

MARCUS DHILERMANDO HORA DE SOUZA

**TROCAS GASOSAS E QUALIDADE DE LUZ NA MICROPROPAGAÇÃO DE
CLONES DE *Corymbia torelliana* x *C. citriodora***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Aloisio Xavier

Coorientador: Wagner Campos Otoni

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

S729t
2024 Souza, Marcus Dhilermando Hora de, 1997-
Trocas gasosas e qualidade de luz na micropropagação de
clones *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* / Marcus
Dhilermando Hora de Souza. – Viçosa, MG, 2024.
1 dissertação eletrônica (57 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Aloísio Xavier.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Engenharia Florestal, 2024.
Referências bibliográficas: f. 48-57.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.296>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Corymbia torelliana* - Propagação - Efeito da luz. 2.
Corymbia citriodora - Propagação - Efeito da luz.
3. Biotecnologia. 4. Irradiância espectral. 5. Clonagem. I. Xavier,
Aloísio, 1965-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Engenharia Florestal. Programa de
Pós-Graduação em Ciência Florestal. III. Título.

GFDC adapt. CDD 22. ed. 634.923219

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB-6/2523

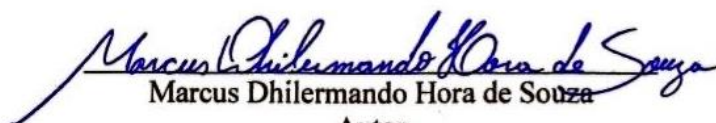
MARCUS DHILERMANDO HORA DE SOUZA

**TROCAS GASOSAS E QUALIDADE DE LUZ NA MICROPROPAGAÇÃO DE
CLONES DE *Corymbia torelliana* x *C. citriodora***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 29 de Fevereiro de 2024.

Assentimento:


Marcus Dhilermando Hora de Souza
Autor


Aloisio Xavier
Orientador

À amizade...

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente à Divina Providência, ao Altíssimo, pelos 729 dias vividos em função exclusiva do Mestrado. Foram 729 vitórias, porque o amanhecer de um novo dia representa uma indescritível vitória.

Ao Estado brasileiro, princípio e fim da educação pública de nível superior no Brasil, por me permitir cursar o Programa de Mestrado que desejei na instituição que eu escolhi.

À minha família, que principalmente através de minha Mãe e Avó, Carla e Natália Hora, respectivamente, nunca deixaram de me apoiar, acreditar em minhas escolhas e me propiciarem a conquista do bem mais valioso que qualquer pessoa pode ter. A educação.

À minha estimada antiga orientadora de Iniciação Científica (Embrapa - CNPMPF), Karen Fialho, que mesmo longe, sempre se fez presente através das agradabilíssimas conversas remotas.

À minha casa de sempre, eterna *alma mater*, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia por ser a pedra fundamental de tudo.

À Universidade Federal de Viçosa e à empresa CMPC-Celulose Riograndense, pelos muitos e felizes momentos, que me trouxeram grandes, profundos e pétreos ensinamentos.

Aos membros da banca avaliadora, na pessoa do meu prestigiado Orientador Prof. Aloisio Xavier, pela paciência e por gentilmente cederem seu tempo ao aceitarem participar deste momento, contribuindo para o enriquecimento da pesquisa produzida.

Ao Prof. Wagner Otoni, pela grande afabilidade que sempre nos demonstra ter, servindo de inspiração a todos que tem a feliz oportunidade de conhecê-lo.

Aos meus muito estimados amigos, os quais guardarei sempre em boa memória, especialmente Sérgio Paiva, Aléxia Diniz, Pedro Queiróz, Elisandra Sousa, Michelle Viana, Quézia Dutra, Tatiane Silva, Michelle Araújo, Jéssica Ribeiro, Lana Dias, Claudinei Silva, Lázara Simões, Terezinha Campos, Kleiton Machado, Andréa Koehler, Marcos e Letícia Barbosa, Sandy Martins, Yara Araújo, Luiza Monteiro, Émerson Silveira, Adriely Abreu e Ravi Sant'ana. A vocês, meu mais sincero e profundo, muito obrigado!

A todos os amigos que porventura me esqueci de citar, colegas, funcionários e colaboradores com os quais tive a felicidade de conviver nestes 24 meses.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Non, je ne regrette rien

Edith Piaf

BIOGRAFIA

Nascido em 21 de setembro de 1997, no Município de Wagner, Bahia, Marcus Dhilermando Hora de Souza, filho de Carla Célia Hora e Marcos Paulo Costa de Souza, concluiu o Ensino Médio Integrado ao Técnico em 2015 na Escola Família Agrícola Mãe Jovina (EFAMJ), em Ruy Barbosa, Bahia.

Em 01 de setembro de 2016, ingressou no curso de Engenharia Florestal, na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), campus de Cruz das Almas, Bahia, graduando-se 10 semestres depois, em 03 de março de 2022. No mesmo dia, ingressou no Mestrado em Ciência Florestal pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), campus de Viçosa, Minas Gerais, submetendo-se à defesa pública da dissertação em 29 de fevereiro de 2024.

RESUMO

SOUZA, Marcus Dhilermando Hora de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2024. **Trocas gasosas e qualidade de luz na micropropagação de clones de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora***. Orientador: Aloisio Xavier. Coorientador: Wagner Campos Otoni.

A cultura de tecidos apresenta-se como importante técnica de propagação clonal, permitindo melhor produção de mudas para espécies de difícil enraizamento em viveiros. Buscou-se avaliar o efeito das trocas gasosas associadas às concentrações de sacarose, bem como uso de diferentes qualidades de luz na micropropagação, analisando a produtividade de propágulos, desenvolvimento morfofisiológico e enraizamento de microestacas na condição *ex vitro* em dois clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora*. Os explantes foram cultivados em frascos selados com tampas sem membranas permeáveis a gases [troca gasosa de $14 \mu\text{L L}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ CO}_2$] ou com duas membranas [troca gasosa de $25 \mu\text{L L}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ CO}_2$], e diferentes concentrações de sacarose (0, 15 ou 30 g L^{-1}) no meio de cultura JADS. A partir destes resultados uma condição de troca gasosa e sacarose foi definida, variando-se em um novo experimento as fontes de luz, sendo testadas: luz fluorescente, LEDs branca, vermelho/azul (3:1) e azul. O uso de $14 \mu\text{L L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ de troca gasosa e 15 g L^{-1} de sacarose favoreceram a produtividade de propágulos. A taxa de $25 \mu\text{L L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ de troca gasosa aumentou as concentrações de clorofilas, carotenoides, amido, açúcares, fenóis, malato, fumarato, prolina, aminoácidos totais e proteína. A presença de membranas e sacarose incrementaram a atividade fotossintética. A atividade enzimática da SOD foi aumentada com $25 \mu\text{L L}^{-1} \text{ s}^{-1}$. O enraizamento de microestacas foi favorecido com uso 15 g L^{-1} de sacarose e presença de membranas. A luz branca reduziu a produtividade de propágulos, enquanto a azul produziu brotações mais alongadas e a vermelho/azul (3:1) incrementou a biomassa. O enraizamento das microestacas foi favorecido quando os propágulos foram micropropagados sob a luz fluorescente em ambos os clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora*.

Palavras-chave: Silvicultura clonal; Biotecnologia; Propagação fotoautotrófica; Irradiância.

ABSTRACT

SOUZA, Marcus Dhilermando Hora de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2024. **Gas exchange and light quality in the micropropagation of *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* clones.** Adviser: Aloisio Xavier. Co-advisers: Wagner Campos Otoni.

Tissue culture presents itself as an important technique for clonal propagation, allowing better seedling production for species that are difficult to root in nurseries. The aim was to evaluate the effect of gas exchange associated with sucrose concentrations, as well as the use of different light qualities in micropropagation, analyzing the productivity of propagules, morphophysiological development, and rooting of microcuttings in ex vitro conditions in two hybrid clones of *Corymbia torelliana* x *C. citriodora*. The explants were cultivated in sealed jars with lids without gas-permeable membranes [gas exchange of $14 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1} \text{CO}_2$] or with two membranes [gas exchange of $25 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1} \text{CO}_2$], and different concentrations of sucrose (0, 15, or 30 g L^{-1}) in the JADS culture medium. From these results, a condition of gas exchange and sucrose was defined, varying the light sources in a new experiment, testing: fluorescent light, white LEDs, red/blue (3:1) LEDs, and blue LEDs. The use of $14 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$ and 15 g L^{-1} of sucrose favored the productivity of propagules. The rate of $25 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$ increased the concentrations of chlorophylls, carotenoids, starch, sugars, phenols, malate, fumarate, proline, total amino acids, and protein. The presence of membranes and sucrose increased photosynthetic activity. SOD enzymatic activity was increased with $25 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$. The rooting of microcuttings was favored with the use of 15 g L^{-1} of sucrose and the presence of membranes. White light reduced propagule productivity, while blue light produced longer shoots and red/blue (3:1) light increased biomass. The rooting of microcuttings was favored when propagules were micropropagated under fluorescent light in both hybrid clones of *Corymbia torelliana* x *C. citriodora*.

Keywords: Clonal silviculture; Biotechnology; Photoautotrophic propagation; Irradiance.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Material vegetal.....	16
3.2. Experimento I: Trocas gasosas e concentração de sacarose	16
3.3. Experimento II: Qualidade de luz.....	18
3.4. Avaliações e análises realizadas na condição in vitro	20
Desenvolvimento e produtividade de microestacas	20
Atividade dos metabólitos primários (Trocias Gasosas)	20
Atividade fotossintética in vitro	20
Quantificação da atividade da superóxido dismutase.....	21
Caracterização anatômica	21
3.5. Enraizamento de microestacas e altura de muda ex vitro	22
3.6. Delineamento experimental	22
4. RESULTADOS	23
4.1. Experimento I: Trocas gasosas e concentração de sacarose	23
Desenvolvimento e produtividade de microestacas	23
Atividade dos metabólitos primários e fotossíntese in vitro.....	26
Atividade da superóxido dismutase.....	33
Caracterização anatômica	33
Enraizamento de microestacas e altura de muda ex vitro.....	35
4.2. Experimento II: Qualidade de luz.....	38
Desenvolvimento e produtividade de microestacas	38
Atividade da superóxido dismutase.....	40
Caracterização anatômica	40
4.3. Enraizamento de microestacas e altura de muda ex vitro	42
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÕES	47
7. BIBLIOGRAFIA	48

1. INTRODUÇÃO

Dos 4 bilhões de hectares (ha) de florestas no planeta, 294 milhões de ha são de florestas plantadas (FAO, 2020). Em 2022, o Brasil alcançou marco recordista de 9,94 milhões ha de florestas plantadas. Isso representou aumento de 30,98% em relação a 2012, registrando saldo na balança comercial para o setor de US\$ 14,3 bilhões, dos quais US\$ 8,4 bilhões correspondem à produção de celulose. O Brasil é o país líder global em exportação dessa matéria prima, seguido dos Estados Unidos, Canadá, Suécia, Finlândia e Chile, enquanto os demais produtos de base florestal, como papel, painéis, carvão e outros, somam os US\$ 5,9 bilhões restantes (IBÁ, 2023).

A principal região produtora de florestas plantadas no Brasil localiza-se entre as latitudes 15°S e 30°S, correspondendo às regiões Sudeste, Centro-Oeste e Sul do país (IBÁ, 2023), em razão de suas condições climáticas favoráveis ao cultivo florestal (ELLI et al., 2020). Entretanto, as mudanças climáticas representam importante fator limitante na expansão de áreas para plantios florestais. Perdas da ordem de 200 mil ha de *Eucalyptus* foram registradas decorrentes de alterações do clima na região e, ainda assim, as áreas florestais continuam em expansão, mesmo para locais com condições climáticas adversas ao plantio (GONÇALVES et al., 2017).

Tal expansão tem direcionado o setor florestal a buscar materiais genéticos melhor adaptados às novas e desafiadoras condições de cultivo. Neste sentido, o gênero *Corymbia*, especialmente seu híbrido comercial mais importante, *Corymbia torelliana* x *C. citriodora*, vem ganhando notoriedade por sua ampla variabilidade genética (ARAUJO et al., 2020; TAMBARUSSI et al., 2018), densidade de madeira igual ou superior à encontrada em espécies de *Eucalyptus* (ARAUJO et al., 2023; MASSUQUE et al., 2023), elevada produtividade de celulose (COSTA et al., 2022), carvão (LOUREIRO et al., 2021), rápido crescimento, resistência à seca, geadas, altas temperaturas e às principais patologias que afetam os plantios florestais, como o pisilídeo de concha, vespa da galha e ferrugem (ASSIS, 2014; REIS et al., 2013, 2014).

O principal método de produção de mudas clonais adotado nos viveiros florestais para o *Corymbia* é a propagação vegetativa por miniestaquia. Entretanto, sua propagação ainda apresenta dificuldades nestas condições (BRYANT e TRUEMAN, 2015). Pesquisas têm buscado melhorar a propagação para o gênero, onde alguns avanços foram obtidos com o uso de brotações obtidas a partir do lignotuber para coleta de estacas (ASSIS, 2014; REIS et al., 2013), uso de estufins (BRONDANI et al., 2018; LIMA et al., 2022), reguladores de

crescimento (MARAVILHA et al., 2023; SOUZA et al., 2020a), e também o estabelecimento e propagação inicial da cultura in vitro (MOLINARI et al., 2023; SOUZA et al., 2020a; SOUZA et al., 2020b; SOUZA et al., 2019; TRUEMAN et al., 2018).

Dado o forte potencial comercial madeireiro do *Corymbia*, tem sido imprescindível desenvolver formas de propagação mais eficientes que reflitam em maior produtividade de mudas para fomentar as crescentes áreas de florestas plantadas. Deste modo, a micropropagação pela proliferação de gemas axilares pela cultura de tecidos pode maximizar a produtividade de microestacas, fixar através da clonagem os ganhos obtidos com o melhoramento genético, revigorar o genótipo pela propagação seriada in vitro, fornecendo material vegetal com elevada qualidade fitossanitária (TRUEMAN et al., 2018; XAVIER et al. 2021), além de viabilizar a criação de amplos bancos de germoplasma e facilitar o intercâmbio de material genético.

Quando propagadas in vitro, as plantas reduzem parcialmente sua condição de organismos autotróficos, comprometendo sua qualidade fisiológica e aumentando a dependência às condições do ambiente in vitro (ALVES, et al., 2024; FORTINI et al. 2021). Com isso, há a adaptação da planta a um sistema heterótrofico, rico em macro e micro nutrientes, onde a fonte de carbono fundamental à fotossíntese deixa de ser o CO₂ atmosférico e passa a ser açúcares disponibilizados no meio de cultura. Tal forma de propagação submete a planta a um ambiente com acúmulo de etileno, elevada umidade, estômatos disfuncionais, baixa concentração de CO₂, redução da radiação fotossinteticamente ativa, desordens morfofisiológicas prejudiciais ao desenvolvimento da planta, maiores perdas por contaminação e subsequente insucesso na aclimatização ex vitro (ALVES et al., 2024; NGUYEN et al., 2020; TISARUM et al., 2018).

Como forma de potencializar a propagação vegetativa, estratégias que permitam trocas gasosas in vitro, associados à redução dos níveis de sacarose (FORTINI et al. 2021; MOLINARI et al., 2023; SOUZA et al., 2020b; TISARUM et al., 2018), bem como a adoção de lâmpadas com diferentes qualidades espectrais (BATISTA et al., 2018; FRADE et al., 2023; MIRANDA et al., 2020; SOUZA et al., 2022ab), vem sendo adotados com relativo êxito na busca por sistemas de propagação fotoautotróficos ou fotomixotróficos eficientes para plantas lenhosas que elevem a produtividade de microestacas e estimulem seu posterior enraizamento ex vitro.

Novas pesquisas têm destinado atenção a qualidade da luz disponibilizada à planta na propagação in vitro. Fundamental à fotossíntese, a luz desencadeia uma série de alterações fotomorfogênicas, provocando incremento de biomassa (LI et al., 2023a; SILVA et al., 2020),

aumento do número de brotações por explante, modificações anatômicas (FRADE et al., 2023; SOUZA, et al., 2022b), aumento na produtividade de metabólitos, pigmentos fotossintéticos (BATISTA et al., 2018; DONG, et al., 2023), e estímulo ao enraizamento adventício em diferentes espécies, podendo levar a uma aclimatização ex vitro bem sucedida (FARROKHZAD, et al., 2022; FRADE et al., 2023; RODRIGUES et al., 2022; SOUZA et al., 2022a).

Na cultura de tecidos, a alta taxa de multiplicação acelera os programas de propagação clonal e possibilita a rápida multiplicação de híbridos de alto valor genético e comercial com limitações em sua propagação vegetativa, como ocorre com o gênero *Corymbia*. Então, um sistema de trocas gasosas associado à redução de sacarose no meio de cultura e à melhores qualidades da luz fornecidas às plantas durante a micropropagação, surgem como métodos promissores na efetiva propagação clonal de espécies e híbridos de *Corymbia*, buscando superar barreiras à clonagem, com grandes potencialidades de automação no processo de propagação em escala comercial, reduzindo perdas por contaminação, produzindo maior número de plantas viáveis em menor espaço, tempo e reduzida mão de obra.

Assim, o presente estudo objetiva avaliar as alterações morfofisiológicas e de produtividade de propágulos em dois clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora*, estabelecidos in vitro por meio da micropropagação via proliferação de gemas axilares, quando submetidos a: (I) diferentes níveis de trocas gasosas e concentrações de sacarose; (II) diferentes qualidades espectrais de luz.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Corymbia*

O gênero *Corymbia*, anteriormente classificado como pertencente ao gênero *Eucalyptus*, teve sua primeira espécie descrita em 1788 por Gaertner como *Metrosideros gummifera*, sendo renomeada em 1793 para *E. corymbosa* e posteriormente reclassificada dentro do novo gênero, *Corymbia*, como *C. gummifera* em 1995 por Hill e Johnson, que catalogaram outras 113 espécies do recém criado gênero, apontando a Austrália como seu berço de ocorrência natural.

De vasta amplitude genética, o *Corymbia* spp. têm sido frequente alvo de estudos para melhoramento genético e propagação clonal. Com distribuição natural na região de

Queensland e New South Wales, Austrália, as espécies *C. torelliana*, *C. citriodora* e o híbrido por elas originado, são as mais notáveis neste sentido em função do grande interesse econômico por traz de suas favoráveis características produtivas. No Brasil são recomendadas para plantio onde as condições bióticas e abióticas dificultam o cultivo de espécies de *Eucalyptus* em razão das progressivas mudanças climáticas (TAMBARUSSI et al., 2018).

O *Corymbia* possui grande dificuldade em sua propagação vegetativa devido principalmente a dificuldades no enraizamento de estacas. Os índices de enraizamento para o gênero giram em torno de 5% de sucesso, exceto para *C. torelliana* onde o enraizamento tem sido considerado viável, com média de 30%, razão pela qual tem sido utilizado como genitor materno no cruzamento híbrido *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (REIS et al., 2013, 2014). Este híbrido apresenta ótima adaptabilidade a diferentes condições ambientes, tem rápido crescimento e é importante fonte de matéria-prima para diversos setores industriais, principalmente para a produção de papel e celulose, construção civil, movelaria, produção de carvão vegetal e extração de compostos fármacos (ASSIS, 2014).

A eucaliptocultura (que engloba espécies *Eucalyptus* e *Corymbia*) tem ganhado cada vez mais espaço no setor florestal, correspondendo a 76% da área de florestas plantadas no Brasil (IBÁ 2023). Em função de demandas cada vez maiores, a clonagem de genótipos superiores tornou-se a alternativa mais viável para o estabelecimento de plantios clonais em substituição aos plantios seminiais por volta da década de 1979 na região litorânea do Espírito Santo, Brasil, onde, a partir de então, a técnica ganhou notoriedade por replicar genótipos comercialmente importantes (HIGASHI et al., 2000).

Entre as técnicas de clonagem, a micropropagação pela cultura de tecidos tem sido amplamente difundida para plantas de difícil enraizamento, como o *Corymbia* spp., tendo diversas aplicações práticas, como rejuvenescimento/revigoração do material clonal, aumento do enraizamento adventício, maior produtividade de microestacas, manipulação gênica, limpeza clonal, duplicação cromossômica, além da conservação de germoplasma em bancos clonais (TRUEMAN et al., 2018; XAVIER et al. 2021).

Nos dias atuais, muito se tem falado a respeito do “apagão florestal” que atingirá a indústria florestal nos próximos anos em virtude da escassez de mudas para subsidiar os plantios de florestais. Tal especulação se deve ao acelerado crescimento das áreas de florestas plantadas que esbarram em um fator limitante: a capacidade de produção de mudas dos viveiristas. Assim, a cultura de tecidos tem surgido como alternativa para contornar esta barreira.

2.2. Cultura de Tecidos

A cultura de tecidos é uma técnica relativamente antiga e aplicada principalmente em culturas agrícolas. Até onde se sabe, o conceito foi pioneiramente explorado no final do século XIX e início do século XX com experimentos de cultura em células vegetais isoladas, pelo botânico Gottlieb Haberlandt (HABERLANDT, 1902). Contudo, apenas por volta de 1930 que a técnica foi aperfeiçoada dando origem aos meios de cultura mais elaborados e com maior controle das condições de cultivo (MURASHIGE, 1974; MURASHIGE; SKOOG 1962; WHITE, 1943; WHITE, 1934). Mas com a necessidade de melhoria da clonagem de espécies florestais e hibridizações complexas, os estudos foram se tornando mais específicos e voltados à propagação de mudas, principalmente buscando trazer maior vigor fisiológico (DUTRA et al., 2009).

A micropropagação possibilita a regeneração de órgãos, tecidos, células e plantas inteiras sob condições assépticas e rigorosamente controladas em ambiente laboratorial, disponibilizando ao material vegetal todos os nutrientes, água, carboidratos, luz e temperatura necessários a seu desenvolvimento, podendo, assim, haver maior controle das variáveis e melhor direcionamento do desenvolvimento morfogênico *in vitro* para atender às demandas pretendidas, como produção de mudas, metabólitos e compostos bioativos (PHILLIPS; GARDA, 2019).

Muitos meios de cultura foram desenvolvidos para diversas espécies. Para o eucalipto, os meios mais utilizados são o MS (MURASHIGE; SKOOG 1962), criado para plantas herbáceas. O Wood Plant Medium (McCOWN; LLOYD, 1981), para plantas lenhosas. E o meio proposto por Gonçalves (1982), elaborado conforme as demandas nutricionais do *E. urophylla*, que posteriormente foi adaptado para o híbrido de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* tornando-se o meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995).

Entretanto, a aplicação da micropropagação para o eucalipto ainda é limitada pelo alto custo de implantação e manutenção de um laboratório que atenda às demandas de produção, a ponto de torná-lo economicamente viável. Outro desafio é a grande especificidade dos clones em relação aos meios de cultura, tornando difícil que um único meio possa satisfazer as demandas nutricionais da maioria das espécies de eucalipto de forma eficaz. Existem ainda fontes de variação difíceis de controlar na cultura de tecidos, como a homogeneidade da fonte de carbono adicionada ao meio de cultura, a padronização das trocas gasosas *in vitro* e a incidência de irradiância luminosa que cada planta recebe.

2.3. Propagação Fotoautotrófica

O cultivo *in vitro* proporciona às plantas um ambiente de crescimento controlado, onde a planta dispõe de condições favoráveis ao seu desenvolvimento, principalmente carbono disponibilizado na forma de açúcares, sendo este, denominado de cultivo heterotrófico. Contudo, a propagação heterotrófica traz barreiras na transição do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*, uma vez que por estar inserida em um ambiente altamente favorável a seu desenvolvimento, a planta reduz a funcionalidade dos órgãos e estruturas, baixando a capacidade fotossintética, abertura estomática, enraizamento, entre outras, tornando-a menos propensa à adaptação para o ambiente *ex vitro*, acarretando em elevadas perdas durante a aclimatização (KOZAI et al., 2005; NGUYEN et al., 2020; TISARUM et al., 2018).

De modo inverso, o cultivo fotoautotrófico ou fotomixotrófico, promove a eliminação ou redução de açúcares no meio de cultura e aumento das trocas gasosas. Com isso, a planta micropropagada recebe estímulos à sua autotrofia, elevando as taxas fotossintéticas, a produção de fotoassimilados, compostos metabólitos, melhor organização vascular, o crescimento e desenvolvimento vegetal, favorecendo uma transição melhor sucedida entre o ambiente *in vitro* para o *ex vitro* durante o enraizamento e aclimatização de mudas (KOZAI, 2010; KOZAI, T.; NGUYEN, 2003; NGUYEN et al., 2020; ZOBAYED et al., 2000).

O conceito de micropropagação fotoautotrófica é derivado do fato uma que muitas das plantas clorofiladas possuem elevada capacidade fotossintética quando cultivadas *in vitro* em meio de cultura ausente de açúcares (BIDABADI; JAIN, 2020; KOZAI, 2010). Vários autores tiveram sucesso no cultivo fotoautotrófico de plantas, como *Ananas comosus* (ALVES et al., 2024), *Eryngium foetidum* (SILVA et al., 2024), *Cannabis sativa* (ZAREI et al., 2021), *Pfaffia glomerata* (SALDANHA et al., 2014), *Hypericum perforatum* (COUCEIRO et al., 2006), *Acacia mangium*, *Coffea arabusta*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Garcinia mangostana*, *Azadirachta indica*, *Paulownia fortunei* e *Pinus radiata* (KOZAI e KUBOTA, 2001).

Além destes fatores, recentes pesquisas tem demonstrado a grande relevância da qualidade dos diferentes espectros de luz na fotomorfogênese *in vitro*, induzindo aumento da biomassa, melhor desenvolvimento, estímulo à rizogênese *in vitro* e *ex vitro*, maior fotossíntese, produtividade de fotoassimilados, metabólicos primários e secundários, além de impulsionar a produtividade de propágulos, o alongamento de brotos e o acúmulo de proteínas (BATISTA et al., 2018; FARROKHZAD, et al., 2022; FRADE et al., 2023; LI et al., 2023a; OLIVEIRA et al., 2020; RODRIGUES et al., 2022; SOUZA et al., 2022a,b).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II (LCT-II) do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa/MG. O material genético utilizado para obtenção dos explantes foram dois clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora*, aqui nominados de C01 e C02, mantidos em banco de germoplasma in vitro do LCT-II.

Os clones híbridos de *Corymbia* utilizados são mantidos em banco de germoplasma in vitro em tubos de ensaio de 25mm x 150mm, contendo 10 ml meio de cultura JADS (CORREIA et al., 1995), suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO, USA), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma Chem. Co. St Louis, USA), 800 mg L⁻¹ de PVP-30 (polivinilpirrolidona - Vetec[®]), 6 g L⁻¹ de ágar (Plant TC Micropropagation Grade, Phytotechnology Lab[®]), 0,5 mg L⁻¹ de BA (6-benziladenina – Sigma Co.) e 0,01 mg L⁻¹ de ANA (ácido α -naftalenoacético – Sigma Co.), encontrando-se no 83^o subcultivo. Cada subcultivo foi realizado \pm 30 dias. A cada subcultivo apenas as melhores e mais vigorosas brotações foram propagadas, visando elevar a qualidade e homogeneidade das plantas doadoras de explantes para fins experimentais.

Como fontes de explantes, foram utilizadas plantas previamente micropropagadas, das quais foram extraídos propágulos agrupados contendo \pm 3 microbrotações com \pm 0,5 cm de comprimento e inoculadas em seus respectivos tratamentos. Todos os meios de cultura tiveram seu pH ajustados para 5.8 antes de serem autoclavados por 20 minutos à temperatura de 121°C e pressão de aproximadamente 1 kgf cm⁻².

3.2. Experimento I: Trocas gasosas e concentração de sacarose

As microbrotações foram inoculadas em frascos de vidro, com 347 mL de capacidade, contendo 50 mL do meio de cultura JADS, suplementado com 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 800 mg L⁻¹ de PVP-30, 6 g L⁻¹ de ágar, 0,05 mg L⁻¹ de BA, 0,27 mg L⁻¹ de AIB (ácido indolil-3-butírico - Sigma Co) e ausência ou presença de 15 g L⁻¹ ou 30 g L⁻¹ de sacarose. As concentrações aqui utilizadas foram determinadas a partir de ensaios (dados não mostrados).

Foram inoculados \pm 3 microbrotações por frasco. Se utilizou duas formas de vedação (BATISTA et al., 2017), com tampas rígidas de polipropileno (TRP) sem membrana

[taxa de troca de CO_2 de $14 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$], e com TRP com dois orifícios de 10 mm cobertos por membranas de fluoroporo hidrofóbica (PTFE, MilliSeal® AVS-045 Air Vent, Tokyo, Japan) de $0,45 \mu\text{m}$ de poros [taxa de troca de CO_2 de $25 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$] (Figura 1).

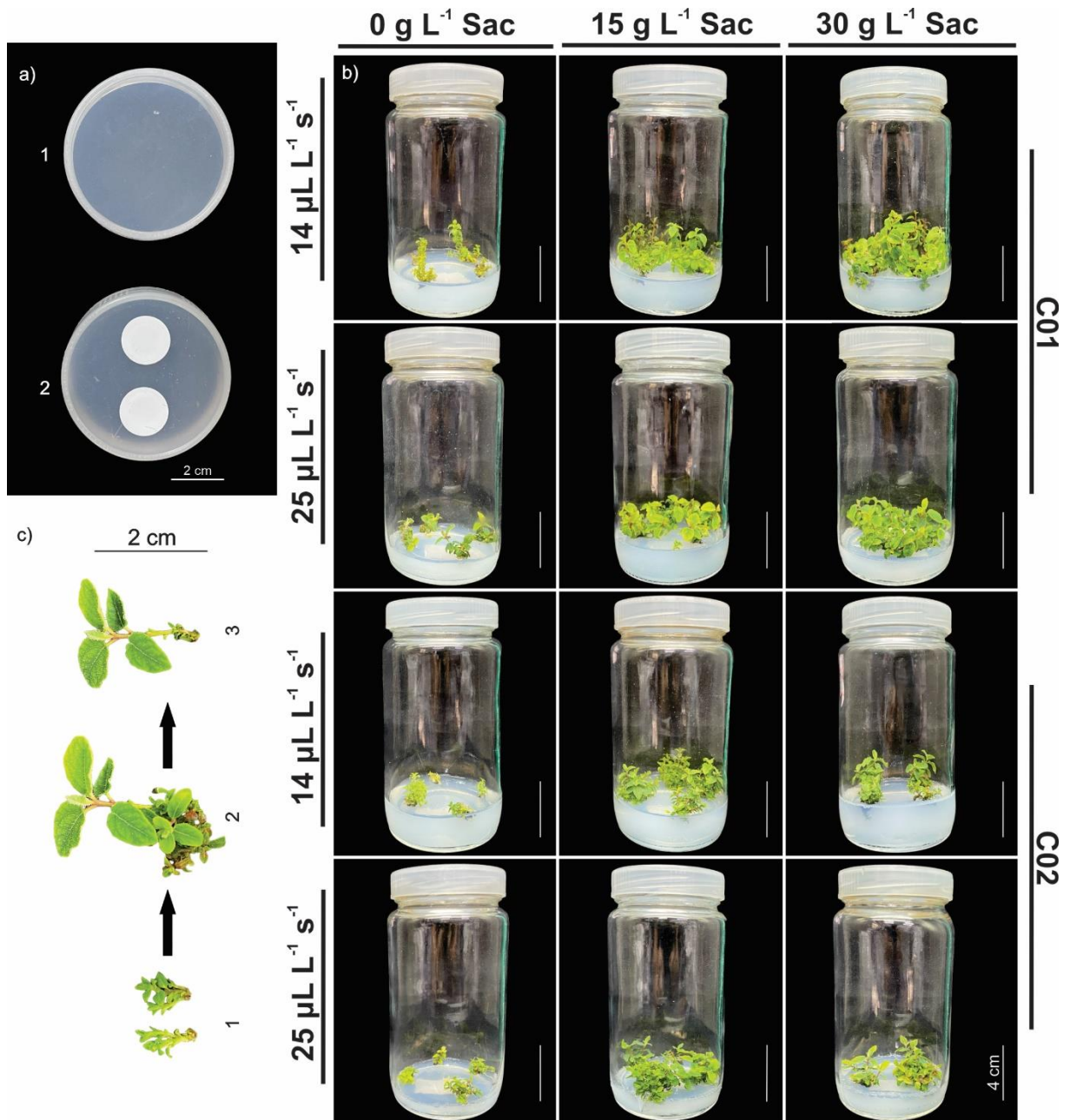


Figura 1 – **a**) Vedação dos frascos utilizada: **1** - Tampa rígida de polipropileno (TRP) [taxa de troca de CO_2 de $14 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$], e **2** - TRP com duas membranas [taxa de troca de CO_2 de $25 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$]. **b**) Frascos com brotações de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* aos 30 dias de cultivo in vitro. **c**) **1** - Explante inicial da cultura, **2** - Brotações desenvolvidas aos 30 dias de cultivo in vitro, **3** - Microestacas utilizadas para enraizamento ex vitro em casa de vegetação.

O experimento foi mantido por 30 dias em sala de crescimento sob irradiância de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (padronizada através de um irradiômetro LI-250A, LI-COR® Inc., Lincoln, NE),

fornecidos por quatro lâmpadas fluorescentes (HO Sylvania T12, 110 W, São Paulo, Brasil), com fotoperíodo de 16 h e temperatura de 25 ± 2 °C. A irradiância foi mensurada por meio de um irradiômetro.

3.3. Experimento II: Qualidade de luz

As microbrotações foram inoculadas em frascos de vidro, com 347 mL de capacidade, contendo 50 mL do meio de cultura JADS, suplementado com 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 800 mg L^{-1} de PVP-30, 6 g L^{-1} de ágar, $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de BA, $0,27 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB, 15 g L^{-1} sacarose e vedado com TRP com dois orifícios de 10 mm cobertos por membranas PTFE de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ de poros (TTCO_2 de $25 \text{ }\mu\text{L L}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Foram testadas quatro fontes de luz: lâmpadas fluorescentes [F L] (HO Sylvania T12, 110 W, São Paulo, Brasil), Lâmpada LED branco [L B] (SMD 100, 18 W, Vilux[®], Vitória, ES, Brasil), Lâmpada LED vermelho/azul (3:1) [L V/A (3:1)] (LabPARLL-HR / DB-480, 11,6 W, LabLumens[®], Carapicuíba, SP, Brasil) e azul [L A] (LabPARLL-HR / DB-480, 11,6 W, LabLumens[®], Carapicuíba, SP, Brasil), figura 2.

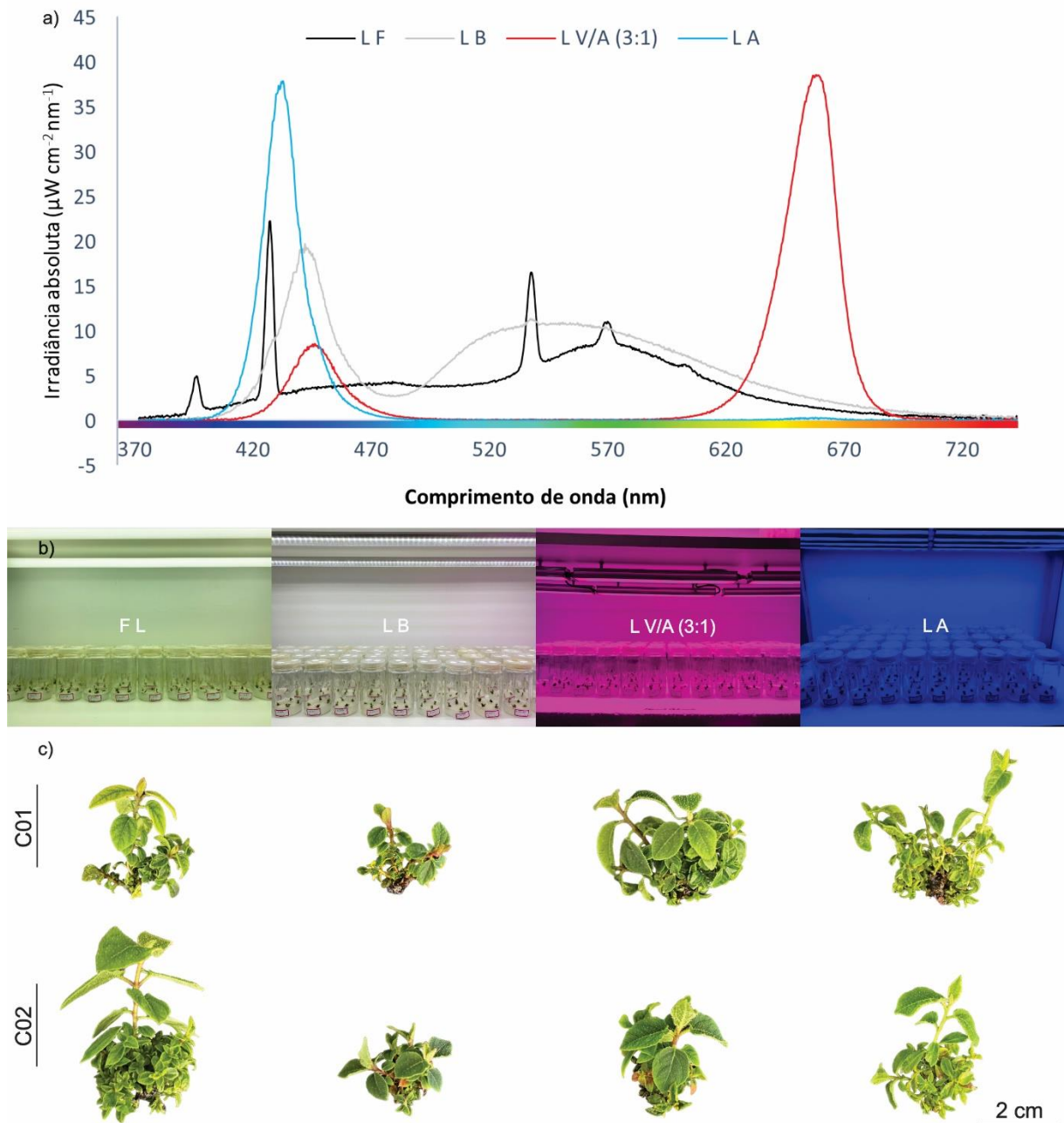


Figura 2. **a)** Irradiância absoluta e comprimentos de onda dos diferentes espectros de luz trabalhados: L F = Fluorescente. L B = LED Branca. L V/A (3:1) = LED Vermelho/Azul (3:1). L A = LED Azul. **b)** Frascos com brotações de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* cultivadas in vitro. **c)** Brotações de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* desenvolvidas sob diferentes espectros de luz aos 30 dias de cultivo in vitro.

O experimento foi mantido por 30 dias em sala de crescimento sob irradiância de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (padronizada através de um irradiômetro), fornecidas pelas respectivas fontes de luz de cada tratamento. Os espectros de luz foram mensurados por um espectralímetro e software de sistema de aquisição de dados Ocean Optics Spectra-Suite (OceanOptics®, Dunedin, FL). Este experimento foi instalado a partir dos resultados obtidos com o experimento anterior.

3.4. Avaliações e análises realizadas na condição in vitro

Desenvolvimento e produtividade de microestacas

Após 30 dias, foram avaliados os seguintes parâmetros: número de brotações com gemas alongadas medindo $\geq 1,5$ cm e < 2 cm, número de brotações com gemas alongadas medindo ≥ 2 cm, massa fresca de folha (MFF, mg), massa seca de folha (MSF, mg), massa fresca de caule (MFC, mg), massa seca de caule (MSC, mg).

Atividade dos metabólitos primários (Trocenas Gasosas)

Amostras da parte aérea foram coletadas às 17 h, congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente maceradas para análise. Aproximadamente 20 mg de tecidos frescos macerados foram utilizados para extração metanólica conforme descrito por Lisec et al. (2006). Os pigmentos fotossintéticos foram determinados conforme descrito por Porra et al. (1989). Os carboidratos (amido, sacarose, glicose e frutose) foram avaliados conforme descrito por Fernie et al. (2001). Os níveis de proteínas totais foram analisados conforme relatado em Gibon et al. (2004). O conteúdo de malato foi determinado conforme descrito por Nunes-Nesi et al. (2007). O conteúdo da prolina seguiu a metodologia proposta por Bates et al. (1973), com modificações descritas por Felipe et al. (2019). As análises foram conduzidas na Unidade de Crescimento de Plantas, do Departamento de Biologia Vegetal da UFV.

Atividade fotossintética in vitro

A quantificação da taxa fotossintética in vitro foi realizada com um sistema de analisador de gás infravermelho (Q-S151; Qubit Systems, Kingston, ON, Canadá) adaptado para o cultivo in vitro e o software LoggerLite 1.8.1 (Vernier Software & Technology Caliper, Beaverton, OR, EUA), conforme descrito por Castro et al. (2019), com modificações. Como fonte de luz, foram utilizadas lâmpadas LEDs vermelhas distribuídas em câmara de iluminação, onde foi calculado o CO_2 de referência através da entrada de ar em um frasco vazio (347 mL de capacidade), bombeado do ambiente ex vitro à taxa de 300 mL min^{-1} de fluxo de ar de forma constante.

A temperatura e umidade do ambiente in vitro foi mensurada através do sensor Espec (Thermo Recorder RS-11, Takai Espec Corp.). Antes de mensurar a atividade fotossintética,

as plantas foram mantidas no escuro por 12 h. A taxa fotossintética foi expressa em $\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ planta}^{-1}$.

A taxa fotossintética (A) foi mensurada pela seguinte fórmula:

$$A(\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}) = \frac{\Delta\text{CO}_2}{\text{Mol. Flow}}$$

$$\Delta\text{CO}_2(\text{ppm}) = \text{CO}_2 \text{ de referência} - \text{CO}_2 \text{ de análise}$$

$$\text{Mol Flow} = \frac{\text{Taxa de fluxo de ar (Lmin}^{-1}\text{)}}{\frac{\text{Constante dos gases perfeitos (22,4) x temperatura (K)}}{600000}} \times \frac{1}{\text{Massa seca de folha (mg)}}$$

Quantificação da atividade da superóxido dismutase

Foi mensurado a atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), que foi extraída por maceração de 100 mg de massa fresca de parte aérea congelada em nitrogênio líquido, com 1 mL do tampão de fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,8), polivinilpirrolidona 1% (p/v), fluoreto fenilmetilsulfonil 1 mM, ácido etilenodiaminotetracético 0,1 mM. A mistura macerada foi centrifugada a 12.000 rpm durante 15 min a 4 ° C e o sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático bruto (Bradford, 1976). A atividade da SOD foi medida conforme descrito por (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977) e expressa como proteína $\text{U min}^{-1} \text{ g}^{-1}$, com 1 U sendo equivalente à concentração de SOD necessária para inibir 50% da fotorredução do azul nitro tetrazólio.

Caracterização anatômica

Após 30 dias, foram coletadas o segundo par de folhas totalmente expandidas e a região mediana do caule, que foram fixadas em solução de Glutaraldeído a 4%. As amostras foram desidratadas em série etanólica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Alemanha). Foram feitos cortes de secções transversais com 5 μm de espessura obtidas em micrótopo rotativo manual (RM2235, Leica® Microsystems Inc., USA). Os cortes foram transferidos para lâminas de vidro, corados em azul de toluidina, pH 3,2 (O'Brien & McCully, 1981), por 2 min, em seguida, foram montadas em Permount® SP15-500 (Fisher

Scientific) e observadas em microscópio de luz (DM750, Leica[®], Alemanha), com câmera digital acoplada (ICC50 HD, Leica[®], Alemanha).

3.5. Enraizamento de microestacas e altura de muda ex vitro

O enraizamento das microestacas na condição ex vitro, foi conduzido no Viveiro de Pesquisa do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa. As brotações com gema alongadas obtidas in vitro foram levadas ao viveiro ainda dentro dos frascos com meio de cultura onde foram micropropagadas. Durante a coleta de microestacas, todo o meio de cultura residual foi lavado com água em abundância.

As microestacas coletadas de cada tratamento foram colocadas para enraizamento, utilizando como recipiente tubetes de 35 cm³ (30 mm x 85 mm) com substrato Carolina Soil[®], acondicionados em casa de vegetação climatizada [temperatura de 20 a 30 °C e umidade relativa do ar $\geq 80\%$ fornecida via nebulização] por 50 dias. Nos primeiros 40 dias, foi mantido uma cobertura com tela de sombreamento 50% a 40 cm das mudas.

Após 50 dias em casa de vegetação, as microestacas foram transferidas para casa de sombra com teto recoberto por tela de sombreamento 50%, por mais 40 dias. As mudas foram mantidas sob irrigação fornecida por aspersor automático.

Em casa de sombra, as mudas foram fertilizadas três vezes por semana em dias alternados com solução nutritiva composta por nitrato de cálcio (92 g L⁻¹), nitrato de potássio (20 g L⁻¹), fosfato monoamômico (9,6 g L⁻¹), cloreto de potássio (24 g L⁻¹), sulfato de magnésio (30,67 g L⁻¹), ferro quelado (4 g L⁻¹), ácido bórico (28 g L⁻¹), mobilidato de sódio (4 g L⁻¹), sulfato de zinco (48 g L⁻¹), sulfato de cobre (10 g L⁻¹) sulfato de magnésio (112 g L⁻¹).

Aos 90 dias de idade da muda produzida, foram avaliados a Sobrevivência (%) e Altura de Muda (AM, cm).

3.6. Delineamento experimental

Para todas as variáveis avaliadas, as análises estatísticas foram realizadas no software R versão 3.4 (R Development Core Team, 2018), utilizando o pacote ExpDes.pt. Os dados foram submetidos a análise de variância, ao teste de normalidade dos resíduos (Shapiro-Wilk 5%), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Em ambos os experimentos, foi utilizado Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). No primeiro experimento, foi adotado um fatorial 2 x 3 (duas taxas de trocas gasosas x três concentrações de sacarose) para cada um dos clones, utilizando 4 repetições, compostas cada uma de um

frasco contendo 4 explantes. No segundo experimento, adotou-se um fatorial de 2 x 4 (dois clones, C01 e C02, x quatro fontes de luz), também utilizando 4 repetições constituídas por 4 explantes cada. No enraizamento das microestacas ex vitro, foi utilizando apenas microestacas $\geq 1,5\text{cm}$, em 4 repetições constituídas de 8 plantas em DIC.

4. RESULTADOS

4.1. Experimento I: Trocas gasosas e concentração de sacarose

Desenvolvimento e produtividade de microestacas

As produtividades de propágulos e de microestacas ($\geq 1,5\text{cm}$ e $< 2\text{cm}$ e de $\geq 2\text{ cm}$), foram favorecidas quando utilizado 15 g L^{-1} de sacarose, onde na ausência de membranas porosas ($14\text{ }\mu\text{L L}^{-1}\text{ s}^{-1}\text{ CO}_2$), foram obtidas maiores médias quando comparadas à concentração de 30 g L^{-1} de sacarose, não diferindo estatisticamente da concentração de 30 g L^{-1} apenas para o clone C01 em microestacas $\geq 2\text{ cm}$ (Figura 3 a-d).

A ausência de membranas, na maior concentração de sacarose também elevou os valores de massa fresca de folha para os dois clones, diferindo estatisticamente para o C01 em todas as concentrações, e apenas na maior concentração para o C02 (Figura 3 e, f). Resultado semelhante foi observado para massa fresca de caule, que obteve ganho de massa na ausência de membranas alcançando as maiores médias quando uma dose de 15 g L^{-1} de sacarose foi utilizada (Figura 4, c,d). Para massa seca de folha, a presença de membranas ($25\text{ }\mu\text{L L}^{-1}\text{ s}^{-1}\text{ CO}_2$) e o incremento de sacarose favoreceram o ganho de massa (Figura 4 a, b). Enquanto para massa seca de caule, independente da membrana para o C01 e na maior troca gasosa para o C02, as maiores concentrações de sacarose proporcionaram as maiores médias (Figura 4, e, f).

Para todos os parâmetros de crescimento in vitro, a ausência de sacarose interferiu negativamente no desenvolvimento da planta, resultando nos valores mais baixos. Em todas as características avaliadas houve interação entre os fatores, exceto massa seca de folha e caule, onde o efeito atuou de forma independente.

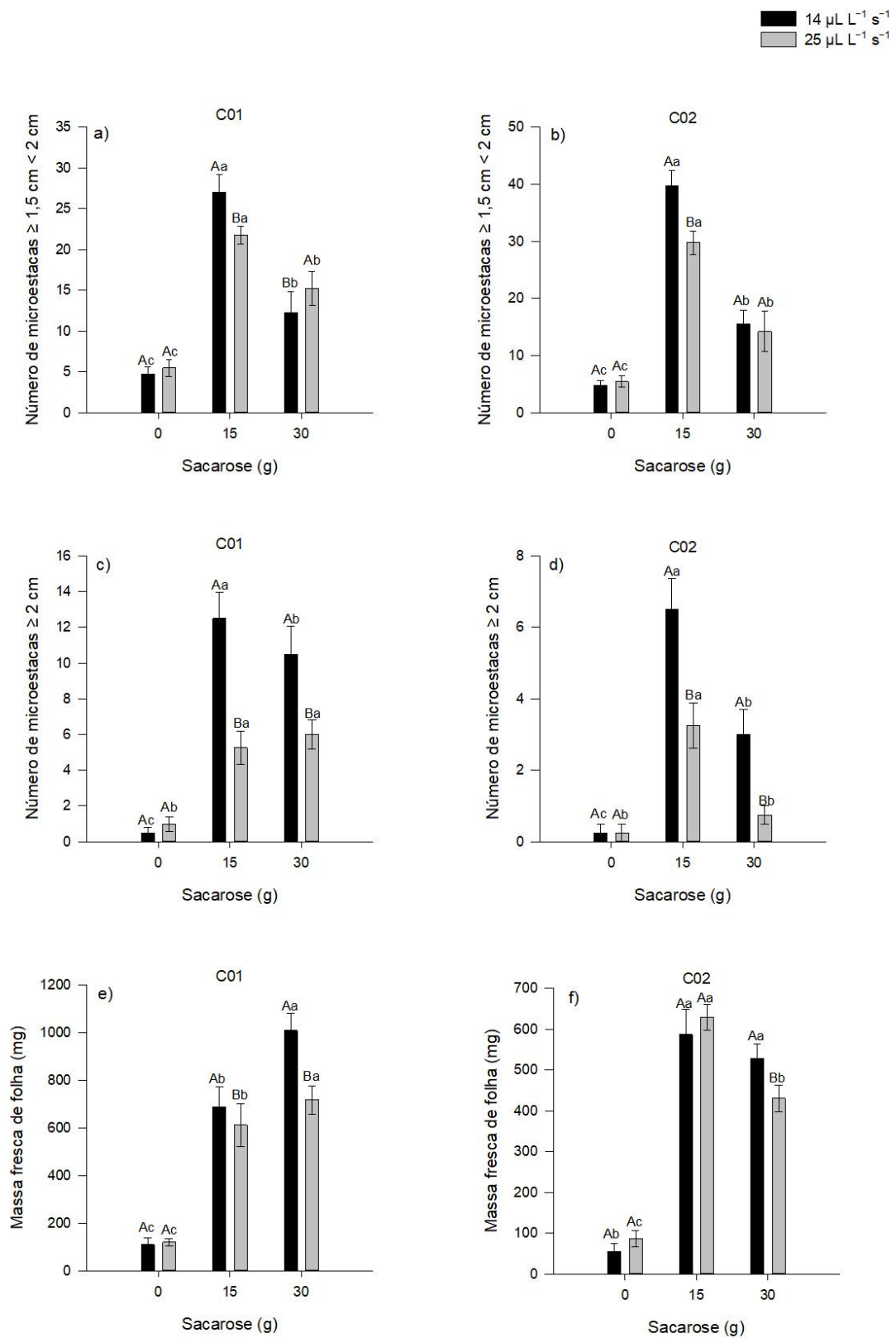


Figura 3. Parâmetros de crescimento de clones de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (C01 e C02) após 30 dias de cultivo in vitro sob diferentes trocas gasosas (CO_2 de 14 e 25 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$) e concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L^{-1}). Número de microestacas $\geq 1,5 \text{ cm} < 2 \text{ cm}$ (a, b). Número de microestacas $\geq 2 \text{ cm}$ (c, d). Massa fresca de folha mg (e, f). Letras maiúsculas comparam médias em diferentes taxas de trocas gasosas; letras minúsculas comparam médias em diferentes concentrações de sacarose. Médias seguidas de letras iguais não diferiram entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Valores representam as médias ($n = 4$) \pm erro padrão.

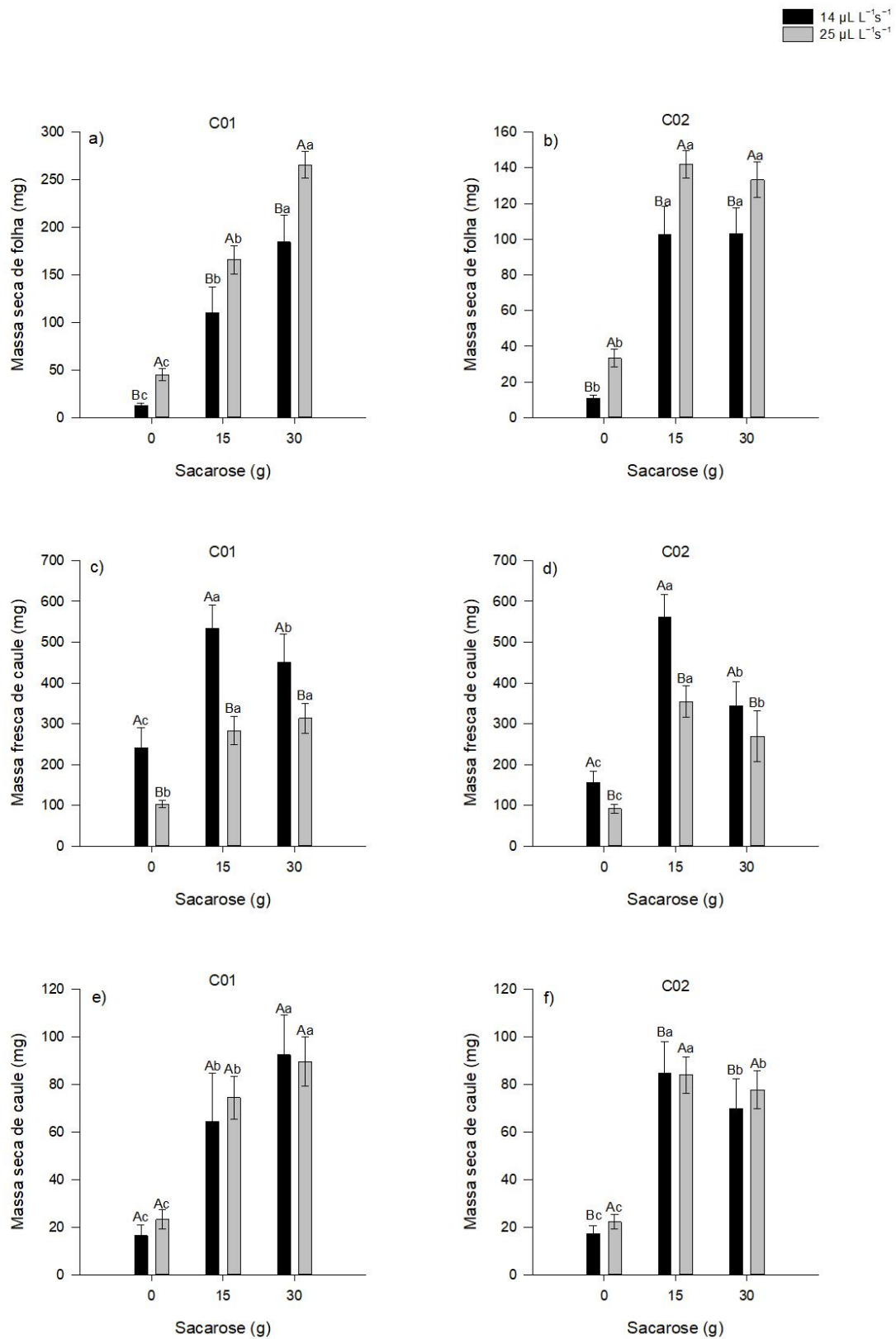


Figura 4. Parâmetros de crescimento de clones de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (C01 e C02) após 30 dias de cultivo in vitro sob diferentes trocas gasosas (CO_2 de 14 e 25 $\mu\text{L L}^{-1}\text{s}^{-1}$) e concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L^{-1}). Massa seca de folha mg (a, b). Massa fresca de caule mg (c, d). Massa seca de caule mg (e, f). Letras maiúsculas comparam médias em diferentes taxas de trocas gasosas; letras minúsculas comparam médias em diferentes concentrações de sacarose. Médias seguidas de letras iguais não diferiram entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Valores representam as médias ($n = 4$) \pm erro padrão.

Atividade dos metabólitos primários e fotossíntese in vitro

Todas as variáveis analisadas do metabolismo primário foram aumentadas com a maior taxa de trocas gasosas, especialmente quando combinada com 15 g L⁻¹ de sacarose, de acordo com o clone observado (Figuras 5, a-f; 6, c-f; 7, 8 e 9,a-f).

Houve interação entre os fatores para os pigmentos Clorofilas *a*, *b*, total (Figura 5 a-f) e Carotenoides (Figura 6 c, d), onde a maior taxa de trocas gasosas permitiu que o conteúdo de pigmentos fosse notavelmente aumentado na ausência de sacarose, em ambos os clones, e também na concentração de 15 g L⁻¹, no C01. Apenas o C01 apresentou valores significativamente inferiores no meio sem sacarose e presença de membranas para Clorofila *a*. Para os demais pigmentos, a ausência de sacarose e a presença de 30 g L⁻¹, na maior taxa de trocas gasosas, não diferiram entre si. Entretanto, na menor taxa de trocas gasosas, os valores de pigmentos foram crescentes de acordo com a concentração de sacarose.

A taxa fotossintética foi aumentada na presença de maior troca gasosa para ambos os clones, principalmente com uso de 15 g L⁻¹ (Figura 6 a, b). Na ausência de membranas, a sacarose elevou os valores de fotossíntese. Para os clones C01 e C02 a ausência de sacarose reduziu a atividade fotossintética. A fotossíntese foi aumentada conforme também o teor de clorofilas crescia na condição de maior troca gasosa. Houve interação entre os fatores para o C01, contudo, para o C02 os fatores agiram de forma independente.

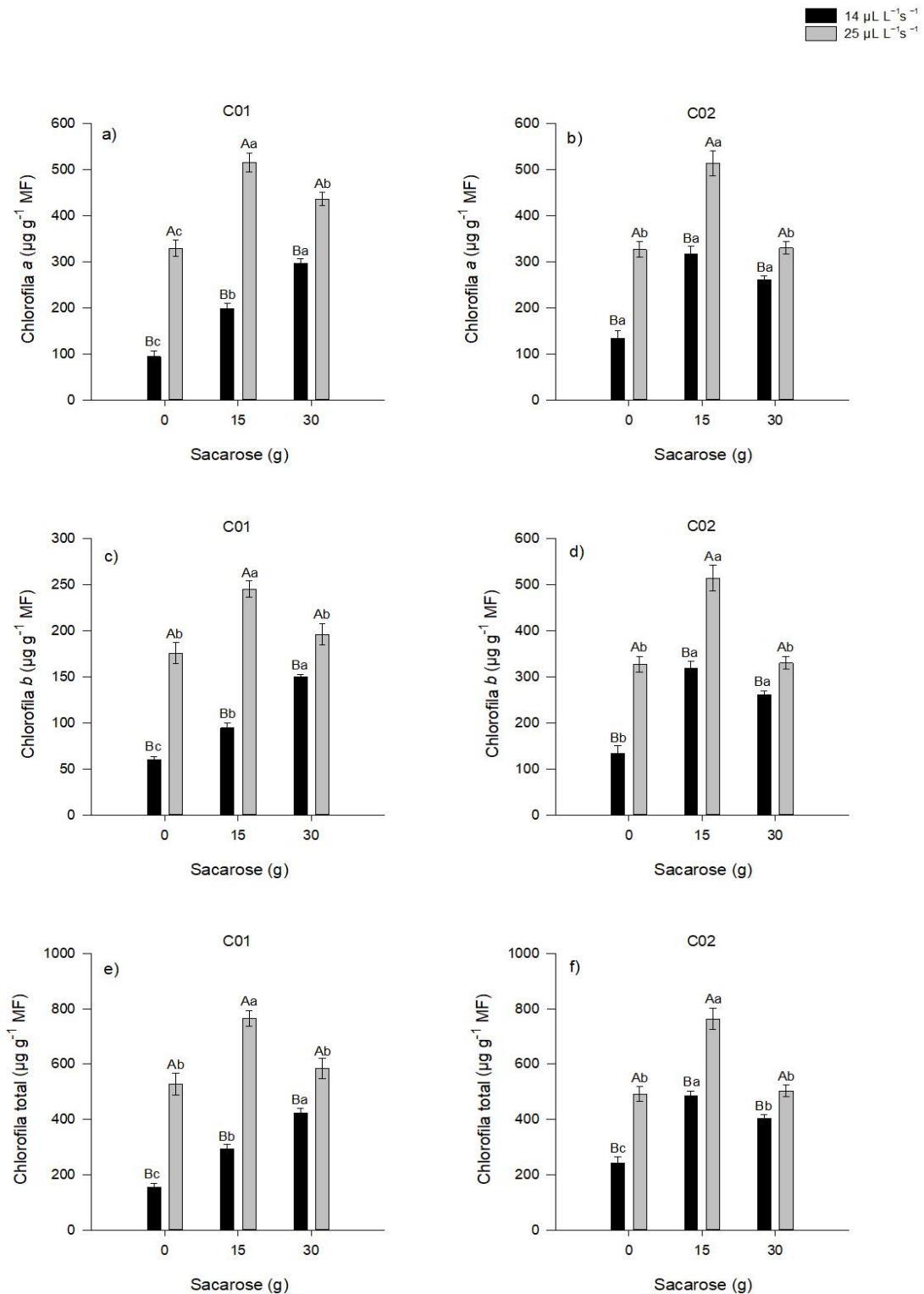


Figura 5. Concentração de Clorofila *a* (a, b). Clorofila *b* (c, d). Clorofila total (e, f), em clones de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (C01 e C02) após 30 dias de cultivo in vitro sob diferentes trocas gasosas (CO₂ de 14 e 25 µL L⁻¹ s⁻¹) e concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L⁻¹). Letras maiúsculas comparam médias em diferentes taxas de trocas gasosas; letras minúsculas comparam médias em diferentes concentrações de sacarose. Médias seguidas de letras iguais não diferiram entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. MF = Massa Fresca. Valores representam as médias (n = 4) ± erro padrão.

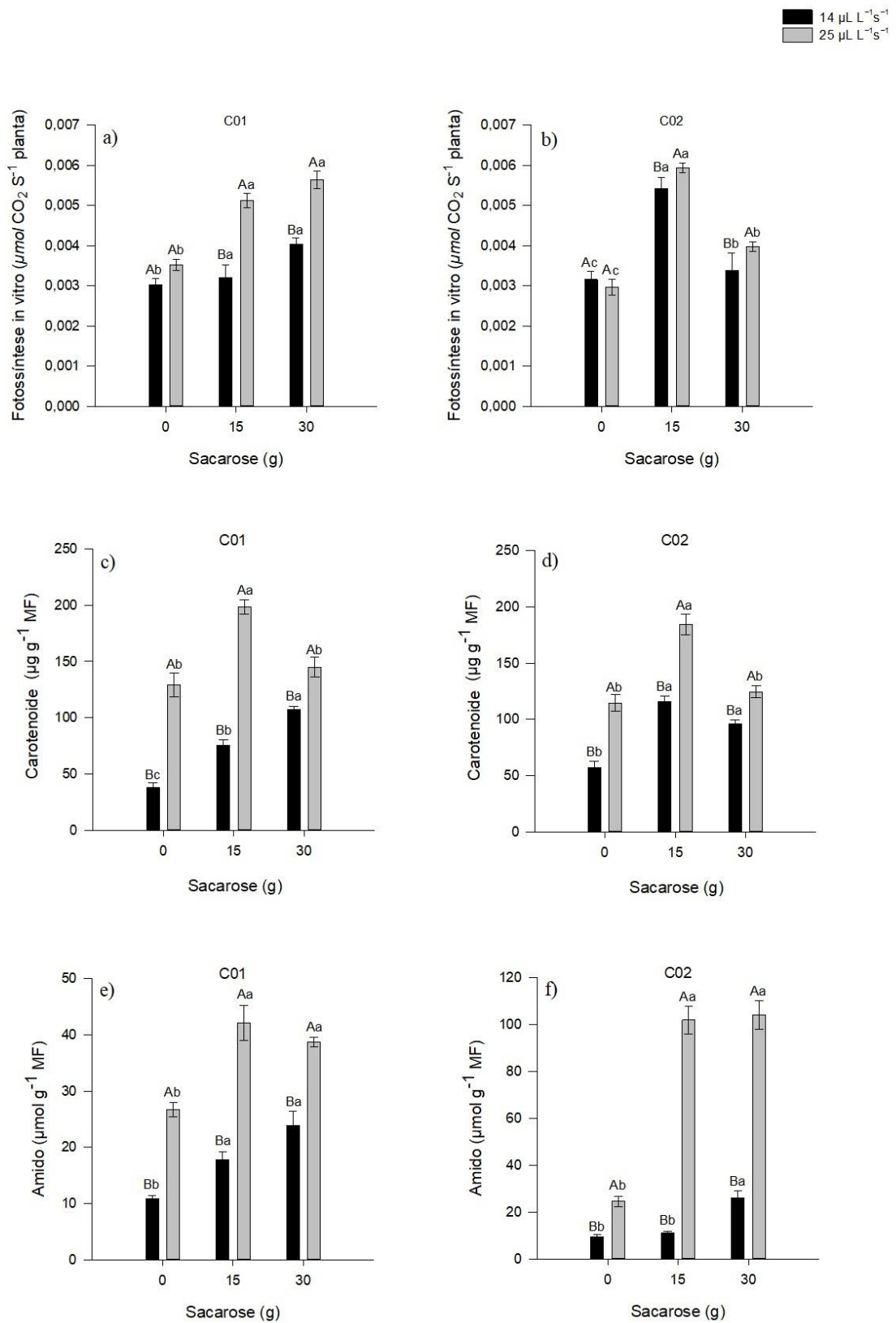


Figura 6. Atividade fotossintética in vitro (**a, b**), Concentração de Carotenoides (**c, d**) e Amido (**e, f**) em clones de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (C01 e C02) após 30 dias de cultivo in vitro sob diferentes trocas gasosas (CO_2 de 14 e 25 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$) e concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L^{-1}). Letras maiúsculas comparam médias em diferentes taxas de trocas gasosas; letras minúsculas comparam médias em diferentes concentrações de sacarose. Médias seguidas de letras iguais não diferiram entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. MF = Massa Fresca. Valores representam as médias ($n = 4$) \pm erro padrão.

O amido e açúcares glicose, frutose e sacarose, tiveram sua concentração aumentada significativamente quando sob a maior taxa de trocas gasosas adotada. (Figura 7, a-f). O amido e açúcares aumentaram de acordo com as concentrações de sacarose no meio de cultura, em ambas as trocas gasosas. Houve interação entre os fatores para todos os açúcares no C01, entretanto, no C02, apenas amido e frutose apresentaram interação, tendo a glicose e sacarose agindo de forma independente.

Nos fenois, malato, fumarato, prolina, aminoácidos totais e proteína, ocorreu interação entre as trocas gasosas e a sacarose. Para fenois, malato e fumarato, o aumento nas trocas gasosas elevaram substancialmente as concentrações destes metabólitos, enquanto a sacarose elevou os valores à medida em que foi acrescida ao meio de cultura em ambas as condições de trocas gasosas (Figura 8, a-f).

Em prolina, aminoácidos totais e proteína, os valores também foram consideravelmente incrementados na maior taxa de trocas gasosas, conforme também aumentava a disponibilidade de sacarose. Na presença de membranas, novamente, as concentrações foram no mínimo dobradas (Figura 9, a-f). Entretanto, na menor taxa de trocas gasosas os valores não diferiram, independentemente da concentração de sacarose, para prolina nos dois clones e aminoácidos totais no C01. Aminoácidos totais no C02 e a proteína em ambos os clones, foram levemente incrementadas de acordo com a disponibilidade de sacarose no meio de cultura.

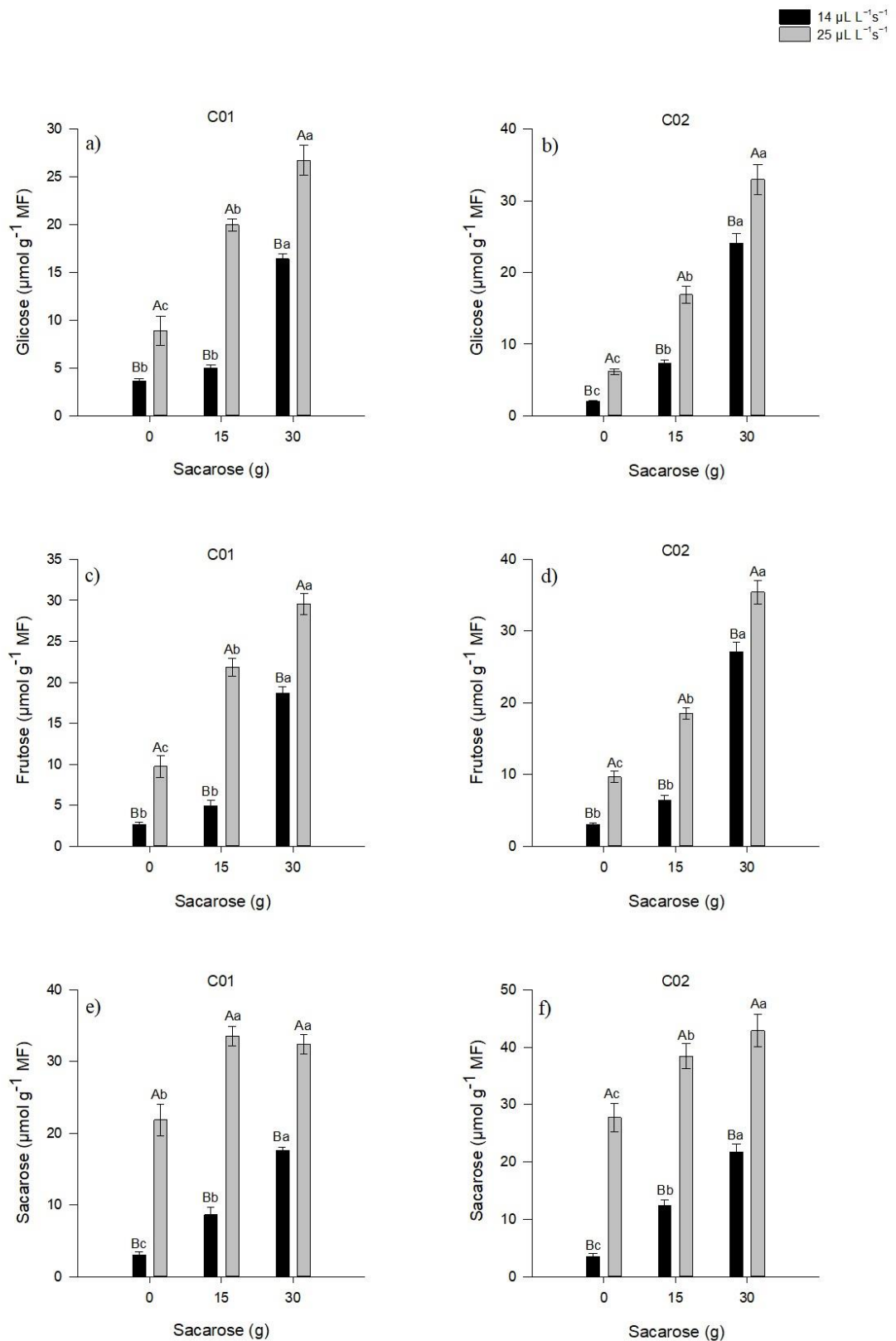


Figura 7. Concentração de Glicose (a, b), Frutose (c, d) e Sacarose (e, f) em clones de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (C01 e C02) após 30 dias de cultivo in vitro sob diferentes trocas gasosas (CO_2 de 14 e 25 $\mu\text{L L}^{-1}\text{s}^{-1}$) e concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L^{-1}). Letras maiúsculas comparam médias em diferentes taxas de trocas gasosas; letras minúsculas comparam médias em diferentes concentrações de sacarose. Médias seguidas de letras iguais não diferiram entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. MF = Massa Fresca. Valores representam as médias, ($n = 4$) \pm erro padrão.

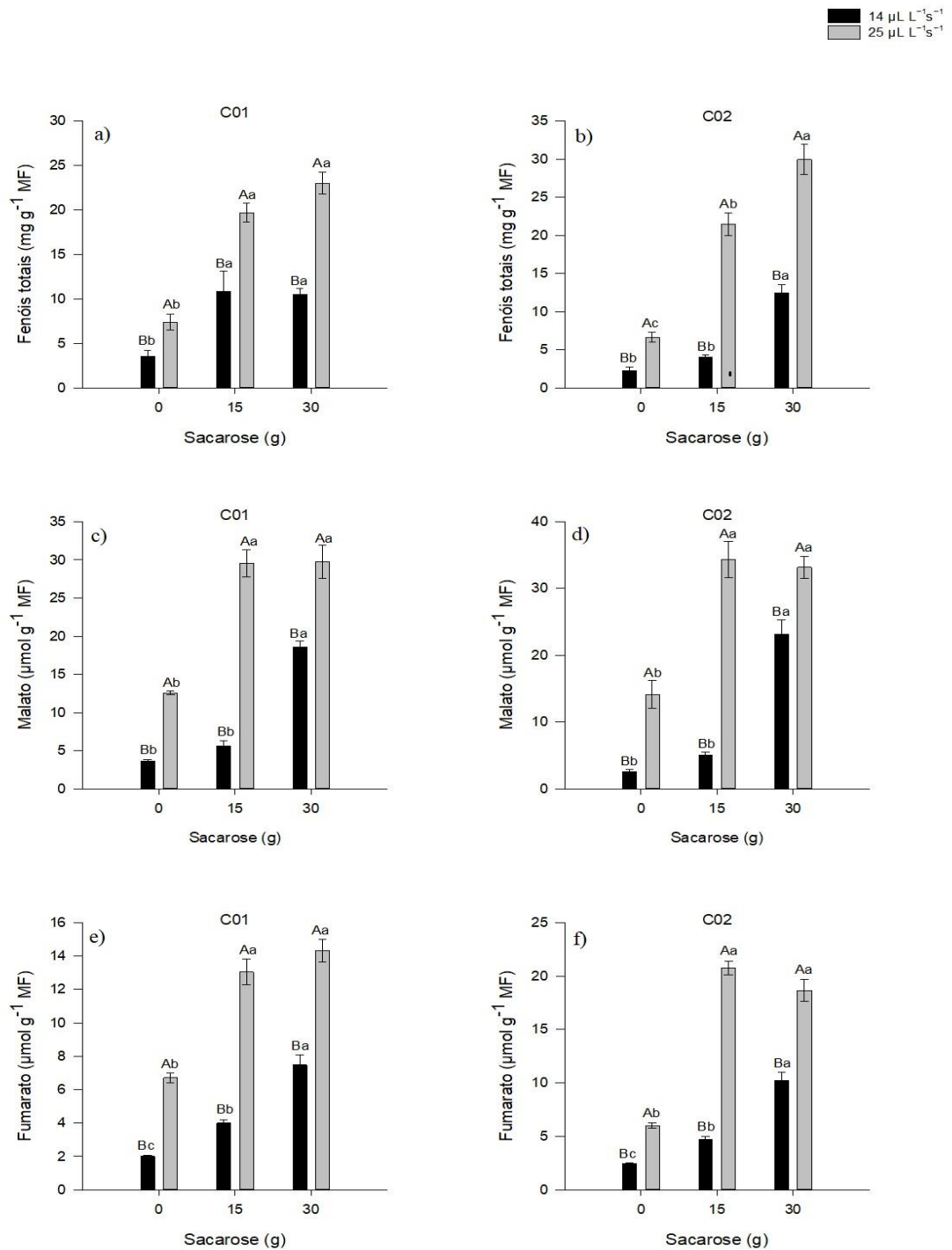


Figura 8. Concentração de Fenóis (a, b), Malato (c, d) e Fumarato (e, f) em clones de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (C01 e C02) após 30 dias de cultivo in vitro sob diferentes trocas gasosas (CO_2 de 14 e $25 \mu\text{L L}^{-1}\text{s}^{-1}$) e concentrações de sacarose (0 , 15 e 30 g L^{-1}). Letras maiúsculas comparam médias em diferentes taxas de trocas gasosas; letras minúsculas comparam médias em diferentes concentrações de sacarose. Médias seguidas de letras iguais não diferiram entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. MF = Massa Fresca. Valores representam as médias, ($n = 4$) \pm erro padrão.

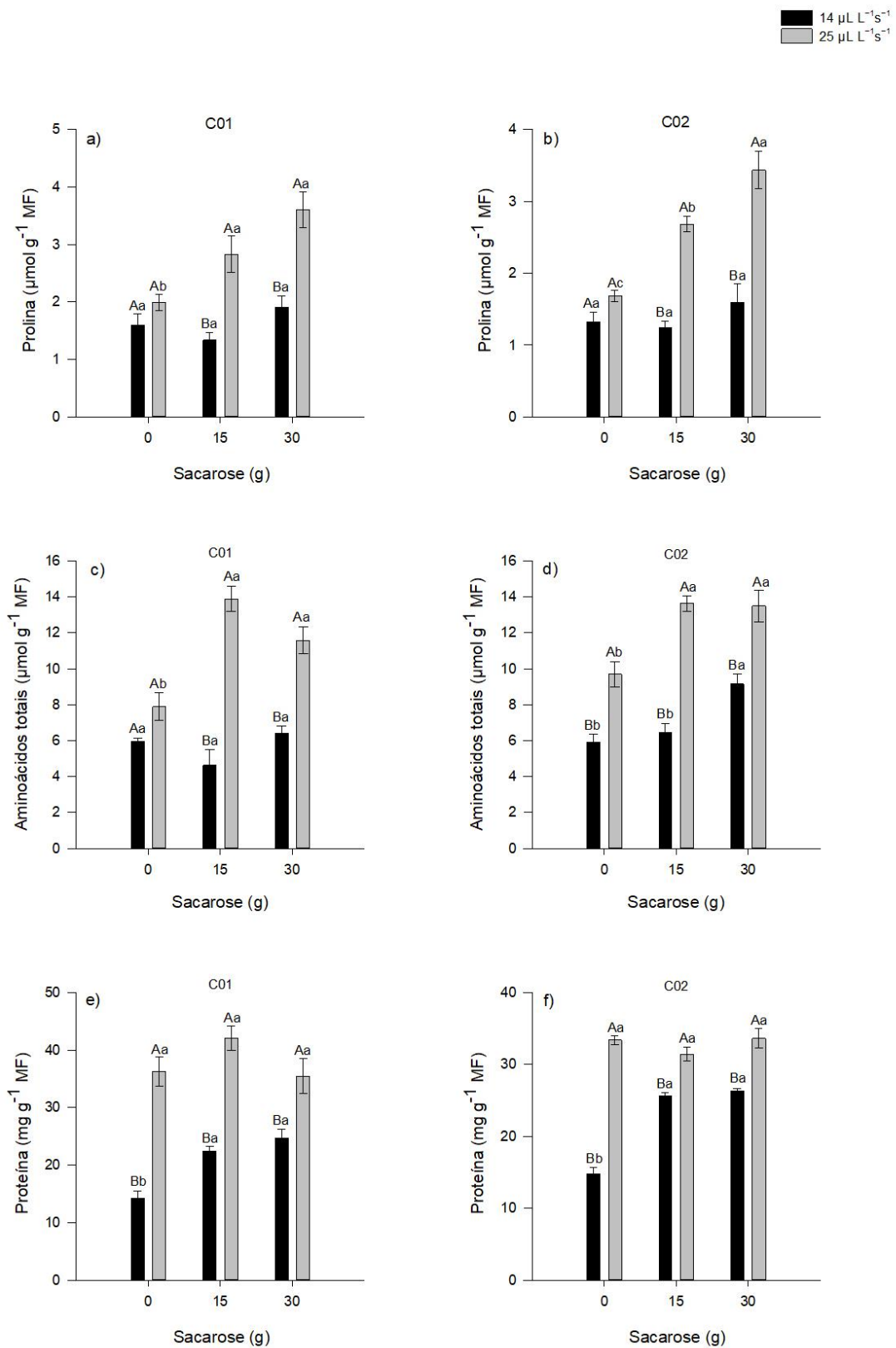


Figura 9. Concentração de Prolina (a, b), Aminoácidos totais (c, d) e Proteína (e, f) em clones de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (C01 e C02) após 30 dias de cultivo in vitro sob diferentes trocas gasosas (CO_2 de 14 e 25 $\mu\text{L L}^{-1}\text{s}^{-1}$) e concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L^{-1}). Letras maiúsculas comparam médias em diferentes taxas de trocas gasosas; letras minúsculas comparam médias em diferentes concentrações de sacarose. Médias seguidas de letras iguais não diferiram entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. MF = Massa Fresca. Valores representam as médias, ($n = 4$) \pm erro padrão.

Atividade da superóxido dismutase

A atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), diferiu para todos os tratamentos em ambos os clones. A SOD (Figura 10) apresentou maior atividade quando houve maior taxa de trocas gasosas e com as crescentes doses de sacarose, enquanto na ausência de membranas os valores diferiram apenas para a ausência de sacarose.

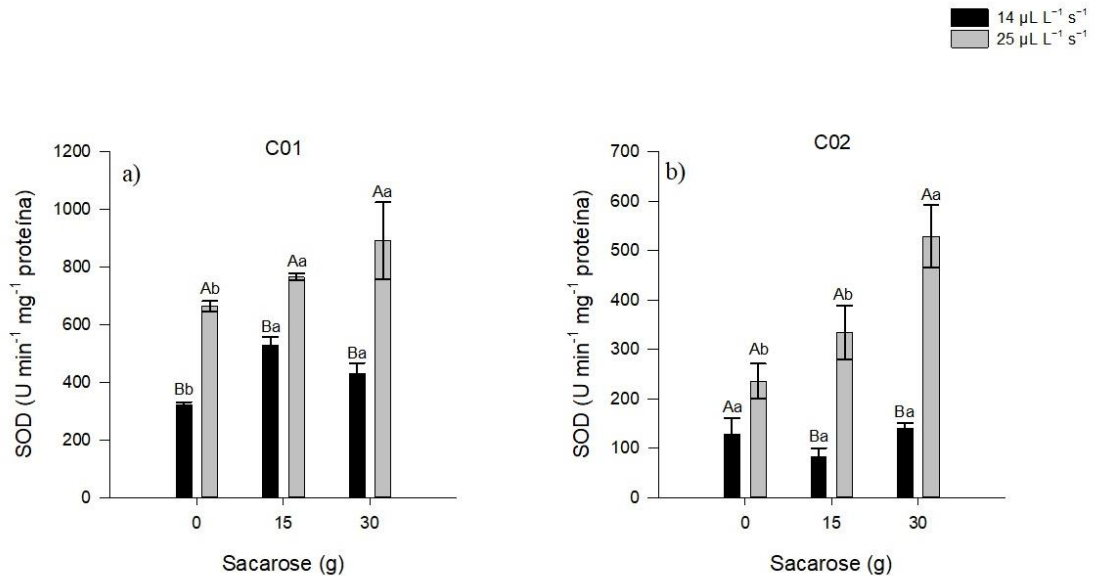


Figura 10. Atividade enzimática do estresse oxidativo para superóxido dismutase (SOD) (a, b), em clones de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (C01 e C02) após 30 dias de cultivo in vitro sob diferentes trocas gasosas (CO₂ de 14 e 25 μL L⁻¹ s⁻¹) e concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L⁻¹). Letras maiúsculas comparam médias em diferentes taxas de trocas gasosas; letras minúsculas comparam médias em diferentes concentrações de sacarose. Médias seguidas de letras iguais não diferiram entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Valores representam as médias, (n = 4) ± erro padrão.

Caracterização anatômica

Alterações morfológicas foram observadas no limbo foliar na ausência de sacarose e presença da maior taxa de trocas gasosas. Visualmente, os cortes histológicos revelam que a menor troca gasosa e ausência de sacarose levaram o parênquima paliçádico e lacunoso a um maior adensamento, fazendo com que praticamente não houvesse espaços intercelulares nos dois clones. Quando a maior taxa de trocas gasosas foi utilizada, ainda na ausência de sacarose, houve atenuamento do adensamento e aparente normalidade na organização morfológica foi restaurada. Na concentração de 15 g L⁻¹ e 30 g L⁻¹ não foram observadas alterações relevantes (Figura 11).

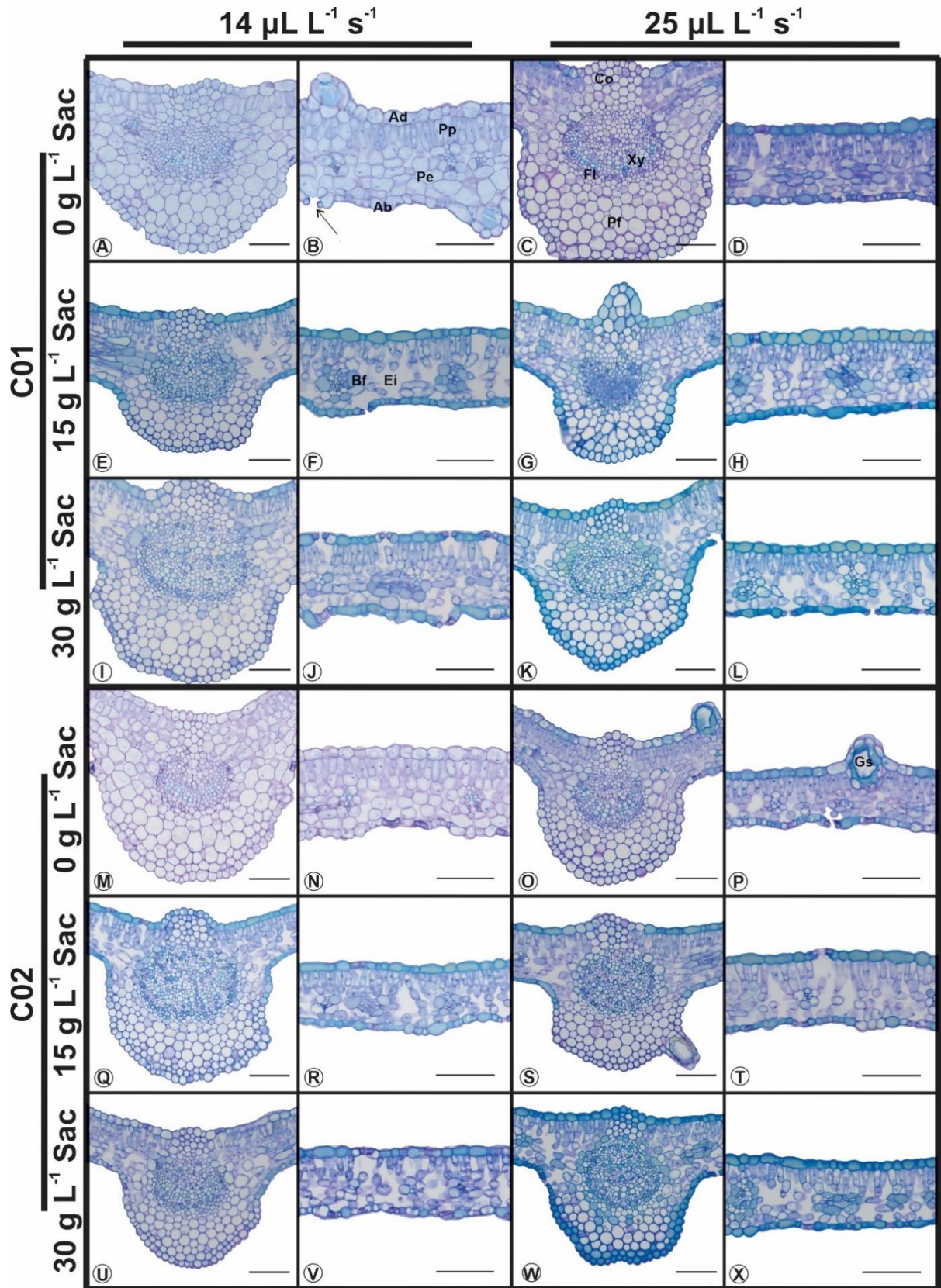


Figura 11. Sessões transversais da nervura central e mesofilo submetidas à coração com azul de toluidina em clones de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (C01 e C02) após 30 dias de cultivo in vitro sob diferentes trocas gasosas (CO_2 de 14 e 25 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$) e concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L^{-1}). Ad = Epiderme adaxial. Pp = Parênquima paliádico. Pe = Parênquima esponjoso. Ab = Epiderme abaxial. \rightarrow = Abertura estomática. Co = Colênquima. Xy = Xilema. Fl = Floema. Pf = Parênquima fundamental. Bf = Bainha do feixe. Ei = Espaço intercelular. Gs = Glândula sebácea emergente. Barra = 200 μm .

Na organização anatômica do caule, visualmente, foi observado aumento do diâmetro, área vascular e aparente maior lignificação do caule conforme houve maior disponibilidade de sacarose no meio de cultura, independente da taxa de trocas gasosas, com exceção do C01 na maior taxa de trocas gasosas, onde não foi notado alterações relevantes (Figura 12).

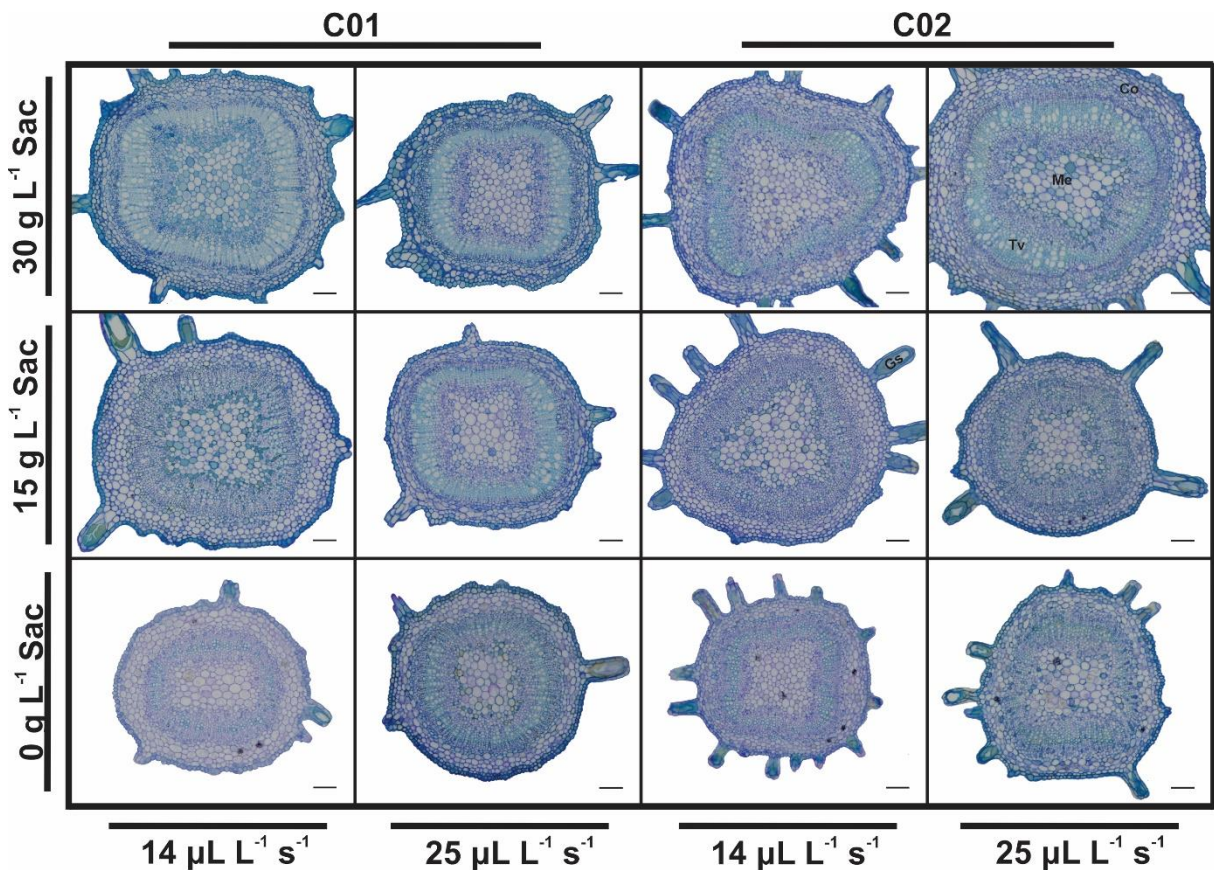


Figura 12. Sessões transversais do caule submetidas à coração com azul de toluidina em clones de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (C01 e C02) após 30 dias de cultivo in vitro sob diferentes trocas gasosas (CO_2 de 14 e 25 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$) e concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L^{-1}). Co = Córtex. Me = Medula. Tv = Tecido vascular. Gs = Glândula sebácea emergente. Barra = 200 μm .

Enraizamento de microestacas e altura de muda ex vitro

Tanto a sobrevivência quando a altura das mudas após 90 dias na condição ex vitro, foram favorecidas quando micropropagadas no meio de cultura com 15 g L^{-1} sacarose, independente da taxa de trocas gasosas, embora quando utilizado o ambiente com maior troca gasosa, estes valores aumentaram. Na presença das membranas permeáveis a gases, a ausência e presença 30 g L^{-1} de sacarose não diferiram entre si na sobrevivência das mudas, enquanto na menor taxa de trocas gasosas o meio de cultura livre de sacarose proporcionou os menores valores (Figura 13, a, b).

O mesmo comportamento foi seguido na altura das mudas, exceto para o C02 que teve as menores alturas na presença de 30 g L⁻¹ sacarose em ambas taxas de trocas gasosas (Figura 13, c, d; Figura 14). Ocorrendo interação entre os fatores para as duas variáveis. Na maior troca gasosa, em ambos os clones, a sobrevivência foi dobrada com 15 g L⁻¹ sacarose quando comparado à concentração de e 30 g L⁻¹ sacarose (Figura 13, a, b).

Foi observado, in loco, que das mudas sobreviventes, a ausência de membranas e presença de 0, 15 e 30 g L⁻¹ sacarose no C01, promoveu crescente percentual de bifurcação das mudas (0%, 12,5% e 54,16% respectivamente). No mesmo clone quando um ambiente de maior troca gasosa foi utilizado, os valores se mantiveram ou reduziram para 0%, 6,25% e 28,83% respectivamente. A mesma tendência foi observada no C02, onde na ausência de membranas a bifurcação de mudas cresceu de acordo com a disponibilidade de sacarose (0%, 8,33% e 58,33% respectivamente), e se mantiveram ou reduziram para 0%, 5% e 37,5% quando micropropagadas num ambiente de maior troca gasosa.

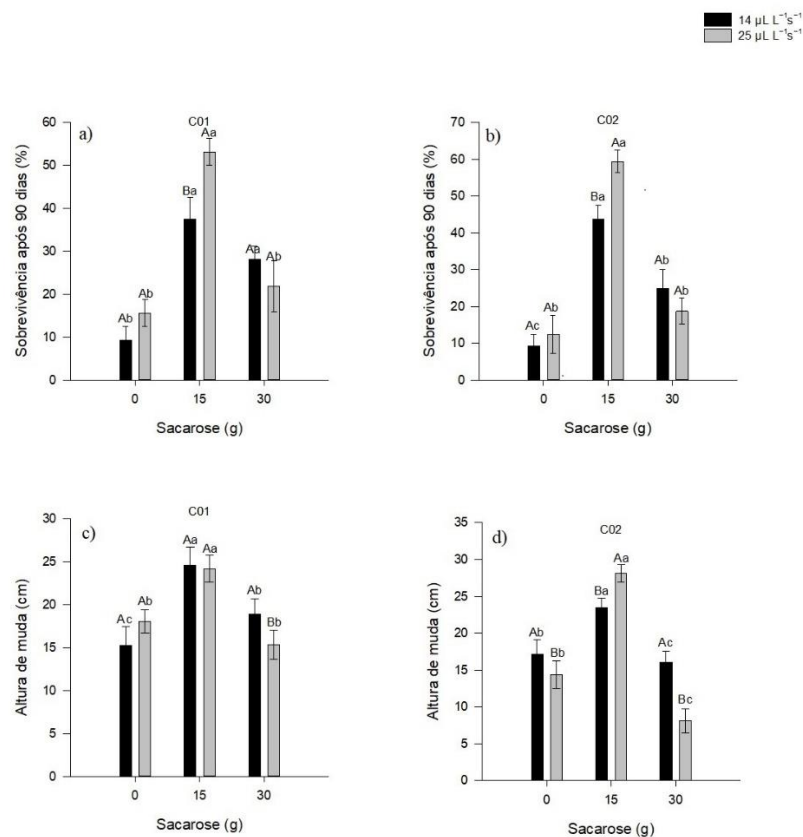


Figura 13. Sobrevivência ex vitro das mudas (a, b) e Altura de muda (c, d) em clones de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (C01 e C02), aos 90 dias de idade em viveiro, após 30 dias de cultivo in vitro sob diferentes trocas gasosas (CO₂ de 14 e 25 µL L⁻¹ s⁻¹) e concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L⁻¹). Letras maiúsculas comparam médias em diferentes taxas de trocas gasosas; letras minúsculas comparam médias em diferentes concentrações de sacarose. Médias seguidas de letras iguais não diferiram entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Valores representam as médias, (n = 4) ± erro padrão.

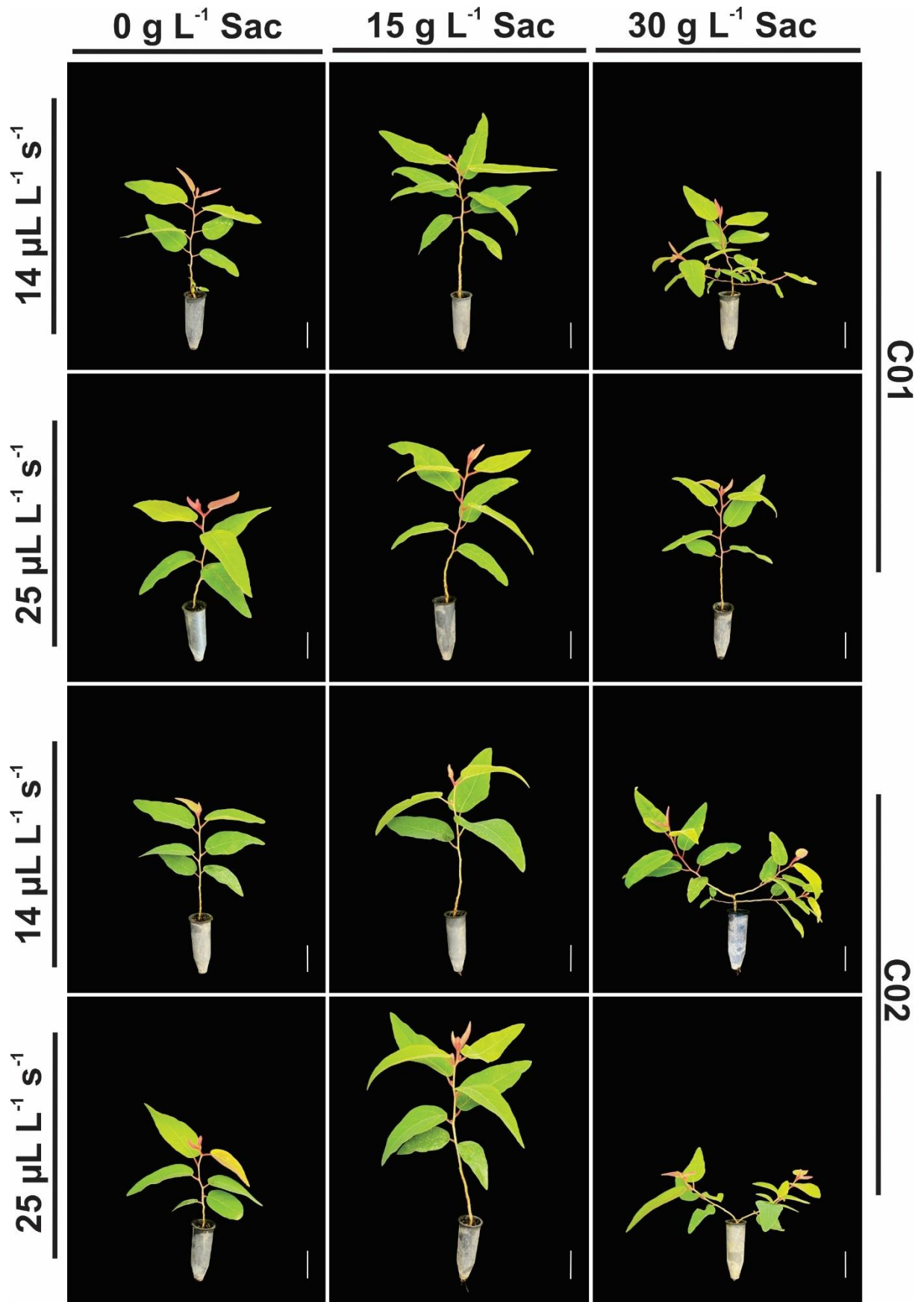


Figura 14. Mudas micropropagadas representativas de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (C01 e C02) aos 90 dias de idade em viveiro, após 30 dias de cultivo in vitro sob diferentes trocas gasosas (CO₂ de 14 e 25 μL L⁻¹ s⁻¹) e concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L⁻¹). Barra = 4 cm.

4.2. Experimento II: Qualidade de luz

Desenvolvimento e produtividade de microestacas

Todos os parâmetros de crescimento avaliados *in vitro* foram afetados sob diferentes qualidades de luz, havendo interação entre os fatores e dependência genotípica entre os clones em todas as variáveis de crescimento (Figura 15 a-f). O número de microestacas $\geq 1,5$ cm < 2 cm, foi reduzido significativamente sob a luz LED branca para ambos os clones, enquanto a luz LED azul e LED vermelho/azul 3:1, foram responsáveis pela maior produtividade de microestacas para os clones C01 e C02, respectivamente, não sendo observada diferença nas outras qualidades de luz (Figura 15 a).

A luz LED azul proporcionou aumento significativo da produtividade de microestacas ≥ 2 cm para ambos os clones (embora no C01 não diferiu da luz fluorescente), quando comparada com as médias mais baixas, que foram alcançadas na luz LED vermelho/azul (3:1) para o C02 sem diferença significativa da luz fluorescente. Também o clone C01 na LED vermelho/azul 3:1 não diferiu da luz LED branca (Figura 15 b).

Tanto o massa fresca quanto seca de folha tiveram suas médias aumentadas na luz Led vermelho/azul (3:1) para o C01, não diferindo da fluorescente, que por sua vez não diferiu da luz LED azul. Já no C02 apenas a LED vermelho/azul (3:1) aumentou significativamente o massa fresca de folha, não apresentando diferença quando comparada com a luz LED branca para o massa seca. Na luz LED branca houve redução do massa fresca e seca de folhas nos dois clones, contudo no C01 não diferiu da luz LED azul (Figura 15 c,d).

Para o massa fresca de caule, a LED vermelho/azul (3:1) favoreceu o ganho de biomassa em ambos os clones, enquanto a luz Led branca reduziu os valores para o C01, sem apresentar diferença para a luz Led azul. No C02 as outras luzes não diferiram entre si (Figura 15, e). O massa seca de caule foi negativamente afetado quando exposto à luz LED branca para os dois clones, embora no C02 não diferiu significativamente da luz LED azul. A LED vermelho/azul (3:1) elevou o ganho de massa seca em ambos os clones, porém para o C01 não diferiu significativamente da luz fluorescente e LED azul (Figura 15, f).

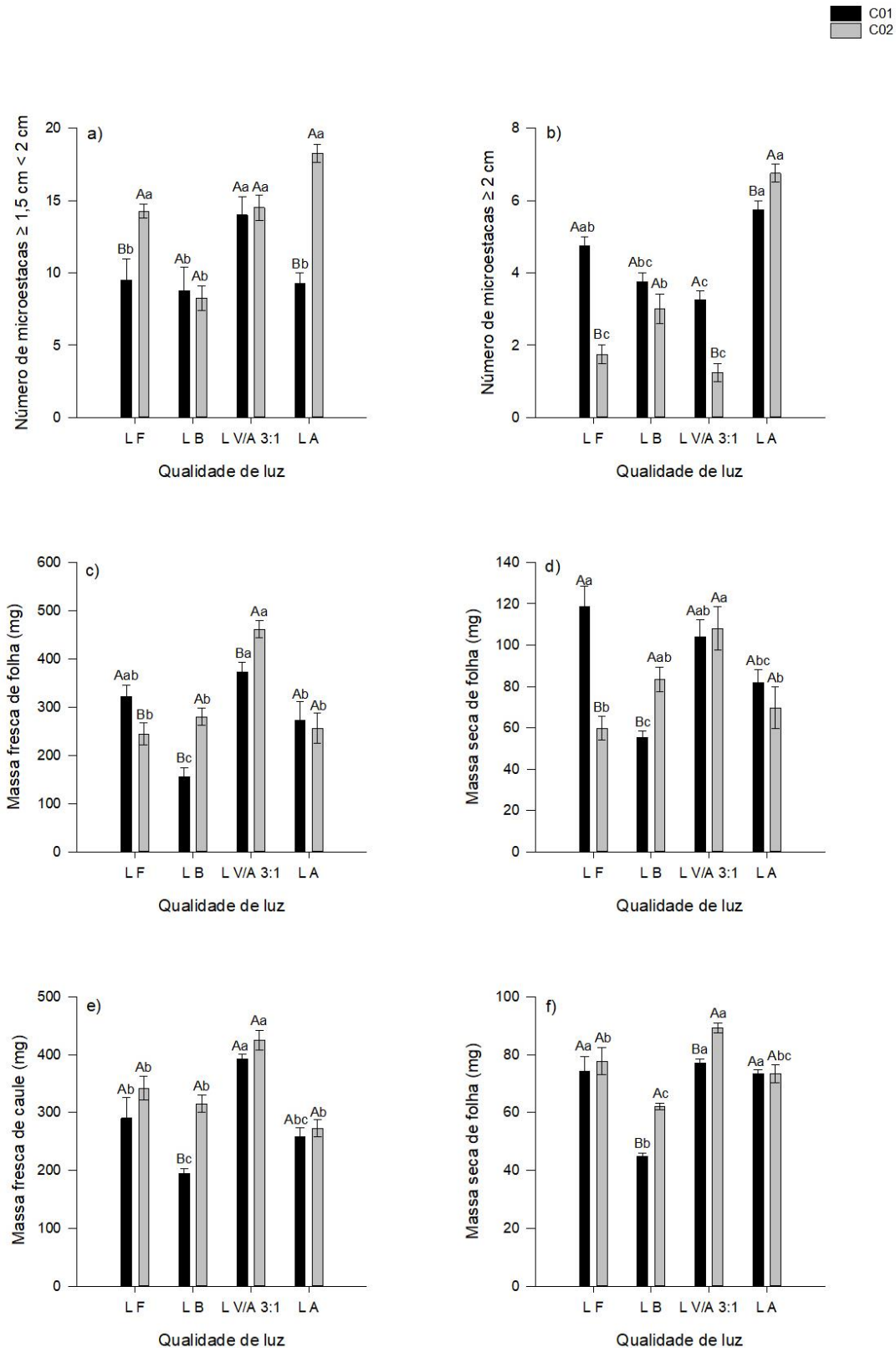


Figura 15. Parâmetros de crescimento em clones de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (C01 e C02) após 30 dias de cultivo in vitro sob diferentes qualidades de luz. LF = Luz Fluorescente. LB = Led Branca. LV/A 3:1 = Led Vermelho/Azul 3:1. LA = Led Azul. Número de microestacas $\geq 1,5$ cm < 2 cm (a). Número de microestacas ≥ 2 cm (b). Massa fresca de folha (mg) (c). Massa seca de folha (mg) (d). Massa fresca de caule (mg) (e). Massa seca de caule (mg) (f). Letras maiúsculas comparam médias em diferentes clones; letras minúsculas comparam médias em diferentes qualidades de luz. Médias seguidas de letras iguais não diferiram entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Valores representam as médias ($n=4$) \pm erro padrão.

Atividade da superóxido dismutase

Para a superóxido dismutase houve interação entre os fatores. No C01, a maior atividade foi observada na luz LED azul, sem diferir da LED branca, enquanto as demais luzes não diferiram entre si. Entretanto, no C02, a luz LED azul foi a responsável pela menor atividade da SOD, sem diferir significativamente da luz Led vermelho/azul (3:1), enquanto não foi observada diferença entre as outras luzes (Figura 16).

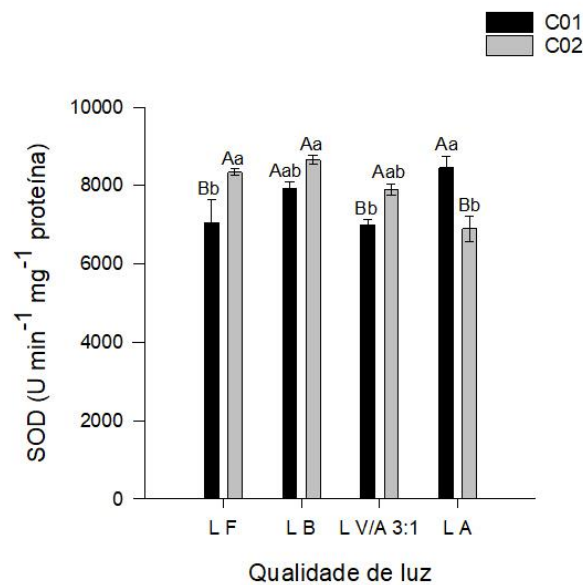


Figura 16. Atividade enzimática do estresse oxidativo para superóxido dismutase (SOD) em *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (C01 e C02) após 30 dias de cultivo in vitro sob diferentes qualidades de luz. LF = Luz Fluorescente. LB = LED Branca. LV/A 3:1 = LED Vermelho/Azul (3:1). LA = LED Azul. Letras maiúsculas comparam médias em diferentes clones; letras minúsculas comparam médias em diferentes qualidades de luz. Médias seguidas de letras iguais não diferiram entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Valores representam as médias, (n = 4) ± erro padrão.

Caracterização anatômica

Em ambos os clones, visualmente, a luz LED vermelho/azul (3:1) aumentou os espaços intercelulares, ao passo em que reduziu a presença de parênquima lacunoso no mesofilo. Enquanto a luz LED azul, presumivelmente, aumentou o adensamento dos parênquimas paliçádico e lacunoso, reduzindo substancialmente os espaços intercelulares. A luz fluorescente, de forma aparente, induziu a formação de mesofilos menos espessos quando comparado às demais qualidades de luz (Figura 17). Já para o caule, no C01, o balanço

vermelho/azul (3:1) reduziu o diâmetro e a luz LED azul o aumentou, visualmente. Não sendo observada diferenças relevantes para as outras qualidades de luz em nenhum dos clones (Figura 18).

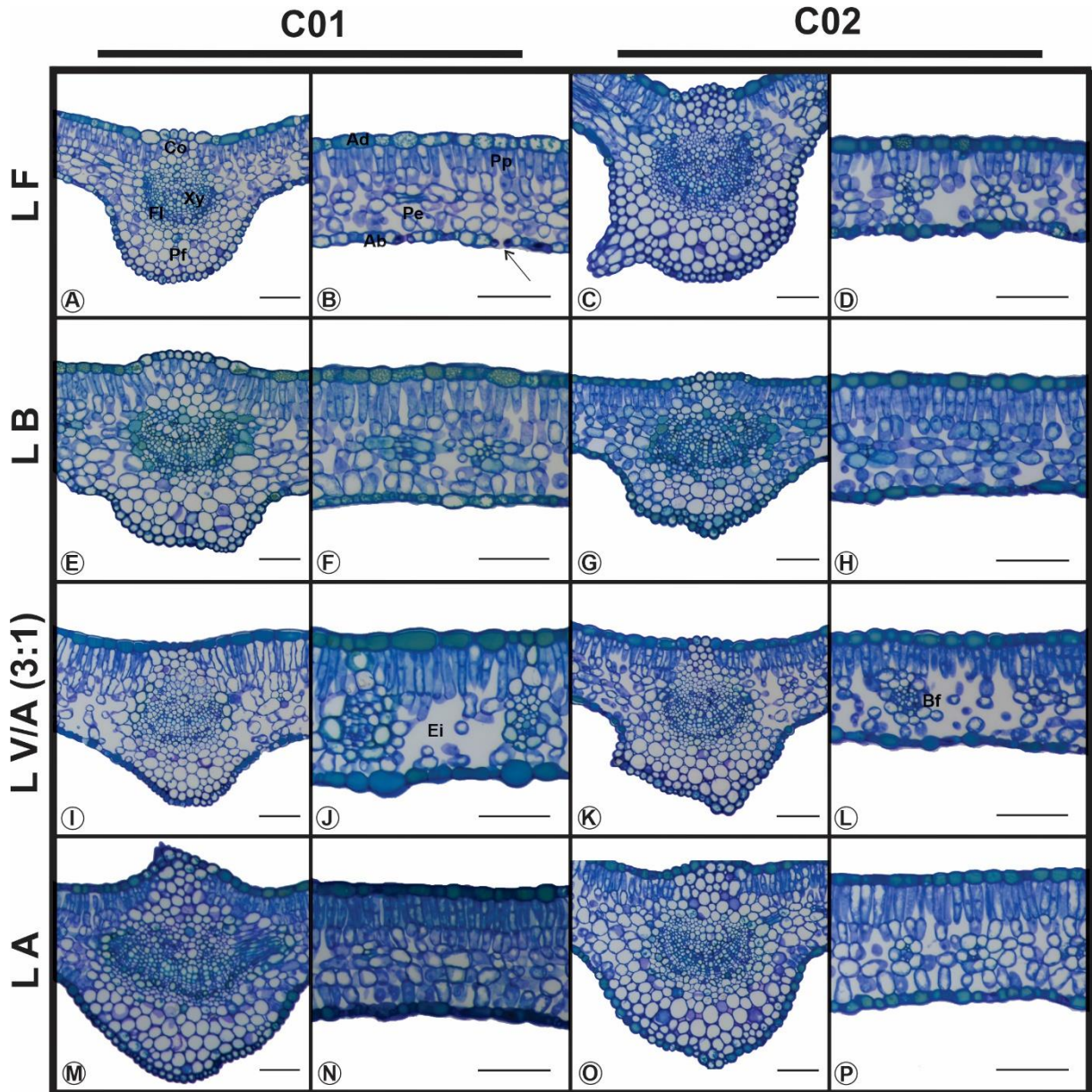


Figura 17. Sessões transversais da nervura central e mesofilo submetidas à coração com azul de toluidina em clones de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (C01 e C02) após 30 dias de cultivo in vitro sob diferentes qualidades de luz. LF = Luz Fluorescente. LB = Led Branca. LV/A 3:1 = Led Vermelho/Azul 3:1. LA = Led Azul. Ad = Epiderme adaxial. Pp = Parênquima paliçádico. Pe = Parênquima esponjoso. Ab = Epiderme abaxial. → = Abertura estomática. Co = Colênquima. Xy = Xilema. Fl = Floema. Pf = Parênquima fundamental. Bf = Bainha do feixe. Ei = Espaço intercelular. Barra = 200 μ m.

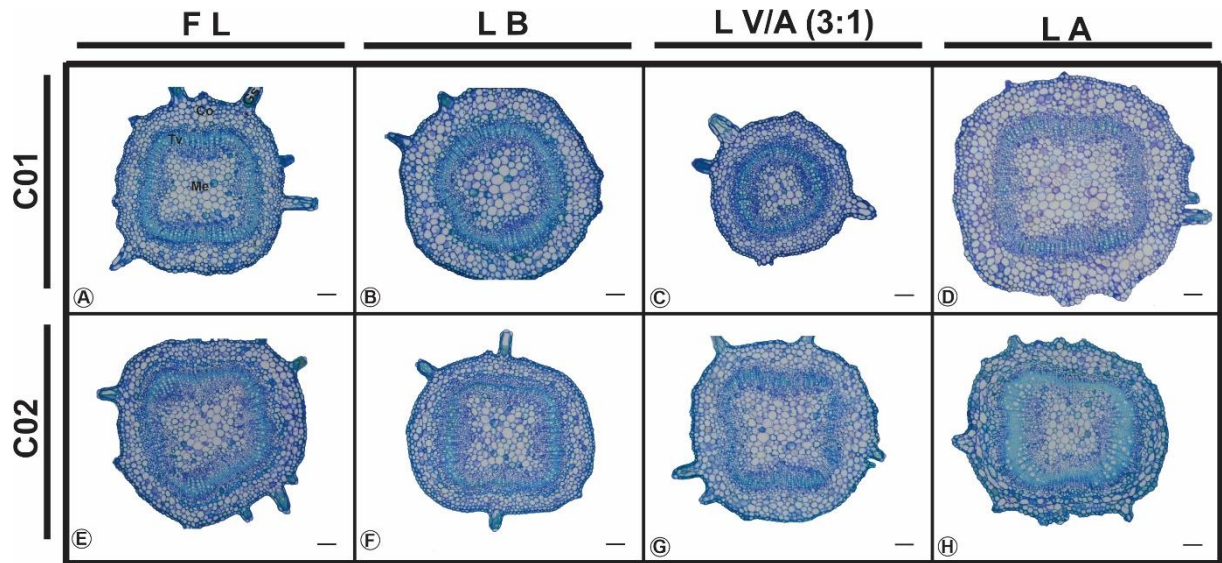


Figura 18. Sessões transversais do caule submetidas à coração com azul de toluidina em clones de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (C01 e C02) após 30 dias de cultivo in vitro sob diferentes qualidades de luz. LF = Luz Fluorescente. LB = Led Branca. LV/A 3:1 = Led Vermelho/Azul 3:1. LA = Led Azul. Co = Córtex. Tv = Tecido vascular. Me = Medula. Gs = Glândula sebácea emergente. Barra = 200 μ m.

4.3. Enraizamento de microestacas e altura de muda ex vitro

O enraizamento das microestacas, avaliadas por meio da sobrevivência e altura das mudas produzidas na condição ex vitro (viveiro) mostrou-se dependente da qualidade de luz em que a planta foi micropropagada. A luz fluorescente apresentou resultados superiores de forma expressiva quanto aos percentuais de sobrevivência e altura das mudas após 90 dias em ambos os clones, quando comparada principalmente com a luz LED branca, para os dois genótipos estudados (Figura 19 a,b; Figura 20). Ambos os parâmetros não apresentaram interação significativa, agindo de forma independente.

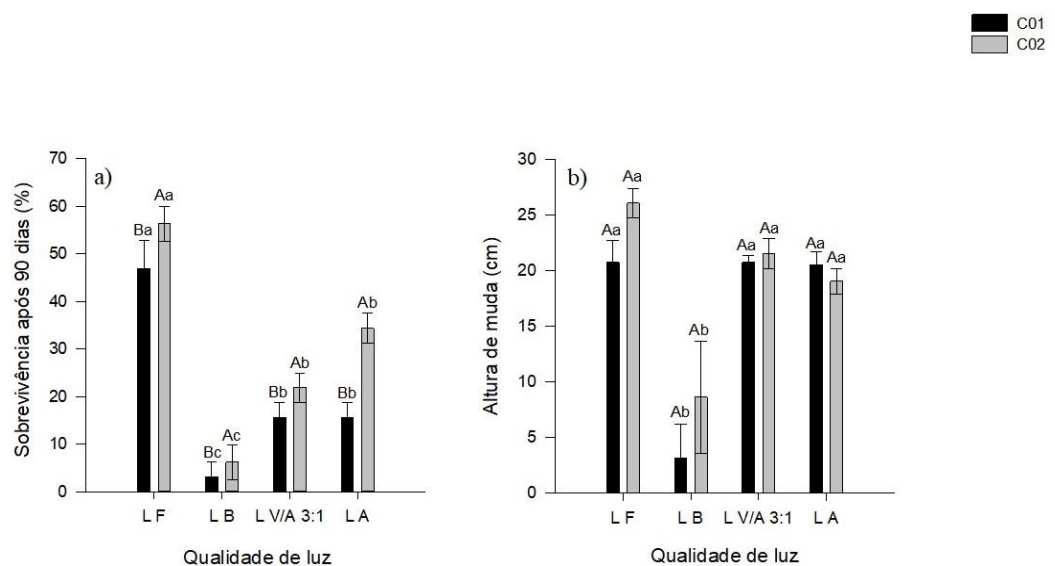


Figura 19. **a)** Sobrevivência ex vitro das mudas. **b)** Altura de muda, em clones de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora*, aos 90 dias em viveiro, após 30 dias de cultivo in vitro sob diferentes qualidades de luz. LF = Luz

Fluorescente. LB = LED Branca. LV/A 3:1 = LED Vermelho/Azul (3:1). LA = LED Azul. Letras maiúsculas comparam médias em diferentes clones; letras minúsculas comparam médias em diferentes qualidades de luz. Médias seguidas de letras iguais não diferiram entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Valores representam as médias, (n=4) \pm erro padrão.

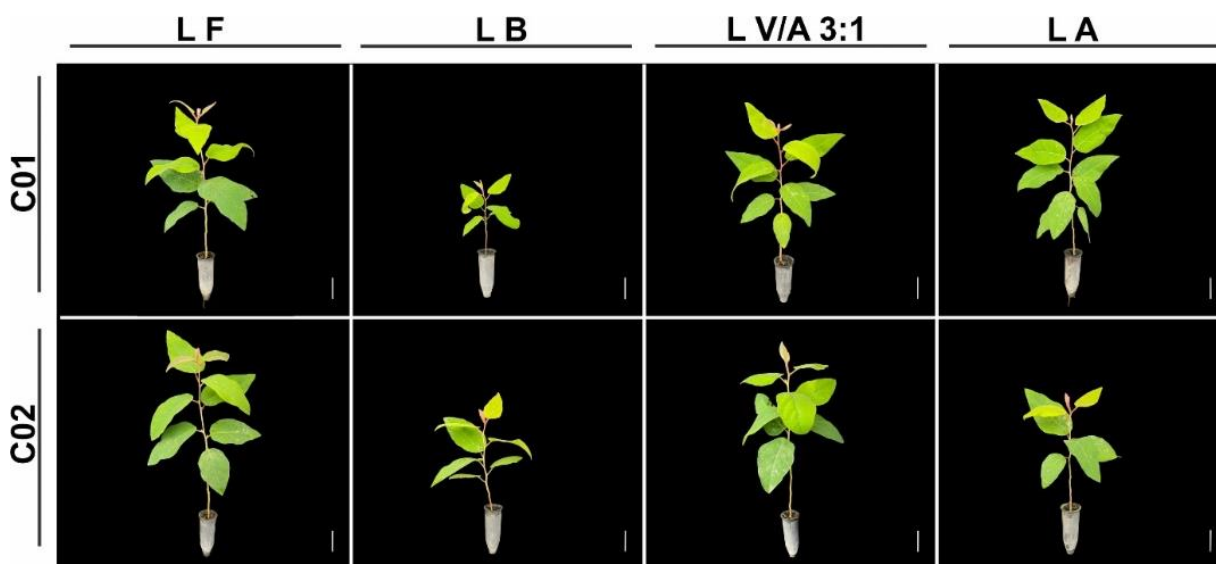


Figura 20. Mudas na condição ex vitro (viveiro) aos 90 dias de idade dos clones de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (C01 e C02), produzidas a partir do enraizamento das microestacas obtidas após 30 dias de cultivo in vitro sob diferentes qualidades de luz. L F = Luz Fluorescente. L B = LED Branca. L V/A 3:1 = LED Vermelho/Azul 3:1. L A = LED Azul. Barra = 4 cm.

5. DISCUSSÃO

Alterações no ambiente in vitro controlam o crescimento, desenvolvimento e metabolismo de plantas micropropagadas. Aqui fica demonstrado que um ambiente com baixa troca gasosa e presença de 15 g L⁻¹ sacarose favorecem a produtividade de propágulos, enquanto a sacarose proporciona ganho de biomassas frescas de folhas e caules.

Um ambiente com menor troca gasosa limita a entrada de CO₂ e principalmente, aumenta a umidade relativa do ar (ALVES et al., 2024; KIRDMANEE et al., 1995; KOZAI et al., 2005;), proporcionando às plantas micropropagadas acumularem maior teor de água em seus tecidos. Agrega-se ainda, o uso da sacarose como abundante fonte de energia de rápida disponibilização para crescimento vegetal (NGUYEN, et al., 2020; KOZAI, 2010), aumentando a capacidade da planta de fixar CO₂ (BADR et al., 2015). Com energia e água facilmente disponibilizadas, a planta investe em maior número de brotações e também brotações mais alongadas. Em contrapartida, a adoção de um sistema com maior troca gasosa ocasionou em acúmulo de biomassa seca em folhas e caules, em razão do ambiente com

menor umidade propiciar tecidos menos hidratados. Batista et al. (2017), também encontraram maior massa seca com trocas gasosas aumentadas.

O aumento das trocas gasosas elevou substancialmente o conteúdo de pigmentos fotossintéticos e maior fotossíntese in vitro. É reportado que plantas de *Ananas comosus* (ALVES et al., 2024), *Vernonia condensata* (FORTINI et al., 2021) e *Capsicum annuum* (BATISTA et al., 2017), também tiveram seus teores de clorofilas *a*, *b*, total e carotenoides aumentados sob trocas gasosas mais elevadas. Ambientes com maiores níveis de CO₂ têm promovido aumento da expressão de genes relacionadas ao metabolismo e síntese de clorofilas, facilitação da fotossíntese e rendimento fotossintético (SONG et al., 2020; XU, et al., 2020). Temos ainda que ambientes in vitro de baixa ventilação acumulam etileno em sua atmosfera (NGUYEN et al., 2020), que por sua vez, é um importante agente indutor da degradação de clorofilas (LI et al., 2023b).

A redução da fotossíntese in vitro também pode ocorrer pelo aumento de sacarose no meio de cultura (Figura 6 b). Nas maiores concentrações de sacarose, foi observada redução da competência fotossintética para *Ananas comosus* (ALVES et al., 2024) e *Eryngium foetidum* (SILVA et al., 2024). O aumento da sacarose afeta a assimilação líquida de CO₂ pela fotossíntese, devido à regulação negativa entre a atividade enzimática da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase [RuBisCO] e a sacarose (DESJARDINS et al., 1995; LOBO et al., 2015).

Um ambiente com maiores níveis de CO₂ também resultou em acúmulo de amido e açúcares solúveis em plantas (DONG et al., 2018; GÁMEZ et al., 2020; XU et al., 2014), corroborando com os resultados obtidos neste estudo. Foi observado que o aumento na fotossíntese em função da maior disponibilidade de CO₂, ocasionou acúmulo expressivo de amido e açúcares solúveis em folhas de *Phaseolus vulgaris*, o qual foi relacionado pelos autores ao aumento da atividade da sacarose-fosfato sintase (SPS) e da adenosina-5'-difosfoglicose pirofosforilase (AGP), que são as principais enzimas envolvidas no uso do carbono pelas plantas (PRASAD et al., 2004).

A presença de membranas permeáveis a gases também elevou as concentrações de malato, fumarato, prolina, aminoácidos totais e proteínas neste estudo. A síntese de malato e proteínas totais são impulsionadas em grãos e glumes de trigo, respectivamente, quando há maior disponibilidade de CO₂ no ambiente (GÁMEZ et al., 2020). Uma cascata enzimática eficaz foi alcançada utilizando condições aeróbicas (+CO₂) e amido para melhorar em 95% a produção de malato (SHI et al., 2019), que posteriormente é desidratado e convertido em fumarato (TAKEUCHI, M.; AMAO, 2023).

A prolina e outros aminoácidos são documentados como sendo relacionados no processo de proteção da planta à desidratação, ocorrendo grande acúmulo em seus tecidos quando cultivadas em ambientes com menor disponibilidade de água (VERSLUES; SHARMA, 2010). Condizente com os resultados aqui encontrados, pois a presença de membranas reduz substancialmente a umidade do interior do frasco ao permitir maior troca gasosas com o ambiente externo, inclusive, promovendo a desidratação do meio de cultura onde a planta é cultivada.

A atividade enzimática da superóxido dismutase foi aumentada na presença de membranas (Figura 10). Concentrações maiores dessa enzima, podem estar ligadas ao estresse oxidativo causado em ambientes ricos em CO₂. Para Fortini et al. (2021), concentrações crescentes de sacarose e a maior troca gasosa também aumentam o conteúdo de fenóis. Resultados semelhantes foram alcançados nesta pesquisa. A presença de maior concentração de CO₂ eleva a assimilação de carbono pela fotossíntese, podendo modificar a partição de fotoassimilados para o metabolismo secundário, aumentando a capacidade antioxidante total (AUSTEN et al., 2019; DONG et al., 2018).

A micropropagação de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* em ambiente com maior troca gasosa elevou a sobrevivência ex vitro e altura de mudas, principalmente quando uma concentração de 15 g L⁻¹ de sacarose foi utilizada (Figura 13). Como reportado anteriormente, a presença de maior troca gasosa com o ambiente externo elevou o conteúdo de pigmentos fotossintéticos e fotossíntese na concentração intermediária de sacarose, facilitando a aclimação da planta ao ambiente ex vitro. Em *Ananas comosus* o uso de membranas permeáveis a gases e a redução da sacarose para 10 g L⁻¹ durante a micropropagação também resultou na maior sobrevivência ex vitro de plantas (ALVES et al., 2023). A ausência de sacarose aqui resultou nos índices de sobrevivência e altura de muda mais baixos, embora, quando avaliada na presença de membranas, não diferiu da concentração mais elevada de sacarose. Nota-se ainda, que a presença de 30 g L⁻¹ de sacarose gerou plantas bifurcadas (Figura 14).

As diferentes qualidades de luz utilizadas na micropropagação dos híbridos aqui avaliadas, mostraram-se altamente influentes no crescimento e desenvolvimento das plantas, ficando demonstrado que os clones podem responder de formas distintas para um mesmo estímulo luminoso. Embora tenha havido grande oscilação nas respostas aos parâmetros de crescimento, a luz azul proporcionou maior número de brotações ≥ 2 cm para ambos os clones, enquanto a luz vermelho/azul 3:1 aumentou a biomassa.

Em plantas de *Achillea millefolium* foi alcançado maior comprimento de parte aérea sob luz azul (ALVARENGA et al., 2015). Também é recomendada a luz azul na regeneração de brotos (GUPTA; KARMAKAR, 2017) e como estimulador da síntese de clorofilas (GUPTA; KARMAKAR, 2017; HOFFMANN et al., 2015). O que pode estar relacionado ao maior crescimento de parte aérea em plantas micropropagadas sob luz azul. Em *Lippia rotundifolia* a presença do espectro de luz vermelha combinada com azul aumentou o acúmulo de biomassa, o que foi associado pelos autores à maior susceptibilidade do fitocromo a esse espectro (HSIE et al., 2019). Em *Pfaffia glomerata* a combinação de luz vermelho/azul 1:1 também favoreceu o acúmulo de biomassa (SILVA et al., 2020). A luz vermelho/azul 1:1 aumentou a divisão celular em *Populus euramericana* influenciando assim no acúmulo de biomassa (KWON et al., 2015).

Grande variação de respostas antioxidantes foram obtidas entre as luzes testadas e entre os clones. O clone C02 expressou menor atividade da SOD na luz azul, enquanto o C01 expressou os maiores valores na mesma luz (Figura 16). Em condições de estresse luminoso, as plantas tendem a absorver mais luz para a fotossíntese e o excesso de excitação luminosa pode causar fotoinibição da fotossíntese e também produzir espécies reativas de oxigênio (ROS), que para serem eliminadas, a planta eleva sua concentração de antioxidantes (SHAO et al., 2020).

A luz mostrou-se fundamental no processo de enraizamento e sobrevivência ex vitro nos clones estudados. A luz fluorescente foi a mais adequada no enraizamento e desenvolvimento para ambos os clones. Resposta semelhante ao enraizamento foi obtida para clones de *Eucalyptus saligna*, *E. microcorys*, *E. pilularis* e *C. torelliana* (SOUZA et al., 2022a). Na contramão de outras espécies que tem melhores respostas sob a luz led branca (BATISTA et al., 2018), as mudas dos híbridos de *Corymbia* aqui avaliadas alcançaram melhor desenvolvimento e enraizamento ex vitro sob a luz fluorescente e o pior sob a luz Led branca. A luz fluorescente utilizada, apresentou espectro abrangente, englobando comprimento de onda de 380 nm a 680 nm, com menores picos de irradiância (Figura 2). Essa amplitude e os picos de irradiância atenuados, podem ter contribuído para melhor enraizamento ex vitro.

Como demonstrado, o material genético, a presença de trocas gasosas, o nível de sacarose e também a qualidade de luz, representam fortes fontes de variação na cultura de tecidos, provocando alterações morfológicas, anatômicas e fisiológicas, devendo ser destinada especial atenção a estes fatores na micropropagação de plantas, como demonstrado nesta pesquisa para os dois clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* avaliados.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que:

- 1) O ambiente com $25 \mu\text{L L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e uso de 15 g L^{-1} de sacarose no meio de cultura, proporcionaram maior crescimento e desenvolvimento de brotações na micropropagação dos dois clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora*, apresentando comportamento fotomixotrófico in vitro.
- 2) O uso de membranas permeáveis a gases aumentou a fotossíntese e a atividade dos compostos metabólicos, aumentou a atividade da enzima superóxido dismutase e levou a maiores percentuais de enraizamento das microestacas obtidas, bem como no crescimento das mudas produzidas.
- 3) O espectro de luz azul mostrou-se o mais adequado no alongamento de microestacas in vitro, entretanto a luz fluorescente utilizada na micropropagação proporcionou brotações com maior resposta ao enraizamento das microestacas ex vitro, com subsequente produção de mudas melhor desenvolvidas.

7. BIBLIOGRAFIA

ASSIS, T. F. (2014). Melhoramento genético de *Eucalyptus*: desafios e perspectivas. In Anais do 3º Encontro Brasileiro de Silvicultura, Jataí: UFJ. <https://www.researchgate.net/publication/311453642>

ALVARENGA, I. C. A.; PACHECO, F. V.; SILVA, S. T.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J. E. B. P. (2015). In vitro culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 122, 299-308. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0766-7>

ALVES, G. L.; PINHEIRO, M. V. M.; MARINHO-DUTRA, T. R.; VIEIRA, K. S.; FIGUEIREDO, F. A. M. M. A.; FERRAZ, T. M.; CAMPOSTRINI, E.; RAMALHO, J. D. C.; CORRÊA, T. R.; REIS, F. O. (2024). Photoautotrophic potential and photosynthetic competence in *Ananas comosus* [L]. Merr. cultivar Turiaçu in in vitro culture systems. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**. <https://doi.org/10.1007/s11627-023-10410-z>

ALVES, J. P.; PINHEIRO, M. V. M.; CORRÊA, T. R.; ALVES, G. L.; MARINHO, T. R. S.; BATISTA, D. S.; FIGUEIREDO, F. A. M. M. A. (2023). Morphophysiology of *Ananas comosus* during in vitro photomixotrophic growth and ex vitro acclimatization. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 59, 106-120. <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10321-5>

ARAÚJO, M. J.; LEE, D. J.; TAMBARUSSI, E. V.; PAULA, R. C.; SILVA, P. (2020). Initial productivity and genetic parameters of three *Corymbia* species in Brazil: designing a breeding strategy. **Canadian Journal of Forest Research**. 51(1). <https://doi.org/10.1139/cjfr-2019-0438>

ARAÚJO, S. L.; MELO, A. B.; OLIVEIRA, L. J.; SILVA, J. G. M.; ALMEIDA, M. N. F.; SILVA, P. H. M.; VIDAURRE, G. B.; GODINHO, T. F. (2023). Cor, grã e propriedades físico-mecânicas da madeira de *Corymbia* e *Eucalyptus* não tradicionais. **Scientia Forestalis**, 51, e4029. <https://doi.org/10.18671/scifor.v51.28>

AUSTEN, N.; WALKER, H. J.; LAKE, J. A.; PHOENIX, G. K.; CAMERON, D. D. (2019) The regulation of plant secondary metabolism in response to abiotic stress: interactions between heat shock and elevated CO₂. **Frontiers in Plant Science**, 10:1463. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01463>

BADR, A.; IRRITA P.; DESJARDINS, Y. (2015). Comprehensive analysis of in vitro to ex vitro transition of tissue cultured potato plantlets grown with or without sucrose using metabolic profiling technique. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 122:491–508. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0786-3>

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, 39, 205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>

BATISTA, D. S.; DIAS, L. L. C.; RÊGO, M. M.; SALDANHA, C. W.; OTONI, W. C. (2017). Flask sealing on in vitro seed germination and morphogenesis of two types of

ornamental pepper explants. **Ciência Rural**, 47(3):e20150245. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150245>

BATISTA, D. S.; FELIPE, S. H. S.; SILVA, T. D.; CASTRO, K. M.; MAMEDES-RODRIGUES, T. C.; MIRANDA, N. A.; RÍOSRÍOS, A. M.; FARIA, D. V.; FORTINI, E. A.; CHAGAS, K.; TORRES-SILVA, G.; XAVIER, A.; ARENCIBIA, A. D.; OTONI, W. C. (2018). Light quality in plant tissue culture: does it matter? **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 54(3), 195-215. <http://dx.doi.org/10.1007/s11627-018-9902-5>.

BIDABADI, S. S.; JAIN, S. M. (2020). Cellular, Molecular, and Physiological Aspects of In Vitro Plant Regeneration. **Plants**, 9(6), 702. <https://doi.org/10.3390/plants9060702>

BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72(1-2): 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

BRONDANI, G. E.; OLIVEIRA, L. S.; KONZEN, E. R.; SILVA, A. L. L.; COSTA, J. L. (2018). Mini-incubators improve the adventitious rooting performance of corymbia and eucalyptus microcuttings according to the environment in which they are conditioned. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 90:2409–2423. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170284>

BRYANT, P. H; TRUEMAN, S. J. (2015) Stem anatomy and adventitious root formation in cuttings of Angophora, Corymbia and Eucalyptus. **Forests** 6:1227–1238. <https://doi.org/10.3390/f6041227>

CASTRO, K. M.; BATISTA, D. S.; FORTINI, E. A.; SILVA, T. D.; FELIPE, S. H. S.; FERNANDES, A. M.; SOUSA, R. M. J.; NASCIMENTO, L. S. Q.; CAMPOS, V. R.; GRAZUL, R. M.; VICCINI, L. R.; OTONI, W. C. (2019). Photoperiod modulates growth, morphoanatomy, and linalool content in *Lippia alba* L. (Verbenaceae) cultured in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 139:139–153. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01672-w>

CORREIA, D.; GONÇALVES, A. N.; COUTO, H. T. Z.; RIBEIRO, M. C. (1995). Efeito do meio de cultura líquido e sólido no desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação in vitro. **IPEF**, n. 48/49, 107-116. <https://www.ipef.br/publicacoes/scientia/nr48-49/cap11.pdf>

COSTA, M. M.; NOGUEIRA, T. A. P. C.; BITTENCOURT, R. C.; SILVA, W. H. M.; SILVA, L. S.; ALMEIDA, R. F.; SANTOS, G. A.; PENA, C. A. A. (2022). ASSESSMENT OF INDUSTRIAL Performance for market pulp production between eucalypt and *Corymbia* hybrids clones. **Revista Árvore**, 46, e4628. <https://doi.org/10.1590/1806-908820220000028>

COUCEIRO, M. A.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A.; KOZAI, T. (2006). Enhanced growth and quality of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) under photoautotrophic in vitro conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 42, 278-282. <https://doi.org/10.1079/IVP2006752>

DONG, T.; ZHANG, P.; HAKEEM, A.; LIU, Z.; SU, L.; REN, Y.; PEI, D.; XUAN, X.; LI, S.; FANG, J. (2023). Integrated transcriptome and metabolome analysis reveals the

physiological and molecular mechanisms of grape seedlings in response to red, green, blue, and white LED light qualities. **Environmental and Experimental Botany**, 213(1), 105441. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2023.105441>

DONG, J. L.; GRUDA, N.; LAM, S. K.; LI, X.; DUAN, Z. (2018). Effects of Elevated CO₂ on Nutritional Quality of Vegetables: A Review. **Frontiers in Plant Science**, 9:924. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00924>

DESJARDINSL, Y.; HDIDERL, C.; RIEK, J. (1995). Carbon nutrition in vitro - regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagated systems. *In*: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; SMITH, M. A. L. (eds) **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-015-8461-6_18

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. (2009). A micropropagação de Eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, 58, 49-59. <https://pfb.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/view/5>

ELLI, E. F.; SENTELHAS, P. C.; HUTH, N.; CARNEIRO, R. L.; ALVARES, C. A. (2020). Gauging the effects of climate variability on Eucalyptus plantations productivity across Brazil: A process-based modelling approach. *Ecological Indicators*, 114, 106325. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106325>

FAO. 2020. **Global Forest Resources Assessment 2020: Main report**. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9825en>

FARROKHZAD, Y.; BABAEI, A.; YADOLLAHI, A.; KASHKOOLY, A. B.; MOKHTASSI-BIDGOLI, A. (2022). In vitro rooting, plant growth, monosaccharide profile and anatomical analysis of *Phalaenopsis* regenerants under different regions of visible light. **South African Journal of Botany**. 149:622-631. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.06.039>

FELIPE, S. H. S.; BATISTA, D. S.; VITAL, C. E.; CHAGAS, K.; SILVA, P. O.; SILVA, T. D.; FORTINI, E. A.; CORREIA, L. N. F. C.; ÁVILA, R. T.; MALDANER, J.; FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; DaMATTA, F. M.; OTONI, W. C. (2019). Salinity-induced modifications on growth, physiology and 20-hydroxyecdysone levels in Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Physiology and Biochemistry**, 140:43-54. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.05.002>

FERNIE A. R, ROSCHER A; RATCLIFFE, R. G; KRUGER, N. J. (2001). Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. **Planta** 212: 250–263. <https://doi.org/10.1007/s004250000386>

FORTINI, E. A.; BATISTA, D. S.; MAMEDES-RODRIGUES, T. C.; FELIPE, S. H. S.; CORREIA, L. N. F.; CHAGAS, K.; SILVA, P. O.; ROCHA, D. I.; OTONI, W. C. (2021). Gas exchange rates and sucrose concentrations affect plant growth and production of flavonoids in *Vernonia condensata* grown in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 144:593–605. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01981-5>

FRADE, S. R. P.; SOUZA, D. M. S. C.; FERNANDES, S. B.; AVELAR, M. L. M.; MOLINARI, L. V.; GONÇALVES, D. S.; MAGALHÃES, T. A.; BRONDANI, G. E. (2023).

Spectral quality influence on in vitro morphophysiological responses of *Eucalyptus dunnii* Maiden and *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden × *E. urophylla* S.T.Blake. **New Zealand Journal of Forestry Science**, 53(3). <https://doi.org/10.33494/nzjfs532023x218x>

GÁMEZ, A. L.; VICENTE, R.; SANCHEZ-BRAGADO, R.; JAUREGUI, I.; MORCUENDE, R.; GOICOECHEA, N.; ARANJUELO, I. (2020). Differential flag leaf and ear photosynthetic performance under elevated (CO₂) conditions during grain filling period in durum wheat. **Frontiers in Plant Science**, 11:587958. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.587958>

GIBON, Y. BLAESING, O. E; HANNEMANN, J.; CARILLO, P.; HÖHNE, M.; HENDRIKS, J. H. M; PALACIOS, N.; CROSS, J.; SELBIG, J.; STITT, M. (2004). A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in Arabidopsis using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. **The Plant Cell** 16:3304-3325. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.025973>

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. (1977). Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, 59(2): 309-314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>

GONÇALVES, A. N. **Reversão a juvenilidade e clonagem de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake in vitro**. (1982). 97f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP, Piracicaba, SP. <https://doi.org/10.11606/T.11.1983.tde-20210104-195351>

GONÇALVES, J. L. M; ALVARES, C. A; ROCHA, J. H. T; BRANDANI, C. B; HAKAMADA, R. (2017). Eucalypt plantation management in regions with water stress. **Southern Forests: a Journal of Forest Science**, 79:3, 169-183. <https://doi.org/10.2989/20702620.2016.1255415>

GUPTA, S. D.; KARMAKAR, A. (2017). Machine vision based evaluation of impact of light emitting diodes (LEDs) on shoot regeneration and the effect of spectral quality on phenolic content and antioxidant capacity in *Swertia chirata*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 174:162-172 <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.07.029>

HABERLANDT, G. (1902). Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *In*: Laimer, M., Rücker, W. (eds) **Plant Tissue Culture**. Springer, Vienna. p. 69-92 https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6040-4_1

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. A.; GONÇALVES, A. N. (2000). Propagação vegetativa de *Eucalyptus*: princípios básicos e a sua evolução no Brasil. **IPEF**, Circular Técnica N° 192 <https://www.ipef.br/publicacoes/ctecnica/nr192.pdf>

HILL, K. D.; JOHNSON, L. A. S. (1995). "Systematic studies in the eucalypts. 7. A revision of the bloodwoods, genus *Corymbia* (Myrtaceae)." **Telopea: Journal of plant systematics** 6, 185–504. <https://doi.org/10.7751/telopea19953017>.

HOFFMANN, A. M.; NOGA, G.; HUNSCHE, M. (2015). High blue light improves acclimation and photosynthetic recovery of pepper plants exposed to UV stress.

Environmental and Experimental Botany, 109: 254-263.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.017>

HSIE, B. S.; BUENO, A. I. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; CARVALHO, A. A.; CUNHA, S. H. B.; MARTINS, E. R.; PINTO, J. E. B. P. (2019). Study of the influence of wavelengths and intensities of LEDs on the growth, photosynthetic pigment, and volatile compounds production of *Lippia rotundifolia* Cham in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 198:111577. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111577>

IBÁ - INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. (2023). **Relatório Anual 2023**.
<https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-anual-iba2023-r.pdf>

KIRDMANEE, C.; KITAYA, Y.; KOZAI, T. (1995). Effects of CO₂ enrichment and supporting material in vitro on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets in vitro. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 31:144-149.
<https://doi.org/10.1007/BF02632010>

KWON, A-R.; CUI, A-Y.; LEE, H.; SHIN, H.; KANG, K-S.; PARK, S-Y. (2015). Light quality affects shoot regeneration, cell division, and wood formation in elite clones of *Populus euramericana*. **Acta Physiologiae Plantarum**, 37(65). <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1812-0>

KOZAI, T. (2010). Photoautotrophic micropropagation. Environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, 10:188-204.
<https://www.researchgate.net/publication/260080835>

KOZAI, T.; KUBOTA, C. (2001). Developing a Photoautotrophic Micropropagation System for Woody Plants. **Journal of Plant Research**, 114:525-537.
<https://doi.org/10.1007/PL00014020>

KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A. (2005). **Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System**. Springer Dordrecht, ed.1, 356p. <https://doi.org/10.1007/1-4020-3126-2>

KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T. (2003). Photoautotrophic Micropropagation of Woody and Tropical Plants. *In*: Jain, S.M., Ishii, K. (eds) **Micropropagation of Woody Trees and Fruits**. Forestry Sciences, v. 75. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-010-0125-0_26

LISEC, J.; SCHAUER, N.; KOPKA, J.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R. (2006). Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, 1(1): 387–396. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.59>

LI, Y.; XU, J.; ZHANG, F.; GU, Y.; TIAN, W. TIAN, W.; TONG, Y.; LI, J. (2023a). The combination of red and blue light increases the biomass and steroidal saponin contents of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. **Industrial Crops and Products**. 194:116311.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116311>

LI, Z.; CHEN, C.; ZOU, D.; LI, J.; HUANG, Y.; ZHENG, X.; TAN, B.; CHENG, J.; WANG, W.; ZHANG, X. Y.; FENG, J. (2023b). Ethylene accelerates grape ripening via increasing

VvERF75-induced ethylene synthesis and chlorophyll degradation. **Fruit Research**, 3(3). <https://doi.org/10.48130/FruRes-2023-0003>

LIMA, M. S.; ARAUJO, M. M.; BERGHETTI, A. L. P.; AIMI, C. S.; COSTELLA, C.; GRIEBELER, A. M. SOMAVILLA, L. M.; SANTOS, O. P.; VALENTE, B. M. R. T. (2022). Mini-cutting technique application in *Corymbia* and *Eucalyptus*: effects of mini-tunnel use across seasons of the year. **New Forests**, 53:161-179. <https://doi.org/10.1007/s11056-021-09851-4>

LOUREIRO, B. A.; ASSIS, M. R.; MELO, I. C. N. A.; OLIVEIRA, A. F. F.; TRUGILHO, P. F. (2021). Rendimento gravimétrico da carbonização e caracterização qualitativa do carvão vegetal em clones de híbridos de *Corymbia* spp para uso industrial. **Ciência Florestal**, 31(1): 214–232. <https://doi.org/10.5902/1980509836120>

LOBO, A. K. M.; MARTINS, M. O.; NETO, M. C. L.; MACHADO, E. C.; RIBEIRO, R. V.; SILVEIRA, J. A. G. (2015). Exogenous sucrose supply changes sugar metabolism and reduces photosynthesis of sugarcane through the down-regulation of Rubisco abundance and activity. **Journal of Plant Physiology**, 179:113-121. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.03.007>

MARAVILHA, L. F.; TITON, M.; CANGUÇU, V. S.; ROCHA, F. M.; OLIVEIRA, M. L. R. (2023). Enraizamento in vitro e aclimatização de plântulas de *Corymbia citriodora*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, 43. <https://doi.org/10.4336/2023.pfb.43e202102232>

MASSUQUE, J.; SANCHEZ, J. Y. S. C.; LOUREIRO, B. A.; SETTER, C.; LIMA, M. D. R.; SILVA, P. H. M.; PROTÁSIO, T. P.; HEIN, P. R. G.; TRUGILHO, P. F. (2023). Evaluating the Potential of Non-commercial *Eucalyptus* spp. and *Corymbia* spp. for Bioenergy in Brazil. **BioEnergy Research**, 16, 1592–1603. <https://doi.org/10.1007/s12155-022-10502-5>

McCOWN, B. H.; LLOYD, G. (1981). Woody plant medium (WPM) - A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant-species **HortScience**, 16:453. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.16.3S.365>

MIRANDA, N. A.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; GALLO, R.; GATTI, K. G.; MOURA, L. C.; SOUZA, D. M. S. C.; MAGGIONI, J. H.; SANTOS, S. S. O. (2020). Quality and Intensity of Light in the In Vitro Development of Microstumps of *Eucalyptus urophylla* in a Photoautotrophic System. **Forest Science**, 66(6):754–760. <https://doi.org/10.1093/forsci/fxaa027>

MOLINARI, L. V.; SOUZA, D. M. S.; AVELAR, M. L. M.; FERNANDES, S. B.; GONÇALVES, D. S.; CARVALHO, D.; ATALA, L. R.; BRONDANI, G. E. (2023). Clonal microplant production of *Corymbia maculata*: effect of chemical sterilisation, plant growth regulator, gas exchange, activated charcoal and lighting. **Southern Forests: a Journal of Forest Science**, 85(1). <https://doi.org/10.2989/20702620.2022.2162459>

MURASHIGE, T. Plant Propagation Through Tissue Cultures. **Annual Review of Plant Biolog**, 25:135-166. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.25.060174.001031>

MURASHIGE, T., & SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15(3):473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

NGUYEN, Q. T.; XIAO, Y; KOZAI, T. (2020). Photoautotrophic micropropagation. *In*: Kozai T, Niu G, Takagaki M (eds) **Plant factory: an indoor vertical farming system for efficient quality food production**, 2nd edn. Academic Press, New York: 333–346. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816691-8.00023-6>

NUNES-NESE, A.; CARRARI, F.; GIBON, Y.; SULPICE, R.; LYTOVCHENKO, A.; FISAHN, J.; GRAHAM, J.; RATCLIFFE, R. G.; SWEETLOVE L. J.; FERNIE, A. R. (2007). Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *The Plant Journal* 50, 1093–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2007.03115.x>

O'BRIEN, T. P.; McCULLY, M. E. (1981). **The study of plant structure principles and selected methods**. Termarcarphi Pty Ltd, Melbourne Austrália.

OLIVEIRA, T. R.; ARAGÃO, V. P. M.; MOHARANA, K. C.; FEDOSEJEVS, E.; AMARAL, F. P.; SOUSA, K. R.; THELEN, J. J.; VENÂNCIO, T. M.; SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C. (2020). Light spectra affect the in vitro shoot development of *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) by changing the protein profile and polyamine contents. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, 1868(12):140529. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140529>

PETERS, J. L; VAN TUINEN, A.; ADAMSE, P.; KENDRICK, R. E.; KOORNNEEF, M. (1989). High pigment mutants of tomato exhibit high sensitivity for phytochrome action. **Journal of Plant Physiology** 134:661- 666. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(89\)80024-0](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(89)80024-0)

PHILLIPS, G.C.; GARDA, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. **In Vitro Cell Develop Biol - Plant**, 55:242–257. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09983-5>

PORRA, R. J.; THOMPSON, W. A.; KRIEDEMANN, P. E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, 975(3), 384–394. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(89\)80347-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(89)80347-0)

PRASAD, P. V. V.; BOOTE, K. J.; VU, J. C. V.; ALLEN JR. (2004). The carbohydrate metabolism enzymes sucrose-P synthase and ADG-pyrophosphorylase in Phaseolus bean leaves are up-regulated at elevated growth carbon dioxide and temperature. **Plant Science**, 166(6), 1565-1573. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.02.009>

REIS, C. A. F.; ASSIS, T. F.; SANTOS, A. M.; PALUDZYSZYN FILHO, E. (2013). **Corymbia citriodora: estado da arte de pesquisas no Brasil**. Colombo: Embrapa Florestas, Documentos, 255. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/94547/1/Doc.-255-Reis-Ainfo1.pdf>

REIS, C. A. F.; ASSIS, T. F.; SANTOS, A. M.; PALUDZYSZYN FILHO, E. (2014). **Corymbia torelliana: estado da arte de pesquisas no Brasil**. Colombo: Embrapa Florestas, Documentos, 261. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/113641/1/Doc.-261-Reis.pdf>

RODRIGUES, P. H. V.; OLIVEIRA, E. L.; DEMETRIO, C. A.; AMBROSANO, G. B.; PIEDADE. (2022). Effects of different light spectra on the slow-grown in vitro storage and quality of banana plantlets cv. Prata Catarina (AAB). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 150, 479–485. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02280-x>

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; ROCHA, D. I.; CAVATTE, P. C.; DETMANN, K. S. C.; TANAKA, F. A. O.; DIAS, L. L. C.; DaMATTA, F. M.; OTONI, W. C. (2014). CO₂-enriched atmosphere and supporting material impact the growth, morphophysiology and ultrastructure of in vitro Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 118:87–99. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0464-x>

SILVA, T. D.; BATISTA, D. S.; FORTINI, E. A.; CASTRO, K. M.; FELIPE, S. H. S.; FERNANDES, A. M.; SOUSA, R. M. J.; CHAGAS, K.; SILVA, J. V. S.; CORREIA, L. N. F.; FARIAS, L. M.; LEITE, J. P. V.; ROCHA, D. I.; OTONI, W. C. (2020). Blue and red light affects morphogenesis and 20-hydroxyecdysone content of in vitro *Pfaffia glomerata* accessions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. 203:111761. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111761>

SILVA, D. R.; SOARES, M. N. B.; SILVA, M. C. R.; LIMA, M. C.; SILVA-MORAES, V. K. O.; ALVES, G. L.; RÍOS-RÍOS, A. M.; LIMA, A. S.; PINHEIRO, M. V. M.; CORRÊA, T. R.; BATISTA, D. S.; FIGUEIREDO, F. A. M. M. A.; REIS, F. O.; FERRAZ, T. M.; FELIPE, S. H. S. (2024). Unlocking the Potential of In Vitro Photoautotrophy for *Eryngium foetidum*: Biomass, Morphophysiology, and Acclimatization. **Horticulturae**, 10(1):107. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10010107>

SHAO, M.; LIU, W.; ZHA, L.; ZHOU, C.; ZHANG, Y.; LI, B. (2020). Differential effects of high light duration on growth, nutritional quality, and oxidative stress of hydroponic lettuce under red and blue LED irradiation. **Scientia Horticulturae**, 268:109366. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109366>

SHI, T.; LIU, S.; ZHANG, Y-H, P. J. (2019). CO₂ fixation for malate synthesis energized by starch via in vitro metabolic engineering. **Metabolic Engineering**, 55:152-160. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.07.005>

SONG, H.; LI, Y.; XU, X.; ZHANG, J.; ZHENG, S.; HOU, L.; XING, G.; LI, M. (2020). Analysis of genes related to chlorophyll metabolism under elevated CO₂ in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Scientia Horticulturae**, 261:108988. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108988>

SOUZA, D. M. S. C.; AVELAR, M. L. M.; SILVA, E. O.; DUARTE, V. P.; GONÇALVES, D. S.; MOLINARI L. V.; BRONDANI, G. E. (2022a). Influence of spectral quality on the rooting of *Corymbia* and *Eucalyptus* spp. minicuttings. **Annals of Forest Research**, 65(1): 141-154. <https://doi.org/10.15287/afr.2022.2074>

SOUZA, D. M. S. C.; FERNANDES, S. B.; SILVA, E. O.; DUARTE, V. P.; GONÇALVES, D. S.; CARVALHO, D.; TEIXEIRA, G. L.; BRONDANI, G. E. (2022b). Effect of light intensity on in vitro introduction and multiplication of *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**. 58:225-239. <https://doi.org/10.1007/s11627-021-10237-6>

SOUZA, D. M. S. C.; XAVIER, A.; MIRANDA, N. A.; GALLO, R.; OTONI, W. C. (2020a). Light quality, 6-benzyladenine and number of subcultures for in vitro multiplication of hybrid clones of *Corymbia*. **Scientia Forestalis**, 48(128):e3282. <https://doi.org/10.18671/scifor.v48n128.03>

SOUZA, D. M. S. C.; XAVIER, A.; MIRANDA, N. A.; GALLO, R.; SANTOS, G. A.; VALENTE, B. M. R. T.; OTONI, W. C. (2020b). Photomixotrophism on in vitro elongation of *Corymbia* hybrid clones. **Scientia Forestalis**, 48(128):e3436. <https://doi.org/10.18671/scifor.v48n128.11>

SOUZA, D. M. S. C.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; MIRANDA, N. A.; MAGGIONI, J. H. (2019). Light quality in the in vitro introduction of *Corymbia* hybrid clones. **Revista Árvore**, 42(6):e420604. <https://doi.org/10.1590/1806-90882018000600004>

TAKEUCHI, M.; AMAO, Y. (2023). Phosphate-induced enhancement of fumarate production from a CO₂ and pyruvate with the system of malate dehydrogenase and fumarase. **RSC Sustainability**, 1:90-96. <https://doi.org/10.1039/D2SU00031H>

TAMBARUSSI, E.V; PEREIRA, F.B; SILVA, P.H.M.; LEE, D.; BUSH, D. (2018). Are tree breeders properly predicting genetic gain? A case study involving *Corymbia* species. **Euphytica**, 214(150):1-11. <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2229-9>

TAMBE, V. D.; BHAMBAR, R. S. (2014). Estimation of total phenol, tannin, alkaloid and flavonoid in *Hibiscus tiliaceus* Linn. wood extracts. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, 2:41-47. <https://www.rroij.com/open-access/estimation-of-total-phenol-tannin-alkaloid-and-flavonoid-in-hibiscus-tiliaceus-linn-wood-extracts-.php?aid=34291>

TISARUM, R.; SAMPHUMPHUNG, T.; THEERAWITAYA, C.; PROMMEE, W.; CHAUM, S. (2018). In vitro photoautotrophic acclimatization, direct transplantation and ex vitro adaptation of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 133: 215-223. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1374-5>

TRUEMAN, S. J.; HUNG, C. D.; WENDLING, I. (2018). Tissue culture of *Corymbia* and *Eucalyptus*. **Forests**, 9(2), 1-42. <http://dx.doi.org/10.3390/f9020084>

VERSLUES, P. E. V.; SHARMA, S. P. (2010). Proline Metabolism and Its Implications for Plant-Environment Interaction. **Arabidopsis Book**, 8:E0140. <https://doi.org/10.1199%2Ftab.0140>

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. (2021). **Silvicultura Clonal: Princípios e Técnicas**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 293p.

XU, X.; WU, P.; SONG, H.; ZHANG, J.; ZHENG, S.; XING, G.; HOU, L.; LI, M. (2020). Identification of candidate genes associated with photosynthesis in eggplant under elevated

CO₂. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 34(1):1166–1175. <https://doi.org/10.1080/13102818.2020.1809519>

XU, S.; ZHU, X. S.; LI, C.; YE, Q. (2014). Effects of CO₂ enrichment on photosynthesis and growth in *Gerbera jamesonii*. **Scientia Horticulturae**. 177(2):77–84. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.07.022>

WHITE, P. R. (1943). Further Evidence on the Significance of Glycine, Pyridoxine and Nicotinic Acid in the Nutrition of Excised Tomato Roots. **American Journal of Botany**, 30(1), 33-36. <https://doi.org/10.2307/2437391>

WHITE, P. R. (1934). POTENTIALLY UNLIMITED GROWTH OF EXCISED TOMATO ROOT TIPS IN A LIQUID MEDIUM. **Plant Physiology**, 9(3):585-600. <https://doi.org/10.1104%2Fpp.9.3.585>

WELLBURN A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, 144:307-313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)

ZAREI, A.; BEHDARVANDI, B.; DINANI, E. T.; MACCARONE, J. (2021). *Cannabis sativa* L. photoautotrophic micropropagation: a powerful tool for industrial scale in vitro propagation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 57:932-941. <https://doi.org/10.1007/s11627-021-10167-3>

ZOBAYED, S. M. A.; AFREEN-ZOBAYED, F.; KUBOTA, C.; KOZAI, T. (2000). Mass Propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a Scaled-up Vessel Under In Vitro Photoautotrophic Condition. **Annals of Botany**, 85(5):587–592. <https://doi.org/10.1006/anbo.1999.1106>