsáveis por cerca de 75% da produção de mirtilos do país. Isso resultou em uma redução de 10% na colheita. No ano encerrado em junho de 2021, a produção de mirtilos na Austrália foi de 23.452 toneladas.

Em suma, a prática é conhecida como "off-season production" (produção fora de época) e pode ser realizada por meio de técnicas como o cultivo em estufas ou a utilização de variedades que se adaptam às condições climáticas locais. Dessa forma, é possível fornecer frutas de qualidade aos consumidores e atender à demanda do mercado, gerando benefícios tanto para os produtores quanto para os consumidores.

## 2.6 Propagação de mudas de mirtilo

No final do século XIX e início do século XX, as técnicas de propagação foram iniciadas na América do Norte. Em 1906, Coville deu início ao processo de domesticação do mirtilo, tendo a primeira seleção sido a "Brooks", pertencente ao tipo highbush. Devido ao potencial de melhoria e à demanda crescente do mercado de Boston ele iniciou trabalhos de seleção e propagação das plantas que apresentavam maior tamanho de frutos. Em 1911, ele cruzou a 'Brooks' com a seleção do tipo "Lowbush" chamada 'Russel', realizada em 1909, sendo esse o primeiro cruzamento bem-sucedido. Coville produziu cerca de 70.000 híbridos e lançou 15 cultivares até sua morte em 1937 (Galletta & Ballington, 1996).

Existem diferentes métodos de propagação do mirtilo. A propagação sexuada é feita através de sementes, enquanto a propagação convencional, assexuada, pode ser feita através de enxertia ou estaquia. Além disso, existe a micropropagação, um método de propagação assexuada que utiliza técnicas de cultura de tecidos para produzir plantas geneticamente idênticas.

As mudas de mirtilo são produzidas comercialmente por meio de estaquia herbácea e semilenhosa, em uma casa de vegetação com nebulização intermitente e controle constante de umidade e temperatura. É importante ressaltar que as estacas utilizadas para a propagação devem ser retiradas de plantas saudáveis e vigorosas e com, no mínimo, um ano de idade. As estacas devem ser mantidas em substrato adequado e devem ser submetidas a tratamento para estimular o enraizamento, como o uso de hormônios de enraizamento e ácido indolbutírico (AIB) (Souza et al., 2011).

Porém, a propagação do mirtilo por meio de estacas pode apresentar resultados variáveis e insuficientes, especialmente dependendo do cultivar que está sendo propagada, conforme apontado por Fachinello (2008).

A propagação por meio de estacas herbáceas é recomendada para ambas as variedades de mirtilo, "Rabbiteye" e "Southern Highbush" (Krewer e Cline, 2015). O processo de produção de mudas por estaca permite a clonagem de plantas com características desejáveis e a obtenção de mudas uniformes em tamanho e qualidade. Um aspecto crítico para o êxito da propagação é a condição nutricional da planta progenitora já que plantas com escassez mineral geram material vegetal de baixa qualidade.

A propagação comercial do mirtilo é predominantemente realizada por meio de estacas, conforme indicado por Mainland (1966), Scott et al. (1978), Shoemaker (1978) e Antunes et al. (2006). No entanto, é importante ressaltar que os resultados desta técnica podem variar consideravelmente de acordo com a espécie e cultivar, como mencionado pelo INIA (1988). Estudos realizados no Brasil por Nachtigall et al. (1998), Faria et al. (1998) e Arruda et al. (1998) com o uso de estacas semilenhosas de mirtilo, relatam taxas de enraizamento de até 73% no cultivar Delite, 62,4% na Powderblue e 60,40% na Bluegem, respectivamente. De maneira geral, na propagação por estacas, é comum obter taxas de enraizamento em torno de 50%, como mencionado por França (1991).

O mirtilo “Highbush” é comumente propagado por meio do enraizamento de estacas preparadas com comprimento de 15 a 20 cm e que podem ser armazenadas em câmara fria e posteriormente preparadas e colocadas em canteiros com leito aquecido. A temperatura ideal do substrato para o enraizamento é de 18 a 21°C (Antunes et al., 2006). Conforme pesquisas feitas por Antunes et al. (2004), as mudas provenientes do enraizamento de estacas podem ser colocadas à venda apenas após 12 meses desde a obtenção das estacas.

De acordo com a EMBRAPA (1991), as dificuldades técnicas de propagação do mirtilo são um dos fatores que restringem a viabilidade dessa cultura, uma vez que essa limitação tem afetado negativamente a oferta de mudas, prejudicando sua expansão.

### **2.6.1 Cultura de tecidos em mirtilo: propagação *in vitro***

Para suprir as crescentes demandas de mercados em expansão, é importante o uso de mudas de alta qualidade, a fim de assegurar a produtividade e a longevidade dos pomares. Uma alternativa viável é a utilização de mudas micropropagadas na criação de novos pomares (Grattapaglia & Machado, 1988). Essas mudas são produzidas em condições controladas de laboratório, o que permite obter plantas geneticamente uniformes e livres de doenças, proporcionando um bom ponto de partida para o estabelecimento de pomares produtivos e saudáveis.

A micropropagação é um modelo de propagação de plantas de forma massal em que um genótipo foi selecionado e clonado por meio da cultura de tecidos vegetais *in vitro* (Hartmann et al., 1997). A micropropagação de mirtilheiros também

pode ser realizada por meio de cultura de ápices meristemáticos caulinares. Esses ápices são coletados de plantas matrizes certificadas e, dessa forma, é possível obter mudas com excelente sanidade e alta homogeneidade (Viveiros Sunnyridge, 2023).

O processo de micropropagação é dividido em quatro estágios principais, conforme descrito por Hartmann et al. (1997). Esses estágios são:

Estágio I: Estabelecimento do explante no meio de cultura - Nesta etapa, o explante, porção de planta utilizada como material inicial, é colocado em um meio de cultura adequado para promover sua sobrevivência e crescimento inicial.

Estágio II: Multiplicação ou indução de brotos múltiplos - Durante esse estágio, ocorre a proliferação dos brotos a partir do explante inicial. São utilizadas técnicas de multiplicação, como a divisão de meristemas ou o uso de reguladores de crescimento, para induzir o desenvolvimento de múltiplos brotos.

Estágio III: Formação de raízes - Nessa fase, os brotos obtidos no estágio II são submetidos a condições favoráveis para o desenvolvimento de raízes. Geralmente, são utilizados reguladores de crescimento específicos para promover a formação e o crescimento das raízes.

Estágio IV: Aclimatização - O estágio final envolve a transferência gradual das plantas obtidas nos estágios anteriores para o ambiente externo, fora do ambiente de cultivo *in vitro*. Nessa fase, as plantas se adaptam progressivamente às condições ambientais, adquirindo características necessárias para o crescimento e desenvolvimento no novo ambiente. Esses estágios são essenciais para o sucesso da micropropagação, permitindo a produção rápida e eficiente de um grande número de plantas geneticamente idênticas.

Conforme descrito por Davey e Anthony (2010), a micropropagação se apoia na totipotência das células, ou seja, na habilidade de uma célula gerar duas células, que posteriormente originam um tecido e, por conseguinte, regeneram uma planta completa. As técnicas de cultivo *in vitro* garantem a reprodução clonal dos genótipos, mantendo a estabilidade genética, e são particularmente benéficas para plantas de importância econômica.

No cultivo de mirtilo no Brasil, um dos principais desafios enfrentados é a produção de mudas, que é limitada devido à dificuldade de propagação da maioria das cultivares (Wagner Júnior et al., 2004). A propagação eficiente e consistente de variedades específicas de mirtilo pode ser um obstáculo para a expansão do cultivo,

o que ressalta a importância de pesquisas e técnicas aprimoradas para superar essas dificuldades e fornecer mudas de qualidade aos produtores. Ademais, a micropropagação tem sido uma técnica satisfatória utilizada para disponibilizar mudas de mirtilo no mercado (Miller et al., 2006; Albert et al., 2009).

Na mirtilo é comum observar variações nos resultados entre diferentes cultivares, grupos e locais onde os experimentos são realizados. No entanto, diversos estudos de campo têm evidenciado que as mudas de mirtilo propagadas *in vitro* apresentam um maior número de brotações quando comparadas com mudas propagadas pela técnica de estaquia (Read et al., 1989; Jamieson & Nickerson, 2003; Litwinczuk et al., 2005). Esses achados indicam que a micropropagação é uma técnica eficiente na produção de mudas de mirtilo, pois permite uma taxa de multiplicação e brotação mais elevada. Isso pode ser vantajoso para os produtores que buscam aumentar a produtividade e a qualidade das mudas de mirtilo.

A capacidade de emitir um maior número de brotações a partir da base da planta possibilita a renovação das hastes produtivas devido ao seu hábito basitônico. Esse tipo de crescimento resulta no surgimento das brotações na região do colo da planta. Essa característica se torna evidente nas plantas propagadas *in vitro*, onde são observadas diferenças notáveis no padrão de crescimento, com um aumento no número de hastes principais e na taxa de crescimento (Smagula, 2006).

Durante o estágio juvenil, a muda apresenta um crescimento vegetativo mais expressivo, resultando em uma maior área foliar e na produção de uma quantidade significativa de fotoassimilados. Esses recursos são posteriormente direcionados para o desenvolvimento dos frutos e do sistema radicular (Greenwood & Hutchison, 1993). E, em um estudo conduzido por Morrison et al. (2000) em campo, foi concluído que um período de um ano é o suficiente para observar um maior vigor nas plantas micropropagadas em comparação com aquelas provenientes de estaquia. Isso sugere que a micropropagação pode ser uma técnica promissora para a produção de mudas de mirtilo com características superiores em termos de vigor e desenvolvimento inicial.

## **2.7 Efeito dos espectros de luz de LED nas plantas**

A luz desempenha um papel importante como sinalizador na regulação da expressão de genes e na fotomorfogênese das plantas (Klem et al., 2019). Além disso, a intensidade, qualidade e duração da radiação luminosa são fatores que

podem influenciar as características morfológicas e fisiológicas (Fu et al., 2012). Como é uma fonte de energia para a fotossíntese, desencadeia um sinal par que ocorra a fotomorfogênese das plantas e respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares. No entanto, a luz solar difere bastante entre as condições de inverno e verão, com o excesso de luz em cultivos de campo aberto impondo estresse severo às plantas, especialmente durante os meses de verão, enquanto fontes de luz suplementares são utilizadas na produção de cultivos em estufa para complementar a luz natural quando ela é insuficiente.

Os LEDs, “Light Emitting Diode” (Diodo Emissor de Luz), são uma nova opção de fonte de luz para a pesquisa e produção de plantas em ambientes controlados (Li et al., 2013). Eles oferecem diversas vantagens, como longa vida útil, tamanho compacto, baixa dissipação de energia e a capacidade de ajustar a intensidade luminosa (Taulavuori et al., 2018). Através da seleção e combinação de diferentes comprimentos de onda, é possível personalizar o espectro de luz para atender às necessidades específicas das plantas em diferentes estágios de crescimento. Além disso, os LEDs permitem a manipulação da qualidade da luz, o que tem sido objeto de desenvolvimento contínuo.

Na atualidade, a indústria usufrui dos benefícios de luzes de LED que podem ser programadas de forma simples para emitir um espectro e intensidade de luz desejados. Além disso, a principal vantagem reside no fato de que os LEDs possuem a maior eficiência energética quando comparados a outras lâmpadas e a vida útil dos LEDs é estimada em aproximadamente 100.000 horas, e esse valor continua em ascensão (Viršile et al., 2017). Essa tecnologia é considerada uma ferramenta ótima para pesquisas em iluminação no campo da ciência das plantas devido às suas vantagens técnicas em relação às fontes de luz tradicionais. Os LEDs têm a capacidade de produzir comprimentos de onda de luz mais compatíveis com os fotoreceptores das plantas, permitindo influenciar de maneira mais eficaz a fisiologia, a morfologia e o desenvolvimento (Meiramkulova et al., 2021).

No estudo sobre como a eficiência do processo fotossintético é afetada pela influência da luz em mudas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), constatou-se que as plantas que foram expostas à iluminação nas faixas azul e vermelha apresentaram um crescimento mais acelerado e atingiram maiores comprimentos em comparação a outros grupos (Araújo et al., 2022). Em outra pesquisa, plantas de *Alternanthera brasiliana*, notáveis por suas propriedades na medicina popular,

incluindo ação anti-inflamatória, analgésica e antiviral, demonstraram ser capazes de prosperar em ambientes com iluminação inteiramente artificial. A combinação de LEDs azuis e vermelhos, que oferece uma diversidade mais ampla de características espectrais, resultou em respostas fisiológicas e crescimento que levaram a uma produção significativamente maior de biomassa (Marani et al., 2022).

Em resumo, os LEDs proporcionam vantagens significativas na agricultura, incluindo longa vida útil, tamanho compacto, baixa dissipação de energia e a capacidade de ajustar tanto a intensidade quanto a qualidade da luz. Essas características tornam os LEDs uma opção cada vez mais popular e eficiente para o cultivo de plantas.

### **2.7.1 Uso de LED no cultivo *in vitro***

No processo de propagação *in vitro*, a luz é um dos fatores mais importantes no desenvolvimento dos explantes. O uso de diodos emissores de luz (LEDs) oferece vantagens superiores em relação ao sistema de iluminação fluorescente (Morrow, 2008). A possibilidade de utilizar diferentes espectros de luz no processo *in vitro* é uma das vantagens que pode ter efeito direto no desenvolvimento dos explantes. Os diferentes espectros de luz emitidos por LEDs podem ter efeito no desenvolvimento dos explantes com alterações significativas nos arranjos dos tilacóides nos cloroplastos, redução no tamanho dos explantes, na emissão e comprimento de raízes, número de estômatos nas folhas e teor de clorofila (Maluta et al 2013; Macedo et al, 2011; Vieira et al., 2015).

Fitocromos e criptocromos são fotorreceptores presentes nas plantas que desempenham regulam o crescimento e desenvolvimento em resposta à luz. Esses fotorreceptores são importantes para que as plantas possam perceber e responder adequadamente ao ambiente de luz, otimizando seu crescimento, desenvolvimento e adaptação às condições ambientais. Os fitocromos são pigmentos que absorvem luz vermelha (660 nm) e vermelho distante (730 nm). Eles são responsáveis por mediar respostas como a germinação de sementes, o alongamento do caule, a abertura dos estômatos e o florescimento das plantas. Os fitocromos existem em duas formas interconvertíveis: a forma ativa (Pfr) quando exposta à luz vermelha e a forma inativa (Pr) na ausência de luz vermelha. A interconversão entre essas formas permite que os fitocromos detectem a quantidade, a duração e a qualidade da luz, desencadeando respostas específicas (Taiz & Zeiger, 2013).

Os criptocromos, por sua vez, são fotorreceptores que absorvem principalmente luz azul (entre 350 nm e 450 nm). Eles estão envolvidos em uma variedade de processos, como a regulação do ritmo circadiano das plantas, a orientação do crescimento do caule em direção à luz, produção de antocianina e a supressão do alongamento do hipocótilo na presença de luz azul. Os criptocromos também desempenham um papel na percepção da luz azul (luz azul ultravioleta) e na proteção das plantas contra danos causados pela radiação UV (Taiz & Zeiger, 2013).

Maluta et al. (2013), Martinez et al. (2016) e Hung et al. (2016) conduziram estudos utilizando LEDs na propagação *in vitro* de diferentes culturas, incluindo cana-de-açúcar, antúrio e mirtilo. O objetivo dessas pesquisas foi incrementar a produção e melhorar a qualidade das mudas. Os resultados indicaram que o uso de LEDs como fonte de iluminação promoveu um aumento significativo no crescimento e desenvolvimento das plantas, resultando em mudas mais vigorosas e saudáveis. Essas descobertas evidenciam o potencial dos LEDs como uma tecnologia eficiente para otimizar o processo de propagação *in vitro* e obter melhores resultados na produção de mudas. As características da luz, como o espectro de comprimento de onda, a intensidade luminosa e a duração do período de luz, desempenham um papel significativo na influência da morfogênese de plantas cultivadas em condições *in vitro*. (Lian et al., 2002; Singh et al., 2015; Souza et al., 2018).

A intensidade da luz afeta o crescimento e desenvolvimento do mirtilheiro, embora a influência específica da qualidade da luz ainda não tenha sido completamente compreendida (Cruz et al., 2021). As lâmpadas fluorescentes, lâmpadas de sódio de alta pressão e lâmpadas de haletos metálicos são amplamente utilizadas como fontes de luz artificial no cultivo de mirtilheiro e outras plantas. No entanto, essas opções de iluminação podem apresentar limitações em termos de qualidade de luz e comprimentos de onda inadequados para promover um crescimento e desenvolvimento ideais das plantas (Isutsa et al. 1994; Cao & Hammerschlag, 2000; Gupta & Jatothu, 2013).

Uma pesquisa envolvendo cultura de tecidos, análise de compostos químicos e avaliação das propriedades antioxidantes de *Passiflora setacea* DC cv “BRS Pérola do Cerrado revelou que a formação de calos, crescimento de biomassa e a atividade de enzimas antioxidantes foram impactados de maneira positiva pela iluminação com LED na faixa do espectro vermelho. Além disso, a produção de

substâncias com relevância biotecnológica foi notadamente influenciada pela utilização de LEDs na faixa do espectro azul (Tierno, 2022).

Outro estudo investigou os efeitos de diferentes comprimentos de onda do espectro visível de luz (escuro, branca, azul, vermelha, azul e vermelha) na produção de metabólitos secundários de indução e proliferação de calos *in vitro* de *Artemisia annua*. A iluminação com luz branca (fria e fluorescente) e luz vermelha (LEDs) levou a uma maior diversidade de metabólitos produzidos nos calos. De fato, seis metabólitos foram identificados exclusivamente nos calos cultivados sob luz vermelha e quatro delas foram relatadas pela primeira vez na espécie, o que indica uma resposta específica dos calos a essa condição (Iiyama, 2023).

Pesquisadores têm demonstrado interesse crescente nos LEDs, conduzindo estudos sobre a viabilidade da utilização de diodos emissores de luz de amplo espectro (LEDs) na micropropagação e apresentaram respostas favoráveis em plantas ornamentais, *Pyrus* spp e *Musa* spp. (Miler, 2019; Lotfi, 2019; Bhaya & Al-Razzaqsalim, 2019). De acordo com estudos conduzidos por Cruz et al. (2021), há a necessidade mais estudos que quantifique os pigmentos fotossintéticos e verifique as possíveis modificações que podem ocorrer na morfologia das plantas.

## **2.8 Aclimatização de plântulas lenhosas**

De acordo com Grattapaglia e Machado (1999), a aclimatização de plântulas é uma etapa de transferência do material cultivado *in vitro* para uma estufa ou casa de vegetação. É um procedimento de transição que visa reduzir o estresse decorrente das disparidades entre os ambientes *in vitro* e *ex vitro*. Essa etapa é caracterizada pela ocorrência de perdas substanciais de explantes (Dutra et al., 2009). Essa fase desempenha um papel primordial na produção de mudas, uma vez que tem como objetivo fortalecê-las e capacitá-las para sobreviver e prosperar em condições ambientais mais exigentes.

Ao longo do processo de aclimatização as plântulas lenhosas são normalmente cultivadas em ambientes protegidos ou em estufas em que são submetidas a condições de iluminação controladas. Assim, as plântulas são gradualmente expostas à luz solar, possibilitando que elas se ajustem à intensidade luminosa e evitem possíveis danos causados por excesso de radiação. Também é necessário regular a umidade. No início, as plântulas são mantidas em um ambiente com maior umidade, a fim de evitar uma transpiração excessiva e a perda de água.

À medida que as elas se adaptam, a umidade é progressivamente diminuída, estimulando assim o crescimento de raízes saudáveis e a capacidade de resistir à escassez de água. Outro fator relevante é a adequada ventilação no local para garantir o fortalecimento dos caules e na prevenção de problemas como o acúmulo excessivo de umidade e o surgimento de doenças. E por último, as plântulas são progressivamente expostas a flutuações de temperatura mais próximas das condições reais do ambiente. O conjunto desses fatores contribuem para o fortalecimento e facilita a adaptação das mudas em diversas condições climáticas.

O custo das mudas micropropagadas está relacionado com o tempo em que o explante permanece *in vitro* e o tempo que essas mudas levam para ficar prontas para os consumidores em casa de vegetação. A aplicação desse método é de grande importância devido à excelente sanidade fitossanitária e à consistência das mudas produzidas. Contudo, é fundamental ressaltar que o investimento final necessário para adquirir essas mudas é mais elevado (Schuch & Erig, 2005).

Porém, durante a fase de micropropagação, as mudas podem não estar completamente formadas e, portanto, são mais suscetíveis a perdas elevadas na fase de aclimatização. A retirada antecipada das mudas, sem passar pelo estágio de enraizamento, pode não ser justificada, pois a falta de raízes viáveis, a falta de cera epicuticular nas folhas e o tamanho reduzido dos explantes podem dificultar o sucesso na fase de aclimatização de plantas lenhosas (Noé & Bonini, 1996).

A constatação de que as plantas cultivadas em ambiente *in vitro* frequentemente exibem elevada umidade relativa, reduzida intensidade luminosa e limitadas trocas gasosas, resultando em diminuição das taxas de transpiração e fotossíntese, encontra respaldo nas descobertas de Shin et al. (2013). Além disso, são verificadas alterações na superfície externa das plantas, como nos depósitos de substâncias cerosas e nas células do mesofilo e estômatos das folhas, o que as torna mais suscetíveis à rápida evaporação de água por meio da transpiração (Costa et al., 2009). O perecimento das plantas ocorre devido à restrição funcional do sistema radicular das plantas cultivadas *in vitro*, que apresenta singular pelos radiculares com função de absorção da água do solo e de íons (Dutra; Wendling, 2010). Adicionalmente, a interrupção da interação entre as raízes e o solo intensifica a evaporação de água nas plantas recentemente transplantadas (Taiz & Zeiger, 2013).

Na cultura do mirtilo, estudos envolvendo técnicas de propagação *in vitro* e *ex vitro* associada a aclimatização foram realizadas testando diferentes substratos, coberturas em casa de vegetação e formas de irrigação. O mirtilheiro é uma espécie frutífera que enfrenta desafios no processo de enraizamento, especialmente em certas variedades, e exige a implementação de novas tecnologias para produzir mudas de alta qualidade que possam ser prontamente plantadas e comercializadas em um período mais curto. Entre os métodos disponíveis para a propagação do mirtilo, a estaquia é amplamente empregada, embora enfrente desafios, principalmente no que diz respeito à produção de estacas e à dificuldade de enraizamento de determinadas variedades (Hoffmann, 1995). De acordo com Miller et al. (2006a), o enraizamento das variedades de mirtilo dos grupos “Highbush” e “Rabbiteye” é variável, com taxas de enraizamento que podem variar de 30% a 80% em diferentes anos. Segundo as informações fornecidas por Schuch et al. (2007), tem sido possível aprimorar o processo de enraizamento de estacas por meio do avanço das técnicas de microestaquia. Essa abordagem tem se mostrado eficaz na produção de mudas de mirtilheiro, especialmente ao utilizar plantas-matrizes propagadas em ambiente controlado.

A transição gradual para essas novas condições é essencial, a fim de minimizar o estresse nas plântulas, evitando assim lesões graves ou até mesmo a morte das mesmas (Silva et al., 1995). Estabelecer um processo adequado de adaptação para as plântulas produzidas no laboratório é um aspecto de extrema importância para o bom resultado da técnica de micropropagação. Esse período é obrigatório para a sobrevivência das plantas, pois durante esse período, conforme mencionado por Zimmerman (1988), ocorre a transição da planta de uma condição mixotrófica, feita em laboratório, para se adaptar a uma condição autotrófica, feita em casa de vegetação.

A fase de transição da muda propagada *in vitro* entre o laboratório e a casa de vegetação deve ser a mais eficiente possível para reduzir o custo final da muda. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito na fotomorfogênese *in vitro*, sem o uso de reguladores de crescimento, de microestacas de mirtillo sob diferentes espectros de luz de LEDs e a performance na aclimatização.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal

Foram utilizadas como fonte de explantes iniciais, microestacas de mirtilo contendo dois nós ou gemas de aproximadamente 1,5 cm, provenientes de brotos cultivados *in vitro* da cultivar *Vaccinium corymbosum* cv. Jewel, subcultivadas por três vezes, a cada seis semanas em meio de cultivo completo de WPM WPM (Wood Plant Media) – Lloyd & Mccown, 1980, (Calsson Lab, Inc) acrescido de 0,3 mg L<sup>-1</sup> de zeatina no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Ornamentais (LCTPO), situado em Piracicaba – SP. Esse material vegetal faz parte da coleção do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo.

A aplicação da zeatina somente durante a etapa inicial do estabelecimento *in vitro* dos explantes promoveu a divisão celular e a formação de brotos laterais nas microestacas, permitindo a condução do experimento com diferentes espectros de luz, sem a necessidade de utilizar reguladores de crescimento vegetal (PGR).

As brotações foram excisadas em microestacas como mostra a Figura 1, e transferidas para tubos de ensaio tipo PIREX (15,0 cm por 2,5 cm) com tampa Kimble (2,5 cm) contendo em cada tubo, 7,0 ml do meio de cultivo completo de WPM, sem regulador de crescimento, acrescido de 3% de sacarose (w/v), semi-solidificado com 2% (w/v) Phytigel (Sigma), autoclavado a 121°C por 20 minutos a 105 kPa logo depois de ajustar o pH para 4,7.

#### 3.2 Enraizamento *in vitro* de microestacas de mirtilo

Na instalação do ensaio conforme a Figura 2, os tubos contendo as microestacas de mirtilo foram incubadas em sala de crescimento por seis semanas a 25°C, com um fotoperíodo de 16 horas e distribuídas em quatro tratamentos de luz de LEDs ajustável (Philips GreenPower LED Research module) sendo as seguintes combinações: 100% vermelho = R, 70% vermelho/30% azul: R2B, 100% azul: B e o controle (CW) de LED branca (4000K) com o Photosyntetic densidade de fluxo de photons (PDF) ajustado, para todos os tratamentos, em 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Em cada tratamento, os frascos foram centralizados e dispostos de forma equidistante para receber uniformemente o espectro avaliado (LI-250A, LI-COR, USA).

Em cada tratamento, os tubos de ensaio foram centralizados e dispostos nas prateleiras de forma equidistante para receber uniformemente o espectro que foi avaliado pelo equipamento (LI-250<sup>a</sup> Light Meter, LI-COR, USA). Cada unidade experimental consistiu de dez tubos de ensaio para reduzir o risco de contaminação contendo um explante por tubo e três repetições por tratamento.

Depois de 45 dias, as microestadas sob o tratamento de luz de LED foram lavadas cuidadosamente em água corrente para retirada do Phytigel e do meio de cultura e avaliadas a altura (cm), número de folhas (un.), entrenós (un.), área foliar (cm<sup>2</sup>), comprimento de raiz (cm), massa fresca (g) das plântulas inteiras (folhas, caule e raízes) e os teores de clorofilas *a*, *b* e total. Para a análise da área foliar foi utilizado o método não-destrutivo permitindo a continuidade das avaliações na mesma planta. Foram realizadas medidas na terceira folha (comprimento e largura) a partir do ápice da planta através do paquímetro (Schmildt, E. R.; Amaral Jat. S, O.; Santos Js., 2014).

Pela forma elíptica da folha, foi descontado 37,5% da área do retângulo com equação:

$$AF = 0,625 (C \times L)$$

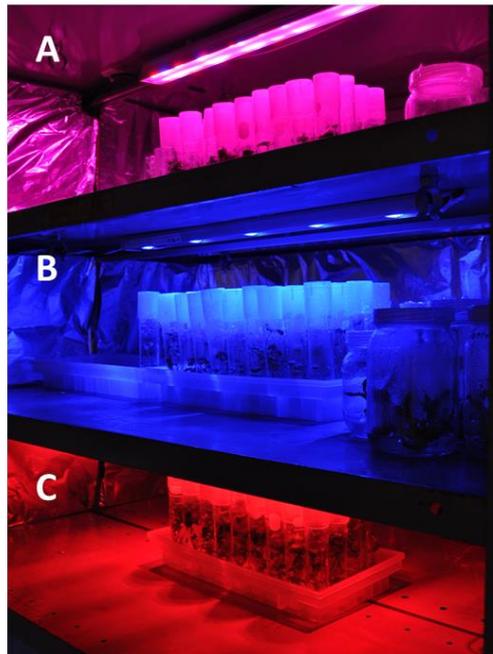
AF = Área Foliar

C = Comprimento Foliar

L = Largura Foliar



**Fig.1.** Introdução *in vitro* de microestaca de mirtilo “Highbush” cv. Jewel com aproximadamente 1,5cm em tubo de ensaio tipo PIREX (15,0 cm por 2,5 cm) com tampa Kimble (2,5 cm) contendo em cada tubo, 7,0 ml do meio de cultivo completo de WPM, sem regulador de crescimento.



**Fig.2.** Sala de crescimento do LCTPO. Tubos de ensaios com explantes de mirtilo cv. Jewel distribuídos em prateleiras com os espectros de luz formados por sistemas de iluminação de LED nas cores: A. 70% vermelho + 30% (70R30B), B. 100% azul (100B) e C. 100% vermelho (100R), de cima para baixo.

### 3.3 Quantificação de clorofila *a*, *b* e total

Amostras de 100 mg de tecido fresco foram submetidas ao processo de extração de acordo com os métodos de Whitham et al. (1971) e preparadas usando um solvente orgânico de acetona a 80%. Para as amostras foram colhidas folhas que brotaram das microestacas enraizadas *in vitro* sob os espectros de luz no período de 45 dias de tratamento. Os experimentos foram feitos em triplicata – repetições analíticas – e as leituras foram feitas diretamente nos extratos obtido das folhas, com comprimentos de onda 645, 652 e 663 nm. A absorbância foi medida usando um espectrofotômetro UV Mini-1240 (Shimadzu Inc.; Kyoto, Japão) e os resultados foram expressos em mg de clorofila por grama de material fresco e os valores obtidos através de equações:

$$\text{Clorofila } a = ((12,7 \times A_{663}) - (2,69 \times A_{645})) \times V / (1000 \times W)$$

$$\text{Clorofila } b = ((22,9 \times A_{645}) - (4,68 \times A_{663})) \times V / (1000 \times W)$$

$$\text{Clorofila total} = A_{652} \times 1000 \times (V/1000 \times W) / 34,5$$

Onde A663: absorbância a 663 nm; A645: absorbância a 645 nm; A652: absorbância a 652 nm; V: volume final de extrato etanólico de clorofila (mL); W: massa de matéria da planta (g).

### 3.4 Processo de aclimatização

Ao final da coleta de dados do experimento de enraizamento *in vitro* e de clorofila *a*, *b* e total, as plântulas foram lavadas com água corrente e em seguida plantadas em bandejas de 200 células contendo dois tipos de substrato BASE® Floresta (casca de pinus, fibra de coco, turfa fibrosa, vermiculita, adubação inicial com NPK e micros nutrientes, granulometria adequada para uso em florestais – U=50%, CRA= 150%, EC= 1,5 +/-0,3, pH= 5,8 +/- 0,5) e BASE® Holambra Ornamentais (casca de pinus, turfa fibrosa, vermiculita, carvão, adubação NPK e micro nutrientes – U=50%, CRA= 150%, EC= 2,0 +/- 0,3, pH= 5,8 +/- 0,5).

As bandejas foram dispostas ao acaso em bancadas de 90 cm de altura e mantidas em casa de vegetação coberta com uma película de polietileno de difusão (150µm) e Aluminet® (Polisack) 50%, submetidas à nebulização tipo fog

proporcionando umidade relativa de 90% controlado pelo sensor de umidade. As bandejas, Figura 3, continham 40 mudas em 4 repetição de cada tratamento formando fileiras duplas ao acaso, separados por duas fileiras de células contendo apenas o substrato como bordadura. O ensaio foi conduzido seguindo delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial 4 (mudas enraizadas em espectros de luz de LED) por 2 (tipos de substrato), totalizando 8 tratamentos.

Depois de 45 dias de aclimatização, as mudas foram retiradas cuidadosamente do substrato para serem avaliadas a altura (cm), brotação (un.), número de folhas (un.), área foliar (cm<sup>2</sup>), massa fresca parte aérea (g), massa seca parte aérea (g), comprimento de raiz (cm), massa fresca da raiz (g) e massa seca da raiz (g).

Após atingir massa constante em um forno de laboratório Sanyo MOV112S (Japão) a 65 °C, massa seca das folhas e a massa seca das raízes foram estimados.



**Fig. 3.** Aclimatização dos mirtilos com substrato BASE® Holambra Ornamentais e o BASE® Floresta.

### **3.5 Análise estatística**

A partir dos dados obtidos no experimento foram corroboradas as pressuposições do modelo e realizadas à análise da variância (ANOVA), utilizando o Software R (R CORE TEAM, 2019). Aqueles dados onde foram observados efeitos de tratamentos foram feitos testes de comparações pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Enraizamento *in vitro* de microestacas de mirtilo

As plântulas submetidas aos quatro diferentes espectros de luz por 45 dias foram analisadas em condição *ex vitro* de acordo com os dados mostrados na Tabela 1. Conforme os resultados obtidos, constatou-se que os tratamentos 100R e 70R30B foram os que proporcionaram o maior crescimento em altura das plântulas. Os tratamentos WC e 100B apresentaram menor altura em relação aos demais. observou-se que a luz 100B e o tratamento WC resultaram em pouco desenvolvimento das plântulas. Da mesma forma, os tratamentos mencionados também influenciaram positivamente o número de folhas das plântulas, seguindo a mesma ordem descrita anteriormente (100R>70R30B>100B>WC). Na Figura 4 observa-se o desenvolvimento da microestaca tanto da parte aérea quanto do sistema radicular.



**Fig.4.** Enraizamento *in vitro* de mirtilo “Highbush” cv. Jewel com meio de cultivo completo de WPM acrescido de 3% de sacarose (w/v), semi-solidificado com 2% (w/v) Phytigel (Sigma) e sem o uso de regulador de crescimento vegetal

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos de luz na avaliação da variável entrenó. Os tratamentos 100R e 70R30B se destacaram ao promover um maior desenvolvimento da área foliar, seguidos pelos tratamentos 100B e WC. Observou-se um padrão semelhante no comprimento das raízes em que os tratamentos 100R e 70R30B promoveram um maior

comprimento de raiz nas plântulas. Para o número de folhas, os tratamentos responderam de forma semelhante à verificada para a variável altura de planta.

Quanto à massa fresca, a luz 70R30BR foi a mais efetiva em promover mais massa nas plântulas, seguida pelo tratamento 100R, 100B e WC, respectivamente. Observou-se que o tratamento com luz 100R resultou em um maior aumento na massa fresca das plântulas, indicando sua eficácia em estimular o crescimento e desenvolvimento vegetal. O tratamento 70R30B também mostrou um efeito positivo, embora em menor grau em comparação com o 100R. Os tratamentos 100B e WC apresentaram níveis inferiores de aumento na massa fresca, sugerindo uma menor efetividade em relação aos tratamentos mencionados anteriormente.

Esses resultados do crescimento em altura das plântulas, do número de folhas, da área foliar e da massa fresca indicam que os tratamentos que promoveram um maior desenvolvimento nessas variáveis também influenciaram positivamente o crescimento das raízes. Em suma, as variáveis altura (cm), número de folhas (un.), área foliar (cm<sup>2</sup>) e comprimento de raiz (cm) e massa fresca (g) demonstraram ser estatisticamente iguais nos tratamentos de luz de LED na cor 100R e 70R30B. Durante a fase de enraizamento, não foi observada a formação de brotações independentemente dos diferentes espectros de luz utilizados.

#### **4.2 Quantificação de clorofila *a*, *b* e total**

A análise dos dados da Tabela 2 indica que, em relação ao conteúdo de clorofila *a* após 45 dias das plântulas mantidas *in vitro* sob os LEDs, não houve diferença significativa entre os quatro tratamentos de luz de LED. Os resultados indicaram que, independentemente dos tratamentos com a luz de LED utilizados (100R, 70R30B, 100B e WC), não houve um impacto significativo no aumento do pigmento de clorofila *a* nas plântulas.

O tratamento controle (WC) e a luz mista (70R30B) mostraram melhores teores de clorofila *b* em comparação aos tratamentos 100B e 100R. Isso significa que o tratamento controle, que provavelmente seguiu condições padrão ou sem intervenções especiais, e o tratamento com luz mista (combinação de luzes vermelha e azul) apresentaram níveis mais altos de clorofila *b* nas plântulas. Por outro lado, os tratamentos com luz vermelha (100R) e luz azul (100B) tiveram teores

de clorofila *b* inferiores. Esses resultados sugerem que diferentes espectros de luz podem ter efeitos variados na produção e acúmulo de clorofila *b* nas plantas.

O teor de clorofila total foi maior no tratamento WC, seguido pelo tratamento 70R30B, 100B e 100R. Com isso, o tratamento controle (WC) resultou em um teor mais elevado de clorofila total nas plântulas, indicando uma maior quantidade de clorofila *a* e clorofila *b* em comparação aos demais tratamentos. O tratamento 70R30B também apresentou um teor significativamente alto de clorofila total, seguido pelos tratamentos 100B e 100R, que tiveram teores inferiores.

Esses resultados sugerem que o tratamento controle e a luz mista (70R30B) foram mais eficazes em promover a síntese e a concentração de clorofila nas plântulas, enquanto os tratamentos com luz vermelha (100R) e luz azul (100B) apresentaram níveis mais baixos de clorofila total.

**Tabela 1** – Média e desvio padrão da altura (cm), número de folhas (un.), entrenós (un.), área foliar (cm<sup>2</sup>), comprimento da raiz (cm) e massa fresca (g) das mudas de mirtilo enraizadas *in vitro* sob 4 espectros de luz de LED após 45 dias de cultivo.

Tratamento	Explantos <i>in vitro</i> de Mirtilo 'Jewel' aos 45 dias de cultivo					
	Altura (cm)	Núm. Folhas (un)	Entrenós (un)	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Comp. raiz (cm)	Massa fresca (g)
WC	2.369b ±0.432	7.967b ±1.454	0.306a ±0.056	0.15b ±0.027	0.417b ±0.076	0.024c ±0.004
70R30B	3.396a ±0.62	11.4a ±2.081	0.297a ±0.054	0.339a ±0.062	1.0467a ±0.191	0.051a ±0.009
100R	3.893a ±0.711	12.433a ±2.27	0.336a ±0.061	0.342a ±0.062	1.292a ±0.236	0.044ab ±0.008
100B	2.074b ±0.379	7.3b ±1.333	0.304a ±0.056	0.159b ±0.029	0.395b ±0.072	0.035bc ±0.006
CV %	37.94	34.35	34.59	62.68	106.06	50.84

Análise de variância (ANOVA). Médias comparadas pelo teste de Tukey (P <0,05).

**Tabela 2** – Média e desvio padrão da quantificação de clorofila de mg por grama de material fresco da clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total de mudas de mirtilo enraizadas *in vitro* sob 4 espectros de luz de LED após 45 dias de cultivo.

Tratamento	Análise das clorofilas		
	Clorofila <i>a</i> (mg.g <sup>-1</sup> )	Clorofila <i>b</i> (mg.g <sup>-1</sup> )	Total (mg.g <sup>-1</sup> )
WC	1.853a ±0.927	36.977a ±18.488	38.83a ±19.415
70R30B	1.307a ±0.653	31.072ab ±15.536	32.379ab ±16.189
100R	1.413a ±0.707	27.463b ±13.732	28.877b ±14.438
100B	1.265a ±0.632	30.413ab ±15.206	31.678ab ±15.839
CV %	42.89	11.19	11.66

Análise de variância (ANOVA). Médias comparadas pelo teste de Tukey (P <0,05).

### 4.3 Processo de aclimatização

As plântulas submetidas aos quatro diferentes espectros de luz foram aclimatizadas por 45 dias e tiveram 100% de taxa de sobrevivência e 100% de enraizamento. Na análise estatística dos dados da Tabela 3, é possível observar que diferentes combinações de tratamentos e substratos resultaram em variações no crescimento das plântulas em termos de altura. No tratamento 100R, utilizando o substrato BASE® Holambra Ornamentais, as plântulas apresentaram o maior crescimento, atingindo uma média de 4 cm de altura. Em seguida, no tratamento 70R30B, com o substrato BASE® Floresta, as plântulas alcançaram uma média de 3 cm de altura. Por outro lado, quando o substrato BASE® Floresta foi combinado com o tratamento 100R, as plântulas apresentaram uma média de altura de 2,3 cm. E no caso do substrato BASE® Holambra Ornamentais, a média de altura foi de 1,92 cm quando combinado com o tratamento 70R30B. Pode-se observar na sequência que o tratamento WC, em conjunto com o substrato BASE® Floresta, resultou em uma média de altura de 1,6 cm. O tratamento 100B, combinado com o substrato BASE® Holambra Ornamentais, ocasionou plantas com uma média de 1,5 cm de altura. No tratamento 100B, em conjunto com o substrato BASE® Floresta, as plântulas atingiram uma média de 1,4 cm de altura. Por fim, o tratamento WC, com o substrato BASE® Holambra Ornamentais, apresentou uma média de altura de 1,2 cm. Esses resultados indicam que o tratamento 100R com o o substrato BASE® Holambra Ornamentais e o tratamento 70R30B em conjunto com o substrato BASE® Floresta mostraram-se mais eficazes, resultando em plântulas com a maior média de altura. Em contraste, o tratamento WC com o substrato BASE® Holambra Ornamentais gerou as plântulas com a menor média de altura.

Em relação ao número de brotações, os resultados mostram que a luz mista (70R30B) teve um maior desenvolvimento quando combinada com os substratos BASE® Floresta e BASE® Holambra Ornamentais, com médias de 1,5 e 1,3 unidades, respectivamente. Em seguida, os tratamentos WC e 100R, tanto em conjunto com o substrato BASE® Holambra Ornamentais quanto com o substrato BASE® Floresta, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si, mantendo uma média de brotações de 0,7 (un.). Além disso, observou-se que o tratamento controle (CW) apresentou uma menor brotação, independentemente do substrato utilizado. Isso sugere que a luz azul (100B) teve um efeito inibitório ou

menos estimulante no desenvolvimento de brotações em comparação com os demais tratamentos. Esses resultados indicam que a luz mista promoveu um maior número de brotações em ambos os substratos utilizados. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na variável avaliada sobre o número de folhas entre os grupos ou tratamentos analisados.

Ao examinar os dados da Tabela 4, verificou-se que o tratamento de LED com luz mista (70R30B), quando combinado com o substrato BASE® Floresta e o substrato BASE® Holambra Ornamentais, resultou em uma maior área foliar, com médias de 0,37 cm<sup>2</sup> e 0,28 cm<sup>2</sup>, respectivamente. Esses resultados indicam que a combinação da luz mista (70R30B) com os substratos BASE® Floresta e BASE® Holambra Ornamentais foi mais favorável para o desenvolvimento da área foliar das plântulas. É relevante ressaltar que a área foliar desempenha um papel fundamental na avaliação do desempenho das plantas, uma vez que está diretamente ligada à capacidade de absorção de luz e, conseqüentemente, à maior capacidade fotossintética. Isso, por sua vez, contribui para o crescimento e desenvolvimento saudáveis das plantas.

Os tratamentos que utilizaram 100R em conjunto com o substrato BASE® Holambra Ornamentais e o substrato BASE® Floresta apresentaram médias de 0,23 cm<sup>2</sup> e 0,20 cm<sup>2</sup> de área foliar, respectivamente, e esses valores foram considerados estatisticamente iguais. Os tratamentos restantes, que envolveram a luz WC e 100B independentemente dos substratos testados, apresentaram as médias mais baixas de área foliar. Isso indica que tanto o tratamento WC quanto o tratamento 100B não promoveram um aumento significativo na área foliar das plântulas e sugerem que esses tratamentos podem ter tido um efeito menos estimulante no desenvolvimento da área foliar em comparação com os demais tratamentos mencionados anteriormente.

Não foram encontradas diferenças significativas na interação entre os quatro tratamentos de luz com substrato BASE® Floresta em relação à massa fresca da parte aérea das plântulas. Ao utilizar o substrato BASE® Holambra Ornamentais, observou-se que a luz 100R apresentou um desempenho superior na produção de massa fresca da parte aérea das plantas, seguida pelo tratamento 70R30B, 100B e WC. Isso indica que os espectros de luz vermelha (100R) e mista (70R30B) foram mais eficazes no estímulo do crescimento e desenvolvimento das plântulas, resultando em mais biomassa na parte aérea.

Ao estudar a massa seca da parte aérea das plântulas, foi observado que a combinação do substrato BASE® Floresta com a luz 70R30B resultou em uma maior produção, com uma média de 0,03 g. Por outro lado, os demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas em relação à massa seca da parte aérea das plântulas. A combinação específica do substrato BASE® Floresta com a luz 70R30B foi mais favorável no quesito de massa seca nas plantas. Esse resultado sugere que esse tratamento pode ter promovido um melhor desenvolvimento e crescimento das plantas em termos de matéria orgânica acumulada. É importante considerar que a massa seca da parte aérea é um indicador importante do desempenho das plantas e está relacionada ao acúmulo de nutrientes e à produção de biomassa.

Quando o substrato BASE® Holambra Ornamentais foi utilizado, foi constatada uma diferença significativa entre as plantas submetidas à luz vermelha (100R) com produção média de massa seca da parte aérea de 0,02 (g). Para os demais tratamentos não foram observadas diferenças significativas na massa seca da parte aérea das plantas indicando que esses tratamentos resultaram em valores semelhantes e não apresentaram um impacto significativo na quantidade de biomassa.

**Tabela 3** – Média e desvio padrão da altura (cm), número de brotações (un.) e número de folhas (un.) de mudas de mirtilo enraizadas *in vitro* sob 4 espectros de luz de LED e aclimatizada em dois substratos diferentes.

Aclimatização dos mirtilos após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i>						
Tratamento	Altura (cm)		Brotação (un)		Núm. Folhas (un)	
	Floresta	Holambra	Floresta	Holambra	Floresta	Holambra
<b>WC</b>	1,62 ± 0,33 Aab	1,27 ± 0,22 Ab	0,80 ± 0,20 Aab	0,50 ± 0,17 Aab	8,00 ± 1,03 Aa	3,50 ± 0,78 Ba
<b>70R30B</b>	3,07 ± 0,31 Aa	1,92 ± 0,44 Bb	1,50 ± 0,34 Aa	1,30 ± 0,21 Aa	9,70 ± 1,18 Aa	6,00 ± 1,11 Ba
<b>100R</b>	2,31 ± 0,35 Bab	4,11 ± 0,69 Aa	0,80 ± 0,25 Aab	0,70 ± 0,21 Aab	9,70 ± 2,22 Aa	8,40 ± 1,25 Ba
<b>100B</b>	1,46 ± 0,30 Ab	1,56 ± 0,45 Ab	0,40 ± 0,22 Ab	0,60 ± 0,22 Ab	6,70 ± 1,26 Aa	5,50 ± 1,28 Ba
<b>CV 1 %</b>	31.1%		76.1%		31.4%	
<b>CV 2 %</b>	28.4%		64.4%		32.0%	
<b>CV 3 %</b>	33.1%		82.6%		27.8%	

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal.

**Tabela 4** – Média e desvio padrão da área foliar (cm<sup>2</sup>), massa fresca (g) da parte aérea e massa seca (g) da parte aérea de mudas de mirtilo enraizadas *in vitro* sob 4 espectros de luz de LED e aclimatizada em dois substratos diferentes.

Aclimatização dos mirtilos após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i>						
Tratamento	Área foliar (cm <sup>2</sup> )		Massa fresca parte aérea (g)		Massa seca parte aérea (g)	
	Floresta	Holambra	Floresta	Holambra	Floresta	Holambra
<b>WC</b>	0,18 ± 0,03 Ab	0,14 ± 0,04 Ab	0,08 ± 0,01 Aa	0,02 ± 0,01 Bb	0,01 ± 0,00 Ab	0,00 ± 0,00 Bc
<b>70R30B</b>	0,37 ± 0,08 Aa	0,28 ± 0,05 Aa	0,12 ± 0,01 Aa	0,06 ± 0,02 Bab	0,03 ± 0,00 Aa	0,01 ± 0,00 Bb
<b>100R</b>	0,20 ± 0,04 Aab	0,23 ± 0,05 Aab	0,10 ± 0,03 Aa	0,11 ± 0,02 Aa	0,01 ± 0,00 Bb	0,02 ± 0,00 Aa
<b>100B</b>	0,17 ± 0,05 Ab	0,13 ± 0,05 Ab	0,06 ± 0,02 Aa	0,05 ± 0,02 Ab	0,01 ± 0,00 Ab	0,01 ± 0,00 Aab
<b>CV 1 %</b>	40.5%		18.3%		6.8%	
<b>CV 2 %</b>	38.2%		12.2%		6.1%	
<b>CV 3 %</b>	36.5%		11.4%		6.6%	

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal.

Ao examinar a Tabela 5, pôde-se observar que o parâmetro comprimento de raiz não houve diferença estatisticamente significativa entre os quatro tratamentos de luz quando combinados como substrato BASE® Floresta. No entanto, quando o substrato utilizado foi o BASE® Holambra Ornamentais observou-se diferença estatisticamente significativa nos tratamentos 100R e 70R30B em relação às demais combinações de luz e substrato, resultando em 4,7 cm e 2,23 cm respectivamente.

As medições de massa fresca e massa seca foram realizadas com uma balança de alta precisão ( $\pm 1$  mg). Porém, devido a possíveis limitações do aparelho, a massa seca foi registrada como resposta zero.

No estudo da variável massa seca da raiz, foram identificadas diferenças significativas nos tratamentos 100R para ambos os substratos utilizados. Isso significa que o tratamento 100R resultou em uma produção significativamente maior de massa seca da raiz em comparação com os demais tratamentos. Além disso, no tratamento 70R30B, o substrato BASE® Floresta também apresentou diferença significativa, indicando que essa combinação específica resultou mais massa seca da raiz em comparação com os outros tratamentos.

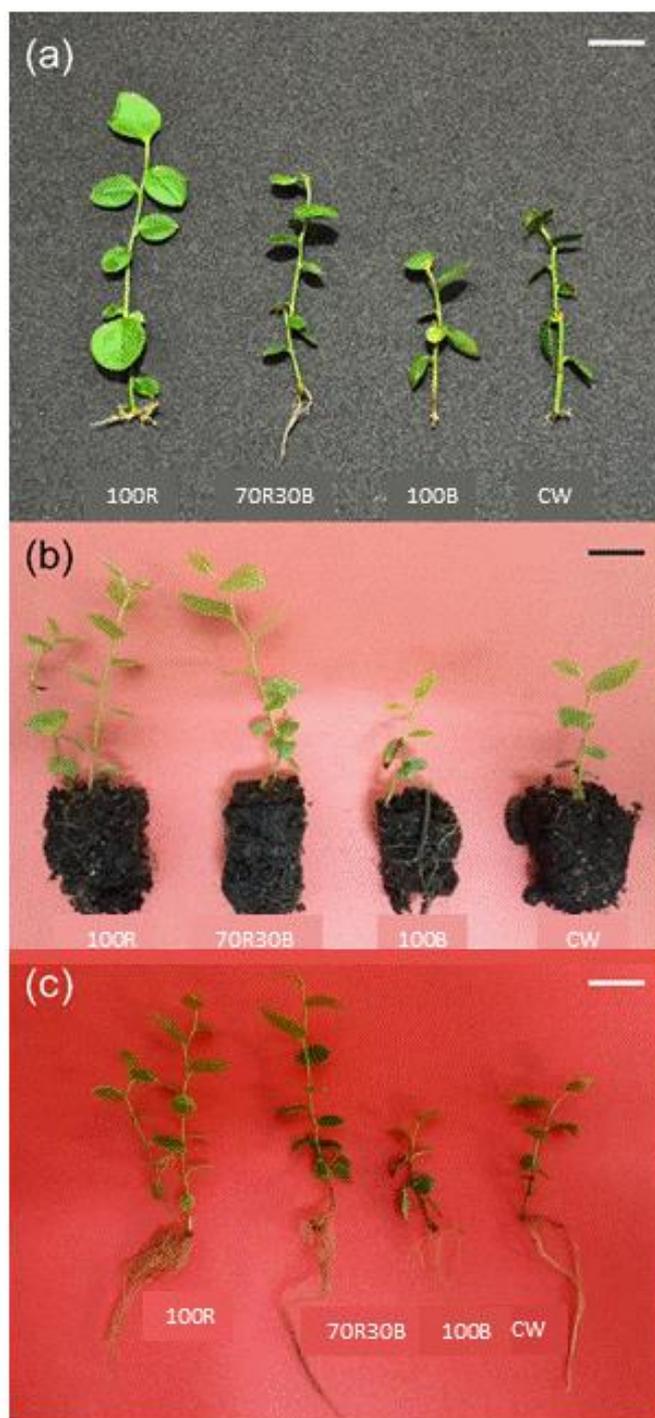
Para a massa fresca da raiz, não foram encontradas diferenças significativas na interação entre os tratamentos de luz e o uso do substrato BASE® Floresta. Isso significa que os diferentes tratamentos de luz não tiveram um impacto estatisticamente discernível na massa fresca da raiz quando combinados com o substrato BASE® Floresta. No entanto, ao utilizar o substrato BASE® Holambra Ornamentais, observou-se que os tratamentos 100R e 100B resultaram em mais massa fresca da raiz em comparação com os tratamentos 70R30B e WC. No geral, os resultados indicam que o substrato BASE® Floresta foi mais eficaz na promoção de massa fresca da raiz e comparação o outro substrato.

Esses resultados evidenciam a influência dos tratamentos específicos e dos diferentes substratos na produção de massa da raiz. Essas diferenças podem ser atribuídas a fatores como a composição do substrato e a interação com a luz fornecida pelos tratamentos de LED. Na Figura 5, é possível observar desenvolvimento das plântulas na parte aérea e principalmente no sistema radicular nas fases *in vitro* e *ex vitro*.

**Tabela 5** – Média e desvio padrão do comprimento da raiz (cm), massa seca (g) raiz e massa fresca (g) raiz de mudas de mirtilo enraizadas *in vitro* sob 4 espectros de luz de LED e aclimatizada em dois substratos diferentes.

Tratamento	Aclimatização dos mirtilos após 45 dias de cultivo <i>in vitro</i>					
	Comp. raiz (cm)		Massa seca raiz (g)		Massa fresca raiz (g)	
	Floresta	Holambra	Floresta	Holambra	Floresta	Holambra
<b>WC</b>	5,86 ± 0,65 Aa	1,83 ± 0,70 Bb	0,01 ± 0,00 Ab	0,00 ± 0,00 Bab	0,11 ± 0,04 Aa	0,01 ± 0,01 Ba
<b>70R30B</b>	5,56 ± 0,54 Aa	2,23 ± 0,62 Bab	0,02 ± 0,00 Aa	0,00 ± 0,00 Bab	0,17 ± 0,04 Aa	0,04 ± 0,01 Ba
<b>100R</b>	4,31 ± 0,74 Aa	4,70 ± 0,70 Aa	0,01 ± 0,00 Aab	0,01 ± 0,00 Aa	0,09 ± 0,03 Aa	0,10 ± 0,02 Aa
<b>100B</b>	3,73 ± 0,88 Aa	1,96 ± 0,68 Ab	0,01 ± 0,00 Ab	0,00 ± 0,00 Ab	0,07 ± 0,02 Aa	0,04 ± 0,02 Aa
<b>CV 1 %</b>	61.6%		30.3%		7.5%	
<b>CV 2 %</b>	62.9%		25.3%		4.7%	
<b>CV 3 %</b>	51.0%		28.5%		6.7%	

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal.



**Figura 5** – Imagem comparativa do crescimento das plântulas da parte aérea e radicular sob diferentes espectros de luz: (a) logo após a retirada do cultivo *in vitro*; (b) plântulas retiradas após 45 dias de aclimatização em nebulização tipo fog; (c) remoção dos substratos para análise das partes aéreas e das raízes. Escala de 1 cm. Fonte: Própria (2022)



## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Enraizamento *in vitro* de microestacas de mirtilo

Embora sejam limitados os estudos sobre os efeitos dos espectros de luz de LED no cultivo *in vitro* de plantas lenhosas, a cultura do “blueberry” se destaca com pesquisas realizadas nos grupos “Highbush” e “Rabbiteye”.

No estudo que investigou os efeitos de diferentes espectros de luz e ventilação na propagação *in vitro* da cultivar Titan da variedade "Rabbiteye", foi constatado que as combinações dos espectros 100R (100% vermelho), 80R20B (80% vermelho e 20% azul) e 50R50B (50% vermelho e 50% azul) apresentaram resultados promissores tanto no desenvolvimento *in vitro* quanto na fase *ex vitro* (Hung et al., 2016a).

Os mesmos espectros de luz também foram utilizados em outra análise na propagação *in vitro* da cultivar Huron, pertencente à variedade "Highbush" (*Vaccinium corymbosum* L.). Esses experimentos foram realizados em meio de cultura MW, sem o uso de reguladores de crescimento vegetal (PGR), e com a adição de ZEA (Hung et al., 2016b). Nesta pesquisa, embora não tenha ocorrido a formação de brotações no tratamento sem PGR, as combinações de espectros de luz 100R, 80R20B e 50R50B mostraram resultados estatisticamente superiores em relação ao controle com luz fluorescente (WC) e ao tratamento apenas com 100B (100% azul) (Hung et al., 2016b).

Os resultados obtidos nestes trabalhos corroboram com os do presente estudo, onde as combinações de espectros 100R e 70R30B foram os tratamentos mais efetivos para a enraizamento de microestacas da cultivar Jewel do grupo “Southern Highbush”. No entanto, no estudo realizado por Hung et al. (2016b) com a cultivar Huron do grupo “Highbush”, não foi observado o enraizamento de microestacas nos tratamentos com espectros, mesmo em meio completo MW sem o uso de PGR.

A rizogênese *in vitro* exclusivamente pelos espectros 100R e 70R30B não havia sido descrita anteriormente para o grupo “Southern Highbush”, especificamente para a cultivar Jewel. Além disso, essa indução não ocorreu no grupo “Highbush”, representado pela cultivar Huron. Esses resultados indicam que a resposta das diferentes cultivares de “blueberry” ao estímulo da formação de raízes

*in vitro* pode variar, sendo importante considerar as características específicas de cada grupo e cultivar no desenvolvimento de estratégias de propagação vegetativa.

O desenvolvimento adventício de raízes no processo *in vitro* é um sistema biológico complexo que é regulado por uma combinação de fatores endógenos e ambientais (Hartmann et al., 2001). Diversos fatores endógenos, como hormônios vegetais e reguladores genéticos, desempenham um papel importante na formação e diferenciação das raízes adventícias. Além disso, fatores ambientais, como luz, temperatura, umidade e composição do meio de cultura, também influenciam o desenvolvimento das raízes. A interação entre os fatores endógenos e ambientais é fundamental para o estabelecimento e sucesso da rizogênese *in vitro*.

De fato, o fator genético das diferentes variedades “Southern Highbush” e a “Highbush”, pode ser significativo na rizogênese *in vitro*. Ao avaliar os resultados dos espectros monocromáticos utilizados nos experimentos é possível observar semelhanças entre os grupos de plantas. Isso sugere que certos espectros de luz, independentemente do genótipo das plantas, podem ter efeitos semelhantes na indução de formação de raízes. Essas semelhanças podem estar relacionadas a vias de sinalização específicas ativadas pelas diferentes cores de luz ou à influência direta da luz na expressão de genes relacionados à rizogênese.

Na presente análise, utilizando o meio completo de WPM, a cultivar Jewel demonstrou a formação de raízes mesmo na ausência de PGR. Foi observado que os espectros 100R e 70R30B resultaram em maior porcentagem de enraizamento, maior altura das plantas, maior número de folhas, maior área foliar, maior comprimento das raízes e mais massa fresca das plantas em comparação aos tratamentos com espectros 100B e WC. Isso significa que a utilização do espectro 100R resultou em um melhor desenvolvimento dessas variáveis em comparação ao espectro 100B.

Os fotorreceptores fitocromos e criptocromos são sensíveis a diferentes comprimentos de onda da luz e desempenham papéis importantes na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas. O fitocromo é um fotorreceptor envolvido em várias respostas fisiológicas das plantas, como a inibição do estiolamento de entrenós (alongamento excessivo dos caules em condições de baixa luminosidade), o aumento da taxa de acúmulo de clorofila (pigmento responsável pela fotossíntese) e a regulação do processo de florescimento (Taiz & Zeiger, 2013). Quando as plantas percebem a luz vermelha (comprimento de onda

próximo a 660 nm), o fitocromo é ativado, promovendo respostas específicas, como o crescimento do caule e a inibição do estiolamento. Por outro lado, a luz vermelha distante (comprimento de onda próximo a 730 nm) inativa o fitocromo e pode induzir respostas como a germinação de sementes e a abertura de estômatos (Taiz & Zeiger, 2013).

De acordo com os resultados observados, o espectro 100R tem um efeito positivo na promoção do crescimento das plantas, independentemente da variedade “Southern Highbush” ou “Highbush”, mas apenas a cv. Jewel foi capaz de formar raízes *in vitro* sem a adição de PGR, e isso ocorreu especificamente quando exposta aos espectros de luz 100R e 70R30B. Esses achados sugerem que a cv. Jewel possui uma maior capacidade de resposta e desenvolvimento em relação a esses espectros de luz.

## 5.2 Quantificação de clorofila a, b e total

A análise quantitativa dos pigmentos cloroplastídicos se justifica, uma vez que são peças centrais na captação de energia luminosa. A concentração de clorofila nas folhas é comumente usada como um parâmetro para estimar a potência fotossintética das plantas, devido à sua relação direta com a absorção e transferência de energia luminosa. (Rêgo & Possamai, 2004).

No cultivo *in vitro* convencional, as plantas geralmente possuem folhas com menor número de cloroplastos, com empilhamento de tilacóides pouco desenvolvidos (Majada et al., 2002), baixa quantidade de clorofilas e grana desorganizados (Lucchesini et al., 2006). As plantas cultivadas em condições *in vitro* podem responder de maneira variada à qualidade da luz, sendo que a luz azul é benéfica para a produção de clorofila, o desenvolvimento dos cloroplastos e a abertura dos estômatos, enquanto a luz vermelha desempenha um papel essencial no crescimento foliar e no armazenamento de carboidratos (Lotfi et al., 2019). Estudos anteriores, como o de Gupta e Jatothu (2013), destacam a importância da combinação adequada desses espectros de luz para obter maiores valores de componentes fotossintéticos, essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas. A proporção adequada de luz azul e vermelha pode otimizar a síntese de clorofila e carotenoides, promovendo assim um melhor desempenho fotossintético e, conseqüentemente, um crescimento mais saudável das plantas.

Segundo a observação feita por Cruz et al. (2021), na variedade Woodard (*Vaccinium* Spp), foi observado um maior crescimento da área foliar quando exposta a um filtro de luz vermelha, enquanto um menor crescimento foi observado nos filtros azul e branco, sem o uso de reguladores de crescimento. O experimento utilizou filtros coloridos de acetato celulose do tipo Lee Filters (Walworth Ind. Estate, Andover, England), sendo o filtro azul com um comprimento de onda de 64,2nm, o filtro vermelho com um comprimento de onda de 21,13nm e uma lâmpada fluorescente branca fria com uma intensidade de 299 lm m<sup>2</sup>. A respeito da relação clorofila a/b, foi constatado que o único fator que teve efeito significativo foi o tipo de filtro utilizado, sendo que o maior valor foi observado quando o filtro branco foi empregado, concordando com o presente estudo. No estudo realizado por Hung et al. (2016b) da cultivar Huron do grupo "Northern Highbush" (*Vaccinium corymbosum*), foi observado que o uso de LEDs na cor azul resultou no acúmulo de clorofila, enquanto o uso de LEDs na cor vermelha não apresentou esse efeito.

Os resultados desta presente pesquisa corroboram com estudos anteriores que também encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes espectros de luz testados e os teores de clorofila. Foi observado que a menor concentração de clorofila ocorreu no tratamento com luz vermelha (100R), seguido pelos tratamentos com luz azul (100B), a combinação de luz vermelha e azul (70R30B) e, por fim, a luz branca fria (CW). Esses resultados sugerem que a composição espectral da luz desempenha um papel importante na síntese e acumulação de clorofila nas plantas.

### **5.3 Processo de aclimatização**

A adaptação das plantas do ambiente de cultivo *in vitro* para o ambiente *ex vitro* requer que elas possuam um certo nível de capacidade fisiológica. Nesse sentido, a fase de aclimatização é considerada a etapa mais desafiadora da técnica de micropropagação (Preece & Sutter, 1991; Kadlecěk et al., 2001). A capacidade de induzir o enraizamento de plântulas durante a etapa laboratorial, sem a necessidade de utilizar PGR e apenas com o uso de um espectro de luz adequado, representa uma vantagem significativa para os laboratórios de cultivo de tecidos vegetais (CTV). Essa abordagem permite reduzir os custos associados à aquisição e aplicação de PGR, além de melhorar a qualidade das mudas produzidas. Ademais, o

processo de aclimatização, que envolve a adaptação das plantas ao ambiente externo, também pode ser otimizado, uma vez que as plântulas já apresentam um sistema radicular desenvolvido durante a fase *in vitro*. Dessa forma, essa estratégia proporciona economia de tempo e recursos, além de contribuir para a produção de mudas de melhor qualidade.

As condições de cultivo em casa de vegetação foram semelhantes às utilizadas pelos viveiristas de “blueberry”, e o padrão de desenvolvimento das plantas nos diferentes tratamentos de espectros de luz foi mantido. Isso denota que as plântulas que apresentaram um bom desempenho no ambiente de cultura *in vitro* em um determinado espectro de luz também responderam de forma positiva durante o processo de aclimatização e desenvolvimento *ex vitro*. Em contraste, as plantas que não apresentaram boa performance durante o cultivo dentro do laboratório não mostraram recuperação durante os 45 dias de aclimatização.

Nos estudos realizados com a cultivar “Highbush” cv. Huron, os pesquisadores decidiram replicar os mesmos tratamentos de espectros de luz que foram utilizados na fase *in vitro* durante o ensaio *ex vitro* (Hung et al., 2016b). O mesmo procedimento foi adotado nos estudos envolvendo a cultivar “Rabbiteye” cv. Titan (Hung et al., 2016a). Nos trabalhos realizados com as cultivares Huron e Titan, os tratamentos com luz vermelha e combinações de luz vermelha e azul em diferentes proporções demonstraram resultados estatisticamente superiores aos tratamentos com luz azul e ao controle com luz fluorescente. Vale ressaltar que as plântulas utilizadas nesses estudos não foram aclimatizadas em condições de casa de vegetação, o que pode afetar seu desempenho e adaptação ao ambiente externo.

Os resultados obtidos na fase *ex vitro*, aclimatização da cultivar Jewel da espécie “Southern Highbush”, foram obtidos exclusivamente em condições de casa de vegetação. Nesse caso os tratamentos 70R30B e 100R apresentaram melhor desempenho em comparação com as luzes 100B e CW. O uso dos substratos foi imparcial. Os substratos utilizados não apresentaram diferenças significativas em relação aos resultados obtidos.

Este estudo complementa as análises importantes de Hung et al. (2016) e confirmam a eficácia da aplicação dos espectros de luz vermelha e a combinação da luz vermelha e azul tanto na fase *in vitro* quanto na fase *ex vitro* no cultivo de “blueberry”. O efeito positivo desses espectros de luz na promoção do crescimento e

desenvolvimento das plantas de "blueberry" persiste mesmo após 45 dias nas condições de casa de vegetação, reforçando a relevância desses tratamentos para a produção bem-sucedida. Esses resultados são inéditos e evidenciam o impacto dos diferentes espectros de luz durante a etapa de enraizamento *in vitro* no processo subsequente *ex vitro*.

Durante a etapa laboratorial, é de suma importância que as plântulas desenvolvam um sistema radicular adequadamente estruturado e funcional, a fim de garantir sua capacidade de absorver água e nutrientes minerais, além de garantir sua sobrevivência após serem transferidas para o ambiente *ex vitro* (Nowak & Shulaev, 2003). E, a capacidade de induzir o enraizamento de plântulas durante essa fase, sem a necessidade de utilizar PGR e apenas com o uso de um espectro de luz adequado, representa uma vantagem significativa para os laboratórios de cultivo de tecidos vegetais (CTV). Essa abordagem permite reduzir os custos associados à aquisição e aplicação de PGR, além de melhorar a qualidade das mudas produzidas. O processo de aclimatização também pode ser otimizado, uma vez que as plântulas já apresentam um sistema radicular desenvolvido durante a fase *in vitro*. Dessa forma, essa estratégia proporciona economia de tempo e recursos, além de contribuir para a produção de mudas de melhor qualidade.

## **6. CONCLUSÃO**

Os tratamentos utilizando o espectro de cor vermelha (100R) e a combinação de cores (70R30B) foram eficazes na indução de enraizamento *in vitro* de microestacas de mirtilo "Highbush" cv. Jewel, dispensando o uso de reguladores de crescimento vegetal (PGR). As mudas provenientes desses tratamentos tiveram melhor desenvolvimento durante o processo de aclimatização, independentemente dos substratos utilizados.



## REFERÊNCIAS

ALBERT, T.; STARAST, M.; KARP, K.; KALDMÄE, H.; VOOL, E.; PAAL, T. The influence of propagation method on growth of the half-highbush blueberry 'Northblue'. *Acta Horticulturae*, v.812, p.141-146, 2009.

ALBUQUERQUE, T. G., NUNES, M. A., OLIVEIRA, M. B. P. P., & SANCHES-SILVA, A. (2020). Blueberry: A review of its health benefits and potential uses and perspectives in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 71-83. doi: 10.1016/j.tifs.2019.12.004.

ALVES, R. M. V., SANTOS, R. G., SILVA, G. L., & PIO, R. M. (2020). Cultivo de Mirtilo no Brasil. In *Fruticultura Tropical: Oportunidades e Desafios* (pp. 237-252). Embrapa.

ANTUNES, L. E. C.; RASEIRA, M.C.B. (Ed.) Cultivo do mirtilo (*Vaccinium* spp.) Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. 99p. (Embrapa Clima Temperado. Sistema de Produção, 8).

ARAÚJO, M. R. S. de, BARBOSA, M. A. F., & BRITO, E. da S. (2022). Incidência de diferentes espectros de luz em feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Education Science and Health*, 2(3), 1–8. <https://doi.org/10.52832/jesh.v2i3.151>

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE PRODUTORES DE MIRTILO (ANPM). Mercado do Mirtilo no Brasil. Disponível em: <https://anpm.com.br/mercado-do-mirtilo-no-brasil/>. Acesso em: 05 fev. 2023.

BARTA, D. J.; TENNESSEN, D. J.; BULA R. J.; TIBBITTS, T. W. Wheat growth under a light source with and without blue photon supplementation. *American Society for Gravitational and Space Biology*. 5:51 1991.

BARTA, D. J.; TIBBITTS, T.W.; BULA, R. J.; MORROW, R. C. Evaluation of light emitting diode characteristics for a space-based plant irradiation source. *Advances in Space Research* v.12, p.141-149. 1992.

BHAYA, M. H. M. & AI-RAZZAQSALIM, S. N. (2019). Impacts os plant growth regulators and light quality on banana (*Musa* SPP) micropropagation. *Plant Archives*, 19(1), 1379-1385.

BLUEBERRIES CONSULTING. Análise do panorama mundial da produção de mirtilo, 2022. Disponível em: <<https://blueberriesconsulting.com/pt/analysis-del-panorama-mundial-de-la-produccion-de-arandanos/>> Acesso em: 05 de mar. de 2023.

BRASIL, SÃO PAULO. Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, 2021. Mirtilo: Saiba mais sobre o cultivo dessa fruta. Disponível em:<<https://www.agricultura.sp.gov.br/Noticias/mirtilo-saiba-mais-sobre-o-cultivo-dessa-fruta.aspx>>.Acesso em: 12 de mar de 2023.

BULA, R. J.; MORROW, R.C.; TIBBITTS, T. W.; BARTA, D. J.; Ignatius, R. W.; Martin, T. S. Light-emitting diodes as a radiation source for plants. *HortScience*, v.26, p. 203-205. 1991.

CANTUARIAS-AVILÉS, T. Cultivo do mirtilo: atualizações e desempenho inicial de variedades de baixa exigência em frio no Estado de São Paulo. Palestra II Simpósio Internacional de Fruticultura-Frutas Exóticas. *Rev. Bras. Frutic.* vol.36 no.1 Jaboticabal Jan./Mar. 2014.

CANTUARIAS-AVILÉS, T. Cultivo de mirtilheiro (*Vaccinium* spp.) Piracicaba: ESALQ, Divisão de Biblioteca e Documentação, 2010. 38 p. (Série Produtor Rural, 48).

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

CAO, X. & HAMMERSCHLAG, F. A. (2000). Improved shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry. *HortScience*, v. 35, n. 5, p. 945-947.

CHÁCARA CATAVENTO. Chácara Cataveto: Sobre nós, 2023. Disponível em: <<https://chacaracatavento.com.br/sobre-nos/>>. Acesso em: 20 de fev. de 2018.

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

CHILDERS, N. F., & LYRENE, P. M. (2006). Blueberries. In *Handbook of environmental physiology of fruit crops* (Vol. 2, pp. 259-287). CRC Press.

COPLACANA - Cooperativa dos Plantadores de Cana do Estado de São Paulo. Vale do Mirtilo: um dos maiores produtores de mirtilo no Brasil. Disponível em: <http://www.coplacana.com.br/vale-do-mirtilo-um-dos-maiores-produtores-de-mirtilo-no-brasil/>. Acesso em 15 jan. 2023.

COSTA, F. H. S.; et al. Perda de água e modificações anatômicas em folhas de plantas de bananeiras micropropagadas durante a aclimatização. *Ciência Rural*, Santa Maria, RS, v. 39, n. 3, p. 742-748, 2009.

COUTINHO E. F.; FRANCHINI E. R.; MACHADO N. P.; CASAGRANDE, J. G, Jr. Propagação de Mirtilo do Tipo Rabbiteye por Estaquia e Alporquia. *Boletim de Pesquisae Desenvolvimento* v.50. EMBRAPA Clima Temperado (Pelotas, RS) dezembro 2007.

CRUZ, J. G.; PASA, M. da S.; DIAS, C. S.; LOY, F.; COPATTI, A. S.; SOMMER, L. R.; DEUNER, S.; MELLO-FARIAS, P. C. de. Light quality on in vitro multiplication and rooting of 'Woodard' blueberry. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 10, n. 2, p. e48510212790, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i2.12790. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/12790>. Acesso em: 27 mar. 2023.

CRUZ, C. D. et al. Mudanças micropropagadas de blueberry: tecnologia, qualidade e produção de frutos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 41, n. 5, e-455, 2019.

CUI, J.; SONG, S.; YU, J.; LIU, H. Effect of daily light integral on cucumber plug seedlings in artificial light plant factory. *Horticulturae* 2021, 7, 139.

DELLA ROSA, V. A. et al. *A cultura do mirtilo*. Embrapa Clima Temperado, 2018.

DAVEY, M.R.; ANTHONY, P. *Plant Cell Culture: essential methods*. 1. ED. Chichester: Willey-Blackwell, 2010. 358 p.

DEVETTER, L. W., CHABERT, S., MILBRATH, M. O., MALLINGER, R. E., WALTERS, J., ISAACS, R., ... EERAERTS, M. (2022). Toward evidence-based decision support systems to optimize pollination and yields in highbush blueberry. *FRONTIERS IN SUSTAINABLE FOOD SYSTEMS*, 6. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.1006201>.

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

DUTRA, L. F.; WENDLING, I. Micropropagação e microestaquia de eucalipto. In WENDLING, I.; DUTRA, L. F. *Produção de mudas de eucalipto*. Cap. 3, Colombo – PR: EMBRAPA, 2010. p.83-120.

EMBRAPA Centro Nacional de Pesquisa de Fruteiras de Clima Temperado (Pelotas, RS). *Relatório Técnico - 1980 a 1990*. Pelotas: EMBRAPA-CNPFT, 1991. 125p.

EMMERICH, J. C.; MORROW, R. C.; CLAVETTE, T. J.; SIRIOS, L. J. Plant Research Unit lighting system development. *SAE Technical Paper Series*. Paper No. 2004-01-2454. 2004.

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

FANG, Y.; NUNEZ, G. H.; NEVES, M.; PHILLIPS, D. A.; MUNOZ, P. R. A review for southern highbush blueberry alternative production systems. *Agronomy*, v. 10, p. 1–15, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy10101531>.

FAO. *FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION*. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 13 mar. de 2013.

FARIA, J. T. C.; CAMELATTO, D.; NACHTIGALL, G. R.; ARRUDA, J. J. P. Enraizamento de estacas semilenhosas de mirtilo (*Vaccinium ashei* Read) cv. Powderblue. In: *CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA*, 15., 1998, Poços de Caldas. Resumos... Poços de Caldas, 1998, p.612.

FLORIDA BLUEBERRY GROWERS. *FBG variety grower's guides*. 2009. Disponível em: <<http://floridablueberrygrowers.com/varieties.html>>. Acesso em: 10 jan 2023.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO); USDA/NASS; FAS/Lima, FAS/Warsaw, FAS/Mexico City, FAS/Pretoria; Chile = International Blueberry Organization. (2020). State of the Industry Report, Americas. FRANÇA, S. Mirtilo: uma doce e rendosa novidade. *Manchete Rural*, Rio de Janeiro, n.46, p.32-34, 1991.

FU, W.; LI, P.; WU, Y. Effects of Different Light Intensities on Chlorophyll Fluorescence Characteristics and Yield in Lettuce. *Sci. Hortic.* 2012, 135, 45–51.

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

GOINS, G.D. et al. Photomorphogenesis, photosynthesis, and seed yield of wheat plants grown under red light-emitting diodes (LEDs) with and without supplemental blue lighting. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v.48, n.7, p.1407-1413, 1997.

GOUGH, R. E. *The Highbush Blueberry and Its Management*. Food Production Press, Haworth Press, Inc. New York, 288 p.,1991.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. Micropropagação In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Eds.) *Técnicas e Aplicações de Cultura de Tecidos de Plantas*. ABCTP: Embrapa CHP Hortaliças. P.99-169, 1998.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. (Eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPASPI/ EMBRAPACNPH, 1999. v. 2, p. 183-260.

GREENWOOD, M.S.; HUTCHISON, K.W. Maturation as a developmental process. In: AHUJA, M.R.; LIBBY, W.J. (Ed.). *Clonal forestry: genetics and biotechnology*. Budapest: Springer-Verlag, 1993. p.14-33.

GUTERRES, S. M. Influência de diferentes espectros luminosos na recuperação de cultura nodulares criopreservadas e na germinação de sementes de *Vriesea reitzii* Leme & A.F. Costa. *Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrária, Programa de Pós-Graduação*, 2002.

GUPTA, S.D. & JATOTHU, B. (2013). Fundamentos e aplicações de díodos emissores de luz (LEDs) no crescimento de plantas in vitro e morfo-Gênese. *Planta Biotechnol Rep* 7:211-220.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T. et al. *Plant propagation: principles and practices*. 6.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. 770p.

HARTMANN, H.T., KESTER, D.E., DAVIES JUNIOR, F.T., GENEVE R.L. *Plant Propagation Principle and Practices*. Prentice-H. New Delhi: 2001.

HOFFMANN, A.; FACHINELLO, J. C.; SANTOS, A. M. Enraizamento de estacas de duas cultivares de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) em diferentes substratos. *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, v.10, n.1, p. 7-11, 1995.

HUBER, M.; NIEUWENDIJK, N.M.; PANTAZOPOULOU, C.K.; PIERIK, R. Light Signalling Shapes Plant–Plant Interactions in Dense Canopies. *Plant Cell Environ.* 2021, 44, 1014–1029.

HUNG, C.D. et al. LED light for in vitro and ex vitro efficient growth of economically important highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, Krakow, v.38, n.6, p.1-9, 2016.

HUNG C. D., HONG C. H., KIM S. K., LEE K.H., PARK J.Y., DUNG C. D., et al. In vitro proliferation and ex vitro rooting of microshoots of commercially important rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) using spectral lights. *Scientia Horticulturae* 2016a;211:248–54. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.003>.

HUNG C.D., HONG C.H., KIM S.K., LEE K.H., PARK J.Y., NAM M.W., et al. LED light for in vitro and ex vitro efficient growth of economically important highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Acta Physiologiae Plantarum* 2016b;38. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2164-0>.

IYAMA, Carla Midori. Calogênese in vitro como alternativa na produção de metabólitos secundários e comparação metabólica entre calos e plantas de *Artemisia annua*. 2023. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados) – Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2023.

ISUTSA, D. K, PRITTS, M. P, MUDGE, K. W. (1994). Rápida propagação de mirtilo plantas usando o enraizamento in vitro e ex- acclima controlada de micropropagules tization. *Horticulture Science*. V. 29, p.1124-1126.

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.

KALT, W. (2010). Blueberries: Impact on Cardiovascular Disease and Metabolic Syndrome. In R. R. Watson, V. R. Preedy & S. Zibadi (Eds.), *Polyphenols in Human Health and Disease* (pp. 575-580). Academic Press.

KALT, W., RYAN, D. A., DUY, J. C., Prior, R. L., EHLENFELDT, M. K., & VANDER KLOET, S. P. (1999). Interspecific variation in anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity among genotypes of highbush and lowbush blueberries (*Vaccinium* section *cyanococcus* spp.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(4), 1230-1237.

KHALID, S., BARFOOT, K. L., MARY, G., LAMPORT, D. J., REYNOLDS, S. A., WILLIAMS, C. M., & BUTLER, L. T. (2017). Effects of acute blueberry flavonoids on mood in children and young adults. *Nutrients*, 9(2), 158. <https://doi.org/10.3390/nu9020158>.

KADLECEK, P.; TICHÁ, I.; HASEL, D.; CAPKOVÁ, V.; SCHAFER, C. Importance of in vitro pretreatment for ex vitro acclimatization and growth. *Plant Science*, 161, p.695-701, 2001.

KLEM, K.; GARGALLO-GARRIGA, A.; RATTANAPICHAJ, W.; ORAVEC, M.; HOLUB, P.; VESELÁ, B.; SARDANS, J.; PEÑUELAS, J.; Urban, O. Distinct Morphological, Physiological, and Biochemical Responses to Light Quality in Barley Leaves and Roots. *Front. Plant Sci.* 2019, 10, 1026.

KREWER, G.; CLINE, B.; NESMITH, D. S. Southeast regional blueberry horticulture and growth regulator guide. University of Georgia Cooperative Extension. 2015. 15p.

LEE, J., DURST, R. W., & WROLSTAD, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1269-1278.

LIAN, M. L., MURTHY, B. N. S., & PAEK, K. Y. (2002). Effects of light emitting diodes (LEDs) on the in vitro induction and growth of bulblets of *Lilium oriental* hybrid 'Pesaro'. *Scientia Horticulturae*, 94(3-4), 365-370.

LI, H.; TANG, C.; XU, Z. The Effects of Different Light Qualities on Rapeseed (*Brassica napus* L.) Plantlet Growth and Morphogenesis in Vitro. *Sci. Hortic.* 2013, 150, 117–124.

LIMA, G.V.M., Ação de auxinas e cofatores fenólicos no enraizamento in vitro de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). 2010. 96f. (Dissertação mestrado/Programa de Pós-Graduação Botânica), UFRPE, Recife, 2010.

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

LOTFI, M., MARS, M., WERBROUCK, S. (2019). Optimizing pear micropropagation and rooting with light emitting diodes and trans-cinnamic acid. *Plant Growth Regulation*, 88(2), 173-180.

LUCCHESINI, M.; MONTEFORTI, G.; MENSUALI-SODI, A.; SERRA, G. Leaf ultrastructure, photosynthetic rate and growth of myrtle plantlets under different in vitro culture conditions. *Biologia Plantarum*, 50(2), p.161-168, 2006.

LYRENE, P. M.; BALLINGTON, J. R. Varieties and their characteristics. In: CHILDERS, N. F.; LYRENE, P. M. (ed.). *Blueberries: for growers, gardeners, promoters*. Gainesville: University of Florida, 2006. p. 26-37.

LYRENE, P.M. 'Emerald' Southern highbush blueberry. *HortScience*, Alexandria, v. 43, n. 5, p. 1606-1607, 2008.

MAINLAND, C. M. Propagation and planting. In: ECK, P.; CHILDERS, N. F. *Blueberry culture*. New Brunswick: Rutgers University Press, 1966, p.111-131.

MAJADA, J.P.; FALL, M.A.; TADEO, F.; SÀNCHEZ-TAMÉS, R.; Effects of natural ventilation on leaf ultrastructure of *Dianthus caryophyllus* L. cultured in vitro. *In Vitro Cellular e Developmental Biology*. *Plant*, 38, p.272-278, 2002.

MALUTA, F. A.; BORDIGNON, S. R.; ROSSI, M. L.; AMBROSANO, G. M. B., RODRIGUES, P. H. Cultivo in vitro de cana-de-açúcar exposta a diferentes fontes de luz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v.48, n.9. Brasília Sept. 2013.

MARANI, Igor Kioshi Hatisuka et al. Avaliação da utilização de diodos emissores de luz (LEDs) sobre as características morfofisiológicas de plantas de *Alternanthera brasiliana* Kuntze. In: CICURV-Congresso de Iniciação Científica da Universidade de Rio Verde. 2022.

MARTINES-ESTRADA, E.; CAAMAL-VELAZQUEZ, J.H.; MORALES-RAMOS, V.; BELLO-BELLO, J. J. Light emitting diodes improve in vitro shoot multiplication and growth of *Anthurium andreaeanum* Lind. *Propagaton of Ornamental Plants* 16:3-8. 2016.

MATSUDA, R., K. OHASHI-KANEKO, K. FUJIWARA, E. GOTO, and K. KURATA. 2004. Photosynthetic characteristics of rice leaves grown under red light with or without supplemental blue light. *Plant & Cell Physiol*. 45:1870–1874.

MEDINA, R. B. Desempenho de novas cultivares de mirtilheiro de baixa exigência em frio em região subtropical. 2016. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências. Área de concentração: Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2016.

MEDINA, R. B.; CANTUARIAS-AVILÉS, T. E.; ANGOLINI, S. F.; SILVA, S. R. Mirtilheiros ‘Emerald’ e ‘Jewel’ cultivados em ausência de frio hibernal. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiânia, v. 48, n. 2, p. 147–152, 2018. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/pat/article/view/52093>. Acesso em: 02 out. 2023.

MEDINA, R.B.; TEZOTTO-ULIANA, J.V.; SANTORO, M.B.; SILVA, S.R. da. Postharvest quality of 'Emerald' blueberry cultivated in a subtropical region. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.57, e02683, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2022.v57.02683>.

MEIRAMKULOVA, K.; TANYBAYEVA, Z.; KYDYRBKOVA, A.; TURBEKOVA, A.; AYTKHOZHIN, S.; ZHANTASOV, S.; TAUKENOV, A. The Efficiency of Led Irradiation for Cultivating High-Quality Tomato Seedlings. *Sustainability* 2021, 13, 9426.

MILER, N., KULUS, D., WOZNY, A., RYMARS, D., HAJZER, M., WIERZBOWSKI, NELKE, R., K., SZEFFS, L. (2019). Application of wide-spectrum light-emitting diodes in micropropagation of popular ornamental plant species: a study on plant quality and cost reduction. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55(1), 99-108.

MILER, N., ŠTAMPAR, F., JEMERIC, T., & JUG, T. (2014). The effect of light quality on the in vitro rooting of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Scientia Horticulturae*, 165, 239-246.

MILLER, S.; RAWNSLEY, E.; GEORGE, J.; PATEL, N. A comparison of blueberry propagation techniques used in New Zealand. *Acta Horticulturae (ISHS)* v. 715, p.397-401, 2006 a.

MILLER, S.; RAWNSLEY, E.; GEORGE, J.; PATEL, N. A comparison of blueberry propagation techniques used in New Zealand. *Acta Horticulturae*, v.715, p.397-402, 2006. INIA, ESTACIÓN EXPERIMENTAL CARILLANCA. El cultivo del arándano. Programa Frutales y Viñas. Temuco, 1988. 203p. (Serie Carillanca, 2).

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.

MORROW, R.C. LED lighting in horticulture. 2008. *HortSci* 43:1947–1950.

MORROW, R.C.; BULA, R.J.; TIBBITTS, T.W. Light emitting diodes as a photosynthetic irradiance source for plants. *American Society for Gravitational and Space Biology*. 3:60.1989.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid grow and biossays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-97, 1962.

MURILLO-GÓMEZ, P. A.; NARANJO, E.; CALLEJAS, R.; ATEHORTÚA, L.; URREA, A. Micropropagation of the native species *Anthurium antioquiense* Engl. for conservation purposes. *Agronomía Colombiana*, Bogotá, v. 32, n. 3, p. 334-340, 2014

NÁJERA, C.; GALLEGOS-CEDILLO, V. M.; ROS, M.; PASCUAL, J. A. LED Lighting in Vertical Farming Systems Enhances Bioactive Compounds and Productivity of Vegetable Crops. *Biol. Life Sci. Forum*, v. 16, n. 1, p. 24, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/IECHo2022-12514>. Acesso em: 22 mar. 2023.

NOÉ, N.; BONINI, L. Leaf anatomy of highbush blueberry grown in vitro and during acclimatization to ex vitro conditions. *Biologia Plantarum*, v.38, p.19- 25, 1996.

NOWAK J, SHULAEV V. Priming for transplant stress resistance in in vitro propagation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 2003;39:107–24. <https://doi.org/10.1079/IVP2002403>.

PEREIRA, J. F. M. et al. *Mirtilo: o produtor pergunta, a Embrapa responde*. Brasília: Embrapa, 2017.

PEREIRA, I. dos S.; PICOLOTTO, L.; CORRÊA, A. P. A.; RASEIRA, M. do C. B.; ANTUNES, L. E. C. *Informações técnicas de cultivares de mirtilo*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2013. 2 p. 1 folder.

PÉREZ, D., TORRES, V., BARRIENTOS, H., RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, E. M., & Fuentes, L. (2020). Blueberries in Chile: current status and future prospects. *Acta Horticulturae*, (1287), 229-234.

PHILLIPS, D. A.; WILLIAMSON, J. G.; LYRENE, P. M.; MUNOZ, P. R. Southern highbush blueberry cultivars from the University of Florida. Gainesville: Department of Horticultural Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 2022. 12 p. (UF/IFAS Extension, HS1245). DOI: <https://doi.org/10.32473/edis-hs1245-2022>.

PINTO, R. M. Melhoria das técnicas culturais na produção de mirtilo em substrato. 2015. 69f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agronômica - Hortofruticultura e Viticultura) – Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2015.

PREECE, J. E.; SUTTER, E. G. Acclimatization of micropapagated plants to the greenhouse and field, in: P.C. Debergh, R.H. Zimmerman (Eds.), *Micropropagation. Technology and Application*, Kluwer, Dordrecht, 1991, p.71-93.

PROARÁDANOS. Arándanos de Perú para el Mundo, 2022. Disponível em: <<https://proarandanos.org/>>. Acesso em: 23 abr. de 2023.

RASEIRA, M. C. B.; ANTUNES, L. E. C. A cultura do mirtilo. Embrapa Clima Temperado, Documentos, 121. 69p., 2014.

RASEIRA, M.C.B. Descrição da planta, melhoramento genético e cultivares. In: RASEIRA, M.C.B.; ANTUNES, L.E.C. *Sistemas de produção: cultivo do mirtilo. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. 99 p.*

RASEIRA, Maria do Carmo Bassols; ANTUNES, Luis Eduardo Corrêa (orgs.). *A cultura do mirtilo. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 67 p.* (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 121).

R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

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

RÊGO, G. M.; POSSAMAI, E. Avaliação dos teores de clorofila no crescimento de mudas de jequitibá-rosa (*Cariniana legalis*). *Boletim de Pesquisa Florestal, Embrapa Florestas*, n.128, 2004.

RETAMALES, J. B., HANCOCK, J. F., & LOBOS, G. A. (2018). Wild Blueberries in Chile. In *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources* (pp. 157-171). Springer, Cham.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, E. M., REBOLLEDO, R., PÉREZ, D., TORRES, V., & FUENTES, L. (2021). The Chilean Blueberry Industry: Overview and Challenges. *Horticulturae*, 7(6), 141.

SCHUCH, M. W. e ERIG, A. C. Micropropagação de plantas frutíferas. In: FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. *Propagação de plantas frutíferas*. Brasília: DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 221 p. 155-173.

SCHUCH, M. W. et al. AIB e substrato na produção de mudas de mirtilo cv. Climax através de microestaquia. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 37, n. 5, p. 1446-1449, 2007.

SCOTT, D. H.; DRAPER, A. D.; DARROW, G. M. *Commercial blueberry growing*. Washington: USDA, 1978. 33p

SEERAM, N. P. (2008). Berry fruits for cancer prevention: current status and future prospects. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(3), 630-635.

SHIMIZU, M., KUDO, T., ITO, K., SAITO, T., & OKUYAMA, T. (2019). Development of pollination management in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) in Japan. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 22(4), 1219-1224.

SHIN, K.; PARK, S.Y.; PAEK, K. Sugar metabolism, photosynthesis, and growth of in vitro plantlets of *Doritaenopsis* under controlled microenvironmental conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, v. 49, n. 4, p. 445-454, 2013.

SHOEMAKER, J. S. *Small fruit culture*. 5. ed. Westport: AVI, 1978. 375p.

SILVA, A.T. da; PASQUAL, M.; ANTUNES, L. E. C.; CARVALHO, G. R.; RAMOS, J. D. Crescimento e desenvolvimento de plantas provenientes da cultura de tecidos. *Revista Ceres*, v.42, n.241, p.243-252, 1995.

SINGH, R., Ali, S., KUMAR, S., & SINGH, S. (2015). Effects of light-emitting diodes (LEDs) on the in vitro shoot regeneration and microtuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Kufri Pukhraj. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 51(2), 127-137.

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.

SOUZA, F. V. D., ANTUNES, L. E. C., & BORGES, B. V. (2018). Efeito do fotoperíodo na morfogênese in vitro de *Schizolobium amazonicum*. *Ciência Florestal*, 28(2), 648-656.

SOUSA, M. B.; CURADO, T.; LAVADINHO, C.; MOLDÃO-MARTINS, M. A survey of quality factors in highbush and rabbiteye blueberry cultivars in Portugal. *Acta Horticulturae*, v.715, p.567-572, 2011.

SUBASH, S., ESSA, M. M., AI-ADAWI, S., MEMON, M. A., MANIVASAGAM, T., & AKBAR, M. (2014). Neuroprotective effects of berry fruits on neurodegenerative diseases. *Neural Regeneration Research*, 9(16), 1557.

STRIK, B. C. (2007). Blueberry production trends in North America, 1992 to 2003, and predictions for growth. *Acta Horticulturae*, 734, 389-396.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 5. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2013. p.449-484.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888p

TAULAVUORI, K.; PYYSALO, A.; TAULAVUORI, E.; JULKUNEN-TIITTO, R. Responses of Phenolic Acid and Flavonoid Synthesis to Blue and Blue-Violet Light Depends on Plant Species. *Environ. Exp. Bot.* 2018, 150, 183–187.

THEHANE, J. Blueberries, cranberries and vacciniums. Cambridge: Timber Press, 2004, 256p

TIERNO, Raphaela Reis dos Santos. Cultura de tecidos, análise fitoquímica e avaliação do potencial antioxidante de *Passiflora setacea* DC cv “BRS Pérola do Cerrado”. 2022. 138 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

USDA FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE. Blueberries: World Markets and Trade. Washington, D.C.: USDA, 2022. Disponível em: <https://www.fas.usda.gov/data/blueberries-world-markets-and-trade>. Acesso em: 12 fev. 2023.

U.S. Highbush Blueberry Council. (2021). Global Blueberry Statistics. Disponível em: <https://www.blueberrytech.org/wp-content/uploads/2021/02/2021-Global-Blueberry-Statistics-Report.pdf>. Acesso em: 25 fev. 2023.

VILLATA, F. High density blueberry production in South America: current situation and future prospects. *Acta Horticulturae*, v. 962, p. 21-27, 2012.

VILLATA, M. Trends in world blueberry production. 2012. Disponível em: <http://www.growingproduce.com/article/26272/2/trends-inworld-blueberry-production>>. Acesso em: 13 jan. 2023.

VIRSILE, A.; OLLE, M.; DUCHOVSKIS, P. LED Lighting in Horticulture. In *Light Emitting Diodes for Agriculture: Smart Lighting*; Springer Singapore: Singapore, 2017; pp. 113–147. ISBN 9789811058073.

VIVEIROS SUNNYRIDGE. Arándanos, 2023. Disponível em <http://www.sunnyridge.cl>>. Acesso em 10 abr. 2021.

WILLIAMSON, J. G.; LYRENE, P. M. Blueberry Varieties for Florida. Gainesville: Department of Horticultural Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 2004. 9 p. (UF/IFAS Extension, HS967). DOI: <https://journals.flvc.org/edis/article/download/111102/106295>.

WAGNER JÚNIOR, A.; COUTO, M.; RASEIRA, M. do C.B.; FRANZON, R.C. 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.

WU, X., BEECHER, G. R., HOLDEN, J. M., HAYTOWITZ, D. B., GEBHARDT, S. E., & PRIOR, R. L. (2006). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(11), 4062-4068.

XU, W.; LU, N.; KIKUCHI, M.; TAKAGAKI, M. Continuous lighting and high daily light integral enhance yield and quality of mass-produced Nasturtium (*Tropaeolum majus* L.) in plant factories. *Plants* 2021, 10, 1203.

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