

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

MAYRA ESTEVÃO BARROS DE CASTRO

**QUALIDADE DE LUZ EM JARDIM CLONAL *IN VITRO* DE CLONES
DE HÍBRIDOS DE *Corymbia* spp.**

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

MAYRA ESTEVÃO BARROS DE CASTRO

**QUALIDADE DE LUZ EM JARDIM CLONAL *IN VITRO* DE CLONES
DE HÍBRIDOS DE *Corymbia* spp.**

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: Aloísio Xavier

Coorientador: Wagner Campos Otoni

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2021**

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

T

C355q
2021

Castro, Mayra Estevão Barros de, 1993-
Qualidade de luz em jardim clonal *in vitro* de clones de
híbridos de *Corymbia* spp. / Mayra Estevão Barros de Castro. –
Viçosa, MG, 2021.
46 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Aloísio Xavier.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 40-46.

1. *Corymbia* - Propagação in vitro. 2. *Corymbia* - Efeito da
luz. 3. Fontes de luz. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Engenharia Florestal. Programa de
Pós-Graduação em Ciência Florestal. II. Título.

CDO adapt. CDD 22. ed. 634.918121

MAYRA ESTEVÃO BARROS DE CASTRO

**QUALIDADE DE LUZ EM JARDIM CLONAL *IN VITRO* DE CLONES
DE HÍBRIDOS DE *Corymbia* spp.**

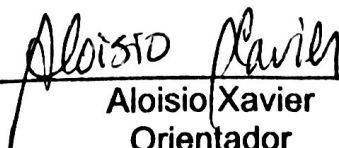
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 12 de fevereiro de 2021.

Assentimento:



Mayra Estevão Barros de Castro
Autora



Aloisio Xavier
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir concluir mais uma etapa em minha vida e me conceder forças para perseverar no caminho até aqui.

À minha mãe Maria Regina, ao meu pai Admar e ao meu irmão Marlon pelo amor incondicional, pelas orações e por apoiarem as minhas decisões.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-graduação em Ciência Florestal e ao Departamento de Engenharia Florestal que me acolheram e forneceram o suporte necessário para a realização desta pesquisa.

A empresa CMPC-Celulose Rio Grandense, por ceder o material genético (clones) base utilizado neste estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), 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.

Ao professor Aloisio Xavier, pela oportunidade de fazer parte desse projeto, pela paciência, confiança e disponibilidade em me orientar; ao professor Wagner Campos Otoni por ser um incentivador de pessoas, contribuir nas discussões do trabalho e por me coorientar.

À Ana Cláudia Ferreira da Cruz e ao professor Samuel Cordeiro Vitor Martins por aceitarem o convite para participar da banca examinadora, pela disponibilidade e por suas contribuições para o trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos II – BIOAGRO/UFV, pela convivência amigável, motivadora e discussões científicas.

Aos membros do Grupo de Silvicultura Clonal (GSC), em especial ao Marlúcio, Ana Kelly, Paloma, Ana Cláudia e Marina por dividirem as experiências, conquistas, por todo aprendizado e colaboração com os trabalhos desenvolvidos.

À Gabriela Torres, que durante o curso de mestrado, além de amiga se tornou indispensável, com conselhos que foram extremamente importantes, pelos bate-papos e por aguçar ainda mais meu interesse sobre a cultura de tecidos.

À República Família 101, por ser meu lar em Viçosa, em especial a Alexandra, Alice, Ana Luísa, Giulia e Rayane, pelos anos de convivência, pelos desabafos e alegrias compartilhadas no dia a dia; assim como a nossa querida colaboradora Célia, sempre cuidando de nós com carinho.

Aos amigos da pós-graduação que compartilharam tantos momentos, em especial à um seleto grupo de amigos da ciência florestal Ana Cláudia, Caio Elete, Danúzia Souto, Fábria Souza, Ítalo Nunes, Ítalo Campanharo e Lidiane Bastos.

Aos amigos que Viçosa me presenteou e que foram alento em situações difíceis e motivo de boas risadas em situações singulares Gabriella Marques, Bruno Lima, Sávio Muratori e Fernando Silva.

E finalmente, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação acadêmica e que por um descuido não foram citados neste texto.

BIOGRAFIA

MAYRA ESTEVÃO BARROS DE CASTRO, filha de Admar de Castro e Maria Regina Estevão Barros, nasceu em 05 de junho de 1993, em Ubá, Minas Gerais.

Concluiu o 1º grau em 2008 na “Escola Estadual Coronel Camilo Soares”, na cidade de Ubá-MG e o 2º grau em 2012, no Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais (IFSEMG), Campus Rio Pomba, onde também realizou em concomitância ao 2º grau, o ensino Técnico em Florestas.

Em maio de 2013, ingressou no curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Campus Alegre- ES, concluindo o curso em julho de 2018.

Em agosto de 2018, ingressou no curso de Pós-Graduação em Ciência Florestal, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), concluindo os requisitos necessários à obtenção do título de *Magister Scientiae* em fevereiro de 2021.

RESUMO

CASTRO, Mayra Estevão Barros de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2021. **Qualidade de luz em jardim clonal *in vitro* de clones híbridos de *Corymbia* spp.** Orientador: Aloísio Xavier. Coorientador: Wagner Campos Otoni

O gênero *Corymbia* vem se destacando no setor florestal pelos bons resultados em qualidade da madeira e produtividade, além de ser alternativa para os programas de melhoramento florestal diversificarem os materiais genéticos disponíveis para plantios clonais. Contudo, os materiais resultantes da hibridação das espécies desse gênero têm apresentado baixo potencial de enraizamento adventício, o que dificulta a eficiência do processo de produção de mudas clonais. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar o comportamento de clones de híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodra* e *Corymbia citriodra* x *C. torelliana* sob influência de diferentes qualidades de luz durante a implantação e o estabelecimento de um jardim clonal *in vitro*, bem como o enraizamento adventício de microestacas na condição *ex vitro*. As seguintes fontes de luz foram testadas: luz fluorescente (2F), LED branca (LED B), LED vermelha/azul (LED V/A, divididas proporcionalmente 50%-50%), LED vermelha/azul (LED V/A+, divididas respectivamente 1%-99%) e LED vermelha/azul (LED V+/A, divididas respectivamente 99%-1%). A qualidade espectral proporcionada por diferentes fontes de luz influenciou a implantação do jardim clonal *in vitro* de híbridos *Corymbia* spp. A fonte LED V/A+ (com maior proporção de azul) estimulou o crescimento em altura na primeira fase (implantação) e na segunda fase (estabelecimento) a luz LED B proporcionou maior produção microestacas. No enraizamento adventício das microestacas na condição *ex vitro*, após 120 dias de monitoramento, o desenvolvimento das mudas de *Corymbia* spp. não foi influenciado significativamente pela qualidade de luz aplicada nas microcepas *in vitro*. Desse modo, as lâmpadas LED promoveram o estímulo à fotoautotrofia *in vitro*, mas não houve influência no enraizamento e sobrevivência das mudas na condição *ex vitro*.

Palavras-chave: Propagação *in vitro*. Cultivo fotoautotrófico. Fontes de luz.

ABSTRACT

CASTRO, Mayra Estevão Barros de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2021. **Quality of light *in vitro* clonal hedge of hybrids of clones of *Corymbia* spp.** Adviser: Aloísio Xavier. Co-adviser: Wagner Campos Otoni.

The *Corymbia* genus has been standing out in the forest sector for presenting good results in terms of wood quality and productivity, in addition to being an alternative for breeding programs to diversify the genetic materials available for planting. However, the combined materials of hybridization of species of this genus have shown a low potential for adventitious rooting, which hinders the efficiency of the seedling production process. In this sense, the objective of this work was to evaluate the behavior of hybrid clones of *Corymbia* spp. influence of different light qualities during implantation and the establishment of an *in vitro* clonal hedge as well as the adventitious rooting of micro-cuttings in the *ex vitro* condition. The following light sources were tested: fluorescent light (2F), white LED (LED B), red / blue LED (LED V / A, proportionally divided 50% -50%), red / blue LED (LED V / A +, divided respectively 1% -99%) and red / blue LED (LED V + / A, divided respectively 99% -1%). The spectral quality provided by different light sources influenced the implantation of the *in vitro* clonal hedge of *Corymbia* spp. The LED light source V / A + (with higher proportion of blue) stimulates growth in height in the first phase (implantation) and in the second phase (establishment) the LED B light provided greater micro-cuttings production. In the adventitious rooting of the micro-cuttings in the *ex vitro* condition, after 120 days of monitoring, the development of the clonal seedlings of *Corymbia* spp. was not influenced by the light quality applied in the micro-stumps *in vitro*. In this way, LED lamps stimulated photoautotrophy *in vitro*, but there was no long-term influence on rooting and changes in the *ex vitro* condition.

Keywords: In vitro propagation. Photoautotrophic cultivation. Light source.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 O gênero <i>Corymbia</i>	12
2.2 A micropropagação.....	14
2.3 Micropropagação fotoautotrófica	14
2.4 Uso da luz na micropropagação	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Material vegetal e caracterização da área experimental	19
3.2 Instalação do jardim clonal <i>in vitro</i>	19
3.3 Fontes de Luz	21
3.4 Manejo do jardim clonal <i>in vitro</i>	23
3.5 Condições <i>ex vitro</i>	23
3.6 Delineamento experimental, coleta e análise de dados.....	24
4 RESULTADOS.....	27
4.1 Fontes de luz e o crescimento em altura	27
4.2 Pigmentos fotossintéticos e qualidade de luz.....	27
4.3 Enraizamento das gemas alongadas.....	29
4.4 Sobrevivência <i>in vitro</i>	30
4.5 Estabelecimento do jardim clonal <i>in vitro</i>	31
4.6 Formação da muda <i>ex vitro</i>	32
5 DISCUSSÃO.....	35
6 CONCLUSÕES.....	39
REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

As espécies *Corymbia citriodora* e *Corymbia torelliana* e alguns de seus híbridos interespecíficos, também receberam destaque no setor florestal nos últimos anos devido adaptação às condições ambientais adversas. Além disso, apresentam boas características silviculturais e propriedades tecnológicas da madeira das espécies de *Corymbia* spp. aumentou o interesse pelo gênero (MORAIS et al., 2010).

O estudo dos efeitos da variabilidade climática no crescimento do eucalipto, além de auxiliar no planejamento de implantação da floresta, diminui os riscos climáticos como geadas e auxilia na importante decisão da adequada escolha de genótipos (ELLI et al., 2020). A busca pela melhoria da produtividade, bem como pela produção de híbridos para regiões não tradicionais em plantios florestais, abriu caminhos para o desenvolvimento da pesquisa utilizando a micropropagação (SOUZA et al., 2020)

Nesse sentido, a micropropagação pode contribuir para diminuir os efeitos da sazonalidade de diferentes regiões, uma vez que o ambiente de cultivo pode ser adaptado e controlado para contornar fatores limitantes no processo de clonagem. O desenvolvimento de protocolos que definam procedimentos de estabelecimento *in vitro* (KERET et al., 2018), multiplicação (TRUEMAN et al., 2018), alongamento (GALLO et al., 2017), estágios de enraizamento e aclimatização (BRONDANI et al., 2018) também corroboram para a evolução da produção de mudas visando o atendimento em larga escala.

Entretanto, o cultivo *in vitro* convencional pode causar perturbações fisiológicas e anatômicas nas plantas. As plantas cultivadas com sacarose exibem uma fotossíntese significativamente menor que aquelas cultivadas na ausência desse carboidrato. A redução da fotossíntese pode ser atribuída a alguns fatores, como por exemplo, a inibição de mecanismos enzimáticos envolvidos na assimilação de carboidratos, ao acúmulo de amido em virtude da alta concentração de carboidrato no meio, ou ainda ao aparato fotossintético ineficiente (BADR et al., 2011).

Assim como a redução fotossintética, a hiperidricidade, o baixo teor de clorofila, raízes não funcionais com poucos pelos absorventes, dificultam a aclimatização *ex vitro* e, por consequência, reduzem a porcentagem final de sobrevivência das mudas (VASCONCELOS et al., 2012; HARTMAN, 2011). Além da presença de carboidratos exógenos, o hábito heterotrófico das plantas micropropagadas é causado pelo

ambiente a que os explantes são condicionados. Os recipientes possuem baixa troca gasosa, alta umidade relativa do ar, alta concentração de etileno, baixa concentração de CO₂ e baixa densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (ARIGITA et al., 2010).

Devido a estas alterações nos mecanismos fisiológicos e bioquímicos nas plantas na organogênese *in vitro*, a micropropagação em sistemas fotoautotróficos têm buscado colaborar para diminuir tais danos, através do aumento da troca gasosa e da intensidade luminosa fornecidas as plantas (NGUYEN et al., 2015). O jardim clonal *in vitro* como uma técnica do cultivo fotoautotrófico, conforme descrito por Miranda (2018), visa reunir os ganhos em resultados obtidos com a técnica da miniestaquia às vantagens da micropropagação. As condições assépticas, o maior controle do ambiente e o cultivo em espaço reduzido, aliadas as características juvenis (ontogeneticamente e fisiologicamente) dos materiais genéticos a serem produzidos, podem sinalizar um caminho para melhoria do processo de produção de mudas (MIRANDA, 2018).

No ambiente de cultivo, a luz pode atuar como um fator regulador externo em diversos processos morfogênicos e fisiológicos que alteram a arquitetura e os níveis fitoquímicos da planta (OUZOUNIS et al., 2015). Sendo assim, o sistema de cultivo *in vitro* que utiliza as lâmpadas LED's podem propiciar um ambiente de luz específico, combinando os componentes necessários durante o cultivo. Os fatores que compõe o ambiente de luz incluem a densidade de fluxo de fótons (intensidade), qualidade da luz (comprimento de onda em determinada faixa espectral) e o fotoperíodo (BATISTA et al, 2018).

A qualidade de luz tem revelado diversos efeitos sobre o crescimento *in vitro*, com uma variedade de respostas entre as espécies, assim como o efeito de diferentes comprimentos de onda podem causar no crescimento, principalmente nos gêneros *Eucalyptus* e *Corymbia*, mais que ainda são escassos estudos neste sentido (SOUZA et al., 2020).

Devido a importância da luz no processo de morfogênese e a variabilidade de respostas existentes para determinadas espécies e clones, fases de desenvolvimento ou objetivo a serem alcançados, o jardim clonal *in vitro* associado à qualidade espectral pode ser uma opção para contribuir com a evolução da propagação vegetativa de *Corymbia*, visto que o gênero possui clones recalcitrantes ao enraizamento. Diferentes qualidades de luz afetam o desenvolvimento de *Corymbia* spp. no ambiente fotoautotrófico? O nível de alteração alcançado por determinada

qualidade de luz *in vitro* obteria o mesmo o resultado na condição *ex vitro*? Se sim, por quanto tempo esse efeito se estenderia?

Sendo assim, o objetivo geral do trabalho foi avaliar a influência da qualidade de luz ao longo do processo de formação da muda para diferentes clones de híbridos de *Corymbia* spp., compreendendo seu comportamento *in vitro* e *ex vitro*. Os objetivos específicos foram: avaliar a influência de diferentes qualidades de luz na implantação e no estabelecimento de um jardim clonal *in vitro* de três clones híbridos de *Corymbia* spp. sob condições fotoautotróficas, assim como o de avaliar a influência da qualidade de luz aplicada as microcepas em jardim clonal *in vitro* no enraizamento e crescimento das microestacas *ex vitro* de dois clones de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gênero *Corymbia*

O gênero *Eucalyptus* se refere a um grande número de espécies originárias da Austrália, Indonésia e outras ilhas da Oceania. Contudo, quando Pryor e Johnson em 1971 elaboraram uma chave sistemática para o *Eucalyptus*, dividiram esse gênero em subgêneros dentre eles o sub-gênero *Corymbia*. A pesquisa molecular em meados dos anos 90, mostrou que as espécies do sub-gênero *Corymbia* não se relacionavam com o sub-gênero *Symphyomyrtus* (maioria dos eucaliptos), gerando indícios de que seria melhor considera-las como um gênero separado. O principal indício que os botânicos e taxonomistas em geral apresentavam era a impossibilidade de reprodução natural entre esses grupos, sendo um fator crucial para rearranjar as espécies sistematicamente (COPPEN, 2005).

Os botânicos Hill e Johnson (1995) foram os primeiros a definir o gênero *Corymbia*, como um grupo distinto dos eucaliptos. Os mesmos autores apresentaram 113 espécies de *Corymbia*, sendo as mais conhecidas: *Corymbia citriodora*, *Corymbia maculata*, *Corymbia ficifolia*, *Corymbia ptychocarpa* e *Corymbia torelliana*.

A introdução do *Corymbia citriodora* no Brasil foi realizada para atender a indústria de produção de carvão vegetal devido à sua adaptação fisiológica, crescimento e produção de madeira. A partir daí, com ampliação do mercado, houve a diversificação da finalidade dos plantios para fins de produção de madeira para serraria, energia e exploração de folhas para extração de óleo essencial (FONSECA et al., 2010).

O *Corymbia torelliana* foi pouco utilizado nos plantios no Brasil, devido ao seu baixo desempenho de crescimento. Porém, o mesmo se destacou por obter propriedades tecnológicas que atendem o mercado, alta resistência a insetos-praga, vento, seca e ao “distúrbio fisiológico” (enfermidade que afeta grande número das espécies de eucalipto), possuindo rápida formação de copa, reduzindo a incidência de luz sobre o sub-bosque (REIS, 2014).

No geral, as espécies de *Corymbia* possuem baixa capacidade ao enraizamento adventício pela propagação vegetativa via estaquia, o que implica dificuldades na produção de mudas clonais. Entretanto, dentro do gênero, a espécie

Corymbia torelliana possui a maior capacidade de enraizamento adventício, o que tem motivado sua utilização na hibridização interespecífica (SEGURA, 2015).

O cruzamento entre *Corymbia torelliana* e *Corymbia citriodora* tem gerado híbridos de destaque no Brasil, por apresentou vantagens significativas em termos de crescimento, facilidade na propagação vegetativa, além de tolerância a doenças, insetos e ao frio. Aliado a estas vantagens, os híbridos gerados por estas duas espécies também têm apresentado maior densidade da madeira, agregando valor ao material genético destinado ao aproveitamento energético (LOUREIRO, 2016).

Além das características do gênero *Corymbia* referentes a uma boa qualidade da madeira, o óleo essencial extraído das folhas de *C. citriodora* é um produto que tem mercado amplo, sendo o Brasil um dos maiores produtores do mundo (REIS et al., 2013). O interesse na ampliação dos materiais genéticos disponíveis no mercado tem colocado o gênero *Corymbia* em evidência, o que pode possibilitar a abertura de novos caminhos para o uso múltiplo ou diversificação de produtos florestais no Brasil.

O método de resgate vegetativo de árvores selecionadas para programas de silvicultura clonal é o processo considerado mais efetivo para *Corymbia* spp., o qual tem sido realizado por meio do resgate de matrizes via lignotubers, visando garantir a juvenilidade das brotações, com melhor resultado no processo de enraizamento adventício. Entretanto, para que seja implementado um protocolo de produção de mudas clonais envolvendo estes materiais genéticos, os resultados ainda requerem maiores porcentagens de enraizamento para viabilização operacional (ASSIS, 2014).

Para determinar o potencial de enraizamento de seis clones de *Corymbia torelliana* × *C. citriodora*, Wendling et al. (2015) testaram o efeito de duas alturas de poda de plantas matrizes (15 cm e 30 cm). A menor altura da poda reduziu a produção de estacas, porém aumentou a porcentagem de estacas que formaram raízes, com o enraizamento médio de 53% em todos os clones.

Utilizando mini-incubadoras colocadas em ambientes distintos, Brondani et al. (2018) obtiveram bons resultados no enraizamento adventício de microestacas de *Corymbia citriodora*. Um fator crítico encontrado na produção de mudas durante o período experimental foi a temperatura as quais as plantas foram condicionadas. A temperatura do ar máxima ideal para a produção de plantas clonais a partir de microestacas foi de 28,4 ° C (± 5,5 ° C), e a temperatura mínima foi de 20,3 ° C (± 6,2 ° C), ao longo dos 22 dias.

2.2 A micropropagação

O *Eucalyptus* constitui-se no gênero mais pesquisado na micropropagação florestal, iniciada no final da década de 60 com o objetivo de promover a regeneração de plântulas de *Corymbia citriodora* (antes denominado *Eucalyptus citriodora*). Com a necessidade de evolução da clonagem das espécies e formação de híbridos, os estudos foram se tornando mais específicos e voltados para problemas relativos à formação de mudas (DUTRA et al., 2009).

A busca por materiais vegetativos cada vez mais juvenis fisiologicamente e ontogeneticamente, principalmente visando obter maior capacidade de enraizamento, motivou o interesse em pesquisas com a micropropagação das espécies florestais (ASSIS e MAFIA, 2007; DUTRA et al., 2009).

O cultivo *in vitro* pode colaborar para aumentar a competência rizogênica, permitir a multiplicação de material vegetativo com baixa variação somaclonal, livre de patógenos (LEONE et al., 2019) e com ótima utilização do espaço e tempo investidos (MIRANDA, 2018). Além disso, a micropropagação pode ser utilizada, em pesquisa básica, criopreservação de espécies, no auxílio dos programas de melhoramento genético e na transgenia, permitindo a obtenção de grande número de plantas saudáveis e geneticamente uniformes em curto período de tempo (CARVALHO e SILVA, 2012).

Entretanto, a aplicação da micropropagação para plantas lenhosas ainda é limitada pelo alto custo de implantação e manutenção de laboratório que atenda a demanda da produção. Além disso, os procedimentos exigem mão de obra treinada e desenvolvimento de protocolos específicos para espécies e/ou clones. A contaminação pode limitar a micropropagação quando ocorre um estresse biológico, havendo redução da troca de carbono entre a planta e microrganismos endofíticos facultativos nos tecidos da planta. Nesse caso, esses organismos podem colonizar o ambiente e competir diretamente com a planta por nutrientes no meio de cultura (LEONE et al., 2019).

2.3 Micropropagação fotoautotrófica

A micropropagação por heterotrofia se refere a condição em que as plantas estabelecidas no cultivo *in vitro* obtêm fontes de carbono disponíveis para suprir o seu

crescimento. Nesse tipo de cultivo, altos teores de sacarose são acrescentados aos meios de cultura como fonte de energia para sustentar o metabolismo heterotrófico (GAGO et al., 2014).

No caminho inverso, temos a fotoautotrofia que é um tipo de cultivo onde os organismos se desenvolvem com retirada de alguns componentes orgânicos exógenos adicionais. Desse modo, a micropropagação deve excluir componentes como açúcares, vitaminas, reguladores de crescimento e agentes gelificantes. Em vez de agentes gelificantes, substâncias porosas como a vermiculita, devem ser empregadas como material de suporte para tornar o cultivo fotoautotrófico (KOZAI et al., 2005).

No entanto, a menor taxa fotossintética dessas plantas em micropropagação heterotrófica está mais ligada a baixa concentração de CO₂ do que a presença de açúcares no meio de cultura. Portanto, o aumento dos níveis de CO₂ dentro do recipiente mesmo com a redução ou eliminação por completo de açúcar poderia promover a atividade fotossintética do explante (KOZAI e KUBOTA, 2001).

As plantas no cultivo *in vitro* podem exibir comportamento anatômico e fisiológico diferente do que apresentam naturalmente no ambiente. No geral as folhas do ambiente *ex vitro* possuem a cutícula mais espessa e desenvolvida, característica que proporciona maior proteção contra radiação solar, evitando superaquecimento das células do mesofilo. Outra característica que também é modificada *in vitro* é a formação de cera epicuticular e menor espessamento da epiderme das folhas (NOGUEIRA, 2003; LIMA, 2004), que pode estar relacionada com a menor irradiância e temperatura da sala de crescimento.

O mecanismo de abertura e fechamento dos estômatos também é afetado pelas condições do cultivo *in vitro* (BRAGA et al., 2009). Esse crescimento anormal apresentado por plantas em cultivo *in vitro* heterotrófico se deve principalmente pela utilização de recipientes herméticos. Este tipo de acondicionamento resulta em alta umidade e estagnação do ar, além da condensação de água na parte interna do frasco e a hiperidricidade de plantas. Outra desvantagem da estrutura de cultivo *in vitro* convencional (heterotrófico) é o acúmulo de etileno que pode causar abscisão foliar (ZOBAYED, et al., 2002). Existe também uma limitação provocada pelo acúmulo de etileno, relacionada a produção de compostos fenólicos que podem oxidar o material, tornar o explante mais vulnerável e dificultar o crescimento (KERBAUY, 2004).

Sendo assim, o grau de desenvolvimento das estruturas anatômicas pode afetar o processo de aclimatização comprometendo a sobrevivência dos propágulos. Ao comparar a anatomia foliar de candeia no ambiente *ex vitro* com o *in vitro*, Rosal (2004) verificou que as plantas cultivadas *in vitro* apresentavam no geral tecidos pouco desenvolvidos, com pouca deposição de cera sobre a epiderme adaxial.

As plantas apresentam baixa taxa fotossintética *in vitro*, mas isso não é uma limitação intrínseca do vegetal. Com a redução ou exclusão da sacarose, fonte de carbono prontamente oferecida nos meios de cultura, torna-se necessário aumentar a troca gasosa de forma a favorecer a fotossíntese. O uso de tampas com filtros além de permitir a entrada de CO₂, pode auxiliar na redução da umidade relativa e concentração de etileno nos frascos (SALDANHA et al., 2012; SOUZA, et al., 2019). A intensidade de luz durante o fotoperíodo também é um fator que pode limitar o desenvolvimento da planta uma vez que dentro da sala de crescimento é ofertada baixo fluxo de irradiância (FORTINI et al., 2020).

Dos custos envolvidos na micropropagação, os mais altos são aqueles ligados a natureza heterotrófica das condições de crescimento. O valor investido em energia elétrica no sistema de iluminação, por exemplo, pode ser reduzido com o uso de luz natural, aumentando a intensidade de luz e conseqüentemente a eficiência da micropropagação. Entretanto, o fornecimento de luz natural às plantas varia ao longo do dia e de acordo com a época do ano, sendo o inverno a época com menor densidade de energia solar incidente (ERIG e SCHUCH, 2005).

De modo geral, a retirada da sacarose, a alteração da intensidade e da qualidade de luz, a substituição do substrato gelificante por um substrato mais poroso e o aumento das trocas gasosas no ambiente *in vitro*, formam um conjunto de procedimentos que visam a aproximação do ambiente natural, melhorando a qualidade de mudas e reduzindo custo. A junção desses procedimentos somados ao rejuvenescimento e a assepsia dos explantes podem colaborar para efetivação de novos protocolos de micropropagação.

2.4 Uso da luz na micropropagação

As fontes de luz utilizadas na propagação *in vitro* tem sido cada vez mais investigadas em virtude das suas diferentes propriedades e como elas podem contribuir no crescimento do vegetal. Além da intensidade da frequência de ondas

emitidas e do fotoperíodo, deve-se analisar também a qualidade de luz e os efeitos que elas podem causar nas plantas. Os efeitos da qualidade da luz podem se relacionar a alteração da concentração de fitohormônios e carboidratos dentro das plantas, alterando o comportamento metabólico e atividades de transporte em algumas células (ALMEIDA e MUNDSTOCK, 2001; ECKERT e KALDENHOFF, 2001).

A qualidade de luz pode influenciar a morfogênese das plantas por meio de uma série de processos mediados por receptores, que absorvem a luz na região do azul (450 - 495 nm) e do vermelho (620 - 750 nm) do espectro (BATISTA et al., 2018). Na introdução *in vitro* de híbridos de *Corymbia*, por exemplo, Souza et al. (2018) observaram que a combinação vermelho/azul apresentou influência sobre o desenvolvimento dos materiais, obtendo menores taxas de oxidação, contaminação e maior produção de brotos por explante.

Devido a alteração nos mecanismos fisiológicos e bioquímicos na organogênese *in vitro*, a qualidade espectral tem sido estudada, porém existem poucas respostas principalmente para espécies arbóreas. Durante os processos fisiológicos no desenvolvimento vegetal, as análises proteômicas podem identificar proteínas envolvidas e ajudar a compreender o efeito de diferentes qualidades de luz (DENG et al., 2014; HERINGER et al., 2017; SILVA et al., 2020).

Para compor as diferentes composições espectrais são utilizadas as lâmpadas LED (*Light Emitting Diode*), que são componentes eletrônicos que transformam a energia elétrica em luz. Diferentemente das lâmpadas convencionais (incandescentes ou fluorescentes) não liberam calor, conseqüentemente não afetam a temperatura ambiente. Além disso, demandam menos energia para funcionamento e apesar de possuírem maior valor de aquisição, esse tipo de lâmpada apresenta maior durabilidade, vida útil estimada em 50.000 horas, e reduzido impacto ambiental se comparado a outros tipos de lâmpadas (AMAN et al., 2013; SANTOS, et al., 2015).

A proposta de substituição das lâmpadas fluorescentes por lâmpadas LED no cultivo *in vitro*, tem como base além dos itens anteriormente citados, o fato de possuírem uma faixa espectral específica de luz, o que também tem demonstrado resultados significativos no alongamento do caule e entrenós (POUDEL et al., 2008) e aumento da matéria seca e fresca (NHUT et al., 2001). Para lenhosas como a *Cedrela fissilis*, o aumento dos valores de matéria fresca e seca foi propiciado pela combinação de proporções variadas de luz com 12-14% de azul e 30-50% de vermelho. O resultado obtido da combinação azul-vermelho foi o alongamento das

brotações na presença da citocinina 6-benzilaminopurina (2,5 µM) no meio de cultura (OLIVEIRA, 2017).

Para um clone de *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* a qualidade de luz influenciou a introdução *in vitro*, multiplicação, alongamento e enraizamento. Entretanto, as lâmpadas fluorescentes e LEDs vermelho/azul foram igualmente sugeridas como as mais adequadas para serem utilizadas na introdução, multiplicação, alongamento e enraizamento, não ocasionando prejuízos no desenvolvimento de brotações destinadas à produção de plantas clonais micropropagadas (SOUZA et al, 2020).

A qualidade do espectro pode impactar na formação e expansão foliar, alongamento do caule e biossíntese de pigmentos. A variabilidade das respostas das plantas aos diferentes tipos de luz torna ainda mais complexo a alteração do ambiente de cultivo para induzir determinada fase. A manipulação da radiação natural é uma alternativa para reduzir custos e maximizar as respostas obtidas com a variação de luz no desenvolvimento vegetal. Contudo, a dependência de um sistema proveniente de fonte de luz natural evidencia as desvantagens ocasionadas pela sazonalidade e pode restringir sua aplicação a algumas regiões (ERIG e SCHUCH, 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e caracterização da área experimental

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II (LCT-II), do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e no Viveiro de Pesquisas do Departamento de Engenharia Florestal, ambos da Universidade Federal de Viçosa. O primeiro experimento *in vitro* foi instalado utilizando-se materiais vegetais do banco clonal do LCT-II, cedidos pela empresa CMPC – Celulose Rio Grandense, mantidos em multiplicação via micropropagação. Os três clones utilizados foram híbridos do gênero *Corymbia*, sendo eles: CM02 (*Corymbia citriodora* X *Corymbia torelliana*), CM04 e CM05 (*Corymbia torelliana* X *Corymbia citriodora*), os quais estavam no 23º subcultivo de multiplicação pela micropropagação.

O segundo experimento foi instalado *ex vitro*, no período de maio a outubro de 2020, e os materiais vegetais utilizados foram provenientes do jardim clonal *in vitro* instalado no primeiro experimento, com exceção do clone CM02. Desse modo, os dois clones utilizados foram híbridos do gênero *Corymbia*, sendo eles: CM04 e CM05 (*Corymbia torelliana* X *C. citriodora*).

A área experimental do Viveiro de Pesquisas, tem como coordenadas geográficas 20°45'45" S de latitude e 42°52'04" W de longitude, sendo localizado a 690 m de altitude. Segundo a classificação de Köppen, o clima da região é temperado quente-mesotérmico (Cwa), com verões chuvosos e invernos secos. A precipitação média anual é de 1.220 mm, com temperaturas média máxima de 26 °C e média mínima de 14 °C.

3.2 Instalação do jardim clonal *in vitro*

Para a formação do jardim clonal *in vitro* foram selecionadas gemas alongadas entre 3 e 5 cm de tamanho, com pelo menos 2 pares de folhas, com ausência de calo e de raiz, a partir de brotações em fase de alongamento pela micropropagação. As brotações alongadas foram obtidas pelo cultivo em tubos de ensaio contendo 10 ml do meio de cultura Murashige e Skoog (MS), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 800 mg L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP), 0,05 mg L⁻¹ de 6-

benzilaminopurina (BAP), 0,2 mg L⁻¹ de ácido 3-indolbutírico (AIB) e 5,5 g L⁻¹ de ágar (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Na instalação do jardim clonal *in vitro*, foram utilizados como recipiente frascos de vidro (343 mL de capacidade) contendo como substrato vermiculita de textura média, 60 mL ou 15 g (AGROFLOC). Para o preparo desse substrato, a vermiculita foi lavada em água destilada em recipiente que permitiu que a porção mais densa do material decantasse e se separasse da porção menos densa. A parte superior foi separada e seca em estufa e posteriormente autoclavada por 40 min, a 1 atm de pressão e 121°C de temperatura, visando eliminar impurezas do material.

Como solução nutritiva, foi utilizado cerca de 50 mL de meio de cultura líquido MS para cada frasco. Inicialmente, o meio continha 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 800 mg L⁻¹ de PVP, 0,1 mg L⁻¹ de AIB e 15 g L⁻¹ de sacarose, com pH ajustado para 5,80 ± 0,02 e foi adicionado 40 mL. Foi realizada a autoclavagem do substrato com meio líquido por 20 min, com temperatura de 121°C e 1 atm de pressão. Os frascos foram vedados com tampas rígidas de polipropileno com dois orifícios (10 mm) cobertos com membranas (MilliSeal AVS-045 Air Vent), de 0,45 µm de poros (com taxa de troca de CO₂ de 25 µL L⁻¹ s⁻¹).

Na instalação do jardim clonal *in vitro* realizou-se também adição de 600 µL L⁻¹ de hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo. No momento da inoculação da gema alongada, quando necessário, adicionou-se 10 mL de meio líquido reservados anteriormente para cada frasco. Este procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar, introduzindo cerca de 1 cm da porção basal da gema alongada centralizada no substrato.

Após a inoculação, as gemas alongadas foram mantidas em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, com diferentes fontes de luz, padronizando-se em 85 µmol m⁻² s⁻¹ (quantificada por radiômetro, LI-COR®, LI-250A Light Meter) e temperatura de 25 ± 2°C. Os frascos contendo os propágulos permaneceram em estantes de cultivo com dimensões de 128 cm de comprimento por 47 cm de largura, com espaçamento de 2 cm entre recipientes, excluindo-se a área de borda da bancada.

3.3 Fontes de Luz

As fontes de luz utilizadas na primeira etapa foram: 1) luz fluorescente, fornecida por dois tubos fluorescentes (HO Sylvania T12, 110 W, São Paulo, Brasil); 2) LED branca fornecida por dois tubos LED (SMD 100, 18 W, Vilux, Vitória, ES, Brasil); 3) LED vermelha/azul, fornecida por dois canais de lâmpadas (LabPARLL-HR / DB-480, 11,6 W, LabLumens®, Carapicuíba, SP, Brasil (divididas proporcionalmente 50%-50%); 4) LED vermelha/azul, fornecida por dois canais de lâmpadas (divididas respectivamente 1%-99%) e; 5) LED vermelha/azul, fornecida por quatro canais de lâmpadas (divididas respectivamente 99%-1%), conforme distribuições espectrais apresentadas na Figura 1.

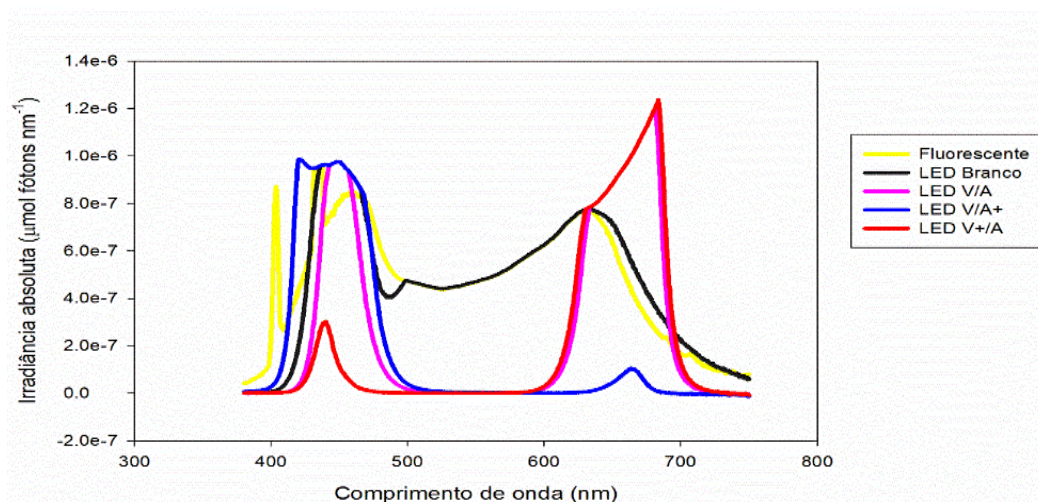


Figura 1. Emissão espectral absoluta das fontes de luz Fluorescente (2F), LED branco, LED vermelho/azul (LED V/A, proporção 50%-50%), LED vermelho/azul (LED V/A⁺, proporção 1%-99%), LED vermelho/azul (LED V⁺/A, proporção 99%-1%), utilizadas no presente trabalho.

Na Figura 2 estão representadas as diferentes qualidades de fontes de luz utilizadas na implantação do jardim clonal *in vitro* com os três clones híbridos de *Corymbia* spp.

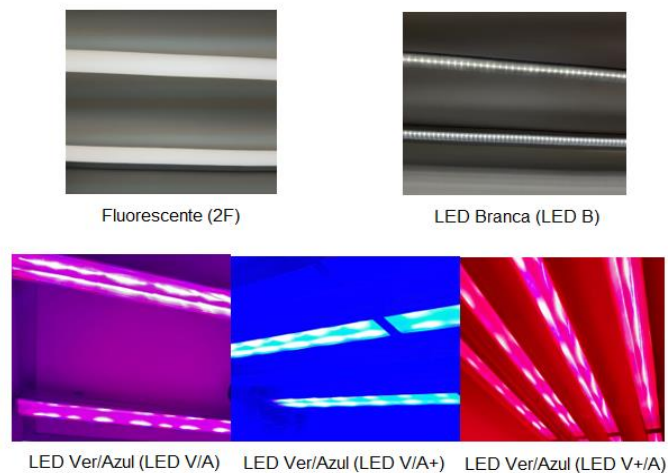


Figura 2. Fontes de luz fornecidas na implantação do jardim clonal *in vitro* de *Corymbia* spp. A. Luz Fluorescente (2F), B. LED branca, C. LED vermelho/azul (LED-V/A), D. LED vermelha/azul (LED V/A⁺), E. LED vermelho/azul (LED V⁺/A).

Já na segunda etapa, as microcepas foram submetidas à duas qualidades de luz diferentes: a fluorescente (2F), fornecida por dois tubos fluorescentes (HO Sylvania T12, 110 W, São Paulo, Brasil) e a LED vermelha/azul (LED V/A⁺, proporção 1%-99% respectivamente), fornecida por dois canais de lâmpadas (LabPARLL-HR / DB-480, 11,6 W, LabLumens[®], Carapicuíba, SP, Brasil) conforme distribuições espectrais apresentadas na Figura 3.

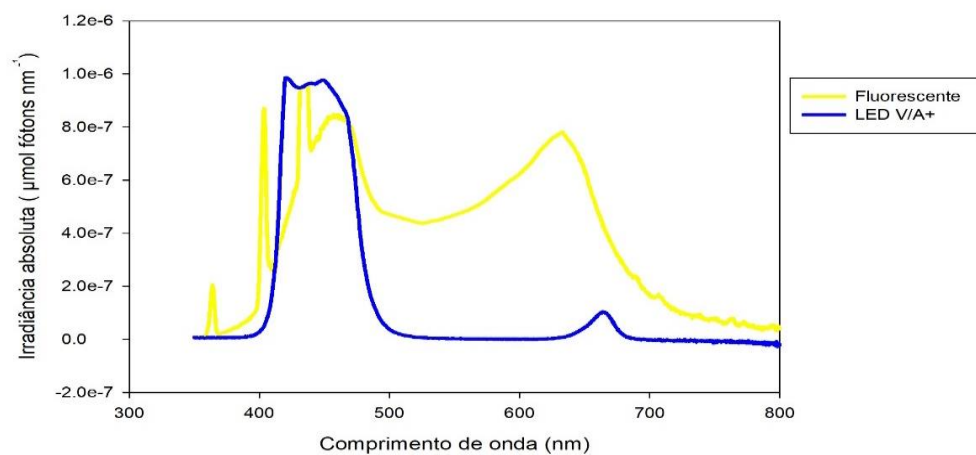


Figura 3. Emissão espectral absoluta das fontes de luz Fluorescente (2F) e LED vermelha/azul (LED V/A⁺, proporção 1%-99%), aplicadas nas microcepas de *Corymbia* spp, clones CM04 e CM05, durante o processo de coleta de microestacas.

3.4 Manejo do jardim clonal *in vitro*

A reposição da solução nutritiva ocorreu a cada 20 dias (em média 10 mL por frasco). Na primeira reposição, reduziu-se para 7 g L⁻¹ a quantidade de sacarose adicionada ao meio líquido MS. A partir da segunda reposição, após 40 dias de instalação, o meio líquido passou a conter apenas macro e micronutrientes.

Aos 60 dias de cultivo foi realizada a poda de formação, retirando os ápices das plantas com o objetivo quebrar a dominância apical, estimulando assim as brotações das gemas axilares na porção remanescente, moldando a microcepa no “formato de taça” para proporcionar brotações aptas para coleta das microestacas.

3.5 Condições *ex vitro*

Para a montagem do experimento *ex vitro*, foram coletadas brotações em microcepas após 228 dias de cultivo em microjardim clonal *in vitro*. O critério adotado para coleta das brotações consistiu em boas condições nutricionais, fisiológicas e sanitárias da planta matriz, bem como o comprimento padrão da brotação de 4 cm, denominadas como microestacas. As microestacas foram transportadas para o viveiro de pesquisa em recipientes de isopor com gelo, mantendo o vigor e a turgescência do material. O tempo entre a coleta das brotações e o estaqueamento foi inferior a 30 minutos, este sendo realizado sempre no fim tarde.

Os recipientes utilizados foram tubetes cônicos, contendo quatro frisos longitudinais e equidistantes, com capacidade 35 cm³. Os mesmos, juntamente com os suportes foram desinfestados através de imersão em água com cloro ativo 2 % por 24 horas, dois dias antes da montagem do experimento. Os tubetes foram preenchidos manualmente com substrato composto por casca de *Pinus*, fibra de coco, casca de arroz e vermiculita expandida (tropstrato florestal - VIDA VERDE) com vermiculita expandida de textura média (AGROFLOC), na proporção 1:1. A adubação de base utilizada foi composta de superfosfato simples (6,00 kg/m³) de substrato.

A casa de vegetação (CV) climatizada utilizada neste trabalho possuía sistema de irrigação via nebulização e janela zenital para controle da umidade mínima superior a 80% e a temperatura inferior a 30°C. Tal estrutura também contava com bancadas metálicas suspensas, piso cimentado e cobertura com Aluminet®. Além da irrigação, temperatura e umidade controladas, o nível de intensidade da luz solar foi reduzido

com uma estrutura metálica coberta com sombrite 50%, fixada aproximadamente 40 cm acima da bancada. Essa cobertura permaneceu sobre as bandejas com as microcepas até o 10º dia de casa de vegetação.

As microestacas permaneceram na casa de vegetação até o 32º dia após o estaqueamento. Em seguida, as mudas foram transferidas para aclimatização em casa de sombra, onde permaneceram por mais 15 dias. Durante esse período iniciou-se a adubação de cobertura que seguiu um cronograma semanal que consistiu em aplicar 4 ml por tubete (35 cm³) de uma solução preparada com 10 gramas por litro de cada fonte utilizada de N, P e K. Na primeira semana, após a saída da CV, foi aplicado Sulfato de Amônio (21% de N e 23% de S), na segunda semana, Fosfato Monoamônico (MAP- 12% de N e 60 % de P₂O₅), na terceira semana Cloreto de potássio (50% de K₂O) e na quarta semana não houve aplicação de nenhuma fonte, assim sucessivamente até o fim do experimento.

Após 47 dias do estaqueamento as mudas foram transferidas para pátio de crescimento e rustificação, onde permaneceram até o fim do experimento (120 dias) com irrigação, sendo a vazão adotada de 5 L/m²/dia. Este volume foi distribuído em cinco aplicações de três minutos, via sistema automatizado por timer digital, sendo realizadas às 9, 11, 13, 15 e 17 horas.

3.6 Delineamento experimental, coleta e análise de dados

O primeiro experimento foi estabelecido em delineamento inteiramente casualizado num esquema de parcela subdividida (3 X 5), sendo 3 clones (CM02, CM04 e CM05) e 5 tipos de fontes de luz (Luz Fluorescente (2F), LED branca, LED vermelho/azul (LED-V/A), LED vermelha/azul (LED- V/A⁺), LED vermelho/azul (LED V⁺/A)). A unidade experimental consistiu em um frasco contendo uma microcepa, sendo 4 repetições com 5 microcepa cada uma, totalizando 20 plantas por tratamento.

Após 60 dias de cultivo, foram avaliadas as características: enraizamento (%), contaminação (%), altura da microcepa (hm), vigor (notas de 1 a 3) e sobrevivência (%). A altura da microcepa também foi avaliada aos 20 e 40 dias de cultivo. Para a característica vigor a avaliação foi realizada a partir da observação de deficiências ou irregularidades como a presença de clorose, hiperidricidade, murcha e abscisão foliar. Adotou-se a nota 1 quando três ou quatro dos critérios puderam ser observados, a

nota 2 quando foram constatados a presença de um ou dois dos critérios e a nota 3 para a ausência de todas as deficiências observadas.

Para a obtenção do teor de pigmentos, clorofilas *a*, *b* e carotenoides, após 105 dias de cultivo, foram coletadas brotações das cepas sobreviventes, de modo que se obteve quatro repetições por tratamento. A coleta ocorreu dentro da câmara de fluxo laminar e cada repetição consistiu em folhas completamente formadas retiradas da porção basal das microestacas coletadas das microcepas sobreviventes. A extração foi realizada com a adição de 600 µL de MeOH 100% em cerca 10 mg de material vegetal macerado e liofilizado (em microtubos de 2 mL). Posteriormente, realizou-se agitação em vórtex vigorosamente por 30 segundos e as amostras foram levadas para centrifuga a 12000g a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante coletado em novos microtúbulos foi reservado em freezer-20°C. Em seguida, foi realizada novamente, a extração do *pellet*, e uniu-se os dois sobrenadantes formados, descartando-se o *pellet*. Por fim, foi retirada uma alíquota de 200 µL e colocada na microplaca de Elisa. Para os cálculos das concentrações de clorofilas *a*, *b* e carotenoides, utilizou-se os mesmos comprimentos de onda e as equações descritas por Wellburn (1994).

Para a característica produção média de microestacas por microcepa foram contabilizadas somente as microestacas que atenderam o padrão estabelecido. Esse padrão incluiu as brotações entre 3 e 5 cm de tamanho, com pelo menos 2 pares de folhas. Neste experimento, considerou a produção média por microcepa determinada após quatro coletas consecutivas, realizadas quinzenalmente, sendo a primeira coleta aos 120 dias de cultivo do jardim clonal *in vitro*.

A análise estatística foi realizada utilizando o software Genes versão Windows /2004.2.1 (CRUZ, 2016). As médias dos dados em porcentagem que não apresentaram distribuição normal pelo teste de Kolmogorof-Smirnoff foram transformadas pela equação $\text{arc sen raiz de } (x/100)$. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância.

O segundo experimento foi conduzido no delineamento em blocos casualizados, em um arranjo fatorial, com dois fatores (luz e clone) e dois níveis dentro de cada fator, sendo dentro do fator luz: 2F e LED V/A⁺; e dentro do fator clone: híbrido de *Corymbia torelliana* x *C. citridora* (CM04 e CM05), totalizando quatro tratamentos. Foram quatro blocos instalados ao longo do tempo (com intervalo de 15 dias de instalação entre si), contendo três repetições, sendo cada repetição composta

por cinco microestacas. Os dados foram submetidos à análise de variância e suas médias foram comparadas pelo teste Tukey, a 5 % de significância. A análise de dados foi realizada pelo software IBM SPSS Statistics versão 22.

Os parâmetros avaliados foram: altura (H) expressa em cm, medida com régua milimetrada, considerando-se a região compreendida entre o colo e a gema apical; diâmetro do colo (DC), expresso em mm, utilizando-se um paquímetro digital; o percentual de enraizamento (%ENR) e de sobrevivência (%SOB), avaliados visualmente a partir da observação da presença de raízes visíveis e da observação do total de sobreviventes em relação ao total de microestacas implantadas. As avaliações foram realizadas aos 32, 47 e aos 120 dias para %ENR, %SOB, H e DC aos 120 dias.

4 RESULTADOS

As diferentes qualidades de luz, às quais os clones foram submetidos, influenciaram algumas características do crescimento e desenvolvimento *in vitro*. Verificou-se que houve efeito significativo ($p < 0,05$) da interação entre os ambientes de luz e os clones para as características: altura 1 (20 dias), altura 2 (40 dias), altura 3 (60 dias), clorofila *a*, clorofila total e carotenoides e produção média de microestacas.

As características de vigor, sobrevivência e contaminação não apresentaram interação significativa, sendo estudados de forma independente, as quais também não apresentaram diferenças significância ($p < 0,05$). Para o enraizamento constatou-se efeito isolado do fator clone, evidenciando os melhores materiais genéticos para essa característica.

4.1 Fontes de luz e o crescimento em altura

O crescimento em altura apresentou efeito significativo da interação “clones x qualidade de luz”, aos 20, 40 e 60 dias após a instalação (Figura 4). Para a altura 1, o resultado obtido após 20 dias de cultivo revela que a luz azul (LED V/A+) influenciou positivamente o crescimento do clone CM04, atingindo um crescimento em altura média 28% maior em comparação às outras fontes de luz. Para as alturas 2 e 3 (após 40 e 60 dias de cultivo, respectivamente), os dados revelaram que a altura da parte aérea permaneceu apresentando diferença significativa na fonte de luz LED V/A+.

4.2 Pigmentos fotossintéticos e qualidade de luz

Após 103 dias de cultivo das microcepas, pode-se observar a influência dos fatores testados sobre a produção dos pigmentos fotossintéticos (Tabela 1). Para a fonte de luz LED V+/A (com maior proporção de luz vermelha) o clone CM04 apresentou menor teor de concentração de todos os pigmentos em relação aos outros clones. Para a clorofila *a*, as fontes de luz 2F e LED V+/A apresentaram menor teor de concentração do pigmento para o clone CM04, em relação às outras fontes de luz.

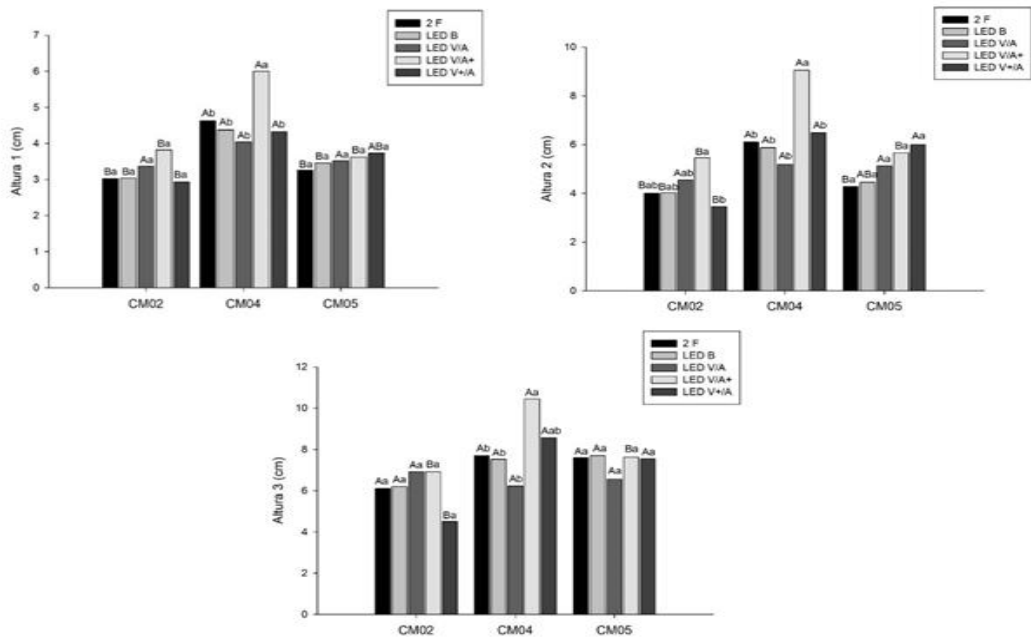


Figura 4 - Crescimento em altura da parte aérea das gemas alongadas inoculadas em substrato vermiculita em frasco de vidro, avaliadas aos 20 (altura 1), 40 (altura 2) e 60 (altura 3) dias, em diferentes fontes de luz para três clones (CM02, CM04 e CM05) de híbridos de *Corymbia spp.*

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparação entre clones e minúsculas para comparação entre fontes de luz, não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey em $p \leq 0,05$.

Tabela 1. Valores médios dos pigmentos fotossintéticos, clorofila *a*, clorofila *b*, clorofilas totais e carotenoides, aos 105 dias de cultivo das microcepas, sob influência de diferentes qualidades de luz em três clones (CM02, CM04 e CM05) de híbridos de *Corymbia spp.*

Fontes de Luz / Clones	Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g mg}^{-1}$)			Clorofila <i>b</i> ($\mu\text{g mg}^{-1}$)		
	CM02	CM04	CM05	CM02	CM04	CM05
2F	2.12 Aa	1.66 Ba	1.81 Aba	2.32 Aa	2.83 Aa	2.63 Aab
LED B	1.54 ABb	1.37 Aa	1.81 Aa	1.97 Aa	1.62 Aab	2.34 Aab
LED V/A	1.58 Ab	1.74 Aa	1.64 Aa	2.77 Aa	2.15 Aab	1.71 Ab
LED V/A+	2.03 Aab	1.63 Aa	1.66 Aa	2.55 Aa	2.32 Aab	2.69 Aab
LED V+/A	1.71 Aab	1.25 Ba	1.98 Aa	2.88 Aa	1.17 Bb	3.25 Aa

Fontes de Luz / Clones	Clorofilas totais ($\mu\text{g mg}^{-1}$)			Carotenóides ($\mu\text{g mg}^{-1}$)		
	CM02	CM04	CM05	CM02	CM04	CM05
2F	4.44 Aa	4.5 Aa	4.43 Aab	0.95 Aa	0.88 Aa	0.89 Aab
LED B	3.51 Aa	2.99 Aab	4.15 Aab	0.77 Aa	0.67 Bab	0.87 Aab
LED V/A	4.35 Aa	3.89 Aab	3.35 Ab	0.83 Aa	0.82 Aa	0.74 Ab
LED V/A+	4.58 Aa	3.95 Aab	4.34 Aab	0.93 Aa	0.82 Aa	0.91 Aab
LED V+/A	4.59 Aa	2.42 Bb	5.23 Aa	0.89 Aa	0.56 Bb	1.02 Aa

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey em $p \leq 0,05$.

4.3 Enraizamento das gemas alongadas

Após 60 dias de cultivo, a porcentagem de enraizamento das gemas alongadas visando obtenção das microcepas não foi influenciada pela qualidade de luz; no entanto, observou-se diferenças de respostas dos clones avaliados quanto à emissão de raiz (Figura 5).

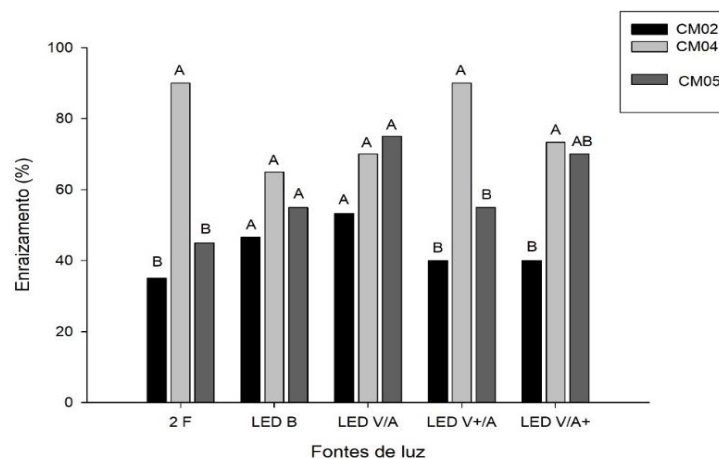


Figura 5. Porcentagem de enraizamento das gemas alongadas, após 60 dias de cultivo, em diferentes fontes de luz, para três clones (CM02, CM04 e CM05) de híbridos de *Corymbia spp.*

* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para comparação entre clones, não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey a $p \leq 0,05$.

O clone CM04 apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos outros clones com as maiores porcentagens de emissão de raiz nas luzes fluorescente e LED V/A+ (com maior proporção de azul). Nestas fontes de luz, o híbrido CM04 (*Corymbia torelliana* X *C. citriodora*) apresentou resultados expressivos de enraizamento se comparado ao híbrido CM02 (*Corymbia citriodora* X *C. torelliana*). Essa resposta pode estar associada à capacidade de enraizamento das espécies em suas respectivas hibridações, conforme resultado corroborado por Assis (2012), em que se encontrou média de enraizamento de 21,2 % para clones de *Corymbia citriodora* X *C. torelliana* e de 41,6% para o seu cruzamento recíproco.

A média de enraizamento na propagação vegetativa por estaquia dos clones resultantes de híbridos de *Corymbia torelliana* X *C. citriodora* é em torno de 27,5 %,

enquanto que na espécie pura *Corymbia citriodora* possui cerca de 2,5% e *Corymbia torelliana* em torno de 32,6% (ASSIS, 2000).

O jardim clonal *in vitro* é uma técnica do cultivo fotoautotrófico que utiliza alto grau de controle do ambiental, o que permitiu maior taxa de enraizamento para os clones de *Corymbia*. Para efeito de comparação, se considerarmos a média de enraizamento das microcepas dos clones CM04 e CM05, oriundos da hibridação *C. torelliana* X *C. citriodora*, independente da qualidade de luz, obteve-se 68,8% de enraizamento, revelando que o maior controle dos fatores ambientais potencializa os ganhos obtidos no melhoramento genético.

4.4 Sobrevivência *in vitro*

Quanto à porcentagem de sobrevivência de gemas alongadas após a etapa de instalação do jardim clonal *in vitro*, destaca-se, no geral, altas taxas de sobrevivência (Figura 6).

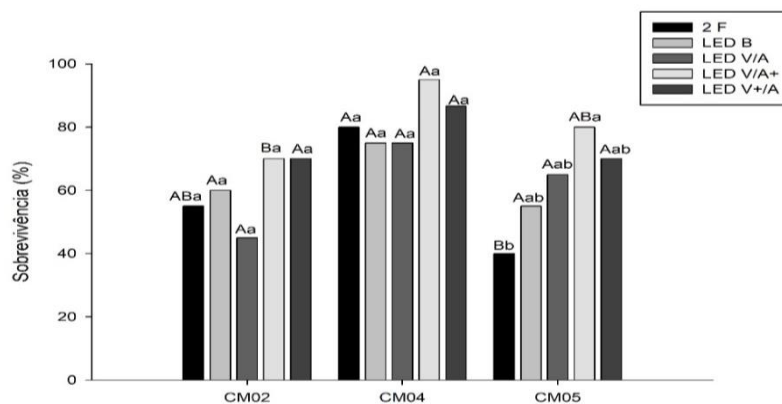


Figura 6. Porcentagem de sobrevivência de gemas alongadas após 60 dias de cultivo, em diferentes fontes de luz, para três clones (CM02, CM04 e CM05) de híbridos de *Corymbia spp.*

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparação entre clones e minúsculas para comparação entre fontes de luz, não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey em $p \leq 0,05$.

No presente estudo, houve reduzida perda de microcepas por contaminação (média geral 8%), na etapa de instalação (até 60 dias), provavelmente devido ao material vegetal utilizado ser proveniente de sucessivos subcultivos, anteriores à implantação do jardim *in vitro*, garantindo a limpeza clonal. Além disso, a retirada gradativa, durante a implantação do jardim clonal *in vitro*, de componentes orgânicos,

como as vitaminas e os carboidratos presentes no meio de cultura, colaboraram para diminuir as contaminações.

4.5 Estabelecimento do jardim clonal *in vitro*

Na figura 7 são apresentadas as etapas realizadas no processo de implantação do jardim clonal *in vitro*, desde a seleção da gema alongada, etapa de enraizamento e crescimento, até o estabelecimento do jardim após a poda da microcepa. Considerou-se como resultado esperado na implantação do jardim clonal quando este consolidou a estabilidade de produção de microestacas pelas microcepas formadas.

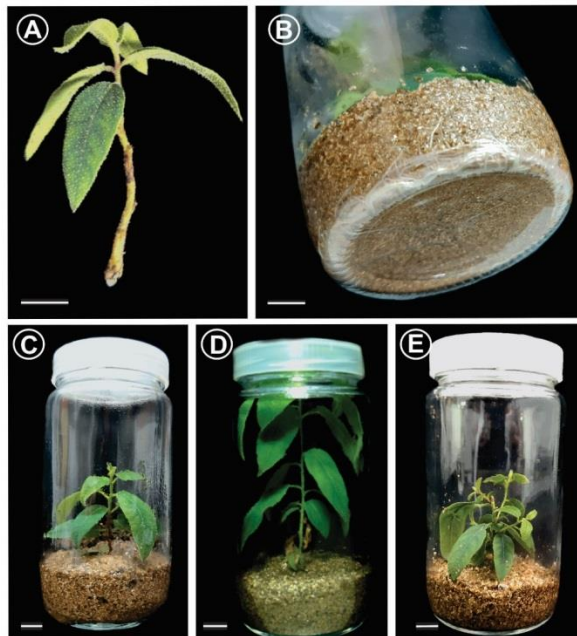


Figura 7. Implantação do Jardim Clonal *in vitro* do clone CM04 (*Corymbia torelliana* X *C. citriodora*). (A) Padrão de gema alongada utilizada; (B) Perfil de enraizamento adventício; (C) Desenvolvimento da microestaca após 20 dias e (D) após 60 dias de cultivo; (E) Formação da microcepa após 15 dias da poda apical (75 dias de cultivo). Valor de referência da barra = 1 cm.

O jardim clonal foi considerado estabelecido quando a produção média por microcepa permanecer constante ao longo de um determinado período ou número de coletas. A microcepa estava bem enraizada, sem contaminações, suportando a poda apical e por fim emitindo brotações axilares visando à obtenção das microestacas.

A produção média de microestacas foi influenciada pela interação dos fatores fonte de luz e clones. A melhor fonte de luz foi a LED B se destacando para todos os

materiais. Em seguida, as fontes 2F, LED V+/A e LED V/A+ tiveram resultados semelhantes quanto à influência na produção de microestacas, sendo a fonte LED V/A (com as mesmas proporções de luz azul e vermelha) com o pior resultado para todos os clones.

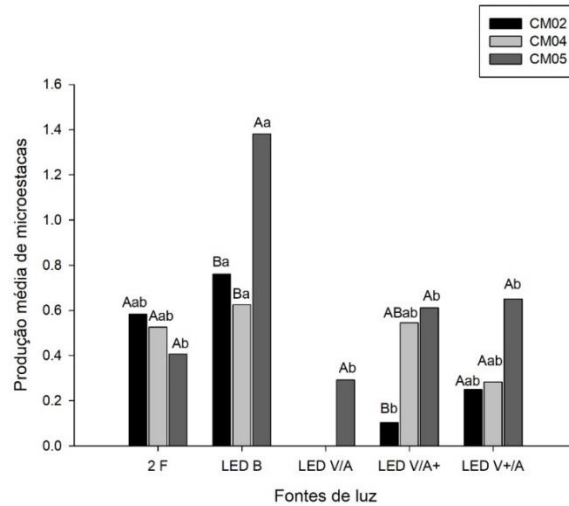


Figura 8. Produção média de microestacas por microcepa após 120 dias de cultivo, em diferentes fontes de luz, para três clones (CM02, CM04 e CM05) de híbridos de *Corymbia spp.*

*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparação entre clones e minúsculas para comparação entre fontes de luz, não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey em $p \leq 0,05$.

A etapa de estabelecimento, avaliada através da característica de produção de microestacas, demonstra que pode haver diferentes exigências das plantas quanto as qualidades de luz aplicadas em diferentes fases do processo. Entretanto, a longo prazo, outros fatores podem afetar esse resultado, a exemplo do manejo das microcepas, sobretudo a frequência de coletas de microestacas.

4.6 Formação da muda *ex vitro*

Após 120 dias de monitoramento durante o enraizamento e formação das mudas dos dois híbridos de *Corymbia spp.*, os fatores luz e clone não apresentaram interação significativa ($p \geq 0,05$). Além disso, estudando-se os fatores separadamente constatou-se que não houve influência para nenhum dos parâmetros avaliados.

A qualidade de luz aplicada às microcepas *in vitro* não influenciou o enraizamento e a sobrevivência das mudas micropropagadas *ex vitro*. A ausência de

influência ao longo do tempo, revela que o efeito da qualidade de luz aplicada *in vitro* pode ser suprimido quando a planta já não está mais em constante exposição a determinada qualidade de luz.

Na figura 9 são apresentadas as etapas realizadas no processo de formação da muda, desde a produção de brotações após a poda da microcepa, realizada *in vitro*, passando pelo padrão de microestaca utilizado no estaqueamento e estrutura montada para o período inicial do enraizamento dentro da CV, até o resultado final com a muda micropropagada.

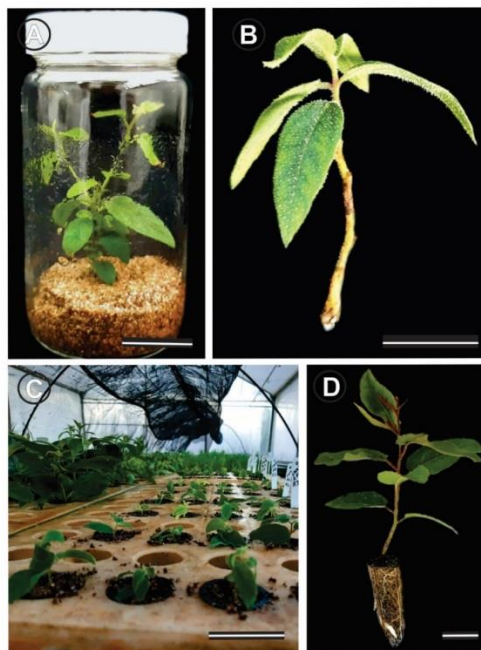


Figura 9. Processo de formação da muda a partir de Jardim Clonal *in vitro* de *Corymbia torelliana* X *C. citriodora* (clone CM04). (A) Microcepa com brotações alongadas; (B) Padrão de microestaca utilizada; (C) Estaqueamento em casa de vegetação sob estrutura com sombrites 50% e (D) Muda micropropagada após 120 dias de formação *ex vitro*. Valores de referência das barras A, C, D = 3 cm e B= 2 cm.

Para os dois clones (CM04 e CM05) de híbridos de *Corymbia* spp., as médias gerais de enraizamento ficaram em torno de 40% (Tabela 2). A etapa de crescimento e rustificação é a etapa final de formação da muda, na qual as mudas apresentam sistema radicular desenvolvido, ocorrendo a degeneração daquelas microestacas com um sistema radicular incompleto ou com formação de calo na base da microestaca. Sendo assim, a redução na sobrevivência, observada para as microestacas a partir da saída da CV (32 dias) para os 120 dias, indicou que muitos

propágulos ainda não possuíam sistema radicular adequado que assegurasse o desenvolvimento da muda.

Tabela 2 - Médias de enraizamento e sobrevivência *ex vitro* aos 32 dias, aos 47 dias e aos 120 dias após o estaqueamento de microestacas de *Corymbia torrelliana* x *C. citriodora*, advindas de Jardim Clonal *in vitro* submetido a fontes de luz 2F e LED V/A+.

Clones - Fonte Luz	32 dias		47 dias		120 dias	
	ENR(%)	SOB (%)	ENR (%)	SOB(%)	ENR(%)	SOB(%)
CM04 - 2F	41.67	83.33	45.00	63.33	40.00	40.00
CM04 - LEDV/A+	28.33	86.67	41.67	60.00	40.00	40.00
CM05 - 2F	35.00	78.33	41.67	56.67	45.00	45.00
CM05 - LEDV/A+	28.33	86.67	38.33	56.67	35.00	35.00
Média Geral	33.33	83.75	41.67	59.17	40.00	40.00

As variáveis de crescimento em altura e diâmetro do colo das mudas de microestacas não foram influenciadas pela qualidade de luz aplicada as microcepas em jardim clonal *in vitro*. A média de altura de mudas de microestacas permaneceu em torno de 15 cm, padrão mínimo aceitável para padrões de qualidade de mudas (GOMES et al., 2003; WENDLING e DUTRA, 2010). Já o diâmetro do colo obteve como média geral 3,52 mm, também dentro dos padrões (LOPES, 2004).

Tabela 3 - Médias de altura (H) e diâmetro do colo (DC) das mudas aos 120 dias na condição *ex vitro*, após o estaqueamento das microestacas dos dois clones de *Corymbia torrelliana* x *C. citriodora*. (CM04 e CM05) submetidas às fontes de luz 2F e LED V/A+ em Jardim Clonal *in vitro*.

Clones - Fonte de Luz	H(cm)	DC(mm)
CM04 - 2F	15.9	4.00
CM04 - LEDV/A+	14.9	3.35
CM05 - 2F	14.8	3.31
CM05 - LEDV/A+	15.7	3.41
Média Geral	15.3	3.52

5 DISCUSSÃO

A fonte de luz contendo majoritariamente o espectro azul (LED V/A+) influenciou, além do crescimento inicial, toda a implantação do jardim clonal *in vitro*, induzindo o maior crescimento da parte aérea até 60 dias. O maior tamanho da parte aérea também foi observado em plantas de *Achillea millefolium* L. com luz monocromática azul a uma intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (ALVARENGA et al., 2015).

Com base em Carvalho e Folta (2014), a fonte de luz azul pode regular o fototropismo e proporcionar crescimento do caule. Nesse sentido, além do efeito de estiolamento proporcionado por essa qualidade de luz, esse resultado pode ser positivo para implantação do jardim clonal *in vitro*, uma vez que pode reduzir o tempo estimado para a primeira poda e conseqüentemente acelerar o processo de formação da microcepa. Entretanto, deve-se atentar as conseqüências fisiológicas que esse estímulo pode provocar a longo prazo nessas matrizes.

Outro fator que deve ser contemplado na escolha da melhor fonte de luz é a variedade de respostas impostas por diferentes espectros de absorção. Estas respostas aparentam ser muito específicas e podem variar de acordo com a origem do material genético (BATISTA et al, 2018). Portanto, existe um desafio para a padronização da qualidade de luz quando se trata do sucesso da implantação do jardim clonal *in vitro*, sendo necessário testar diferentes materiais e levar em consideração sua especificidade.

A variabilidade de respostas para o comprimento da parte aérea em relação as fontes de luz utilizadas no cultivo *in vitro* também foi observada por Rosa (2020), quando obteve influência positiva da luz LED vermelha para plantas de *Anacardium othonianum*, sendo 39% superior as outras qualidades de luz testadas. A qualidade de luz LED vermelha também proporcionou maior crescimento para plantas de *Lippia gracilis* cultivadas sob intensidade de $42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LAZZARINI et al., 2018) e ainda para *Myrtus communis* L. cultivada sob intensidade de $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de (CIOĆ et al., 2018).

As combinações de luz LED branca com diferentes proporções de luz LED azul (11, 19 e 28%) foram testadas por Cope e Bugbee (2013), em *Raphanus sativus*, *Glycine max* e *Triticum* spp., onde obtiveram resultados que promoveram aumento na altura das plantas com 11% de luz azul. Entretanto, com a combinação onde havia

28% de luz azul as plantas ficaram mais compactas. Sendo assim, fica evidente que a proporção na combinação dos espectros pode influenciar no crescimento e desenvolvimento da parte aérea.

Em relação ao conteúdo de pigmentos fotossintéticos, a menor concentração de clorofilas *a* e *b* podem estar associadas ao aumento da capacidade de absorção de luz de diferentes comprimentos de onda. Entretanto, para o mesmo clone (CM04) que apresentou menores teores de clorofilas a presença de carotenóides na luz LED B e LED V+/A também foi reduzida na mesma fonte de luz, conforme resultado similar encontrado por Miranda (2018), quando comparou diferentes qualidades de luz para eucalipto.

Para clorofila *b*, houve uma redução de cerca de 60% na concentração do pigmento na luz 2F em relação a luz LED V+/A para o clone CM04, que foi o material mais responsivo as diferentes fontes de luz aplicadas. Analisando o efeito de diferentes qualidades de luz em *Anacardium othonianum*, Rosa (2020) também encontrou redução no teor da concentração de pigmentos fotossintéticos sob a fonte de luz LED vermelha, o que acabou comprometendo a funcionalidade do aparato fotossintético. A investigação sobre a qualidade de luz obtém alguns resultados que indicam que a luz vermelha não é propícia à formação de clorofila, devido a redução do ácido 5-aminolevulínico (ALA), o precursor do tetrapirrol (FAN et al., 2013).

O efeito da diminuição da concentração de pigmentos em determinada condição de cultivo pode colaborar para estimar o potencial fotossintético do material vegetal. Em relação aos carotenoides, o potencial fotossintético pode ser reduzido com a diminuição do seu conteúdo, uma vez que eles são essenciais na atuação como fotoprotetores dos cloroplastos (PINNOLA e BASSI, 2018).

Nesse caso, a redução desse pigmento de proteção, pode ser um indício de que a planta foi exposta a determinadas faixas de comprimentos de onda do espectro que não foram úteis no seu processo metabólico. O conteúdo reduzido de carotenoides na fonte de luz LED V+/A pode ter refletido na produção de clorofila *a* na mesma fonte de luz, já que o papel dos carotenoides seria de prevenir a fotooxidação do pigmento (OUZOUNIS et al., 2015; ROSA, 2020).

A fonte de luz atua no controle de diversos processos do organismo vegetal, inclusive na formação e acumulação de pigmentos fotossintéticos (CHEN et al., 2018). Assim, a diminuição dos pigmentos fotoprotetores, como os carotenoides, pode

demonstrar que a planta foi exposta a uma quantidade de luz excessiva ou ainda pode ser um indício de que a planta está preparada para a aclimatização.

Se considerarmos o baixo desempenho na produção média de microestacas, após a poda de formação das microcepas, pode-se relacionar essa resposta a baixa capacidade fotossintética intrínseca dos clones para superar as mudanças ambientais impostas pelo sistema fotoautotrófico (CORRÊA et al, 2015).

A definição da produção média de microestacas deve ser realizada por um período maior de tempo para contemplar às variações de respostas ao manejo, às condições nutricionais e fisiológicas das microcepas. Todavia, o presente trabalho sugere que o maior número de brotações alongadas ocorreu na luz LED B, sendo corroborado por Ferreira et al. (2016) que encontrou maior número de brotações para cana-de-açúcar na mesma fonte de luz.

A luz LED branca (460-560 nm) apresenta em seu espectro uma maior proporção de luz azul e verde e uma menor proporção de UV em relação ao vermelho e vermelho distante em comparação às lâmpadas fluorescentes (FRASZCZAK et al., 2014). Nesse caso, a proporção de azul e verde presentes no espectro da luz LED B podem ter contribuído para o crescimento e alongamento dessas brotações laterais, considerando que para a coleta das microestacas, estas devem estar dentro do padrão mínimo de 3 cm de comprimento.

A produção final de microestacas está diretamente relacionada com a porcentagem de sobrevivência das microcepas, e essa com o nível de contaminação presente no sistema, uma vez que na micropropagação heterotrófica quando há contaminação, o explante é descartado. Este fato, ocasiona perdas no processo e compromete a multiplicação rápida e em grande escala das plantas. As três fontes básicas de contaminação por microrganismos são o meio de cultura, o explante e o ambiente (PASQUAL, 2001), sendo para o presente caso, a etapa inicial do processo de implantação do jardim clonal *in vitro* a mais susceptível a contaminação. Apesar dos cuidados rigorosos de assepsia do cultivo *in vitro*, ocasionalmente, pode ocorrer a contaminação devido o meio de cultura apresentar condições propícias e erros inerentes a manipulação do material vegetal.

A partir da coleta das microestacas, a formação da muda micropropagada passou a utilizar as estruturas comumente utilizadas no processo de produção de mudas por miniestaquia, como a casa de vegetação e a casa de sombra. Nesses ambientes a variação de temperatura, umidade e componentes ligados a energia

luminosa recebida passaram a obter menor controle se comparado ao ambiente do cultivo *in vitro* estabelecido para as microcepas no jardim clonal *in vitro*. A maior sensibilidade das microestacas às condições ambientais durante o enraizamento está ligado ao fato de as mesmas serem mais tenras do que miniestacas ou estacas (FERRARI et al.,2004; CARVALHO e SILVA, 2012).

Portanto, o fato da qualidade de luz aplicada as plantas matrizes *in vitro* não ter alcançado alteração significativa nas microestacas na condição *ex vitro* pode estar ligado entre outros fatores com a temperatura, umidade relativa e intensidade de luz recebidas durante todo o processo. Principalmente por se tratar de clones híbridos de origem tropicais e dependerem nessa fase de condições climáticas favoráveis a formação e o crescimento da muda.

6 CONCLUSÕES

A qualidade espectral proporcionada por diferentes fontes de luz influenciou a implantação do jardim clonal *in vitro* de clones híbridos de *Corymbia* spp. A fonte de luz LED V/A+ (com maior proporção de azul) estimulou o crescimento em altura na primeira etapa (implantação) e na segunda etapa (estabelecimento) a luz LED B proporcionou maior produção de microestacas.

Na terceira etapa, as duas fontes de luz aplicadas sobre as microcepas, em jardim clonal *in vitro* dos dois clones de *Corymbia torrelliana* x *C citriodora*, não influenciaram no enraizamento e crescimento das microestacas na condição *ex vitro*.

Portanto, as lâmpadas LED promoveram o estímulo a fotoautotrofia *in vitro* e, em situações onde a lâmpada fluorescente apresentar resultados muito similares à lâmpada LED, recomenda-se priorizar o uso dessas fontes luminosas. Destaca-se que o jardim clonal *in vitro* ainda apresenta procedimentos manuais, induzindo esforços futuros direcionados para a amplificação e automação do processo visando atender à produção em escala.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. L.; MUNDSTOCK, C. M. O afilamento da aveia afetado pela qualidade de luz em plantas sob competição. **Ciência Rural**, Santa Maria-RS. v. 31, n. 3, p.393-400. 2001.
- ALVARENGA, I.C.A.; PACHECO, F.V.; SILVA, S.T.; BERTOLUCCI, S.K.V.; PINTO, J.E.B.P. *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.122. n.2. p.299-308. 2015.
- AMAN, M.M.; JASMON, G.B.; MOKHLIS, H.; BAKAR, A.H.A. Analysis of the performance of domestic lighting lamps. **Energy Policy**, v. 52, p. 482-500. 2013.
- ARIGITA, L.; CANAL, J.; TAME'S, R.S.; GONZA'LEZ, A. CO₂-enriched microenvironment affects sucrose and macronutrients absorption and promotes autotrophy in the in vitro culture of kiwi (*Actinidia deliciosa* Chev. Liang and Ferguson). **In Vitro Cellular & Developmental Biology** 46:312–322. 2010.
- ASSIS, T. F. Melhoria genética de *Eucalyptus*: desafios e perspectivas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SILVICULTURA, 3, 2014, Campinas. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, v.1, p. 127-148. 2014.
- ASSIS, T. F. **Relatório de visitas à Arcelor Mittal Bioflorestas**. 17. [S.L.]: AssisTech. 15 f. 2012.
- ASSIS, T. F.; MAFIA, R. G. Hibridação e clonagem. In: BORÉM, A. (ed.) **Biotecnologia Florestal**. Viçosa, p.93-121. 2007.
- ASSIS, T.F. Production and use of *Eucalyptus* hybrids for industrial purposes. In: Hybrid breeding and genetics of forest purposes. In: DUNGEY, H.S.; DIETERS, M. J.; NIKLES, D.J. (Ed.). In: QFRI/CRC-SPF SYMPOSIUM, NOOSA, Queensland, Austrália. **Proceedings...**Brisbane: Department of Primary industries, p.63-75. 2000.
- BADR, A.; ANGERS, P.; DESJARDINS, Y. Metabolic profiling of photoautotrophic and photomixotrophic potato plantlets (*Solanum tuberosum*) provides new insights into acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 107:13–24. 2011.
- BATISTA, D.S., FELIPE, S.H.S., SILVA, T.D., CASTRO, K.M., RODRIGUES, T.C.M., MIRANDA, N.A., et al. Light quality in plant tissue culture: does it matter? **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant.**; v.54 n.3. p.195-215. 2018.
- BRAGA, F.T.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M.; DIGNART, S. L.; BIAGIOTTI, G. PORTO, J.M.P. Qualidade de luz no cultivo in vitro de *Dendranthema grandiflorum* cv. Rage: características morfofisiológicas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33. n. 2, p. 502-508. 2009.
- BRONDANI, G. E.; OLIVEIRA, L. S.; KONZEN, E. R.; SILVA, A. L. L.; COSTA, J. C. 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 (2, Suppl.1), p.2409-2423. 2018.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A.; Campina Grande, PB. Plantas Matrizes na Propagação Vegetativa. **Documentos** 242. p.36. 1ª edição. 2012.

CARVALHO, S.D.; FOLTA, K. M. Sequential light programs shape kale (*Brassica napus*) sprout appearance and alter metabolic and nutrient content. **Horticulture Research**. v.8. n.1.p.1-13. 2014.

CHEN, L.; XUE, X.; YANG, Y.; CHEN, F.; ZHAO, J.; WANG, X.; KHAN, A.T.; HU, Y. Effects of red and blue LEDs on *in vitro* growth and microtuberization of potato single-node cuttings. v.5 n.2. p -197-205. **Frontiers of Agricultural Science and Engineering**. 2018.

CIOĆ, M.; SZEWCZYK, A.; ŻUPNIK, M.; KALISZ, A.; PAWŁOWSKA, B. LED lighting affects plant growth, morphogenesis and phytochemical contents of *Myrtus communis* L. in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. V.132. n.3. p.433–447. 2018.

COELHO JÚNIOR, L. M.; NUNES, A. M. M.; PÁDUA, J.F. F.; SANTOS JÚNIOR, E. P.; LIMA, P. A. F. O desenvolvimento brasileiro das florestas de rápido crescimento com fins energéticos. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 5, p. 28111-28125. 2020.

COPE, K.R.; BUGBEE, B. Spectral effects of three types of white light-emitting diodes on plant growth and development: absolute versus relative amounts of blue light. **HortScience**, Virginia, v.48, n.4, p.504-509, 2013.

COPPEN, J.J.W. **Eucalyptus: The genus Eucalyptus**. CRC Press. New York. 464 p. 2005.

CORRÊA, J.P.O.; VITAL, C.E.; PINHEIRO, M.V.M.; BATISTA, D.S.; AZEVEDO, J.F.L.; SALDANHA, C.W.; CRUZ, A.C.F.; DAMATTA, F.M.; OTONI, W.C. In vitro photoautotrophic potential and ex vitro photosynthetic competence of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen accessions **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.121. n.2. p.289–300. 2015.

CRUZ, C. D. **Programa Genes - Ampliado e integrado aos aplicativos R, Matlab e Selegen**. *Acta Sci., Agron.* [online], vol.38, n.4, pp.547-552. 2016.

DENG, Z.; OSES-PRIETO, J. A.; KUTSCHERA, U.; TSENG, T. S.; HAO, L.; BURLINGAME, A. L.; ZHI-YONG, W.; BRIGGS, W. R. Blue light-induced proteomic changes in etiolated *Arabidopsis* seedlings. **Journal of Proteome Research**, 13. 2014.

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

ECKERT, M.; KALDENHOFF, R. Ligh-induced stomatal movement of selected *Arabidopsis thaliana* mutants. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v. 51, n. 349, p. 1435-1442.2001.

ELLI, E. F.; SENTELHAS, P.C.; HUTH, N.; CARNEIRO, R. L.; ALVARES, C. A. Gauging the effects of climate variability on Eucalyptus plantations productivity across Brazil: A process-based modelling approach. **Ecological Indicators**. V.114. p.106325. 2020.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria. v.35, n.4, p. 961-965. 2005.

FAN, X.; ZANG, J.; XU, Z.; GUO, S.; JIAO, X.; LIU, X.; GAO, Y. Effects of different light quality on growth, chlorophyll concentration and chlorophyll biosynthesis precursors of non-heading chinese cabbage (*Brassica campestris* L.). **Acta Physiologia e Plantarum** v. 35. n. 5. 2013.

FERRARI, M.P.; GROSSI, I.; WENDLING, I. Propagação vegetativa de espécies florestais. **Embrapa Florestas**, Colombo-PR, agosto 2004.

FERREIRA, L. T.; SILVA, M. M. A.; MACÊDO, C. R.; WILLADINO, L. Fonte de luz e concentração de sacarose no cultivo *in vitro* da cana-de-açúcar (RB 867515). **Plant Cell Culture & Micropropagation**. Lavras. v.12. n. 2. p.46-52. 2016.

FONSECA, S. M. et al. **Manual prático de melhoramento genético do eucalipto**. Viçosa, MG: UFV, 200 p. 2010.

FORTINI, E. A.; BATISTA, D. S.; CASTRO, K. M.; SILVA, T. C. et al. Photoperiod modulates growth and pigments and 20-hydroxyecdysone accumulation in Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] grown *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. V.142, p. 595–611. 2020.

FRASZCZAK, B.; GOLCZ, A.; ZAWIRSKA-WOJTASIAK, R.; JANOWSKA, B.; Growth rate of sweet basil na lemon balm plants grown under fluorescent lamps and led modules. **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus**. v.13. n.2. p-3-13. 2014.

GAGO, J.; MARTÍNEZ-NÚÑEZ, L.; LANDÍN, M.; FLEXAS, J.; GALLEGO, P. P. Modeling the effects of light and sucrose on *in vitro* propagated plants: a multiscale system analysis using artificial intelligence technology. **Plos One**, v. 9, 2014.

GALLO, R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, B. A.; MOURA, L. C.; MIRANDA, N. A.; GATTI, K. C.; OTONI, W. C. Micro-cutting propagation of *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* through clumps of axillary buds using different containers and substrates. **Australian Journal of Crop Science**, v.11 n.10. 2017.

GOMES J. M. et al. Crescimento de mudas de *Eucalyptus grandis* em diferentes tamanhos de tubetes e fertilização N-P-K. **Revista Árvore**. V.27.n.1, p-113-127. 2003. GONÇALVES, J.L.; ALVARES, C.A.; ROCHA, J.H.; BRANDANI, C.B.; HAKAMADA, R. Eucalypt plantation management in regions with water stress. **Southern Forests: a Journal of Forest Science**. p.1–15. 2017.

HERINGER, A. S.; REIS, R. S.; PASSAMANI, L. Z.; SOUZA-FILHO, G. A.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. Comparative proteomics analysis of the effect of

combined red and blue lights on sugarcane somatic embryogenesis. **Acta Physiologia e Plantarum**, 39: 52. 2017.

HILL, K. D.; JOHNSON, L. A. S. Systematic studies in the eucalyptus 7: a revision of the bloodwoods, genus *Corymbia* (Myrtaceae). **Telopea**, Sydney, v. 6, p. 173-505, 1995.

IBGE, 2019. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pevs/tabelas>. Acessado em: 17 Jan 2021.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. 1 Ed. Guanabara Koogan, 472p .2004.

KERET, R., NAKHOODA, M.; HILLS, P. N. Optimization of Eucalyptus micropropagation. **South African Journal of Botany**. V.115. n. 320. 2018.

KOZAI, T.; AFREEN, F. ZOBAYED, S. M. A. Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system, p.19-30. **Springer**. 2005.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. Developing a Photoautotrophic Micropropagation System for Woody Plants. **Journal of Plant Research**. 2001.

LAZZARINI L.E.S.; BERTOLUCCI, S.K.V.; PACHECO, F.V.; DOS SANTOS, J.; SILVA, S.T.; DE CARVALHO, A. A.; PINTO, J.E.B.P. Quality and intensity of light affect *Lippia gracilis* Schauer plant growth and volatile compounds *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. V.135. n.3. p.367-379. 2018.

LEONE, G.F.; ANDRADE, P.A.M.; ALMEIDA, C.V. et al. Use of antibiotics to control endophytic bacterial growth migration onto culture medium in *Eucalyptus cloeziana* F.Muell.: a micropropagation approach. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** v.55, 421–432 p. 2019.

LOPES, J. L. W. **Produção de mudas de *Eucalyptus grandis* W. (Hiil ex. Maiden) em diferentes substratos e lâminas de irrigação**. 2004. 100f. Dissertação (Mestrado em Irrigação e Drenagem) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

LOUREIRO, B. A. **Análise energética da madeira e do carvão de híbridos entre *Corymbia citriodora* (Hook.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson e *Corymbia torelliana* (F. Muell.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson**. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia da Madeira) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2016.

MELO, E.A.S.; GONÇALVES, J.L.D.M.; ROCHA, J.H.T.; HAKAMADA. R.E.; BAZANI, J.H.; WENZEL, A.V.A.; ARTHUR, J.C.J.R.; BORGES, J.S.; MALHEIROS, R.; LEMOS, C.C.Z.D.; FERREIRA, E.V.D.O.; FERRAZ, A.D.V. Respostas das plantações clonais de eucalipto à aplicação de fertilizantes N, P e K em diferentes condições edafoclimáticas. **Florestas**. 7 (1): 2. 2016.

MIRANDA, N. A. **Jardim clonal *in vitro* na propagação vegetativa de *Eucalyptus* spp.** Viçosa, MG, 2018. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 88 p. 2018.

MORAIS, E.; ZANATTO, A.C.S.; FREITAS, M.L.M.; MORAES, M.L.T. de; SEBBENN, A.M. Variação genética, interação genótipo solo e ganhos na seleção em teste de progênies de *Corymbia citriodora* Hook em Luiz Antônio, São Paulo. **Scientia Forestalis**, v.38, p.11-18, 2010.

NGUYEN, Q.T.; XIAO, Y.; KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation. In: KOZAI, NHUT, D. T., TAKAMURA, T., WATANABE, H., TANAKA, M. Efficiency of a novel culture system by using light-emitting diode (LED) on *in vitro* and subsequent growth of micropropagated banana plantlets. In **I International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants**, n. 616, p. 121-127. 2001.

NOGUEIRA, R. C. **Propagação *in vitro*, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.)**. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Lavras, Lavras. 89p. 2003.

OLIVEIRA, T. R.; **Influência dos subcultivos e da qualidade da luz na morfogênese *in vitro* em *Cedrela fissilis* vell. (Meliaceae)**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Campos dos Goytacazes.112 f. 2017.

OUZOUNIS, T.; ROSENQVIST, E.; OTTOSEN, C.O. Spectral effects of artificial light on plant physiology and secondary metabolism: A review. **Horticultural Science**. v.50. n.8. p.1128–1135. 2015.

PASQUAL, M. **Fases do cultivo *in vitro***. In: PASQUAL, M. Introdução: fundamentos básicos. Lavras: UFLA; FAEPE, p.32-73. 2001.

PINNOLA, A.; BASSI, R. Molecular mechanisms involved in plant photoprotection. **Biochemical Society Transactions**. V. 46. n.2. p.467–482 .2018.

POUDEL, P. R., KATAOKA, I., MOCHIOKA, R. Effect of red-and blue-light-emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, n. 92, p. 147-153. 2008.

REIS, C. A. F. et. al. *Corymbia torelliana*: estado da arte de pesquisas no Brasil. **Documento 261**. 1 edição. Embrapa Florestas, Colombo. 2014.

REIS, C. A. F.; et. al. *Corymbia citriodora*: estado da arte de pesquisas no Brasil. **Documento 255**. 1 edição. Embrapa Florestas, Colombo. 2013.

ROSA, M. **Photon flux density and wavelengths alter the morphophysiological and chemical characteristics of *Anacardium othonianum* Rizz** -Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), 90 f. Goiânia, 2020.

ROSAL, L. F. **Germinação, indução de calos, micropropagação e anatomia foliar da candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC) Mac Leish)**. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Lavras. Lavras. 106 f. 2004.

SALDANHA, C.W.; OTONI, C.G.; AZEVEDO, J.L.F.; DIAS, L.L.C.; RÊGO, M.M.; OTONI, W.C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 110, p. 413-422. 2012.

SANTOS, T. S.; BATISTA, M. C.; POZZA, S. A.; ROSSI, L. S. Análise da eficiência energética, ambiental e econômica entre lâmpadas de LED e convencionais. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.20, n.4. p.595-602. 2015.

SEGURA, T.E.S. **Avaliação das madeiras de *Corymbia citriodora*, *Corymbia torelliana* e seus híbridos visando à produção de celulose Kraft branqueada**. Tese (Doutorado)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 198 f. Piracicaba, 2015.

SILVA, T.D; BATISTA, D.S; FORTINI, E. A.; CASTRO, K.M. et al. Blue and red light affects morphogenesis and 20-hydroxyecdysone content of *in vitro* *Pfaffia glomerata* accessions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. V 203. 2020.

SOUZA, D. M. S. C.; FERNANDES, S. B.; AVELAR, M. L. M.; FRADE, S. R. P.; MOLINARI, L. V.; GONÇALVES, D. S.; PINTO, J. E. B. P.; BRONDANI, G. E. Light quality in micropropagation of *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*. **Scientia Forestalis**. v.48. n.127 p. 1-13 .2020.

SOUZA, D. M. S. C.; XAVIER, A.; OTONI, W.C.; MIRANDA, N. A.; MAGGIONI, J.H. Light quality in the *in vitro* introduction of *Corymbia* hybrid clones. **Revista Árvore**. p.1-9. 2018.

SOUZA, D.M.S.C, SB FERNANDES, MLM AVELAR, SRP FRADE, LV MOLINARI, DS GONÇALVES, GE BRONDANI. Mixotrophism effect on *in vitro* elongation and adventitious rooting of *Eucalyptus dunnii*. **Cerne** 25(4): 394-401. 2019.

TRUEMAN, S. J., HUNG, C. D., & WENDLING, I. Tissue culture of *Corymbia* and *Eucalyptus*. **Forests**. v.9. n. 2. p.1-42. 2018.

VASCONCELOS, A.G.V.; TOMAS, L.F.; CAMARA, T.R.; WILLADINO, L. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**. v.42 n.5. Santa Maria. 2012.

WELLBURN, A. R. 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(3), p. 307–313. 1994.

WENDLING, I.; WARBURTON, P. M.; TRUEMAN, S. J. Maturation in *Corymbia torelliana* × *C. citriodora* Stock Plants: Effects of Pruning Height on Shoot Production,

Adventitious Rooting Capacity, Stem Anatomy, and Auxin and Abscisic Acid Concentrations. **Forests**, 6, p.3763-3778. 2015.

WENDLING, I; DUTRA, L.F. **Produção de mudas de eucalipto**. Colombo. Empraba Florestas p. 13-47. 2010.

XAVIER, A.; WEDLING I.; SILVA, R. L. **Silvicultura Clonal: Princípios e Técnicas**. 2.ed. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2013. 279 p.

ZOBAYED, S.M.A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Multiple shoot induction and leaf and flower bud abscission of *Annona* cultures as affected by types of ventilation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 69. p. 155–165, 2002.