



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS DE LARANJEIRAS DO SUL
CURSO DE AGRONOMIA**

MYLENA CRISTINA REYNAUD

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO:
Cultivo *in vitro* de mirtilheiro (*Vaccinium virgatum* Ait.), da cultivar delite com
uso de TDZ e 2iP.**

LARANJEIRAS DO SUL

2023

MYLENA CRISTINA REYNAUD

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO:

Cultivo *in vitro* de mirtilheiro (*Vaccinium virgatum Ait.*), da cultivar delite com uso de TDZ e 2iP.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Roberson Dibax

LARANJEIRAS DO SUL

2023

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS

Reynaud, Mylena Cristina

Cultivo in vitro de mirtilheiro (*Vaccinium virgatum* Ait.), da cultivar "delite" com uso de TDZ e 2iP. / Mylena Cristina Reynaud, Roberson Dibax, Jacqueline Romero Pereira. -- 2023.

12 f.

Orientador: Doutor Roberson Dibax

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Bacharelado em Agronomia, Laranjeiras do Sul, PR, 2023.

1. *Vaccinium virgatum* Ait. 2. mirtilo. 3. micropropagação. 4. métodos de propagação. 5. propagação in vitro. I. Dibax, Roberson II. Pereira, Jacqueline Romero III. Dibax, Roberson, orient. IV. Universidade Federal da Fronteira Sul. V. Título.

MYLENA CRISTINA REYNAUD


Cultivo *in vitro* de mirtilheiro (*Vaccinium virgatum* Ait.), da cultivar “delite” com uso de TDZ e 2iP.

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Agronomia linha de formação em Agroecologia pela Universidade Federal da Fronteira Sul- *Campus* Laranjeiras do Sul (PR)


Orientador: Prof. Dr. Roberson Dibax

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 07/07/2023.


BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 ROBERSON DIBAX
Data: 07/07/2023 18:52:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Roberson Dibax

Documento assinado digitalmente
 JACQUELINI ROMERO PEREIRA
Data: 08/07/2023 11:10:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Msc. Jacqueline Romero Pereira

Documento assinado digitalmente
 SILVIA ROMAO
Data: 07/07/2023 19:10:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr^a. Silvia Romão

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de cursar o curso de agronomia no campus da Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul.

Aos meus pais, Marta Cristina Reynaud e Marcelo Teixeira Reynaud, que sempre me apoiaram no decorrer do curso, não deixando faltar recursos para a minha formação e por todo o zelo e dedicação que sempre dispuseram comigo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberson Dibax pelo apoio, pelas chances e compreensão ao longo desse período de aprendizagem, pelas correções e orientações na elaboração deste trabalho e por todo aprendizado acadêmico.

Ao Professor Dr. Josuel Alfredo Vilela Pinto e a pesquisadora Me. Jacqueline Romero Pereira, por terem proporcionado a chance dessas experiências, cedido os materiais analisados neste trabalho e sempre me deram apoio na minha formação.

A técnica Vanessa Gomes da Silva por todo o apoio, compreensão e suporte durante este trabalho.

A banca examinadora, meu agradecimento. À todos aqueles que de alguma forma participaram, contribuíram e agregaram com e meu desenvolvimento acadêmico, meu muito obrigado.

Não poderia deixar de agradecer ao Mateus, que sempre esteve comigo me apoiando e dando conselhos.

Obrigada a todos !

FORMA DE PUBLICAÇÃO

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi redigido em forma de artigo de acordo com as normas do “Journal of Biotechnology and Biodiversity”, periódico de divulgação científica, publicado pela editora Universidade Federal do Tocantins - UFT. As normas utilizadas pode ser encontradas no site de link:

<https://sistemas.uft.edu.br/periodicos/index.php/JBB/about/submissions>

Cultivo *in vitro* de mirtilheiro (*Vaccinium virgatum* Ait.), da cultivar delite com uso de TDZ e 2iP.

In vitro culture of blueberry (*Vaccinium virgatum* Ait.) cultivar delite using TDZ and 2iP.

Mylena Cristina Reynaud

Universidade da Fronteira Sul

myreynaud@yahoo.com.br

<https://orcid.org/0009-0001-3298-7933>

Roberson Dibax

Universidade da Fronteira Sul

roberson.dibax@uffs.edu.br

<https://orcid.org/0009-0003-3665-9077>

Jacqueline Romero Pereira

Universidade Federal do Paraná

jacque_knoas@hotmail.com

<https://orcid.org/0009-0005-2996-5783>

RESUMO

O mirtilheiro é uma espécie que pertence ao grupo das pequenas frutas, é uma planta perene e seus frutos apresentam alta concentração de antioxidantes e anti-inflamatórios. A propagação utilizada comercialmente ocorre de forma vegetativa por estaquia, trazendo riscos para a fitossanidade. Assim, o cultivo *in vitro* da espécie, é uma alternativa muito bem vista. Na maioria dos estudos apresentados, à área da pesquisa se concentram mais nas cultivares dos grupos highbush e lowbush, por apresentarem maiores valores comerciais, as espécie do grupo rabbiteye, apresenta melhor adaptação para regiões de clima temperado. Assim, esta pesquisa baseou-se na utilização de uma cultivar do grupo rabbiteye, a “delite” e teve como objetivo estudar o comportamento da cultivar na micropropagação das plantas utilizando diferentes reguladores vegetais. Os resultados demonstram que a junção de 2iP com TDZ, nos fatores de números de folhas e número de brotações, teve resultados semelhantes quando comparados a zeatina, na questão de sobrevivência, não ocorreu diferença nos tratamentos, entretanto a utilização de TDZ contribuiu para maior formação de calos. Desta forma a utilização de TDZ com 2iP se mostra eficaz para a multiplicação *in vitro*.

Palavras-chave: *Vaccinium virgatum* Ait., mirtilo, micropropagação, métodos de propagação, propagação *in vitro*.

ABSTRACT

The blueberry is a species that belongs to the group of small fruits, it is a perennial plant and its fruits have a high concentration of antioxidants and anti-inflammatories. The propagation used commercially occurs in a vegetative way by cuttings, bringing risks to phytosanity. Thus, the *in vitro* cultivation of the species is a very well regarded alternative. In most of the studies presented, the research area focuses more on the cultivars of the highbush and lowbush groups, because they present higher commercial values, the species of the rabbiteye group, presents better adaptation to regions of temperate climate. Thus, this research was based on the use of a cultivar of the rabbiteye group, the "delite" and aimed to study the behavior of the cultivar in the micropropagation of plants using different plant regulators. The results show that the combination of 2iP with TDZ, in

the factors of number of leaves and number of shoots, had similar results when compared to zeatin, in the question of survival, there was no difference in the treatments, however the use of TDZ contributed to greater formation of callus. Thus, the use of TDZ with 2iP is effective for in vitro multiplication.

Key-words: *Vaccinium virgatum* Ait., blueberry, micropropagation, propagation methods, in vitro propagation.

INTRODUÇÃO

Em muitos países as espécies silvestres, melhoradas em laboratório para comércio, são consideradas biologicamente e economicamente valiosas, sendo importantes espécies de pequenos frutos, como o mirtilheiro, *Vaccinium virgatum* Ait. e suas variações. Esta importância acontece devido à sua dupla capacidade de ser visualmente bela e comestível (Retamales e Hancock, 2012). O mirtilheiro, é oriundo de várias regiões dos Estados Unidos e Europa, ele possui grande capacidade nutricional e um alto teor de antioxidantes e antiinflamatórios o tornando um fruto com valor econômico na área da saúde (Fachinello, 2008).

Com a expansão do mercado nacional e internacional, aumentou significativamente a demanda por mirtilheiros (*Vaccinium virgatum* Ait) e suas variações, nos últimos 30 anos, sendo estes diplóides, tetraplóides e hexaplóides. Assim a micropropagação *in vitro* de plantas livres de vírus, principalmente, foram muito bem aceitas para fins comerciais e para pesquisas. Sendo que o principal país de produção, o Estados Unidos e o Canadá, onde juntos produzem cerca de 61% da produção global (Retamales e Hancock, 2012).

Existem muitas espécies de mirtilheiros, sendo separados em três grupos com valores comerciais, onde se baseia no genótipo, hábito de crescimento e o tipo do fruto que é produzido. Assim, existem diferenças expressivas no manejo para cada grupo; grupo a) “highbush” (mirtilo gigante), uma espécie tetraplóide, com produção de melhor qualidade, tanto em tamanho como em sabor, o principal representante do grupo é *Vaccinium corymbosum*; grupo b) “rabbiteye”, uma cultivar hexaploide, produz frutos menores e de menor qualidade, em relação ao do grupo, sendo seu principal representante o *Vaccinium ashei* Reade, mas apresenta maior produção por planta, sendo que seus frutos possuem maior tempo de conservação no pós-colheita e o grupo c) conhecida como “lowbush”, apresenta plantas diplóides, com hábito de crescimento rasteiro, frutos de pequeno tamanho, onde são na sua maioria destinados à indústria processadora, são mais comumente conhecidos pela espécie *Vaccinium ashei*. (Rowland, 2010). Assim, é uma cultivar de crescimento mais lento em relação aos demais grupos (Fachinello, 2008).

O mirtilheiro é uma cultura que é comumente propagado por meio de estaquias, micropropagação e rebentos (Hoffmann et al., 1994). No Brasil, a maioria é feita por estaquias, o que acaba levando a resultados insatisfatórios e apresentando grandes variações de acordo com a cultivar (Fachinello et al., 1995). Sendo assim a técnica de micropropagação, acaba tendo bastante destaque, por gerar resultados satisfatórios para a produção de mudas de mirtilheiro (Schuch, 2008).

O principal objetivo da multiplicação é aumentar o número de plantas sem risco biológicos, de acordo com Grattapaglia e Machado (1990), o importante é se obter uma boa taxa de sobrevivência dos exemplares, acompanhado de qualidade, homogeneidade e quantidades de gemas disponíveis.

A micropropagação *in vitro*, apresenta regime heterotrófico, com trocas gasosas e intensidade luminosa controladas (Kubota & Kozai, 1992), além de manter a planta longe de problemas com patógenos e de infectantes, ela fornece à capacidade de uma produção em massa de uma mesma cultivar, sendo clones com a mesma capacidade de produção que sua planta de origem. Mas também a nutrição *in vitro*, é um importante recurso para o aumento da taxa de multiplicação e melhor contribuinte para produção de mudas de ótima qualidade (Schuch, 2005).

Na micropropagação do mirtilheiro, é muito observado à presença de calos, onde o calo é uma massa de células que acabam se proliferando de forma desorganizada, eles se

desenvolvem a partir de um pequeno fragmento da planta, assim determinando à capacidade de se diferenciar nos mais variados tecidos (Paiva & Paiva, 2001; Pierik, 1990; Torres & Caldas, 1990).

A zeatina, é a principal citocinina que é formada naturalmente dentro da planta, pela junção de isopentenil e a adenina (Melo, 2002).

Comumente é utilizado o 2iP (2-isopenteniladenina) na micropropagação de mirtilo, por ele ser um regulador de crescimento, promovendo o desenvolvimento dado como superior em relação às demais citocininas (Schuch et al., 2008).

O Tidiazuron (TDZ), é um regulador de crescimento, que está no grupo das uréias, com ação no metabolismo das citocininas, estimulando ou reduzindo o metabolismo de das citocininas, resultando em um acréscimo de fatores endógenos de citocininas no tecido da planta (MOK et al., 1987). Seus principais efeitos são o aumento de frutificações efetivas e modificações morfológicas nos frutos. Mas em uma cultura *in vitro*, possui ação raleante e de indução da brotação (Petri, 2016).

Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito e interação de diferentes tratamentos utilizando TDZ com 2iP na multiplicação do mirtilheiro da cultivar delite, visando a utilização de reguladores vegetais com menor custo..

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido com a cultivar delite. As plântulas são oriundas de cultivos *in vitro*, já nas condições de assepsia e cultivo ideais, o experimento ocorreu no Laboratório de micropropagação do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

O cultivo *in vitro* foi conduzido em sala de crescimento controlado, sob luz fluorescente de cor branca fria, fotoperíodo de 16 horas, temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e densidade de fluxo de fótons no período de luz de $25 \mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. O material vegetal utilizado foi proveniente da fase de multiplicação *in vitro* em meio com $2,5 \mu\text{M}$ de zeatina, sendo explantes caulinares de aproximadamente 3 cm em posição vertical com 4 a 6 folhas, segmentados e manuseados com bisturís e pinças. Os explantes foram isolados em frascos de 270 ml, contendo 30 mL de meio de cultura WPM - Wood Plant Media (LOYD; McCOWN, 1980), acrescido das vitaminas do meio MS (Murashige e Skoog) na formulação original, mio-inositol ($0,1 \text{g L}^{-1}$), sacarose (30 g) o pH ajustado a 5,2 e autoclavado durante 20 min à 120°C

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 7 tratamentos, com 10 repetições em 2 parcelas. Os tratamentos comparados foram os seguintes:

- T1) $2,5 \mu\text{M}$ de zeatina;
- T2) $0,5 \mu\text{M}$ de TDZ;
- T3) $0,5 \mu\text{M}$ de TDZ e $25 \mu\text{M}$ de 2ip;
- T4) $0,5 \mu\text{M}$ de TDZ com $50 \mu\text{M}$ de 2ip;
- T5) $1 \mu\text{M}$ de TDZ;
- T6) $1 \mu\text{M}$ de TDZ com $25 \mu\text{M}$ de 2ip;
- T7) $1 \mu\text{M}$ de TDZ com $50 \mu\text{M}$ de 2ip.

Após 100 dias do isolamento das amostras, as variáveis analisadas foram taxa de sobrevivência, número de brotações por explante, número de folhas por explante, presença de calos e tamanho das brotações.

Para as análises estatísticas foi utilizado o sistema SISVAR® desenvolvido por Ferreira (2006). A interação entre os tratamentos foi analisada pela ANOVA e as interações significativas entre os tratamentos tiveram suas médias comparadas pelo Teste de Tukey a 0,5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A utilização de TDZ juntamente com 2iP, para o cultivo in vitro de explantes da cultivar delite, sendo estes reguladores aplicados isoladamente ou em combinação para reduzir e/ou substituir à zeatina.

Em relação à variável sobrevivência, a análise de variância (ANOVA) não demonstrou interação significativa entre os tratamentos. Onde a taxa de sobrevivência de todos os tratamentos, obtiveram porcentagens iguais entre estes, relacionado com isso, em Cappelletti et al. (2016), o TDZ e o 2iP, não interferiram na propagação e sobrevivência dos explantes de mirtilheiro.

Quando analisada a variável números de brotos por tratamento, ocorreu diferença significativa entre os tratamentos, sendo que os tratamentos T2, T5, T3 e T4 e não diferiram entre si, bem como os tratamentos T3 e T4 também não diferiram dos demais, bem como T1 e T6 não diferiram entre si e dos anteriores, os tratamentos T1, T3, T6 e T7 não diferiram significativamente entre si, para Cappelletti et al. (2016) o TDZ contribuiu para a formação de folhas e um número satisfatório de brotações, sendo assim ocorreu resultados semelhantes aos observados em Cappelletti et al. (2016) concentrações mais baixas de TDZ, se obtém melhores resultados, quando comparados a outras concentrações, como as utilizadas e descritas por (Rowland e Ogden 1992; Cao et al., 2002; Song e Sink 2004).

Nas avaliações de calos, o TDZ induziu uma elevada formação de calos na base dos explantes, conforme observado em experimentos parecidos desenvolvidos por Cappelletti (2016) e Schuchovski (2020), onde os tratamentos com a presença de TDZ, como os tratamentos T2, T3, T4, T5, T6 e T7, houve uma produção de calos, quando comparados com tratamentos sem a presença do regulador vegetal.

Para a variável de tamanho de brotos, segundo REIS et al. (2008), o comprimento desempenha um papel crucial na sobrevivência e desenvolvimento da planta, para que ocorra um transplante para o campo, assim os tratamentos T1, T3 e T7, obtiveram as médias mais altas, as quais segundo Cappelletti et al. (2016), conforme os tratamentos T1, T3 e T4, a junção de TDZ com 2iP, promoveu alongamento e inibiu o aparecimento de calos, nas concentrações mais elevadas dessa citocinina, mas não foi observado no presente trabalho, quando comparado ao T1.

Tabela 1 - Efeitos da utilização de zeatina, TDZ e 2iP, em diferentes concentrações e combinações, para cultivo in vitro do mirtilheiro, após 100 dias de experimento.

Tratamentos	Sobrevivência %	Nº de brotos	Nº de folhas	de Presença de calos	Tamanho dos brotos
T1 - 2,5 µM de Zeatina	98 a	9,8 bc	11,5 a	0,5 b	2,33 a
T2 - 0,5 µM de TDZ	100 a	14,5 a	6,69 b	4,9 a	0,96 c
T3 - 0,5 µM de TDZ + 25 µM de 2ip	100 a	11,4 abc	6,73 b	5,0 a	1,62 abc
T4 - 0,5 µM de TDZ + 50 µM de 2ip	100 a	12,5 ab	6,76 b	4,9 a	1,39 bc
T5 - 1 µM de TDZ	100 a	15,2 a	6,19 b	5,0 a	1,07 c
T6 - 1 µM de TDZ + 25 µM de 2ip	100 a	9,3 bc	5,7 b	4,9 a	1,43 bc
T7 - 1 µM de TDZ + 50 µM de 2ip	100 a	8,1 c	6,81 b	4,8 a	1,92 ab
Coefficiente de variação (%)	2.4	25.02	20.85	8.72	30.78

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

CONCLUSÃO

A utilização dos reguladores vegetais no meio de cultura, independente da concentração, favoreceu o aparecimento de calos e a taxa de sobrevivência não foi afetada pelos diferentes tratamentos. Quando juntos (TDZ e 2iP), acabaram sendo mais vantajosos, devido ao número de brotações por planta e apresentando tamanhos aceitáveis .

REFERÊNCIAS

CAPPAL, F. GARCIA, A. CULLEN, R. DAVIS, M. MUNOZ, P. **Advancements in Low-Chill Bluerberry *Vaccinium corymbosum* L. Tissue Culture Practices.** Blueberry Breeding and Genomics Laboratory, Horticultural Sciences Departmente, University of Florida, Gainesville, USA.

HOFFMANN, A. MIRTILO. **Aspectos gerais da cultura** Acesso em 15 de agosto de 2005.

HOFFMANN, A. **Propagação de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) através de estacas** 1994. 94f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

SCHUCHOVSKI, C; SANTOS, B. F. S; MARRA, R. C; BIASI, L. A. **Morphological and anatomical insights into de novo shoot organogenesis of in vitro “Delite” rabbiteye blueberries.** Heliyon, v6, n.11, November 2020.

LIA, Q. YUB, P. JINGRU, L. MENGMENG, G. **Micropropagation of the potential blueberry rootstock - *Vaccinium arboreum* through axillary shoot proliferation.** Scientia Horticulturae. V - 280. Abril.

DAMIANI, C.R.; SCHUCH, M.W. **Multiplicação fotoautotrófica de mirtilo através do uso de luz natural.** Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v.30, n.2, p.000-000, 2008 (no prelo).

H, J. G, A. S, M. **Effect of Mesos Components (MgSO₄, CaCl₂, KH₂PO₄) on In Vitro Shoot Growth of Blackberry, Blueberry, and Saskatoon.** Institute of Plant Genetics and Biotechnology, Plant Science and Biodiversity Center, Slovak Academy of Sciences, 950 07 Nitra, Slovakia.

MELO, N.F. **Hormônios e Reguladores de Crescimento Vegetal.** EMBRAPA Semi-Árido. Petrolina - PE. 2002.

ROWLAND, L; ORDEN, E; EHLENFELDT, M. **EST-PCR markers developed for highbush blueberry are also useful for genetic fingerprinting and relationship studies in rabbiteye blueberry.** Scientia Horticulturae. V. 125. Issue 4, 26 July, 2010. pg 779-784.

FACHINELLO, José Carlos Blueberry. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 30, n. 2, p. 285-289, 2008. DOI: 10.1590/S0100-29452008000200001.

MOK, M.C.; MOK, D.W.S.; TURNER, J.E.; MUJER, C.V. **Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivatives in tissue culture systems.** HortScience. Virginia, EUS, v.22, n.6, p.1194-1197. 1987.

PETRI, J. L; HAWERROTH, F. J; LEITE, G. B; SEZERINO, A. A; COUTO, M. **Reguladores de crescimento para frutíferas de clima temperado.** EPAGRI. Florianópolis. 2016.

- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C. et al. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas** Brasília: Embrapa-SPI / Embrapa-CNPq, 1998. V.1, p.183-260.
- OLIVEIRA, B. A; JEWSKI, P. M; RAMM, A; MATTOS, M. G; SHUCH, M. W; ASSIS, À. M. **Substâncias húmicas e 2-isopenteniladenina na multiplicação in vitro de mirtilheiro “woodard”**. Universidade Federal de Pelotas.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. **Micropropagação**. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA SPI/EMBRAPA-CNPq, 1998. v. 1, p. 183-260.
- SCHUCH, M. W.; DAMIANI, C. R.; SILVA, L. C.; ERIG, A. C. **Micropropagação como técnica de rejuvenescimento em mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) cultivar clímax**. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 32, n. 3, p. 814-820, 2008.
- KOZAI, T; KUBOTA, C. **Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants**. Journal of Plant Research, Tokyo, v.114, p.525-537, 2001.
- SCHUCH, M. W.; ERIG, A. C. **Micropropagação de plantas frutíferas**. In: FACHINELLO, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Brasília: DF: Embrapa Informação Tecnológica. p.155-173. 2005.
- SCHUCH, M. W; DAMIANI, C. R. **Diferentes substratos e ambientes no enraizamento in vitro de mirtilo**. Fitotecnia. Cienc Rural 39 (2). Abr 2009.
- SCHUCH, M. W; DAMIANI, C. R. **Enraizamento in vitro de mirtilo em condições fotoautotróficas**. Fitotecnia. Cienc Rural 39 (2). Abr 2009.
- FACHINELLO, J. C. et al. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado** 2. ed. Pelotas: UFPel, 1995. 179p.
- RETAMALES, J. B.; HANCOCK, J. F. **Blueberries**. Oxfordshire: CABI, 2012.
- ROWLAND, L.J; OGDEN, E.L. **Use of a cytokinin conjugate for efficient shoot regeneration from leaf sections of highbush blueberry**. HortScience 27. 1127-1129. 1992.
- CAO, X; HAMMERSCHALAG, F.A; DOUGLASS, L. **A two-step pretreatment significantly enhances shoot organogenesis from leaf explants of highbush blueberry cv Bluecrop**. HortScience 37, 819-821. 2002.
- SONG, G. Q; SINK, K.C. **Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.)**. Plant Cell Rep. 23, 475-484. 2004.
- PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O. **Textos acadêmicos: cultura de tecidos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 97 p.
- PIERIK, R.L.M. **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. Martins Nijoff, 1990. 326p.
- TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA/ CNPq, 1990. 433p.