



**SAMIRA RANGEL DO PRADO FRADE**

**INFLUÊNCIA DA QUALIDADE DE LUZ NA  
MICROPROPAGAÇÃO DE *Eucalyptus dunnii* E *Eucalyptus  
grandis* × *Eucalyptus urophylla***

**LAVRAS-MG  
2023**

**SAMIRA RANGEL DO PRADO FRADE**

**INFLUÊNCIA DA QUALIDADE DE LUZ NA MICROPROPAGAÇÃO DE *Eucalyptus dunnii* E *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Gilvano Ebling Brondani  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Frade, Samira Rangel do Prado.

Influência da qualidade de luz na micropropagação de  
*Eucalyptus dunnii* e *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* /  
Samira Rangel do Prado Frade. - 2019.

53 p. : il.

Orientador(a): Gilvano Ebling Brondani.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Propagação in vitro. 2. Espectro de luz. 3. Clorofila. I.  
Brondani, Gilvano Ebling. II. Título.

**SAMIRA RANGEL DO PRADO FRADE**

**INFLUÊNCIA DA QUALIDADE DE LUZ NA MICROPROPAGAÇÃO DE *Eucalyptus dunnii* E *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla***

**LIGHT QUALITY IN THE MICROPROPAGATION OF *Eucalyptus dunnii* E *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 1 de março de 2019.

Dr. Thiago Magalhães Alves , UFLA  
Dra. Evânia Galvão Mendonça, UFSJ

Prof. Dr. Gilvano Ebling Brondani  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2023**

*À minha família que sempre me deram suporte em todos os momentos dessa trajetória.  
Aos meus avôs João e Jorge (in memoriam).*

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

Acima de tudo e de todos, agradeço a Deus por ter me concedido todas essas oportunidades em minha vida, pela saúde e proteção nas minhas jornadas.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal pela oportunidade de desenvolvimento intelectual e profissional e ao Departamento de Ciências Florestais o qual concedeu toda estrutura necessária para desenvolver este trabalho.

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 pelo financiamento da bolsa de estudos. E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Dr. Gilvano, excelente profissional, que me acolheu no DCF e transferiu seus conhecimentos com competência, paciência e ética durante minha trajetória no mestrado. Muita grata a você pelas lições diárias, tanto elogios quanto críticas, as quais me tornaram uma profissional ainda melhor.

À Professora Dra. Dulcinéia (Dulci), pelo carinho e atenção desde o primeiro contato e ajuda na realização de algumas etapas deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Cultivo *In Vitro* de Espécies Florestais do DCF e a técnica Ana Luiza, por todo apoio e ajuda durante o experimento, pela companhia, parceria e boas risadas dentro e fora do laboratório. Sem vocês com certeza teria sido tudo mais difícil.

Aos professores, técnicos e discentes de outros laboratórios que com toda atenção doaram um pouco do seu tempo para me auxiliar.

Aos meus queridos amigos, que se tornaram a Família Biotec em Lavras, Fernanda e Bruno (nosso trio de mestres), Sérgio (meu amigo e irmão), Jéssica, Natalia, Karine, Thyana, Mariana, Fernanda Lopes (parceira do boxe) e Roxane, muito obrigada a todos vocês pela amizade nas horas difíceis, pelas dicas e apoio sempre. Vocês foram extremamente importantes nessa etapa.

A toda minha família, pelo incentivo incondicional. Em especial meus pais, Valdenio e Nívia, por acreditarem em mim, se sacrificarem e me apoiarem para a realização dos meus sonhos.

Ao meu companheiro, amigo e amor, Renan, pela paciência, por entender minha ausência e total apoio nas minhas decisões, estando junto na alegria e na tristeza mesmo a 833 km de distância. Juntos, somos melhores e mais fortes.

A todos da Família Carvalho que torceram e lutaram junto comigo nessa caminhada.

Por fim e não menos importante agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO

As ferramentas biotecnológicas, como a cultura de tecidos, especialmente a técnica de micropropagação, tem possibilitado a propagação em larga escala das espécies e híbridos de *Eucalyptus* com elevado valor econômico. No entanto, uma das maiores dificuldades de reprodutibilidade dos protocolos de cultivo *in vitro* está relacionada aos fatores ambientais. A luz, sendo fundamental para as plantas clorofiladas, possui características como a qualidade do espectro (comprimento de onda) que podem influenciar no crescimento e desenvolvimento *in vitro*, processo conhecido como fotomorfogênese. Baseado no exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito fotomorfogênico de seis espectros de luz (vermelho, branco, azul, amarelo, roxo e verde) nas fases de multiplicação, alongamento e enraizamento *in vitro* de *Eucalyptus dunnii* e de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* (eucalipto urograndis). Os comprimentos de onda foram fornecidos por meio da filtragem da luz de lâmpadas fluorescentes com folhas duplas de celofanes coloridas. Durante as fases do cultivo *in vitro*, avaliaram-se os aspectos morfológicos de comprimento de brotos, número de brotos, oxidação dos explantes, porcentagem de enraizamento e sobrevivência, comprimento e número de raiz, variações na concentração de pigmentos fotossintéticos e modificações na organização histológica dos tecidos foliares. O experimento foi conduzido em arranjo fatorial 2×6, no delineamento inteiramente casualizado, sendo testados duas espécies e seis espectros de luz. Em termos gerais, a qualidade de luz influenciou a fotomorfogênese *in vitro* das duas espécies estudadas, onde os espectros de luz branco, vermelho, azul e roxo resultaram nas melhores respostas para as características morfológicas analisadas e para os pigmentos fotossintéticos. Com as análises histológicas foi possível verificar diferenças na organização e espessura das células dos tecidos foliares entre as qualidades de luz testadas. Os menores valores para o tamanho dos estômatos e a densidade estomática de eucalipto urograndis foram observados em filtro de luz verde e vermelho respectivamente, e em *E. dunnii* essas características foram observadas em luz branca fluorescente e filtro de luz verde. Assim, os resultados deste trabalho contribuem com informações relevantes para o cultivo *in vitro* dessas espécies e para o entendimento das alterações morfofisiológicas ocasionadas pela qualidade da luz.

**Palavras-chave:** Propagação *in vitro*. Espectro de luz. Clorofila. Anatomia foliar.



## ABSTRACT

Biotechnological tools, such as tissue culture, especially the micropropagation technique, have enabled large-scale propagation of *Eucalyptus* species and hybrids with high economic value. However, one of the greatest difficulties of reproducibility of *in vitro* culture protocols is related to environmental factors. Light, being fundamental for chlorophyll plants, has characteristics such as spectrum quality (wavelength) that can influence *in vitro* growth and development, a process known as photomorphogenesis. Based on the above, the present work had the objective of evaluating the photomorphogenic effect of six light spectra (red, white, blue, yellow, purple, and green) in the multiplication, elongation and *in vitro* rooting stages of *Eucalyptus dunnii* and *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* (urograndis eucalypt). The wavelengths were provided by filtering the light from fluorescent lamps with double sheets of colored cellophanes. The morphological aspects of shoot length, number of shoots, oxidation of explants, rooting and survival percentage, root length and number, variations in the concentration of photosynthetic pigments and changes in histological organization were evaluated during *in vitro* culture stages of the foliar tissues. The experiment was conducted in a 2×6 factorial arrangement, in a completely randomized design, with two species and six light spectra being tested. In general terms, the light quality influenced the *in vitro* photomorphogenesis of the two species studied, where white, red, blue and purple light spectra resulted in the best responses for the analyzed morphological characteristics and the photosynthetic pigments. With the histological analyzes it was possible to verify differences in the organization and thickness of the cells of the foliar tissues among the light qualities tested. The lowest values for stomata size and stomatal density of urograndis eucalypt were observed in green and red-light filters respectively, and in *E. dunnii* these characteristics were observed in fluorescent white light and green light filter. Thus, the results of this work contribute with relevant information for the *in vitro* culture of these species and for the understanding of the morphophysiological changes caused by the light quality.

**Keywords:** *In vitro* propagation. Light spectrum. Chlorophyll. Leaf anatomy.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	2
2.1	Importância silvicultural do gênero <i>Eucalyptus</i> .....	2
2.2	Micropropagação .....	3
2.3	Qualidade de luz no cultivo <i>in vitro</i> de plantas .....	6
2.4	Anatomia foliar de plantas micropropagadas .....	8
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1	Caracterização geral do experimento e material experimental.....	9
3.2	Tratamentos e delineamento experimental .....	10
3.3	Fases do cultivo <i>in vitro</i> e avaliações experimentais.....	13
3.4	Análise de pigmentos fotossintéticos .....	13
3.5	Análise histológica .....	14
3.6	Análise estatística dos dados .....	15
4	RESULTADOS .....	15
4.1	Fase de multiplicação .....	15
4.2	Fase de alongamento .....	22
4.3	Fase de enraizamento .....	28
4.4	Análise histológica .....	33
5	DISCUSSÃO .....	41
6	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS .....	46

## 1 INTRODUÇÃO

O *Eucalyptus* é um gênero de grande importância econômica, com grande potencial como matéria-prima, principalmente para o abastecimento do setor energético e fins industriais. A espécie está estabelecida em plantações florestais de grande escala comercial tornando-se uma das atividades que mais se expandem no setor florestal mundial (LORENZI; SOUZA, 2008).

No Brasil, as florestas de eucalipto são baseadas principalmente em variedades clonais formadas a partir de material genético superior, mais adaptado às condições ambientais adversas e resistentes a fatores bióticos, garantindo assim uma maior produtividade e suprindo a demanda por madeira e outros produtos (MÁXIMO, 2014; SANTOS *et al.*, 2010).

Atualmente, devido a grande demanda por produção de mudas de eucalipto, a técnica de propagação vegetativa tem dado suporte ao método convencional, possibilitando a obtenção de mudas geneticamente idênticas a uma planta-matriz (HARTMANN *et al.*, 2011).

Aliada a este sistema de propagação, as ferramentas biotecnológicas, como a cultura de tecidos, especialmente a técnica de micropropagação, vem tornando possível uma multiplicação em escala comercial de propágulos vegetativos de alto valor genético, em curto período de tempo e espaço reduzido (BRONDANI *et al.*, 2009; MÁXIMO, 2014).

No entanto, há certas dificuldades de reprodutibilidade dos protocolos de micropropagação, principalmente relacionadas aos fatores ambientais (BATISTA *et al.*, 2018). Dentre os fatores ambientais, a luz tem um destaque fundamental para as plantas clorofiladas, pois além de atuar na produção de energia pela fotossíntese, estimula os fotorreceptores que desencadeiam as respostas morfogenéticas, anatômicas e bioquímicas das células e tecidos vegetais, processo conhecido como fotomorfogênese (RIBEIRO *et al.*, 2009; SOUZA, 2018).

A qualidade de luz (comprimento de onda dos espectros) é uma das características principais da luz (RIBEIRO *et al.*, 2009) e que tem sido alvo de estudos mais aprofundados sobre seus efeitos significativos nas plantas clorofiladas cultivadas *in vitro* (HERINGER *et al.*, 2017; SOUZA, 2018).

Baseado nesse contexto, tendo em vista a importância de aperfeiçoar os protocolos de micropropagação para as espécies de eucalipto, desde a introdução do material vegetativo *in vitro* até o enraizamento adventício das miniestacas, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos que as diferentes qualidades de luz proporcionarão nas fases de multiplicação e alongamento, como alterações no crescimento, no número de folhas, no

número de brotações e no teor de pigmentos fotossintéticos, assim como na fase de enraizamento *in vitro*, observando os melhores estímulos para o desenvolvimento de raízes adventícias e as alterações que podem ocorrer na organização dos tecidos foliares e na formação de estômatos funcionais em clones de *Eucalyptus dunnii* e de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Importância silvicultural do gênero *Eucalyptus*

Originário da Austrália, o gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae, que é composta por mais de 700 espécies (SHARMA, 2007).

Devido ao potencial das espécies de *Eucalyptus* como matéria-prima, principalmente para o abastecimento do setor energético e fins industriais, tornou-se uma das espécies lenhosas de maior importância econômica e uma das atividades que mais se expande no setor florestal mundial, sendo estabelecida em plantações de grande escala pelo mundo todo (LORENZI; SOUZA, 2008).

Segundo levantamento estatístico feito pela Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura - PEVS relativos a 2017 e divulgado pelo IBGE (AGÊNCIA BRASIL, 2019), o cultivo de florestas plantadas no Brasil já atingiu cerca de 9,85 milhões de hectares, sendo 75,2% de eucalipto e 20,6% de pinus. A escolha pelo uso de espécies do gênero *Eucalyptus* é em virtude das mesmas apresentarem excelentes características silviculturais, como rápido crescimento, troncos retos, baixa densidade de ramificações, fibras de alta qualidade e bastante adaptativas às mais variadas condições de clima e solos brasileiros (ANDRADE *et al.*, 2003).

As florestas de eucalipto tornaram-se uma alternativa para suprir a demanda por biomassa lenhosa, contribuindo para a redução da pressão sobre o uso de florestas nativas e assim preservando os recursos naturais ali existentes (FETT-NETO; FOGAÇA, 2005). O eucalipto pode ser utilizado também para fins farmacêuticos, como óleos essenciais, na apicultura e na formação de quebra-vento (LORENZI; SOUZA, 2008). Além disso, o setor privado tem demonstrado interesse pelo uso dessa espécie para fixação de carbono, visando reduzir a concentração de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) na atmosfera (ALFENAS *et al.*, 2004).

No Brasil, essas plantações são baseadas principalmente em variedades clonais formadas a partir de material elite, obtidos por meio do melhoramento genético (MORA; GARCIA, 2000). Dentre as espécies de eucalipto mais cultivadas, destaca-se o *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla* assim como seus híbridos, o eucalipto urograndis, um material genético superior mais adaptado as condições adversas, garantindo maior produtividade e assim suprimindo a demanda por mais madeira e outros produtos advindos da silvicultura clonal deste híbrido (MÁXIMO, 2014; SANTOS *et al.*, 2010).

No entanto, apesar dos avanços tecnológicos, ainda existem certas limitações de expansão de plantios na região sul do país, devido à ocorrência de temperaturas mais baixas e geadas frequentes. Devido a este fato, tornam-se necessários estudos direcionados para novas espécies e variedades mais adaptadas a essas regiões (BRONDANI *et al.*, 2009).

O *Eucalyptus dunnii* tem sido considerado uma espécie alternativa para as empresas das regiões sul e sudeste do Brasil, principalmente devido ao seu rápido crescimento, uniformidade de povoamentos, forma da árvore e tolerância ao gelo. Entre suas aplicações, apresenta desempenho adequado para produção de celulose e papel, madeira serrada para fins estruturais, engenharia de produtos de madeira e pisos (FLORSHEIM *et al.*, 2009; REZENDE *et al.*, 2018).

A fim de suprir essa crescente demanda por espécies mais adaptadas e mais produtivas, as empresas do setor florestal têm investido fortemente em programas de melhoramento próprios e, periodicamente, lançam novos clones no mercado (MÁXIMO, 2014).

## **2.2 Micropropagação**

Com as constantes mudanças climáticas e o crescimento populacional avançando, há uma demanda crescente na indústria florestal para implementar técnicas inovadoras de propagação e explorar novos genótipos de eucalipto com propriedade superior de crescimento, adaptação e resiste a pragas e doenças (KERET *et al.*, 2018).

A propagação vegetativa ou assexual consiste em obter mudas geneticamente idênticas a planta-matriz a partir de diferentes órgãos vegetativos (HARTMANN *et al.*, 2011). Isso tem sido a base da silvicultura clonal para as espécies florestais e uma alternativa na obtenção de indivíduos que apresentam características genéticas superiores, por possibilitar a multiplicação de genótipos selecionados, conservação de germoplasma e pesquisas em geral

(ELDRIDGE *et al.*, 1994; XAVIER *et al.*, 2013), principalmente em situações onde a semente é um fator limitante (SOUZA JUNIOR; WENDLING, 2003).

Dentre as técnicas mais promissoras para a clonagem do *Eucalyptus*, a micropropagação vem sendo bastante explorada pela maioria das empresas florestais e pesquisadores (TRUEMAN *et al.*, 2018).

A micropropagação consiste em produzir plantas a partir de órgãos, tecidos ou células vegetais, como embriões zigóticos ou somáticos, folhas, segmentos caulinares e raízes, que são nomeados como fonte de explante (BACCARIN *et al.*, 2015; RATHORE *et al.*, 2014; SIWACH *et al.*, 2014; SOUZA, 2018; ZURADA *et al.*, 2017). Estes explantes são inoculados sob condições assépticas, em meio de cultura adequado e com alto controle das condições ambientais e nutricionais, de forma que possam ter a capacidade de formar novas plantas (BACCARIN *et al.*, 2015; BIANCHETTI *et al.*, 2017; ROUSSOS *et al.*, 2016; SOUZA, 2018).

As principais vantagens da utilização desta técnica, como ferramenta de produção de mudas clonais em larga escala, consistem na obtenção de grande número de plantas a partir de uma única matriz, em curto espaço de tempo e em área reduzida, promover o rejuvenescimento do tecido vegetal, possibilitar um maior controle nutricional, ambiental, fitossanitário e de transporte do material clonal para grandes distâncias sem danos, além do armazenamento por longos períodos e a manutenção do vigor híbrido (BISHT *et al.*, 1999; BRONDANI, 2012; XAVIER *et al.*, 2013).

Além disso, a micropropagação tem como objetivo clonar espécies ou híbridos com altas taxas de crescimento, tolerantes as condições ambientais adversas, como baixa temperatura e salinidade, resistentes a fitopatógenos (BENNETT *et al.*, 2003) e, contornar ou até mesmo solucionar um dos problemas mais comuns na propagação vegetativa, o difícil enraizamento das estacas, observado principalmente em árvores adultas, devido a elevada concentração de metabólitos secundários, fenóis e outros inibidores do enraizamento adventício (BRONDANI *et al.*, 2017; JOSHI *et al.*, 2003). Assim como também pode ser aplicado para a produção de sementes sintéticas, limpeza clonal, conservação de germoplasma *in vitro*, criopreservação e patenteamento de clones desenvolvidos em laboratório (XAVIER *et al.*, 2007).

De maneira simplificada, a micropropagação pode ser realizada nas seguintes etapas, segundo Dutra *et al.*, (2009), Grattapaglia e Machado (1998) e Xavier *et al.*, (2013):

I. Estabelecimento e introdução *in vitro* dos explantes, onde o material vegetal selecionado é cuidadosamente preparado em tratamentos de assepsia utilizando etanol (70%)

em concentrações e tempo de exposição variados para cada espécie, visando estar isento de qualquer contaminação, o qual é imprescindível para o estabelecimento inicial do mesmo que será posteriormente inoculado em recipientes contendo meio de cultura totalmente assépticos;

II. Multiplicação *in vitro*, nesta etapa objetiva-se maior número de gemas uniformes, em curto espaço de tempo, oriundos daqueles explantes estabelecidos com sucesso na etapa anterior;

III. Alongamento *in vitro*, esta etapa tem como objetivo realizar o alongamento dos brotos multiplicados, que geralmente ainda estão em tamanhos muito pequenos, visando prepará-los com tamanho adequado para a etapa de enraizamento;

IV. Enraizamento *in vitro*, refere-se à última etapa sob condições *in vitro*, onde consiste em induzir o enraizamento das brotações por meio de reguladores de crescimento;

V. Aclimatização, nesta etapa as plantas bem estabelecidas são transferidas para recipientes contendo substrato e acondicionadas em locais com elevada umidade relativa do ar, onde começarão a se adaptar as condições de ambiente externo. As brotações que não enraizaram nas condições *in vitro* poderão ser acondicionadas nestes locais, para que sejam estimuladas a formarem raízes *ex vitro* e regenerarem as novas plantas.

Nos últimos anos houve um aumento significativo nas pesquisas voltadas a micropropagação do gênero *Eucalyptus*, como resultado da grande demanda por este método de propagação vegetativa (ALI; RAY, 2018; TRUEMAN *et al.*, 2018).

Em geral, as pesquisas estão focando cada vez mais em otimizar os protocolos de forma específica para cada espécie, a fim de solucionar alguns fatores que podem ser limitantes para o sucesso do cultivo *in vitro* (TRUEMAN *et al.*, 2018), como: o tipo de explante utilizado (AGGARWAL *et al.*, 2012; KERET *et al.*, 2018; NAVROSKI *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2015); o tipo de meio de cultura e componentes nutricionais (CORDEIRO *et al.*, 2014; DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; OBERSCHELP *et al.*, 2015; OBERSCHELP; GONÇALVES, 2016; OBERSCHELP; GONÇALVES, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2016; OLIVEIRA-CAUDURO *et al.*, 2014); o desenvolvimento de tecnologias e novos recipientes (SHUKLA *et al.*, 2017) e a adoção de sistemas que melhorem as trocas gasosas, como membranas porosas (SALDANHA *et al.*, 2012; XAVIER *et al.*, 2013).

Além disso, fatores como as variações no uso dos reguladores de crescimento (AGGARWAL *et al.*, 2012; BRONDANI *et al.*, 2009; DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; DUTRA *et al.*, 2009; HARTMANN *et al.*, 2011; KERET *et al.*, 2018; NAVROSKI *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2016; PRADO *et al.*, 2015); temperatura das salas de crescimento e estufas para aclimatização (TRUEMAN *et al.*, 2013); fonte e qualidade da luz utilizada (BATISTA *et*

*al.*, 2018; RUEDELL *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2018); uso de substratos alternativos, visando reduzir os gastos com meios semissólidos (NIU *et al.*, 2015; XAVIER *et al.*, 2013); desenvolvimento de ambientes mais eficiente para o sistema (BRONDANI *et al.*, 2018; WILLYAMS, 2016); abordagens moleculares para identificar respostas á recalcitrância no enraizamento adventício (ABU-ABIED *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2017; BRYANT; TRUEMAN, 2015; LEVY *et al.*, 2014; NAKHOODA; WATT, 2017; RUEDELL *et al.*, 2015); entre outros fatores (ESPOSITO-POLESI *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2017; SHANTI *et al.*, 2015;) veem sendo objeto de estudo de muitos pesquisadores.

### **2.3 Qualidade de luz no cultivo *in vitro* de plantas**

As principais questões relacionadas à dificuldade de reprodutibilidade dos protocolos de cultivo *in vitro* de plantas entre os laboratórios são fatores ambientais (BATISTA *et al.*, 2018). Entre os fatores externos, a luz tem um destaque fundamental para as plantas clorofiladas, pois atua na produção de energia pela fotossíntese e no estímulo dos fotorreceptores que desencadeiam as respostas morfogênicas, anatômicas e bioquímicas das células e tecidos vegetais, processo conhecido como fotomorfogênese (RIBEIRO *et al.*, 2009; SOUZA, 2018).

Alguma das características principais da luz que podem interferir no cultivo *in vitro* de plantas são o fotoperíodo (duração), o fluxo de fótons (quantidade) e a qualidade de luz (comprimento de onda dos espectros) (RIBEIRO *et al.*, 2009). Entretanto, muita das vezes esses detalhes sobre os espectros utilizados nos experimentos não são muito bem especificados (BATISTA *et al.*, 2018).

Tem sido cada vez mais aprofundado os estudos relacionados ao efeito da qualidade de luz em espécies cultivadas *in vitro*, pois os níveis de comprimento de onda afetam de maneira distinta o crescimento, desenvolvimento e diversas vias metabólicas nas plantas (HERINGER *et al.*, 2017; SOUZA, 2018).

A faixa do espectro de luz visível mais importante para as plantas é chamada de radiação fotossinteticamente ativa (400 a 700 nm) e nela estão contidas as faixas dos espectros do azul (400 a 500 nm) e do vermelho (600 a 700 nm), os quais mais afetam a fotossíntese, pois as moléculas fotossintéticas absorvem os comprimentos de onda destas faixas de forma mais eficiente (ANDRADE *et al.*, 2014; SILVA, 2016).



As moléculas receptoras que as plantas utilizam para detectar luz solar são denominadas fotorreceptoras, as quais respondem a um sinal, nesse caso a luz, dando início a reação de sinalização (TAIZ; ZEIGER, 2017). Os fotorreceptores mais abundantes nas plantas são os fitocromos, criptocromos e receptores de luz ultravioleta. A faixa de absorbância que estimula o fitocromo está no vermelho (600 a 700 nm), vermelho distante (700 a 800 nm) e em menor quantidade no azul (400 a 500 nm) e para os criptocromos a faixa de absorbância se encontra no azul (SILVA, 2016).

Após a detecção da luz pelos fotorreceptores, os pigmentos fotossintéticos são sinalizados e servem como um complexo antena, coletando luz e transferindo a energia para o centro de reação, onde acontecem as reações de energia durante a fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2017).

As clorofilas *a* e *b* e os carotenoides são os pigmentos fotossintéticos que participam da reação de fotossíntese. As concentrações destes pigmentos indicam a suscetibilidade da planta a determinado comprimento de onda e intensidade luminosa. As clorofilas tendem a ser foto-oxidadas devido ao excesso de luz e os carotenoides possuem o papel de prevenir essa foto-oxidação. Nestas situações de luminescência, ocorre a limitação do metabolismo primário, podendo afetar a atividade enzimática e o metabolismo secundário das plantas (BASSOLINO *et al.*, 2015; DARKO *et al.*, 2014; SILVA, 2016).

Neste sentido, muitos pesquisadores têm testado variações na composição espectral da luz do ambiente de cultivo para aumentar a eficiência da micropropagação das plantas, onde geralmente são utilizadas como fonte de luz, as lâmpadas convencionais fluorescentes brancas frias (GUPTA; JATOTHU, 2013; SINGH *et al.*, 2015).

Novas tecnologias e alternativas como as lâmpadas de diodos emissores de luz (LED) permitem com que espectros mais específicos sejam aplicados para regular as respostas fotomorfogênicas, podendo-se utilizar diferentes comprimentos de onda e a combinação entre eles (GUPTA; JATOTHU, 2013; BATISTA *et al.*, 2018). A substituição por lâmpadas fluorescentes coloridas também vem sendo estudadas (GAZOLLA *et al.*, 2017). A qualidade espectral também pode ser fornecida por meio da filtragem da saída dos tubos de lâmpadas fluorescentes brancas com filtros coloridos, como folhas de celofane (HÉRAUT-BRON *et al.*, 2001; LIN; YANG, 1999; RUEDELL *et al.*, 2013; RUEDELL *et al.*, 2015).

Resultados significativos nos aspectos morfológicos do material vegetal têm sido encontrados em diversos estudos que avaliam a qualidade de luz, como um melhor alongamento do caule utilizando lâmpadas LED na micropropagação de *Corymbia* spp. (SOUZA *et al.*, 2018), aumento da matéria seca e fresca e concentrações mais elevadas de

pigmentos fotossintéticos em *Gossypium hirsutum* L. (LI *et al.*, 2017), maior quantidade de óleo essencial em *Lippia alba* (BATISTA *et al.*, 2016), aumento da atividade de enzimas antioxidantes em folhas e raízes de *Rehmannia glutinosa* (MANIVANNAN *et al.*, 2015), entre outros (BATISTA *et al.*, 2018).

Diferenças relacionadas à organização do tecido fotossintético também foram observadas em folhas de plantas *in vitro* (ARENA *et al.*, 2016; BARUPAL *et al.*, 2018; MA *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2015), indicando que as mudanças no ambiente, como a luz, afetam a anatomia.

Manipular as condições de cultivo na cultura de tecidos tem contribuído para a otimização dos protocolos de micropropagação, no entanto, é importante salientar que ainda são necessários estudos específicos para cada espécie que correlacionem à qualidade de luz, o fotoperíodo, a intensidade luminosa, os reguladores de crescimento e fatores moleculares mais complexos (KUTSCHERA; WANG, 2016; RUEDELL *et al.*, 2015; SOUZA, 2018).

#### **2.4 Anatomia foliar de plantas micropropagadas**

A anatomia foliar é um indicador chave das adaptações morfofisiológicas das plantas e sua capacidade de se desenvolver em um ambiente específico (THOLEN *et al.*, 2012).

Um ambiente *in vitro* consiste em temperatura constante, baixa densidade de fluxo de fótons fotossintéticos, grande flutuação diurna na concentração de CO<sub>2</sub>, alto teor de umidade relativa, alta concentração de açúcar, sais e nutrientes no meio, ausência de microrganismos, baixas taxas de transpiração, fotossíntese, absorção de água e CO<sub>2</sub>, o que pode resultar em crescimento deficiente e necessidade de adaptações histológicas das plantas cultivadas neste ambiente (XIAO *et al.*, 2011).

As folhas de plantas do habitat natural mostram uma organização mais compacta dos tecidos e mais diferenciada, em comparação com plantas cultivadas hidroponicamente e *in vitro* (BARUPAL *et al.*, 2018).

Em muitos casos, até mesmo o desenvolvimento enfraquecido do aparato fotossintético das folhas de cultivo *in vitro* pode estar associado ao ambiente, à oferta exógena contínua de sacarose e más condições de luz (HAZARIKA, 2006).

A intensidade e a qualidade de luz têm se mostrado bastante influente na densidade estomática de plantas em ambiente *in vitro*, sendo estimada pela razão entre o número de estômatos e a uma determinada área de células epidérmicas (KHAN *et al.*, 2003).

Este fato torna-se importante, pois é por meio da abertura e fechamento dos estômatos que ocorre o controle osmótico, e quando em menor densidade garantem uma menor transpiração e conseqüentemente uma maior sobrevivência das plântulas micropropagadas na etapa de aclimatização (FRÁGUAS, 2003).

Portanto, entender quais mecanismos externos são passíveis de serem alterados para melhorar as condições de cultivo *in vitro* das plantas, pode favorecer um desenvolvimento mais eficiente dos protocolos de micropropagação (ABBADE *et al.*, 2009).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Caracterização geral do experimento e material experimental

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultivo *In Vitro* de Espécies Florestais do Departamento de Ciências Florestais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), localizado no município de Lavras-MG. As análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal do Setor de Botânica/DBI da UFLA. A leitura da absorvância dos pigmentos fotossintéticos foi realizada no Departamento de Fitopatologia da UFLA.

Sementes do material genético de *Eucalyptus dunnii*, com matrizes localizadas em Piracicaba-SP (sem conhecimento da origem), foram doadas pelo Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (IPEF) para o Laboratório Central de Biologia Molecular da UFLA (LCBM), onde realizaram a inoculação das sementes e o estabelecimento do material vegetal *in vitro* a pouco mais de um ano, com subcultivos a cada 21 dias em meio de cultura WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,02 mg L<sup>-1</sup> de ANA e 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Alguns destes explantes já estabelecidos *in vitro* foram cedidos para a realização deste trabalho.

Os clones híbridos de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* (eucalipto urograndis) foram obtidos de segmentos apicais e nodais retirados de minicepas cultivadas em casa de vegetação, localizada na UFLA e estabelecidos *in vitro* para serem utilizados no presente trabalho.

### 3.2 Tratamentos e delineamento experimental

Para avaliação da qualidade de luz, os explantes de *E. dunnii* e do híbrido de eucalipto urograndis foram mantidos em sala de crescimento a  $25 \pm 1$  °C por um fotoperíodo de 16 horas de luz, sendo utilizado em cada prateleira duas lâmpadas do tipo tubular branca fria marca Philips T10 de 0,60 metros, potência de 20W cada e temperatura de cor 6400-6500k. A irradiância das duas lâmpadas ( $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) foi aferida pelo fotorradiômetro modelo QSO-S Procheck + Sensor-PAR Photon Flux (Decagon Devices, Pullman, Washington-USA).

Os tratamentos testados consistiram em seis tipos de qualidade espectral (T1: vermelho; T2: branco (tratamento controle); T3: azul; T4: verde; T5: roxo e T6: amarelo) e foram fornecidas pela filtragem da saída de luz das lâmpadas fluorescentes por meio de folhas duplas de celofane (FIGURA 1). Os filtros foram substituídos a cada 30 dias para evitar pequenas alterações na qualidade espectral da radiação transmitida devido ao possível desbotamento da cor.

Entretanto, este sistema utilizando folhas de celofanes coloridos não fornece um comprimento de onda monocromático total, havendo pequenos ruídos (interferências) provenientes de outros espectros de luz da lâmpada fluorescente.

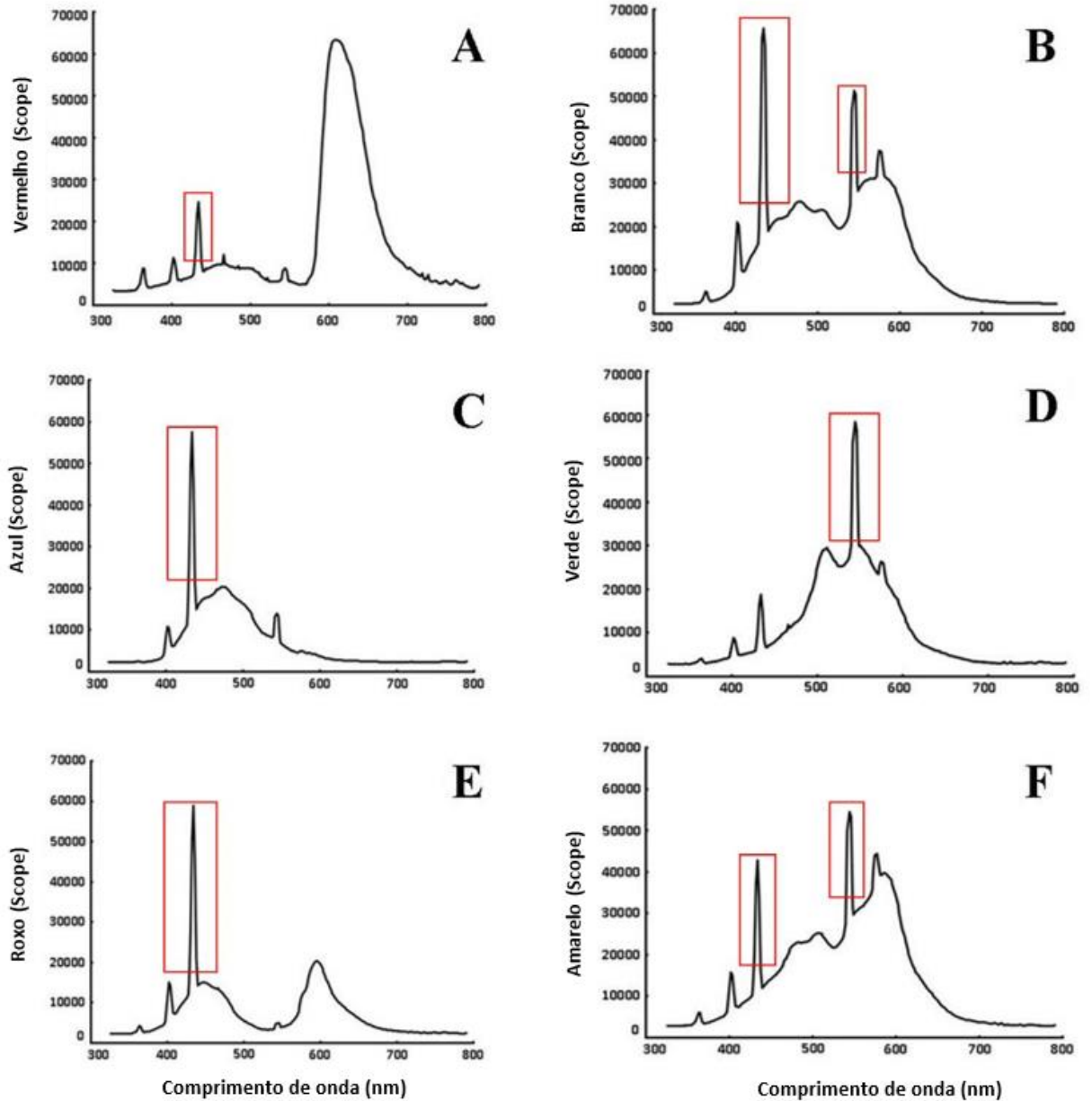
Figura 1 – Sistema utilizado para fornecer as qualidades espectrais no experimento, pela filtragem da saída de luz das lâmpadas fluorescentes por meio de folhas duplas de celofane. A: vermelho, B: branco (controle), C: azul, D: verde, E: roxo e F: amarelo.



Fonte: Do autor (2023).

Os espectros de luz foram aferidos por meio do espectrômetro portátil SPECTRA PEN Z850 (Qubit Systems-Kingston, Ontario-USA). As distribuições espectrais dos filtros de cada tratamento utilizados neste experimento estão representadas na Figura 2.

Figura 2 – Variações do comprimento de onda (nm) utilizadas na experimentação emitida pelas lâmpadas fluorescentes e filtrada por folha dupla de celofane. A: vermelho, B: branco (controle), C: azul, D: verde, E: roxo e F: amarelo.



 Presença de ruídos (interferências) de outros espectros de luz.

Fonte: Do autor (2023).

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado (DIC) em arranjo fatorial (2×6), sendo os fatores constituídos por duas espécies (*E. dunnii* e *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*) e seis espectros de luz (vermelho, azul, amarelo, roxo, verde e branco).

### 3.3 Fases do cultivo *in vitro* e avaliações experimentais

Na fase de multiplicação, os explantes de *Eucalyptus dunnii* e *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* foram padronizados em tufo contendo quatro brotações com cerca de 1 cm aproximadamente. Foram realizados dois subcultivos com intervalo de 28 dias cada em meio de cultura WPM suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0,05 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Para cada espécie, foram realizadas quatro parcelas experimentais contendo cinco repetições cada, onde os explantes foram a unidade experimental, totalizando 20 repetições.

Na fase de alongamento, foi selecionado explantes em tufo com no mínimo quatro brotações e maiores que 1 cm. Foi realizado um subcultivo de 35 dias em meio de cultura WPM suplementado com 0,5 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Para cada espécie, foram realizadas quatro parcelas experimentais contendo três repetições cada, onde os explantes foram a unidade experimental, totalizando 12 repetições.

Na fase de enraizamento, foi selecionado explantes alongados. As microestacas acima de 2,0 cm foram individualizadas para serem enraizadas. Realizou-se um subcultivo de 35 dias em meio de cultura WPM suplementado com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB, 0,05 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e 20 g L<sup>-1</sup> de glicose. Para cada espécie foi realizado quatro parcelas experimentais contendo cinco repetições cada, onde os explantes foram a unidade experimental, totalizando 20 repetições.

As características avaliadas nas fases de cultivo *in vitro* foram: porcentagem média de oxidação de acordo com o parâmetro de escala de notas adaptado de Oliveira *et al.* (2016), onde foi atribuída nota 1= para ausente de oxidação, nota 2= para pouca oxidação na base dos explantes e nota 3= para oxidação completa do meio de cultura (meio de cultura escurecido); comprimento e número médio de brotos por explante maiores que 1,0 cm; porcentagem de enraizamento e sobrevivência dos explantes; comprimento e número médio de raízes; conteúdo de pigmentos fotossintéticos da clorofila *a*, *b*, totais (*a* + *b*), carotenoides e análises histológicas de tecidos foliares.

### 3.4 Análise de pigmentos fotossintéticos

Nas três fases do cultivo *in vitro* foram analisadas as concentrações de pigmentos fotossintéticos da clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenoides. A extração foi

realizada conforme metodologia adaptada de Lichtenthaler (1987). Em ambiente parcialmente escuro, foi coletado 25 mg de matéria fresca de folhas de três plântulas e colocadas em tubos Eppendorf de 0,5 mL. Em seguida, pipetou-se em cada amostra um volume de 2,5 mL da solução de Dimetilsulfóxido (DMSO) e o material foi armazenado em local escuro por 48 horas. Com o pigmento extraído das folhas foi realizada a leitura da absorbância (A) à 480 nm, 649 nm, 665 nm no espectrofotômetro KASUAKI. Para cada tratamento e espécie estudada, as leituras foram realizadas em triplicatas. As concentrações de clorofila e carotenoides foram calculadas seguindo as equações descritas por Wellburn (1994): clorofila a=  $[(12,19 \times A_{665}) - (3,45 \times A_{649})]$ ; clorofila b=  $[(21,99 \times A_{649}) - (5,32 \times A_{665})]$  e carotenoides=  $(1000 \times A_{480} - 2,14 \times Ca - 70,16 \times Cb)/220$ , sendo os resultados expressos em mg de pigmento por g de matéria fresca de tecido foliar ( $\text{mg g}^{-1}$  MF).

### 3.5 Análise histológica

Ao final das fases de alongamento e enraizamento foram coletadas folhas para realização das análises histológicas. As amostras de folhas foram fixadas em solução de formaldeído ácido acético (FAA) + álcool a 70% por um período de 48 horas e posteriormente mantidas em álcool 70% (JOHANSEN, 1940). Em seguida, as amostras foram desidratadas por meio de série alcoólica-etílica em concentrações crescentes (80, 90 e 100%) por 30 minutos em cada solução (JOHANSEN, 1940) e armazenadas em solução de álcool 100% e na proporção 1:1 em estufa quente (overnight). Por fim, as amostras foram postas em solução pura de historresina (Leica<sup>®</sup>) por 24 horas.

Após este processo, as amostras foram emblocadas em resina pura de hidroxietil metacrilato (Leica<sup>®</sup>). Com o uso de micrótomo rotativo manual e navalha, os blocos contendo as amostras foram seccionados transversalmente a 7  $\mu\text{m}$  de espessura. Os cortes obtidos foram corados com solução de azul de toluidina (KRAUS; ANDRUIN, 1997) e montados em lâminas histológicas com finalizador verniz vitral (PAIVA *et al.*, 2006).

Para obter cortes paradérmicos, as amostras de folhas foram colocadas em solução de hipoclorito de sódio e água destilada (1:1) por 24 horas, para que pudesse ocorrer a dissociação dos tecidos (KRAUS; ANDRUIN, 1997). Posteriormente, foram retirados os tecidos da face abaxial, corados com solução de safranina 1% e distendidos em lâminas histológicas. As lâminas histológicas dos cortes transversais e paradérmicos foram observadas



em microscópio de luz (Zeiss®) e fotomicrografadas com câmera digital acoplada (AxionCam ERc5s) em escala micrométrica e objetiva de 20x e 40x.

As espessuras dos tecidos foliares da epiderme adaxial, abaxial, parênquima paliádico, lacunoso e limbo total foram mensurados na escala micrométrica utilizando o software Axion Vision versão 4.8 e Image J em três pontos distintos de três fotomicrografias de cada tratamento, obtendo uma média dos dados. A espessura da nervura central também foi mensurada de três fotomicrografias de cada tratamento para obter uma média final. A espessura do diâmetro polar e equatorial dos estômatos foi mensurada de cinco estômatos mais homogêneos de três fotomicrografias de cada tratamento e realizada uma média. A densidade estomática (número de estômatos por unidade de área) foi calculada pela média de estômatos presentes em três fotomicrografias de cada tratamento da área da imagem em uma área definida, de acordo com a metodologia proposta por Castro *et al.* (2009).

### **3.6 Análise estatística dos dados**

Os dados quantitativos mensurados em todo o experimento foram processados no software estatístico SOC (EMBRAPA, 1990) e SISVAR (FERREIRA, 2011). As variáveis analisadas que não apresentaram distribuição normal perante o teste de Shapiro-Wilk a 5% de significância foram transformadas quando necessário. Em seguida, foi realizada a análise de variância (ANOVA) pelo teste F ( $p < 0,01$ ) e ( $p < 0,05$ ).

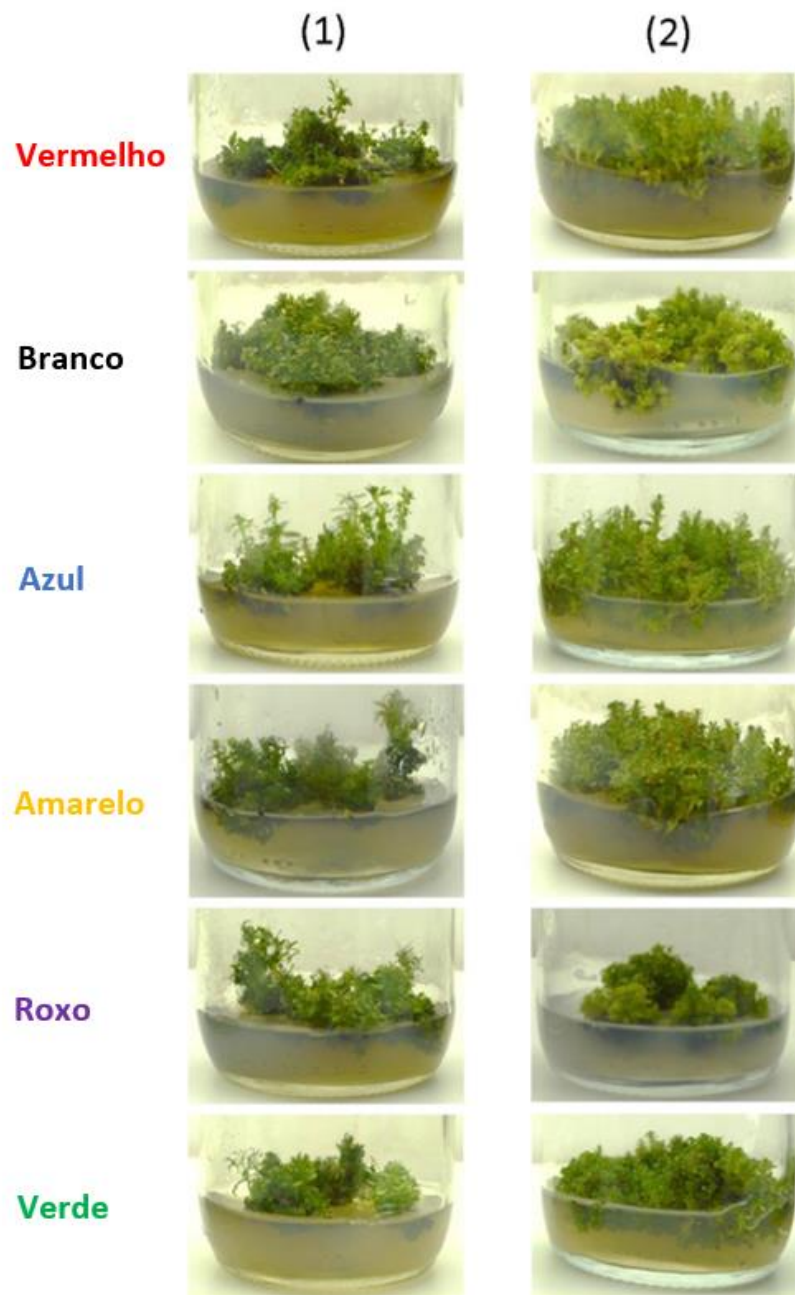
## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Fase de multiplicação *in vitro***

Os resultados revelaram que os espectros de luz produziram diferentes efeitos na fotomorfogênese durante as etapas do cultivo *in vitro* de *Eucalyptus dunnii* e o híbrido de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*. Concomitantemente, a presença de ruídos nas qualidades espectrais, mesmo que em baixa frequência, podem ter influenciado nas respostas fisiológicas das plântulas e ocasionado efeitos secundários.

O desenvolvimento foliar, a forma e coloração das plântulas de *E. dunnii* e eucalipto urograndis foram influenciados pela qualidade de luz após 56 dias na fase de multiplicação *in vitro* (FIGURA 3).

Figura 3 – Explantes de *E. dunnii* (1) e eucalipto urograndis (2) cultivados *in vitro* aos 56 dias na fase de multiplicação sob espectro de luz vermelho, branco, azul, amarelo, roxo e verde. Detalhes das variações da forma - brotos alongados em (1) e rosetados em (2) - e coloração dos explantes sob os diferentes tratamentos.



De acordo com a análise de variância, na fase de multiplicação *in vitro*, houve efeito significativo ( $p < 0,01$ ) das espécies avaliadas e da interação entre as espécies e os espectros de luz para variável número de brotos (NB). O comprimento de brotos (CB) também variou significativamente ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ) quanto aos fatores testados. Apenas houve efeito significativo ( $p < 0,05$ ) do fator espectro de luz para a variável resposta de oxidação dos explantes (OXI) (TABELA 1).

Tabela 1 – Resumo da análise de variância para a porcentagem média de oxidação (OXI), número de brotos (NB) e comprimento de brotos (CB) em explantes de *Eucalyptus dunnii* e o eucalipto urograndis sob os diferentes espectros de luz na fase de multiplicação *in vitro*, aos 56 dias.

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios		
		OXI <sup>(1)</sup> (%)	NB <sup>(1)</sup> (brotos explante <sup>-1</sup> )	CB <sup>(1)</sup> (cm explante <sup>-1</sup> )
Espécie (SP)	1	0,03 <sup>ns</sup>	205,10 <sup>**</sup>	0,41 <sup>**</sup>
Espectro de luz (EL)	5	0,20 <sup>*</sup>	0,35 <sup>ns</sup>	0,25 <sup>**</sup>
SP*EL	5	0,05 <sup>ns</sup>	1,47 <sup>**</sup>	0,04 <sup>*</sup>
Resíduo	228	0,10	0,18	0,02
Total	239	-	-	-
Média Real	-	54,60	16,60	1,04
CV <sub>exp</sub> (%)	-	25,65	10,60	10,70

<sup>ns</sup> Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. \* e \*\* Valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F. <sup>(1)</sup> Dados transformados por  $\sqrt{x}$ , onde  $x$  = dado amostrado. GL = grau de liberdade. CV<sub>exp</sub> = coeficiente de variação experimental.

Fonte: Do autor (2023).

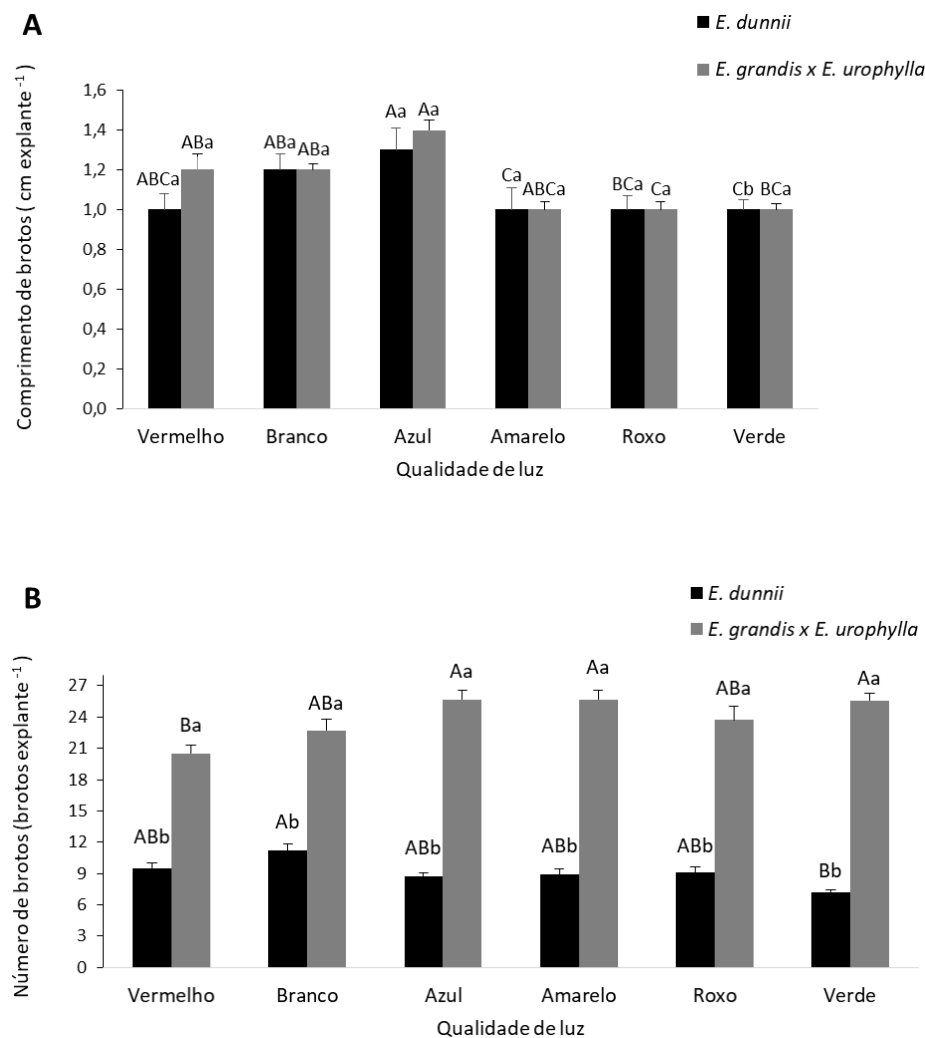
De modo geral, na etapa de multiplicação *in vitro* foram observados valores superiores de comprimento de brotos dos explantes na qualidade de luz azul para ambas as espécies analisadas (FIGURA 4A).

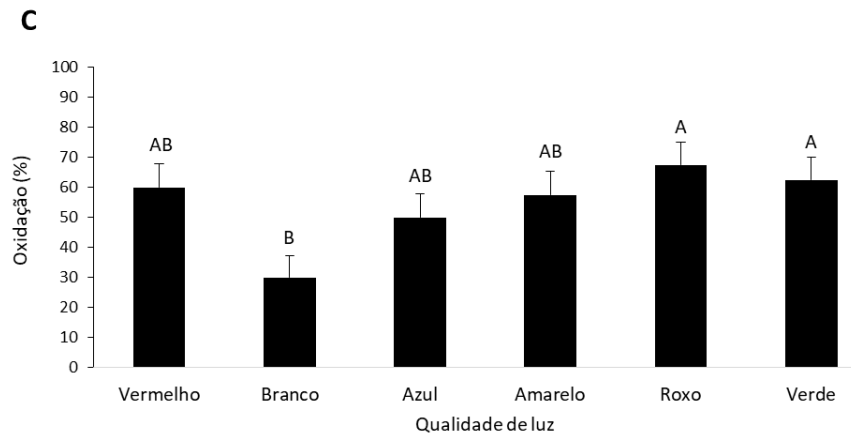
Já o número de brotos por explante para ambas as espécies não apresentou variação significativa entre os tratamentos testados, somente entre as espécies, onde o eucalipto urograndis apresentou o maior número de brotos por explante quando comparado ao *E. dunnii* (FIGURA 4B).

Em relação a variável oxidação, apenas houve diferença significativa entre os tratamentos, porém os resultados demonstram a maior porcentagem de explantes oxidados para as duas espécies no tratamento com qualidade de luz roxo (67,5%) e verde (62,5%) e a

menor porcentagem observada nos explantes cultivados na qualidade de luz branca fluorescente (30%), condição a qual favorece o melhor desenvolvimento das espécies *in vitro* (FIGURA 4C).

Figura 4 – Respostas morfológicas observadas na multiplicação *in vitro* de *E. dunnii* e do híbrido eucalipto urograndis. (A) Comprimento de brotos; (B) Número de brotos e (C) Porcentagem de oxidação. Médias seguidas por mesma letra maiúscula para o efeito dos tratamentos (luz) na espécie e, médias seguidas por mesma letra minúscula para o efeito entre as espécies no mesmo tratamento (luz) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média  $\pm$  erro padrão.





Fonte: Do autor (2023).

Além de ter influenciado o desenvolvimento morfológico das plântulas, a qualidade da luz influenciou também na concentração de pigmentos fotossintéticos nesta fase do cultivo *in vitro*, onde dependendo do tipo de espectro de luz utilizado, pode ocorrer a redução na concentração de clorofila a, b e carotenoides das plântulas.

Na fase de multiplicação *in vitro*, foi observado pela análise de variância que houve interação ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ) entre os fatores testados quanto à concentração de clorofila a (CLO a), clorofila b (CLO b), clorofila total (a + b) (CLO total) e carotenoides (CARO) (TABELA 2).

Tabela 2 – Resumo da análise de variância para a concentração média de clorofila a (CLO a), clorofila b (CLO b), clorofila total (CLO total) e carotenoides (CARO) em massa fresca de folhas de explantes de *Eucalyptus dunnii* e eucalipto urograndis sob os diferentes espectros de luz na fase de multiplicação *in vitro*, aos 56 dias.

Causas da variação	GL	Quadrados Médios (mg g <sup>-1</sup> de MF)			
		CLO a <sup>(1)</sup>	CLO b <sup>(2)</sup>	CLO total <sup>(1)</sup>	CARO <sup>(1)</sup>
Espécie (SP)	1	0,43**	6,89**	0,49**	0,06**
Espectro de luz (EL)	5	0,02**	0,27**	0,02**	0,002**
SP*EL	5	0,01**	0,10*	0,01**	0,002**
Resíduo	24	0,001	0,03	0,002	0,0004
Total	35	-	-	-	-
Média Real	-	0,17	0,12	0,29	0,04
CV <sub>exp</sub> (%)	-	11,37	6,17	8,74	10,61

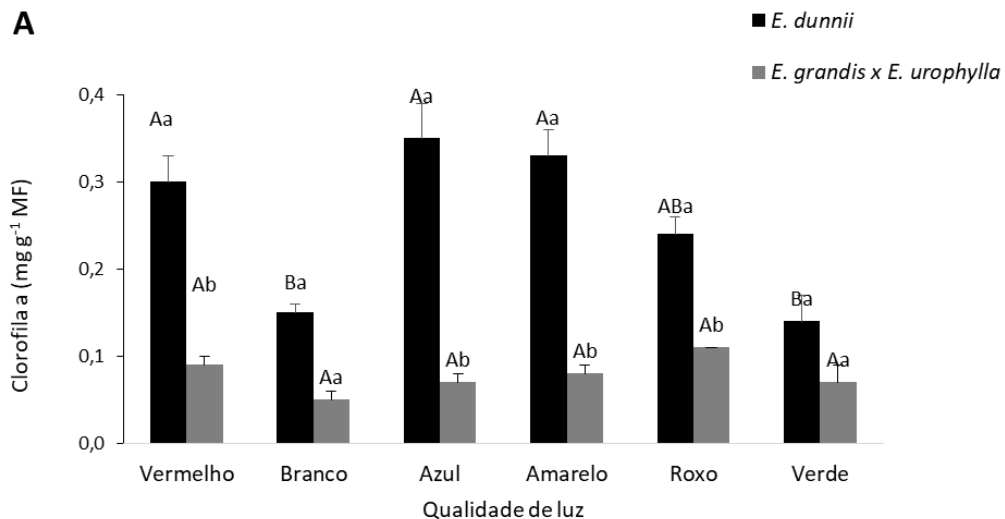
\* e \*\* Valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F. <sup>(1)</sup>Dados transformados por  $\ln y$  onde  $y$  = dado amostrado. <sup>(2)</sup>Dados transformados por  $1/y$ , onde  $y$  = dado amostrado. GL = graus de liberdade. CV<sub>exp</sub> = coeficiente de variação experimental.

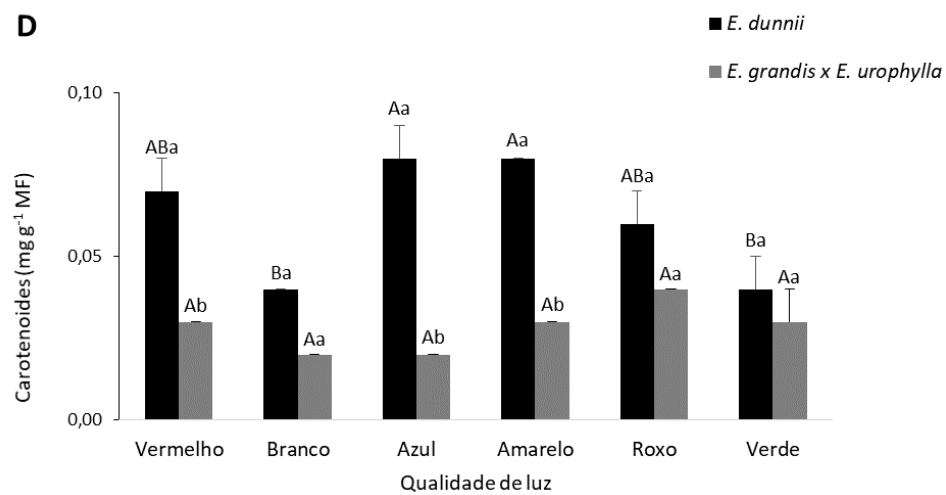
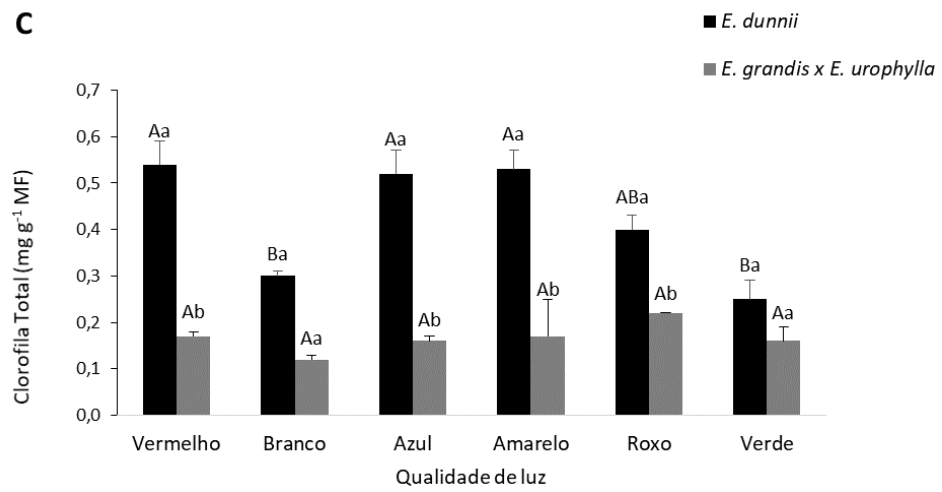
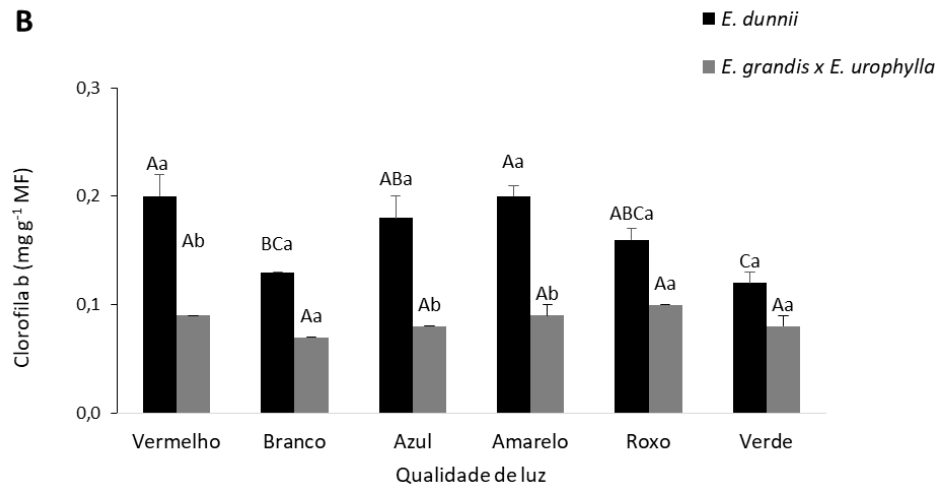
Fonte: Do autor (2023).

Para o *E. dunnii*, os pigmentos fotossintéticos analisados variaram estatisticamente entre si diante dos tratamentos testados de qualidade de luz, sendo a maior média de clorofila *a* observada no espectro de luz azul ( $0,35 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$ ) (Figura 5A), de clorofila *b* no espectro de luz vermelho e amarelo ( $0,20 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$ ) (Figura 5B), de clorofila total no espectro de luz vermelho ( $0,54 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$ ) (Figura 5C) e de carotenoides no espectro de luz azul e amarelo ( $0,08 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$ ) (Figura 5D). Já a menor concentração média para todos os pigmentos fotossintéticos avaliados foi observada quando as plântulas foram expostas no espectro de luz verde.

Para o eucalipto urograndis, não houve diferença estatística na concentração dos pigmentos fotossintéticos entre os tratamentos testados, contudo as médias superiores de todos os pigmentos analisados foram observadas no espectro de luz roxo e as inferiores observadas no espectro de luz branca fluorescente e luz azul para os carotenoides ( $0,02 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$ ) (FIGURA 5D).

Figura 5 – Concentração de pigmentos fotossintéticos de *E. dunnii* e eucalipto urograndis na fase de multiplicação *in vitro*. (A) Clorofila *a*; (B) Clorofila *b*; (C) Clorofila total e (D) Carotenoides. Médias seguidas por mesma letra maiúscula para o efeito dos tratamentos (luz) na espécie e, médias seguidas por mesma letra minúscula para o efeito entre as espécies no mesmo tratamento (luz) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média  $\pm$  erro padrão.



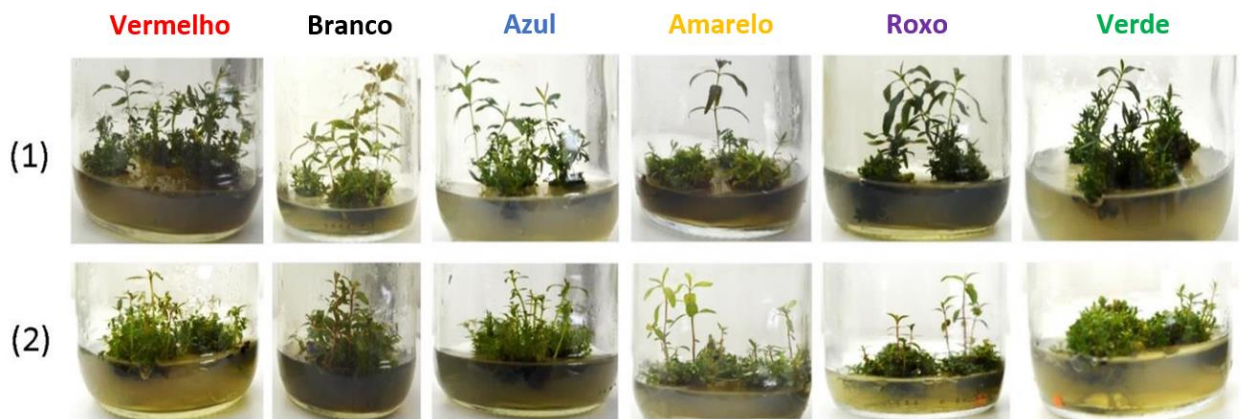


Fonte: Do autor (2023).

#### 4.2 Fase de alongamento *in vitro*

Os diferentes tratamentos com qualidade de luz influenciaram os parâmetros observados nesta fase, como número e comprimento médio de brotos, oxidação na base dos explantes e o desenvolvimento fisiológico de *E. dunnii* e eucalipto urograndis *in vitro* (FIGURA 6).

Figura 6 – Explantes de *E. dunnii* (1) e eucalipto urograndis (2) cultivados *in vitro* aos 35 dias na fase de alongamento sob espectro de luz vermelho, branco, azul, amarelo, roxo e verde.



Fonte: Do autor (2023).

Na fase de alongamento *in vitro*, observou-se pela análise de variância que houve efeito significativo ( $p < 0,01$ ) do fator espécie para a variável resposta de oxidação dos explantes (OXI) e número de brotos (NB). Além disso, o número de brotos também variou significativamente ( $p < 0,01$ ) quanto à interação da espécie e o espectro de luz, assim como o comprimento de brotos (CB), o qual também obteve variação significativa para o fator espectro de luz (TABELA 3).



Tabela 3 – Resumo da análise de variância para a porcentagem média de oxidação (OXI), número médio de brotos (NB) e comprimento de brotos (CB) em explantes de *Eucalyptus dunnii* e eucalipto urograndis sob os diferentes espectros de luz na fase de alongamento *in vitro*, aos 35 dias.

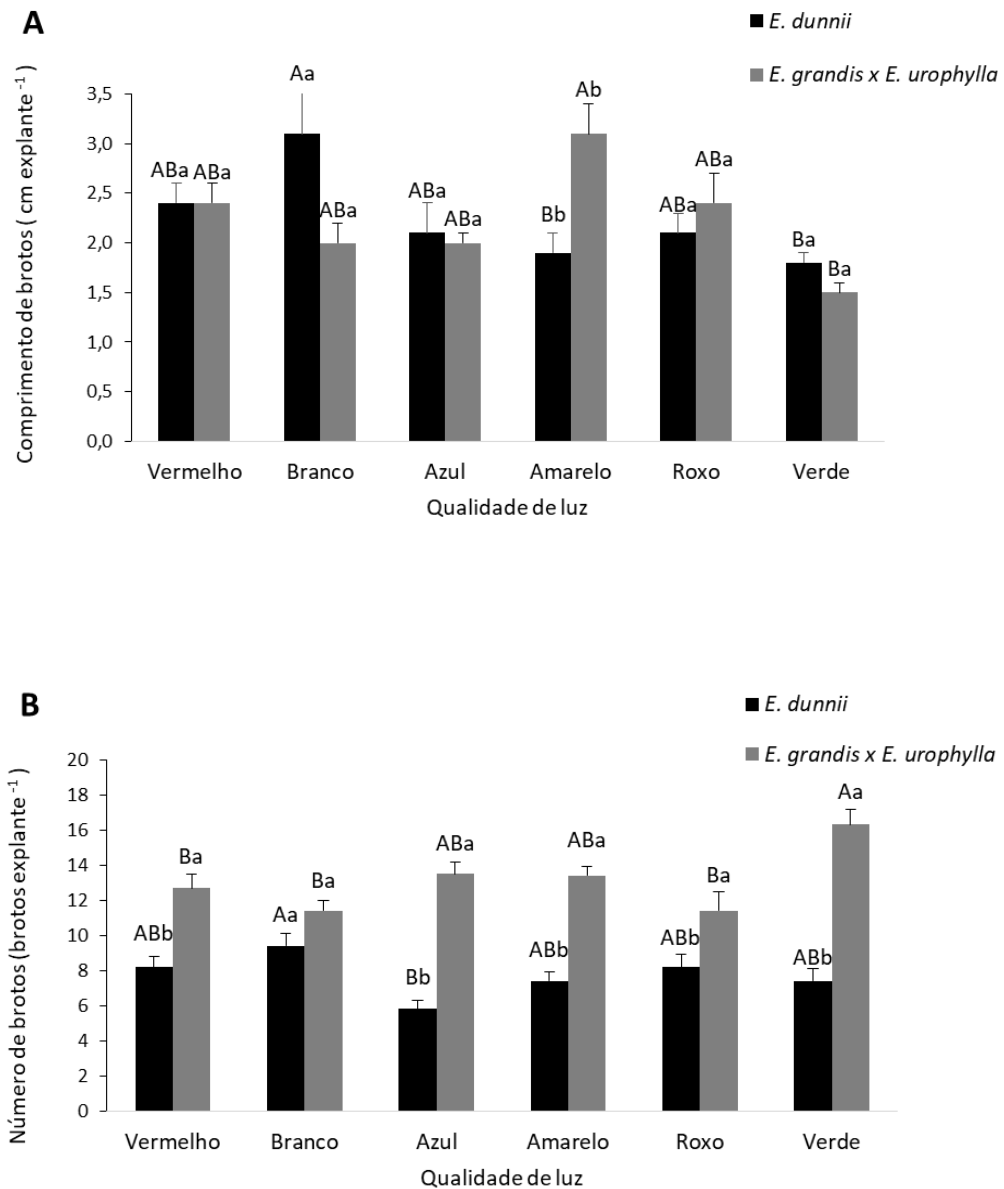
Causas da Variação	GL	Quadrados Médios		
		OXI <sup>(1)</sup> (%)	NB <sup>(1)</sup> (brotos explante <sup>-1</sup> )	CB <sup>(2)</sup> (cm explante <sup>-1</sup> )
Espécie (SP)	1	1,0 <sup>**</sup>	26,00 <sup>**</sup>	0,000005 <sup>ns</sup>
Espectro de luz (EL)	5	0,07 <sup>ns</sup>	0,31 <sup>ns</sup>	0,05 <sup>**</sup>
SP*EL	5	0,1 <sup>ns</sup>	1,04 <sup>**</sup>	0,05 <sup>**</sup>
Resíduo	132	0,06	0,15	0,01
Total	143	-	-	-
Média Real	-	0,53	10,45	2,25
CV <sub>exp</sub> (%)	-	24,7	12,41	15,84

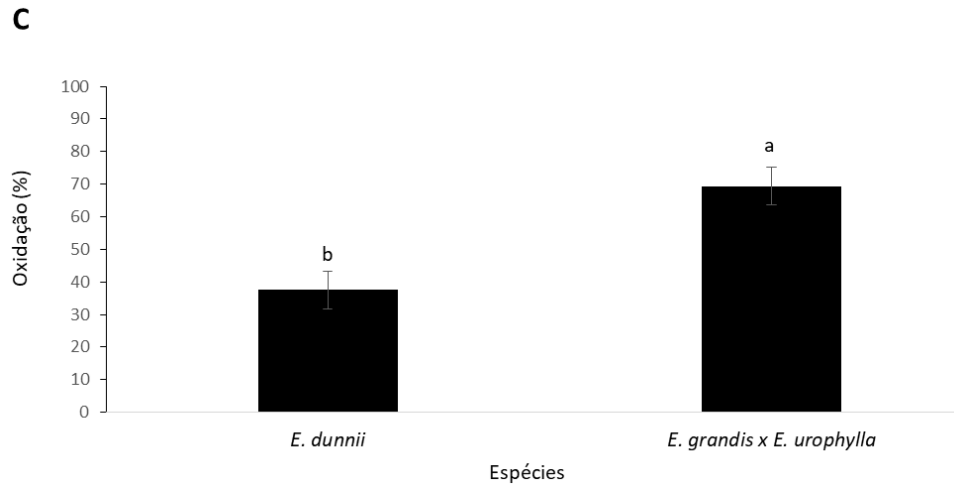
<sup>ns</sup> Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. \* e \*\* Valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F. <sup>(1)</sup> Dados transformados por  $\sqrt{x}$ , onde  $x$  = dado amostrado. <sup>(2)</sup> Dados transformados por  $1/\sqrt{y}$ , onde  $y$  = dado amostrado. GL = graus de liberdade. CV<sub>exp</sub> = coeficiente de variação experimental.

Fonte: Do autor (2023).

A variável resposta de comprimento de brotos apresentou efeito dos tratamentos nas duas espécies analisadas, sendo as maiores médias observadas no comprimento de luz branco fluorescente para o *E. dunnii* (3,10 cm) e no comprimento de luz amarelo para o eucalipto urograndis (3,1 cm), entretanto não houve variação significativa entre as espécies dentro do mesmo tratamento (FIGURA 7A). Para a variável número de brotos, os efeitos dos tratamentos mostraram-se mais significativo na luz branca para o *E. dunnii* e na luz verde para o eucalipto urograndis, apresentando médias de 9,4 brotos/explante e 16,3 brotos/explante, respectivamente (FIGURA 7B). Em relação à porcentagem de oxidação dos explantes, as duas espécies não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (luz), apenas foi possível observar uma média geral maior de oxidação no eucalipto urograndis (69,4%) comparado ao *E. dunnii* (37,5%) (FIGURA 7C).

Figura 7 – Características observadas no alongamento *in vitro* de *E. dunnii* e do híbrido eucalipto urograndis. (A) Comprimento de brotos; (B) Número de brotos e (C) Porcentagem de oxidação. Médias seguidas por mesma letra maiúscula para o efeito dos tratamentos (luz) na espécie e, médias seguidas por mesma letra minúscula para o efeito entre as espécies no mesmo tratamento (luz) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média  $\pm$  erro padrão.





Fonte: Do autor (2023).

Ainda nesta etapa de alongamento *in vitro* foi observado pela análise de variância que houve interação significativa ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ) do fator espécie e do fator interação de espécie e espectros de luz quanto à clorofila *a* (CLOA *a*), clorofila *b* (CLO *b*), clorofila total (CLO total) e carotenoides (CARO), apenas não existindo efeito significativo do fator espectro de luz (TABELA 4).

Tabela 4 – Resumo da análise de variância para a concentração média de clorofila *a* (CLOA *a*), clorofila *b* (CLO *b*), clorofila total (CLO total) e carotenoides (CARO) em massa fresca de folhas de explantes de *Eucalyptus dunnii* e eucalipto urograndis sob os diferentes espectros de luz na fase de alongamento *in vitro*, aos 35 dias.

Causas da variação	GL	Quadrados Médios (mg g <sup>-1</sup> de MF)			
		CLO <i>a</i>	CLO <i>b</i>	CLO total	CARO
Espécie (SP)	1	0,04**	0,013**	0,113**	0,003**
Espectro de luz (EL)	5	0,005 <sup>ns</sup>	0,001 <sup>ns</sup>	0,012 <sup>ns</sup>	0,0001 <sup>ns</sup>
SP*EL	5	0,013*	0,002*	0,028*	0,0005*
Resíduo	24	0,003	0,0008	0,007	0,0001
Total	35	-	-	-	-
Média Real	-	0,31	0,17	0,49	0,07
CV <sub>exp</sub> (%)	-	19,7	16,12	17,93	17,66

<sup>ns</sup> Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. \* e \*\* Valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F. GL= grau de liberdade. CV<sub>exp</sub> = coeficiente de variação experimental.

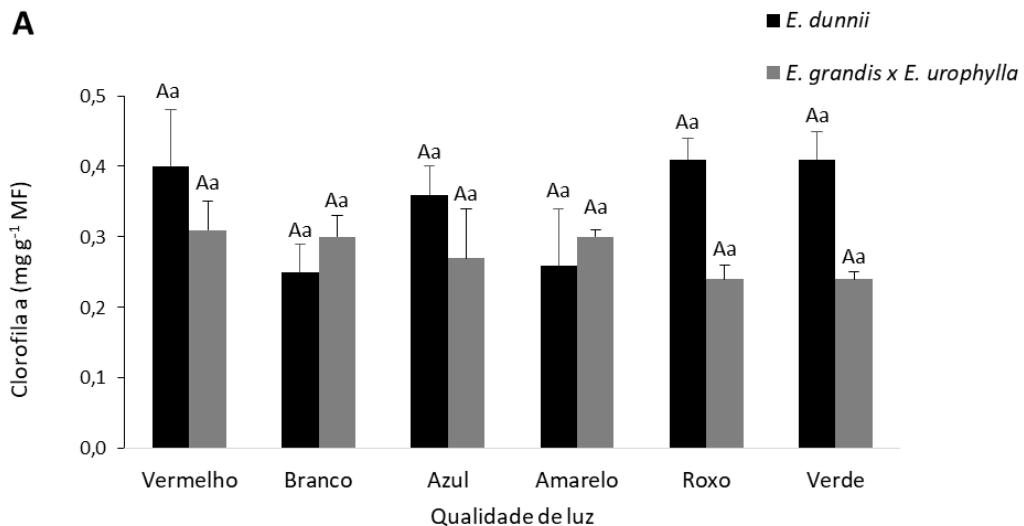
Fonte: Do autor (2023).

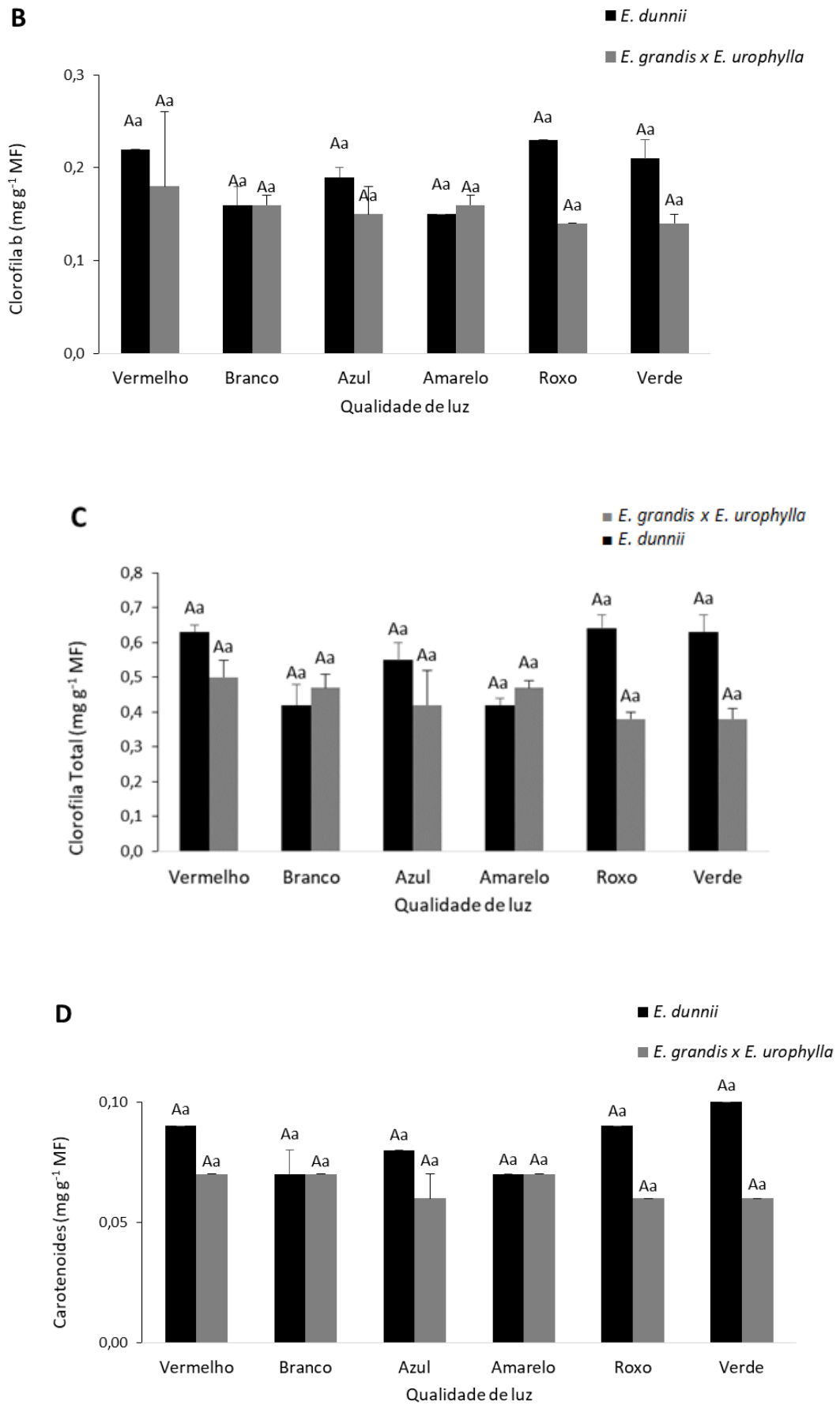
Os pigmentos fotossintéticos não diferiram estatisticamente para nenhuma das espécies estudadas quando foram conduzidos sob os diferentes espectros de luz na fase de alongamento *in vitro*.

Entretanto, o maior acúmulo médio de pigmentos como uma resposta fisiológica do híbrido urograndis foi observada no espectro de luz vermelho, exceto para os carotenoides o qual demonstrou esta mesma tendência nas luzes branca e amarela. Já as menores médias de concentrações de pigmentos foram observadas sob os espectros de luz roxo, verde e azul, sendo este último apenas para os carotenoides (FIGURA 8 A e D).

Para o *E. dunnii*, as respostas acumulativas dos pigmentos com médias superiores ocorreram sob espectro de luz roxo e verde, e as menores sob espectro de luz branco e amarelo (FIGURA 8 A e D).

Figura 8 – Concentração de pigmentos fotossintéticos de *E. dunnii* e eucalipto urograndis na fase de alongamento *in vitro*. (A) Clorofila *a*; (B) Clorofila *b*; (C) Clorofila total e (D) Carotenoides. Médias seguidas por mesma letra maiúscula para o efeito dos tratamentos (luz) na espécie e, médias seguidas por mesma letra minúscula para o efeito entre as espécies no mesmo tratamento (luz) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média  $\pm$  erro padrão.



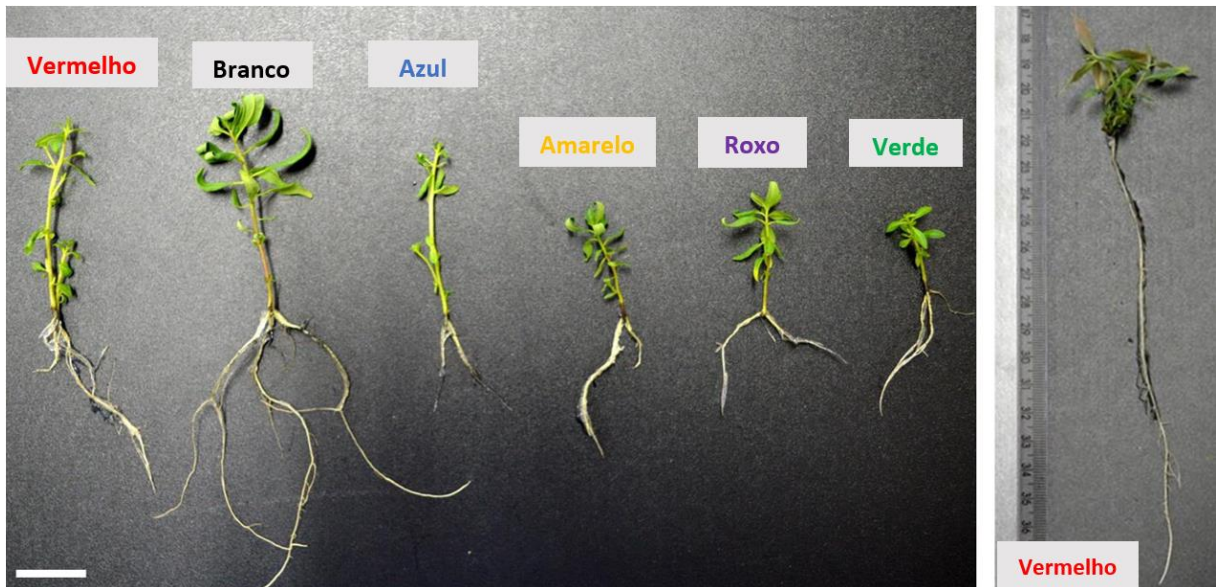


Fonte: Do autor (2023).

### 4.3 Fase de enraizamento *in vitro*

Tanto a formação, quanto a quantidade e o comprimento de raízes adventícias são parâmetros importantes que refletem posteriormente na sobrevivência das plântulas cultivadas *in vitro*. Neste trabalho, essas características foram avaliadas sob as diferentes qualidades de luz e observou-se que a resposta de cada uma delas variaram entre as espécies estudadas (FIGURA 9).

Figura 9 – Plântulas de eucalipto *urograndis* (esquerda) enraizadas sob os diferentes espectros de luz e única plântula de *E. dunnii* (direita) enraizada no espectro de luz vermelho, ambas cultivadas *in vitro* aos 35 dias em meio de enraizamento. Barra= 1 cm.



Fonte: Do autor (2023).

Nesta etapa de enraizamento *in vitro*, foi possível observar pela análise de variância que houve interação ( $p < 0,01$ ) entre os fatores testados quanto à porcentagem de sobrevivência (SOB) dos explantes. No entanto, as variáveis de porcentagem de enraizamento (ENR) e o número de raiz (NR) por explante apenas variaram significativamente ( $p < 0,01$ ) quanto ao fator espécie, não existindo efeito dos espectros de luz. Por sua vez, o comprimento de raiz (CR) dos explantes apresentaram uma variação significativa ( $p < 0,01$ ) quanto ao fator espécie e o espectro de luz (TABELA 5).

Tabela 5 – Resumo da análise de variância para a porcentagem média de sobrevivência (SOB) e enraizamento (ENR), número médio de raiz (NR) e comprimento de raiz (CR) em explantes de *Eucalyptus dunnii* e o eucalipto urograndis sob os diferentes espectros de luz na fase de enraizamento *in vitro*, aos 35 dias.

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios			
		SOB <sup>(1)</sup> (%)	ENR <sup>(2)</sup> (%)	NR <sup>(3)</sup> (raiz explante <sup>-1</sup> )	CR <sup>(3)</sup> (cm explante <sup>-1</sup> )
Espécie (SP)	1	3,75**	220,4**	0,03**	0,08**
Espectro de luz (L)	5	1,11**	0,06 <sup>ns</sup>	0,00006 <sup>ns</sup>	0,0004**
SP*EL	5	1,11**	0,14 <sup>ns</sup>	0,00004 <sup>ns</sup>	0,0003 <sup>ns</sup>
Resíduo	228	0,2	0,08	0,00004	0,0001
Total	239	-	-	-	-
Média Real	-	93,75	50,42	1,25	2,08
CV <sub>exp</sub> (%)	-	20,05	22,70	0,68	1,28

<sup>ns</sup> Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. \* e \*\* Valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F. <sup>(1)</sup> Dados transformados por  $y^2$ , onde  $y$  = dado amostrado. <sup>(2)</sup> Dados transformados por  $\ln y$  onde  $y$  = dado amostrado. <sup>(3)</sup> Dados transformados por  $1/\sqrt{y}$  onde  $y$  = dado amostrado. GL = graus de liberdade. CV<sub>exp</sub> = coeficiente de variação experimental.

Fonte: Do autor (2023).

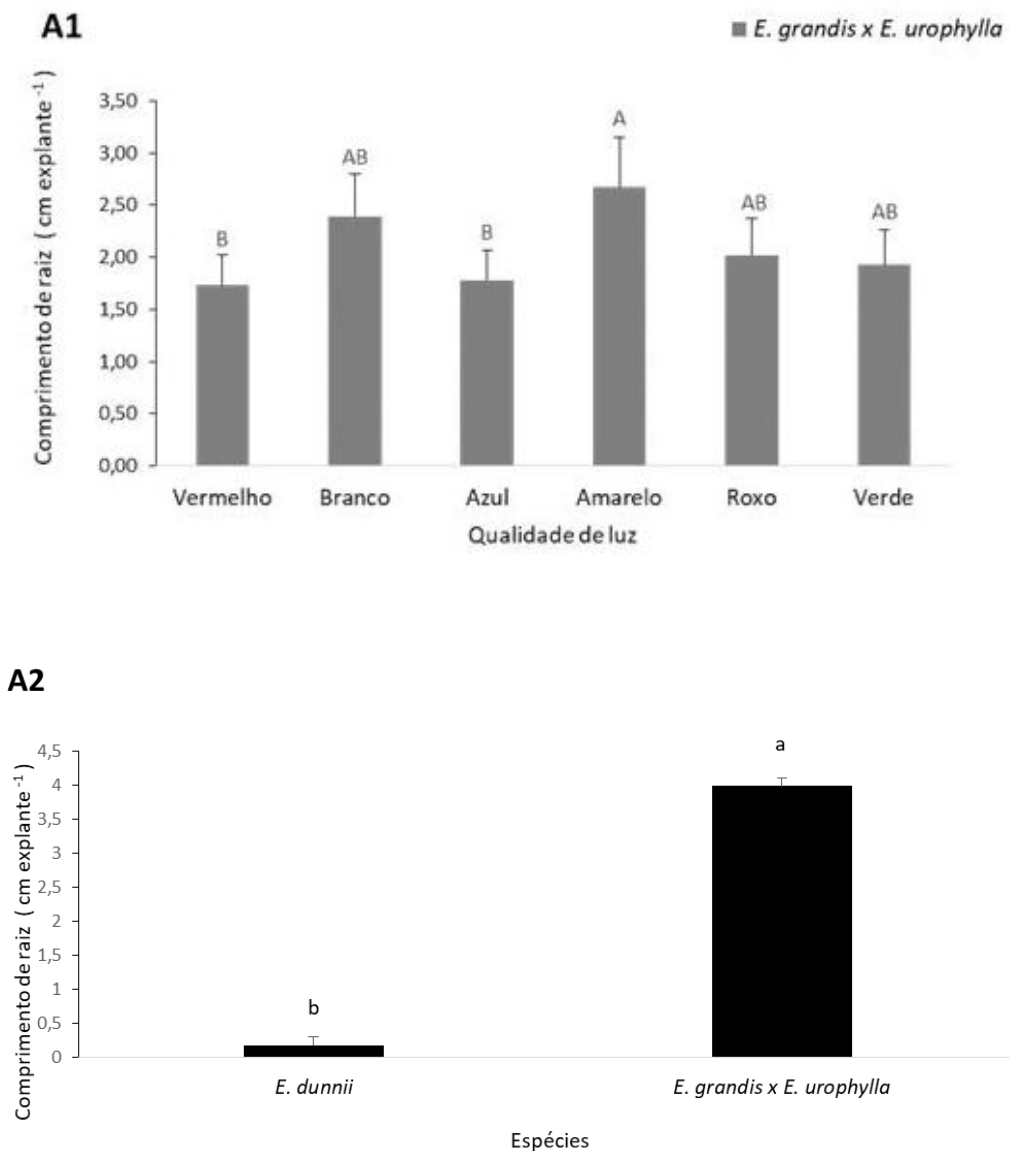
Os tratamentos de espectro de luz demonstraram ter diferença estatística para o comprimento de raiz do eucalipto urograndis, onde observou-se a maior média dos comprimentos sob o espectro amarelo (2,67 cm) (FIGURA 10 A1). Entre as espécies, esta mesma variável também apresentou diferença significativa, onde o eucalipto urograndis obteve uma média de 3,98 cm e o *E. dunnii* uma média de 0,18 cm (FIGURA 10 A2).

A porcentagem de sobrevivência dos explantes não apresentou diferença significativa entre os tratamentos testados, com exceção para o *E. dunnii* o qual sob o espectro de luz roxo apresentou uma menor sobrevivência (55%) (FIGURA 10B).

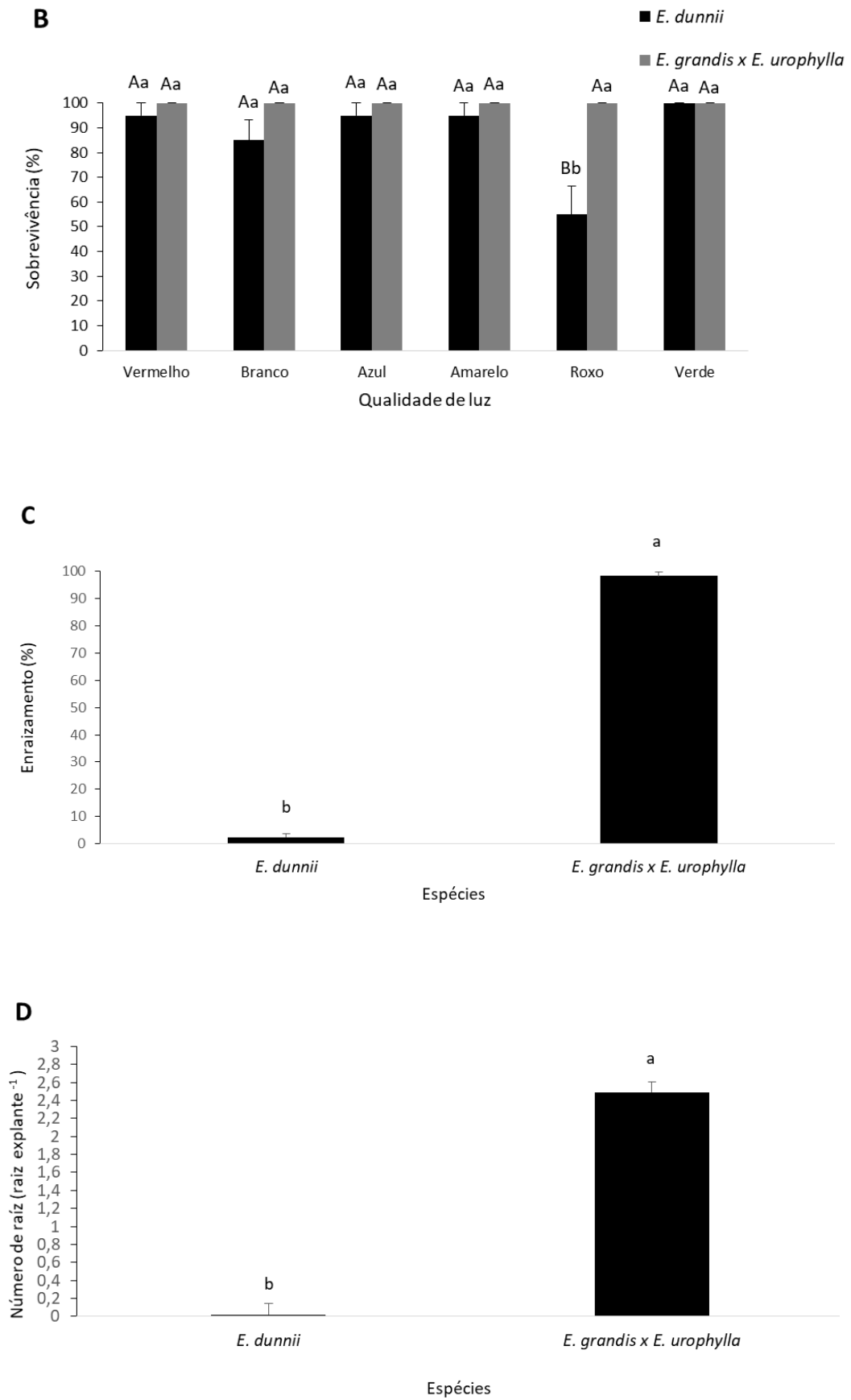
Além disso, os explantes de *E. dunnii* não enraizaram independente da qualidade de luz, ocorrendo formação de calos e oxidação na base dos explantes. Apenas três plântulas do experimento com essa espécie emitiram raiz, não sendo possível avaliar um efeito significativo dos tratamentos de luz nos fatores porcentagem de enraizamento e número de raiz.

Já para o eucalipto urograndis foi possível avaliar as respostas desses fatores, pois observou-se uma média de 95% de enraizamento em todo o experimento (Figura 10C) e uma média de 2,5 no número de raízes por explante (Figura 10D), porém não havendo diferença entre os tratamentos de luz testados.

Figura 10 – Características observadas no enraizamento *in vitro* de *E. dunnii* e do híbrido eucalipto urograndis. (A1 e A2) Comprimento de raiz; (B) Porcentagem de sobrevivência; (C) Porcentagem de enraizamento e (D) Número de raiz por explante. Médias seguidas por mesma letra maiúscula para a mesma espécie entre as qualidades de luz e, médias seguidas por mesma letra minúscula para a mesma qualidade de luz entre as espécies não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média  $\pm$  erro padrão.







Fonte: Do autor (2023).

Com relação aos pigmentos fotossintéticos, na etapa de enraizamento *in vitro* foi observado pela análise de variância que houve interação entre o fator espécie ( $p < 0,01$ ) e o fator espectro de luz ( $p < 0,05$ ) quanto à clorofila *a* (CLO *a*) e clorofila total (CLO total) e houve também interação do fator espécie×espectro luz para a clorofila *b* (CLO *b*). Apenas para o pigmento carotenoide (CARO) não foi observado efeito significativo dos fatores (TABELA 6).

Tabela 6 – Resumo da análise de variância para a concentração média de clorofila *a* (CLO *a*), clorofila *b* (CLO *b*), clorofila total (CLO total) e carotenoides (CARO) em massa fresca de folhas de explantes de *Eucalyptus dunnii* e eucalipto urograndis sob os diferentes espectros de luz na fase de enraizamento *in vitro*, aos 35 dias.

Causas da variação	GL	Quadrados Médios (mg g <sup>-1</sup> de MF)			
		CLO <i>a</i>	CLO <i>b</i>	CLO total	CARO
Espécie (SP)	1	0,04**	0,0001 <sup>ns</sup>	0,04*	0,00002 <sup>ns</sup>
Espectro de luz (EL)	5	0,01*	0,002 <sup>ns</sup>	0,02*	0,0008 <sup>ns</sup>
SP*EL	5	0,009 <sup>ns</sup>	0,003*	0,02 <sup>ns</sup>	0,0004 <sup>ns</sup>
Resíduo	24	0,004	0,001	0,009	0,0003
Total	35	-	-	-	-
Média Real	-	0,38	0,14	0,53	0,10
CV <sub>exp</sub> (%)	-	16,58	23,84	18,09	17,56

<sup>ns</sup> Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste F. \* e \*\* Valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste F. GL= graus de liberdade. CV<sub>exp</sub> = coeficiente de variação experimental.

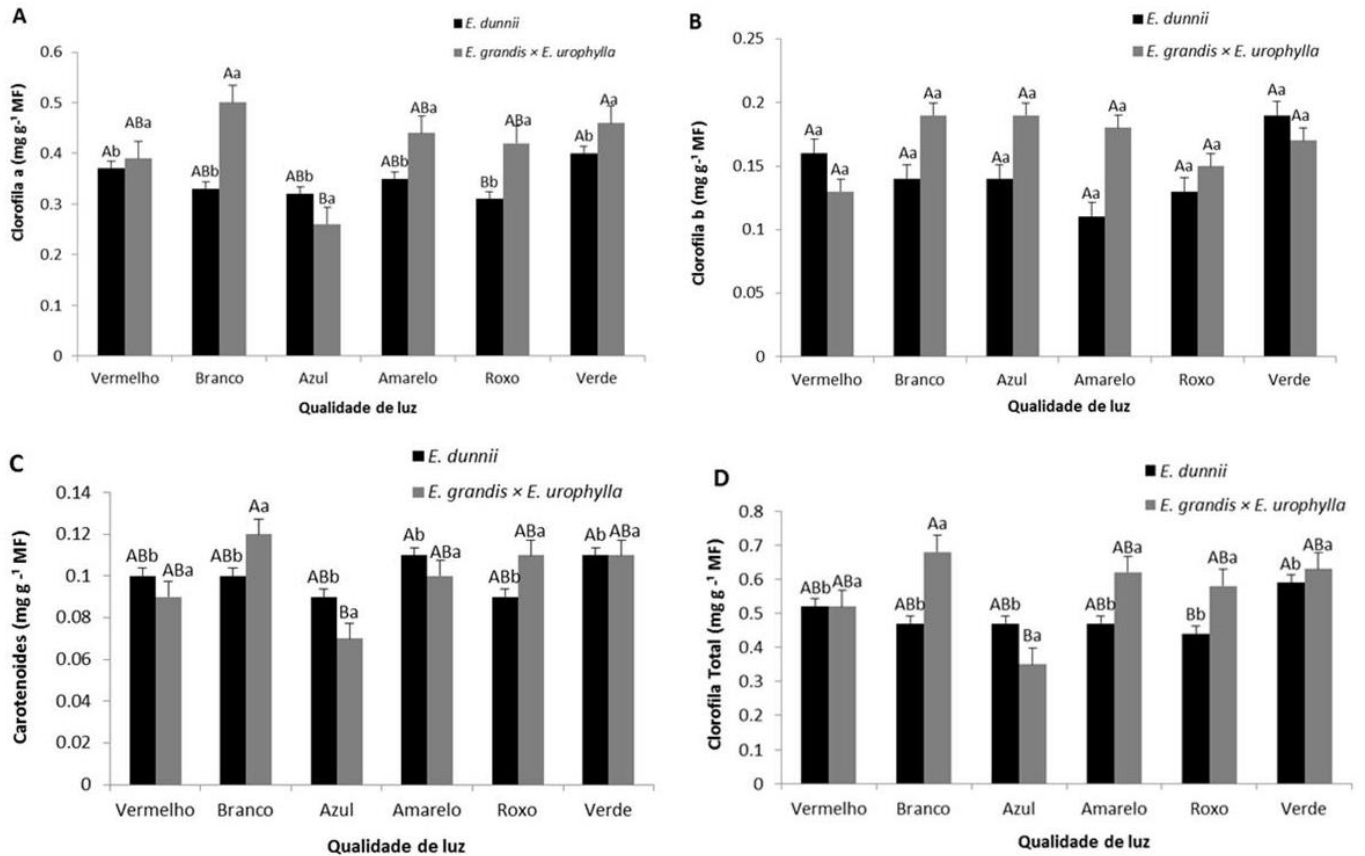
Fonte: Do autor (2023).

Tanto as plântulas de *E. dunnii* quanto as de eucalipto urograndis apresentaram diferenças estatísticas nas concentrações dos pigmentos fotossintéticos analisados sob os tratamentos de qualidade de luz, com exceção do pigmento clorofila *b* o qual não demonstrou diferenças entre os tratamentos e entre as espécies (FIGURA 11).

No eucalipto urograndis as menores concentração médias dos demais pigmentos em geral foram observadas quando o explante era exposto ao espectro de luz azul e as maiores no espectro de luz branca, já no *E. dunnii* estes efeitos de baixa e alta concentração de pigmentos foi observado nos tratamentos de luz roxo e verde, respectivamente (FIGURA 11).

E entre os materiais genéticos estudados, exceto na clorofila *b*, o eucalipto urograndis foi o que apresentou superioridade das médias para todos os pigmentos fotossintéticos.

Figura 11 – Concentração de pigmentos fotossintéticos de *E. dunnii* e eucalipto urograndis na fase de enraizamento *in vitro*. (A) Clorofila a; (B) Clorofila b; (C) Carotenoides; (D) Clorofila total. Médias seguidas por mesma letra maiúscula para a mesma espécie entre as qualidades de luz e médias seguidas por mesma letra minúscula para a mesma qualidade de luz entre as espécies não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média  $\pm$  erro padrão.



Fonte: Do autor (2023).

#### 4.4 Análise histológica

Na análise histológica foi observado que houve interação ( $p < 0,01$ ) entre o fator espectros de luz e os tecidos foliares analisados, tamanho e densidade dos estômatos. Não houve interação significativa quanto ao fator espécie (TABELA 7).

Tabela 7 – Resumo da análise de variância para a espessura dos tecidos foliares da epiderme adaxial (EAD), epiderme abaxial (EAB), parênquima paliçádico (PP), parênquima lacunoso (PL), limbo total (LT), nervura central (NC), diâmetro equatorial (DE) e diâmetro polar (DP) dos estômatos de *Eucalyptus dunnii* e eucalipto urograndis sob os diferentes espectros de luz após a fase de enraizamento *in vitro*.

Causa da Variação	GL	Quadrados Médios ( $\mu\text{m}$ )				
		EAD	EAB	PP	PL	
Espécie (SP)	1	5,61*	13,64*	309,23**	1494,1**	
Espectro de luz (L)	5	2,17 <sup>ns</sup>	3,69 <sup>ns</sup>	18,58 <sup>ns</sup>	101,27 <sup>ns</sup>	
SP*EL	5	2,20 <sup>ns</sup>	2,59 <sup>ns</sup>	52,60**	64,13 <sup>ns</sup>	
Resíduo	24	0,85	2,43	11,02	46,91	
Total	35	-	-	-	-	
Média Real	-	11,6	10,1	33,5	58,2	
CV <sub>exp</sub> (%)	-	8,0	15,5	9,9	11,7	
	GL	LT	NC	DE	DP	
Espécie (SP)	1	4339,30**	712,53 <sup>ns</sup>	0,688 <sup>ns</sup>	8,22 <sup>ns</sup>	
Espectro de luz (L)	5	225,08 <sup>ns</sup>	1892,48**	1,931 <sup>ns</sup>	2,94 <sup>ns</sup>	
SP*EL	5	153,58 <sup>ns</sup>	2102,83**	1,824 <sup>ns</sup>	8,97**	
Resíduo	24	127,24	346,72	0,809	2,00	
Total	35	-	-	-	-	
Média Real	-	111,0	215,5	5,4	11,5	
CV <sub>exp</sub> (%)	-	10,2	8,6	16,7	12,3	

<sup>ns</sup> Valor não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey. \* e \*\* Valor significativo ao nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente pelo teste de Tukey. GL= grau de liberdade. CV<sub>exp</sub> = coeficiente de variação experimental.

Fonte: Do autor (2023).

Os tratamentos com diferentes espectros de luz mostraram ter efeito significativo sobre a espessura de todos os tecidos anatômicos das espécies estudadas.

Em *E. dunnii* exposto a luz vermelha o tecido do parênquima lacunoso, o diâmetro equatorial dos estômatos e a densidade estomática apresentaram as maiores médias. Sob a luz amarela, os tecidos do parênquima paliçádico, a nervura central e o diâmetro polar dos estômatos apresentam médias superiores. E em luz roxa o tecido da epiderme abaxial e o limbo foliar total apresentaram-se maiores (TABELA 8).

Em eucalipto urograndis, as maiores médias dos tecidos da epiderme adaxial, parênquima lacunoso, nervura central, diâmetro polar e equatorial dos estômatos foram observadas no espectro roxo. Os tecidos da epiderme abaxial e a densidade estomática

mostraram-se maiores sob a luz amarela, e os tecidos do parênquima paliçádico e limbo foliar total foram superiores em condições de luz verde (TABELA 8).

Tabela 8 – Espessura média dos tecidos foliares e densidade estomática de *E. dunnii* e o híbrido de *E. grandis* × *E. urophylla* cultivados *in vitro*. Epiderme adaxial (ED); Epiderme abaxial (EB); Parênquima paliçádico (PP), Parênquima lacunoso (PL); Limbo total (LT); Nervura central (NC); Diâmetro polar (DP); Diâmetro Equatorial (DE) e Densidade estomática (DEST).

Espectro de luz (nm)	Espessura do tecido foliar (µm) - <i>E. dunnii</i>								
	ED	EB	PP	PL	LT	NC	DP	DE	DEST (mm <sup>2</sup> )
Vermelho	11,23±0,00 f	9,47± 0,00 e	32,16± 0,00 e	73,57± 0,00 a	122,14± 0,00 d	177,87± 0,00 e	10,97± 0,00 c	6,37± 0,00 a	1044,75± 0,00 a
Branco	13,27± 0,00 a	10,40± 0,00 d	36,47± 0,00 d	54,46± 0,00 f	109,91± 0,00 f	238,07± 0,00 b	8,40± 0,00 f	4,60± 0,00 f	1032,80± 0,00 b
Azul	11,70± 0,00 c	9,40±0,00 f	37,99± 0,00 c	69,80± 0,00 b	130,86± 0,00 b	204,75± 0,00 d	10,26± 0,00 e	4,89± 0,00 d	814,48± 0,00 d
Amarelo	11,62± 0,00 d	10,44± 0,00 c	41,65± 0,00 a	64,06± 0,00 c	123,18± 0,00 c	256,24± 0,00 a	13,00± 0,00 a	5,34± 0,00 c	513,46± 0,00 e
Roxo	12,66± 0,00 b	13,11± 0,00 a	40,00± 0,00 b	63,62± 0,00 d	133,24± 0,00 a	216,53± 0,00 c	10,68± 0,00 d	4,64± 0,00 e	844,80± 0,00 c
Verde	11,38± 0,00 e	11,29± 0,00 b	30,43± 0,00 f	63,25± 0,00 e	112,55± 0,00 e	172,81± 0,00 f	12,82± 0,00 b	5,62± 0,00 b	390,09± 0,00 f

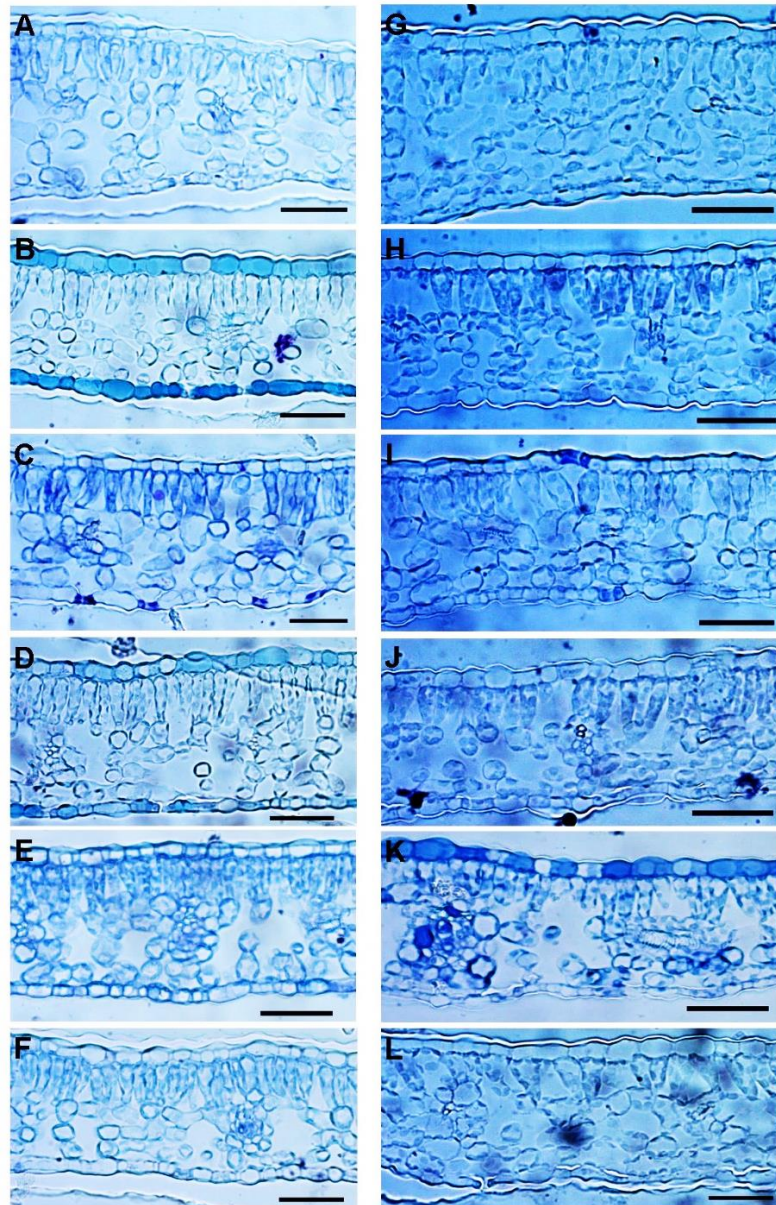
Espectro de luz (nm)	Espessura do tecido foliar (µm) – <i>E. grandis</i> × <i>E. urophylla</i>								
	ED	EB	PP	PL	LT	NC	DP	DE	DEST (mm <sup>2</sup> )
Vermelho	10,06±0,00 f	8,64±0,00 f	29,32±0,00 e	53,62±0,00 b	97,10±0,00 d	219,62±0,00 d	12,34±0,00 c	6,25±0,00 b	626,20±0,00 f
Branco	10,36±0,00 e	9,54±0,00 d	29,97±0,00 d	49,25±0,00 e	94,43±0,00 e	228,03±0,00 c	12,03±0,00 d	5,71±0,00 d	1367,73±0,00 b
Azul	10,80±0,00 d	9,56±0,00 b	30,41±0,00 c	50,74±0,00 d	99,73±0,00 c	232,51±0,00 b	12,73±0,00 b	4,57±0,00 e	886,84±0,00 c
Amarelo	11,87±0,00 b	10,00±0,00 a	28,40±0,00 f	46,99±0,00 f	93,88±0,00 f	197,67±0,00 f	11,64±0,00 e	5,90±0,00 c	1396,45±0,00 a
Roxo	12,22±0,00 a	9,55±0,00 c	30,95±0,00 b	56,35±0,00 a	106,95±0,00 b	237,22±0,00 a	12,99±0,00 a	6,40±0,00 a	763,71±0,00 e
Verde	11,80±0,00 c	9,43±0,00 e	34,47±0,00 a	53,34±0,00 c	108,03±0,00 a	204,60±0,00 e	10,15±0,00 f	4,28±0,00 f	784,37±0,00 d

Médias seguidas por mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade de erro. Dados apresentados como: média± erro padrão.

Fonte: Do autor (2023).

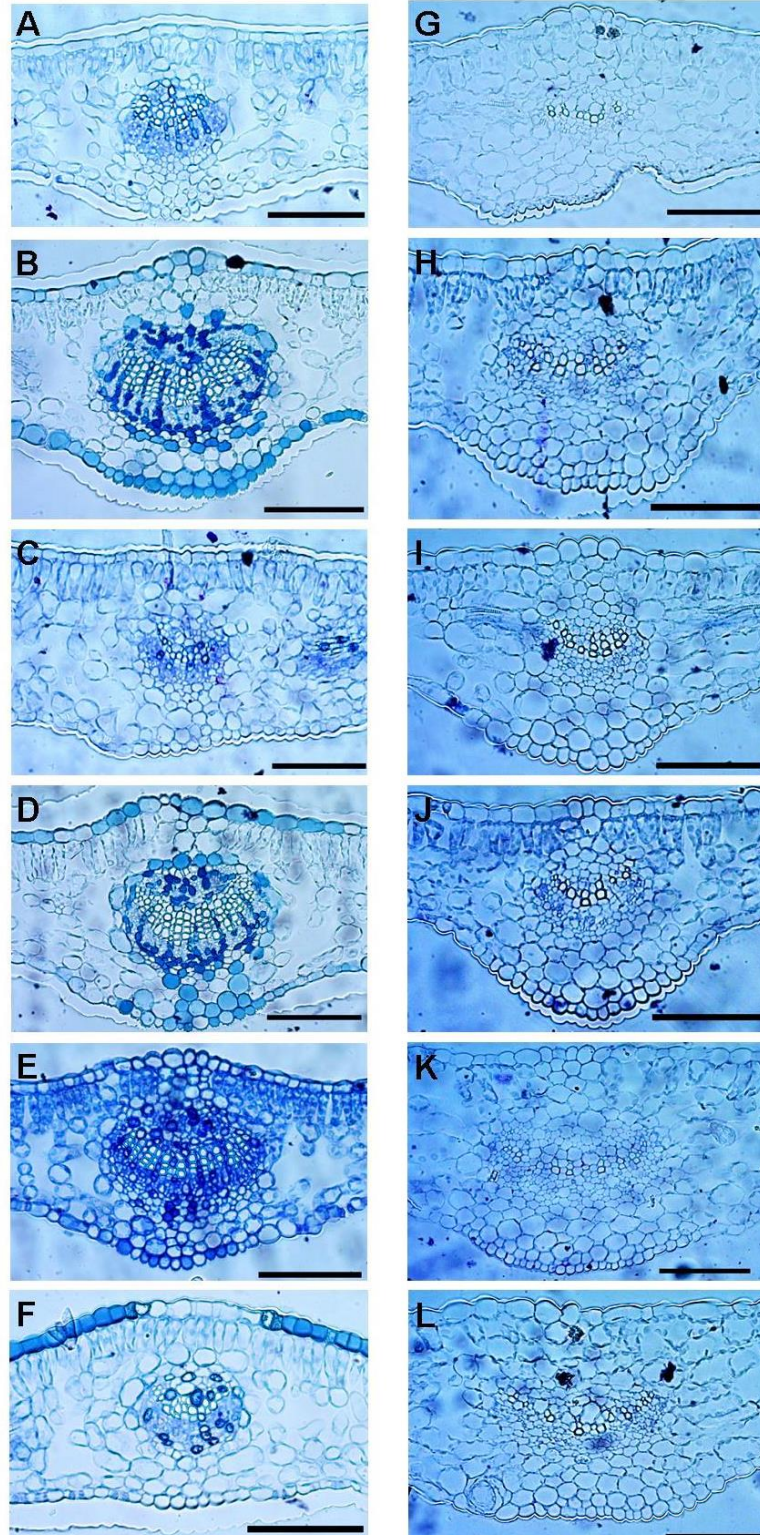
Nas análises anatômicas das plântulas de *E. dunnii* e eucalipto urograndis no final do experimento, pode-se observar uma disposição diferenciada dos tecidos foliares (Figura 12 e 13) e dos estômatos (Figura 14) e variações na espessura da epiderme adaxial e abaxial, do parênquima paliçádico e lacunoso, do limbo total, da nervura central e também dos estômatos e sua densidade foram estatisticamente diferentes quando condicionadas as diferentes qualidades de luz.

Figura 12 – Secções transversais da lâmina foliar de plântulas de *E. dunnii* (A-F) e eucalipto urograndis (G-L) submetidas a qualidade de luz vermelha (A, G); branco (B, H), azul (C-I), amarelo (D-J), roxo (E-K) e verde (F-L). As imagens estão na mesma ampliação. Barra = 50  $\mu$ m.



Fonte: Do autor (2023).

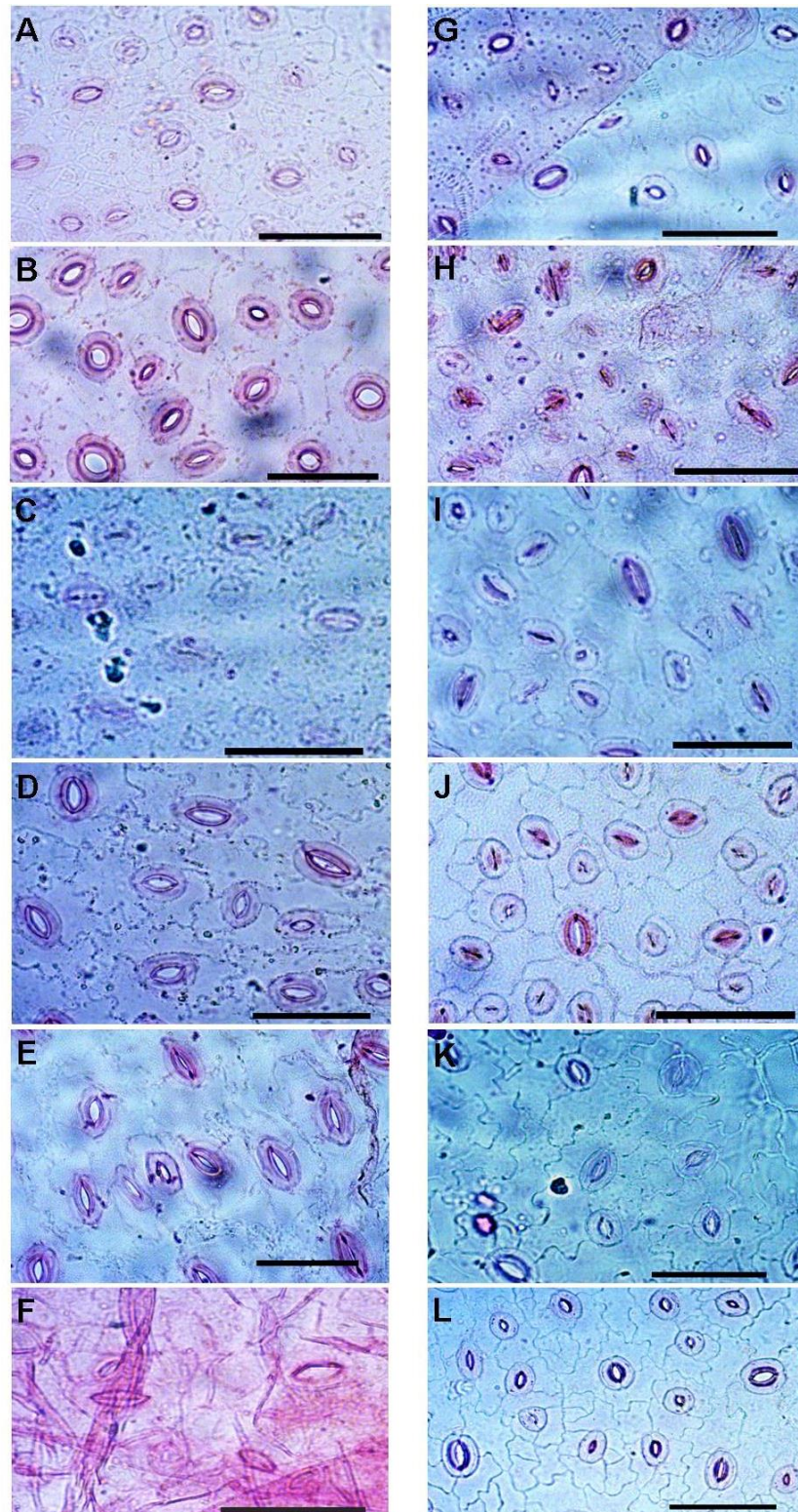
Figura 13 – Secções transversais da nervura central de plântulas de *E. dunnii* (A-F) e eucalipto urograndis (G-L) submetidas a qualidade de luz vermelha (A, G); branco (B, H), azul (C-I), amarelo (D-J), roxo (E-K) e verde (F-L). As imagens estão na mesma ampliação. Barra = 50  $\mu$ m.



Fonte: Do autor (2023).



Figura 14 – Superfícies da face abaxiais da epiderme de folhas de plântulas de *E. dunnii* (A-F) e eucalipto urograndis (G-L) submetidas a qualidade de luz vermelha (A, G); branco (B, H), azul (C-I), amarelo (D-J), roxo (E-K) e verde (F-L). As imagens estão na mesma ampliação. Barra = 50  $\mu$ m.



Fonte: Do autor (2023).

## 5 DISCUSSÃO

Os autores que avaliaram as respostas fotomorfogênicas em diferentes condições de qualidade de luz no cultivo *in vitro* de algumas espécies agrícolas e arbóreas observaram resultados variados como os encontrados no presente estudo.

Como no trabalho de Singh *et al.* (2017), com acerola (*Acer saccharum* Marsh.) cultivada *in vitro*, utilizando lâmpadas fluorescentes branca a  $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  não apresentou efeito significativo no número de brotos ou no comprimento, e houve uma redução no conteúdo de clorofila induzido pela qualidade de luz.

Na pesquisa feita por Sánchez-Sánchez *et al.* (2018), avaliando diferentes cultivares de limão (*Limonium sinuatum*) *in vitro*, observaram que o tratamento com lâmpadas fluorescentes claras não resultou em diferenças significativas na multiplicação de brotos, porém o crescimento e os níveis de pigmentos (clorofilas e carotenoides) mostraram variações entre as cultivares, indicando que as mesmas foram capazes de ajustar seu metabolismo em resposta às diferenças na qualidade de luz.

Os resultados do presente estudo colaboram com os trabalhos citados anteriormente, onde o tratamento com espectro de luz branco da lâmpada fluorescente também não promoveu diferenças significativas no número de brotos e uma redução no conteúdo de clorofila para o eucalipto urograndis na fase de multiplicação, porém na fase de alongamento apresentou os maiores valores de comprimento e número de brotos e uma redução no conteúdo de clorofila para o *E. dunnii*.

Por outro lado, Ramírez-Mosqueda *et al.* (2017), avaliaram as repostas *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni sob diferentes comprimentos de onda com LEDs e observaram que a propagação de brotos foi maior com lâmpadas LEDs vermelho em comparação com a luz fluorescente branca, embora os explantes tenham tido um comprimento menor. Com LEDs vermelho e azul (1:1), os autores obtiveram o alongamento máximo da parte aérea e durante o enraizamento, os LEDs não melhoraram o enraizamento das brotações, mas aumentaram o teor de pigmentos fotossintéticos. No presente estudo, corroborando com estes resultados para os pigmentos, também foi observado um aumento do teor de clorofilas sob luz vermelha, azul e roxa, o que demonstra certa similaridade com a luz LED vermelho e azul (1:1) utilizada pelos autores.

Também utilizando como fonte de luz os LEDs, Souza (2018) observou os melhores resultados das características analisadas na fase de multiplicação, alongamento e

enraizamento *in vitro* de clones híbridos de *Corymbia torelliana* × *C. citriodora* e *Corymbia citriodora* × *C. torelliana* com o uso de LEDs vermelho e azul (1:1).

Similarmente ao sistema de filtros com celofane utilizado neste trabalho, Ruedell *et al.* (2013) observaram para *E. grandis* e *E. globulus* que não houve efeito da qualidade da radiação na indução do enraizamento adventício *in vitro* ou quando os tratamentos foram aplicados às plantasadoras de ambas as espécies. Os resultados do presente estudo colaboram com os de Ruedell *et al.* (2013), pois também não houve diferenças significativas na indução do enraizamento *in vitro* sob as diferentes luzes testadas, apenas o comprimento das raízes de eucalipto *urograndis* foram relativamente maiores em luz branca fluorescente.

O controle dessas respostas fotomorfogênicas nas plantas pode variar de acordo com a espécie, estágio de desenvolvimento, espectro de luz, fontes da luz, composição do meio de cultura e outros fatores (GUPTA; JATOTHU, 2013).

A aplicação de LEDs na micropropagação é uma alternativa interessante e econômica aos sistemas convencionais de iluminação fluorescente, e vem contribuindo para um progresso nos controles ambientais *in vitro*, pois esta fonte de luz permite ser personalizada para estimular a morfologia e a produtividade ideais das característica de interesse, além de eliminar os comprimentos de onda de luz que são inativos para a fotossíntese, causando maior eficiência no crescimento e desenvolvimento das plantas (GUPTA; JATOTHU, 2013; HUNG *et al.*, 2015).

A qualidade da luz desempenha um papel importante na fotossíntese, pois influencia a síntese de pigmentos, ou seja, a maneira pela qual a luz é absorvida pelos principais fotorreceptores como fitocromos para luz vermelha e criptocromos para luz azul (HERINGER *et al.*, 2017).

Vieira *et al.* (2015) atestaram em plântulas *in vitro* de *Musa acuminata* tratadas com LEDs branco e LEDs vermelho valores mais elevados dos teores de clorofila total, clorofila a e b em comparação com as lâmpadas fluorescentes.

Li *et al.* (2010) relataram que o teor de clorofila foliar em plântulas de algodão também variaram em resposta às diferentes qualidades de luz, apresentando o maior valor quando exposto ao LEDs azul.

Os resultados do presente trabalho também colaboram com os citados anteriormente, pois de maneira geral os espectros de luz azul, vermelho e roxo apresentaram os maiores teores de pigmentos entre as fases do cultivo *in vitro* analisadas e as duas espécies.

De fato, a eficiência de clorofilas e carotenoides na captura de fótons e transferência em energia pode ser específica para cada espécie e condição da qualidade de luz (ARENA *et al.*, 2016).

Como citados em trabalhos anteriores, também relatam que os comprimentos de onda na faixa do vermelho e azul melhoram as condições de crescimento dos explantes, a biossíntese de cloroplastos, a abertura estomática e até mesmo os aspectos anatômicos das plantas (SCHUERGER *et al.*, 1997; VIEIRA *et al.*, 2015).

Este efeito foi avaliado por Arena *et al.* (2016), onde verificaram a anatomia foliar de uma espécie herbácea (*Solanum lycopersicum* L.) e de uma arbórea (*Platanus orientalis* L.), ambas submetidas a três diferentes regimes de qualidade de luz *in vitro*: LEDs VVA (vermelho 33%, verde 33%, azul 33%), LEDs VA (vermelho 66%, azul 33%) e luz branca por lâmpadas fluorescentes. Os autores inferiram que o crescimento sob as diferentes luzes LED não alterou a estrutura geral da lâmina foliar em ambas as espécies, porém as folhas crescidas sob a luz LEDs VVA mostraram uma redução do volume dos espaços intercelulares do mesofilo e o tamanho dos estômatos foi significativamente maior sob a luz LED VA.

O presente trabalho demonstra resultados opostos, onde as duas espécies estudadas apresentaram maior espessura do parênquima lacunoso sob a luz vermelha (*E. dunnii*) e luz roxa (eucalipto urograndis), porém se assemelham a outros estudos quando observado as maiores médias dos tamanhos dos estômatos para o híbrido eucalipto urograndis no espectro de luz roxo, o qual é a combinação do espectro de luz vermelho + azul.

Vieira *et al.* (2015) também verificaram em suas pesquisas com mudas *in vitro* de *Musa acuminataum*, um maior número de estômatos na face abaxial para os tratamentos de iluminação com LED vermelho e branco, concordando com os resultados observados neste estudo que para o *E. dunnii* sob espectro de luz vermelho apresentou a maior média de densidade estomática.

Os estômatos são estruturas importantes que auxiliam as plantas a se ajustarem às mudanças ambientais, por meio do seu controle de aberturas das células-guarda, eles maximizam a homeostase das plantas modulando as trocas gasosas entre as células e o ambiente externo (ZEIGER, 1984). Esta característica faz dos estômatos uma peça central na sobrevivência de plantas cultivadas *in vitro* durante a fase de aclimatização, onde seria vantajoso ter a regulação da perda de água a fim de evitar desidratação instantânea, o menor tamanho dos estômatos, o que facilita na abertura e fechamento dos mesmos de forma mais rápida e a redução no volume dos espaços intercelulares, ou seja, a estrutura do mesofilo ser mais densa (DRA *et al.*, 2013).

Dessa forma, é possível aferir que a qualidade da luz fornecida para as plantas *in vitro* pode influenciar não somente na morfogênese, mas também nas características fisiológicas, como maior número estomático e maior teor de clorofila (WILKEN *et al.*, 2014).

A manipulação da qualidade da luz é uma ferramenta interessante para aplicações biotecnológicas destinadas a melhorar o desempenho fotossintético, a produtividade e maiores porcentagens de sobrevivência, em casa de vegetação e campo das plantas cultivadas *in vitro*.

Estudos adicionais ainda são necessários para obter uma avaliação mais específica para cada espécie, dos efeitos das diferentes combinações entre os espectros de luz e as várias fontes disponíveis, como os LEDs.

Portanto, o uso deste tipo de experimento com filtros de luz coloridos pode ser útil para melhorar o desenvolvimento de plantas *in vitro* e seus protocolos de micropropagação.

## 6 CONCLUSÃO

A qualidade de luz influenciou a fotomorfogênese *in vitro* de *Eucalyptus dunnii* e de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*.

Na fase de multiplicação *in vitro*, os espectros de luz branco e azul proporcionaram os melhores resultados fotomorfogênicos, como maior número de brotos (luz branca em *E. dunnii* e luz azul para eucalipto urograndis), baixa oxidação dos explantes (luz branca para ambas as espécies) e maior comprimento dos brotos (luz azul para ambas as espécies).

Na fase de alongamento *in vitro*, os espectros de luz branco, amarelo e azul proporcionaram os melhores resultados fotomorfogênicos, como maior comprimento dos brotos (luz fluorescente branca para *E. dunnii* e luz amarela para o híbrido) e reduzida oxidação dos explantes sob o espectro de luz azul. Apesar de a luz branca ter induzido os maiores brotos, essa também apresentou a maior média de oxidação.

Na fase de enraizamento *in vitro*, os espectros de luz branco e amarelo induziram um melhor desenvolvimento de raízes adventícias em eucalipto urograndis.

Os pigmentos fotossintéticos analisados também apresentaram maiores concentrações sob os tratamentos com luz branca fluorescente, filtro vermelho, azul, roxo e amarelo, havendo uma relação direta sobre o desenvolvimento morfológico dos explantes.

As análises histológicas permitiram verificar que houve modificações das células dos tecidos foliares entre as qualidades de luz testadas.

Beneficiando a aclimatização das plântulas cultivadas *in vitro*, tanto o tamanho dos estômatos quanto a densidade estomática no híbrido de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* apresentaram valores menores no tratamento com filtro de luz verde e vermelho, respectivamente. Em *Eucalyptus dunnii*, essas condições histológicas foram observadas em luz branca fluorescente e filtro de luz verde.

## REFERÊNCIAS

- ABBADE, L. C. *et al.* **Anatomia foliar de ipê-branco (*Tabebuia roseo alba* (Ridl.) Sand.)-Bignoniaceae, proveniente do cultivo *ex vitro* e *in vitro*.** *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 31, n. 3, p. 307-311, 2009.
- ABU-ABIÉD, M. *et al.* **Gene expression profiling in juvenile and mature cuttings of *Eucalyptus grandis* reveals their portance of microtubule remodeling during adventitious root formation.** *BMC Genomics*, v. 15, 826 p., 2014.
- AGÊNCIA BRASIL. Rio de Janeiro, 2 set. 2018. Disponível em: <<http://www.http://agenciabrasil.ebc.com.br>>. Acesso em: 04 fev. 2019.
- AGGARWAL, D. *et al.* **Factors affecting micropropagation and acclimatization of an elite clone of *Eucalyptus tereticornis* Sm.** *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, n. 48, p. 521-529, 2012.
- ALFENAS, A. C. *et al.* **Clonagem e doenças do eucalipto.** 442 p. Viçosa, MG: Editora UFV, 2004.
- ALI, M. N.; RAY, S. S. **Plant tissue culture as potential option in developing climate resilient spices.** A. B. Sharangi (ed.), *Indian Spices*, Mohanpur, cap. 15, p. 405-419, 2018.
- ALMEIDA, M. R. DE. *et al.* **Environmental control of adventitious rooting in *Eucalyptus* and *Populus* cuttings.** *Trees*, v. 31, p. 1377-1390, 2017.
- ANDRADE, G. C. *et al.* **Effects of phosphate fertilization and the application of cellulose residue on the growth of *Eucalyptus dunnii*.** *Boletim de Pesquisa Florestal*, Colombo, n. 47, p. 43-54, 2003.
- ANDRADE, A. M. D. *et al.* **Radiação fotossinteticamente ativa incidente e refletida acima e abaixo do dossel de floresta de Mata Atlântica em Coruripe, Alagoas.** *Revista Brasileira de Meteorologia*, São José dos Campos, v. 29, n. 1, p. 68-79, 2014.
- ARENA, C. *et al.* **The effect of light quality on growth, photosynthesis, leaf anatomy and volatile isoprenoids of a monoterpene-emitting herbaceous species (*Solanum lycopersicum* L.) and an isoprene-emitting tree (*Platanus orientalis* L.).** *Environmental and Experimental Botany*, v. 130, p. 122-132, 2016.
- BACCARIN, F. J. B.; BRONDANI, G. E., DE ALMEIDA, L. V. *et al.* **Vegetative rescue and cloning of *Eucalyptus benthamii* selected adult trees.** *New Forests*, v. 46, n. 4, p. 465-483, 2015.
- BARUPAL, M.; KATARIA, V.; SHEKHAWAT, N. S. ***In vitro* growth profile and comparative leaf anatomy of the C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate plant *Mollugo nudicaulis* Lam.** *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, v. 54, n. 6, p. 689-700, 2018.
- BASSOLINO, L. *et al.* **Tissue culture and aromatic profile in *Salvia dolomitica* Codd.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, v. 121, n. 1, p. 83-95, 2015.

- BATISTA, D. S. *et al.* **Light quality affects *in vitro* growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae).** *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, Wallingford, 2016.
- BATISTA, D. S. *et al.* **Light quality in plant tissue culture: does it matter?** *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, v. 54, p. 195-215, 2018.
- BENNETT, I. J.; MCDAVID, D. A. J.; MCCOMB, J. A. **The influence of ammonium nitrate, pH and indole butyric acid on root induction and survival in soil of micropropagated *Eucalyptus globulus*.** *Biologia Plantarum*, v. 47, p. 355-360, 2003.
- BIANCHETTI, R. E. *et al.* **An improved protocol for *in vitro* propagation of the medicinal plant *Mimosa pudica* L.** *African Journal of Biotechnology*, v.16, p. 418-428, 2017.
- BISHT, P. *et al.* **Micropropagation of newly produced F1 hybrid of *Eucalyptus* (*E. tereticornis* Sm. x *E. camaldulensis* Dehn. Southern Form).** *Silvae Genetica*, v.48, p.104-108, 1999.
- BRONDANI, G. E. *et al.* **Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden.** *Revista Árvore*, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 11-19, 2009.
- BRONDANI, G. E. *et al.* **Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal microgarden.** *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, n. 48, p. 478-487, 2012.
- BRYANT, P. H.; TRUEMAN, S. J. **Stem anatomy and adventitious root formation in cuttings of angophora, *Corymbia* and *Eucalyptus*.** *Forests*, v. 6, p. 1227-1238, 2015.
- CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia Vegetal: estrutura e função dos órgãos vegetativos.** UFLA, Lavras, 2009.
- CORDEIRO, G.M. *et al.* **Meio de cultura, BAP e ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus globulus* Labill.** *Sci. For*, v. 42, p. 337-344, 2014.
- DARKO, E. *et al.* **Photosynthesis under artificial light: the shift in primary and secondary metabolism.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, London, v. 369, n. 1640, 2014.
- DE OLIVEIRA, C. *et al.* **Micropropagation of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* AEC 224 clone.** *Journal of Forestry Research*, v. 28, n.1, p. 29-39, 2017.
- DRA, P. L.; FROEND, R. H.; FRANKS, P. J. **Smaller, faster stomata: scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance.** *Journal of Experimental Botany*, v. 64, n. 2, p. 495-505, 2013.
- DUTRA, L. F.; WENDLING, J.; BRONDANI, G. E. **A micropropagação de eucalipto.** *Pesquisa Florestal Brasileira*, Colombo, n. 58, p. 49-59, 2009.
- ELDRIDGE, K. *et al.* **Mass vegetative propagation.** In: ELDRIDGE, K. *et al.* *Eucalyptus domestication and breeding.* Oxford: Clarendon Press, p. 228-246, 1994.



EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Programa SOC-software científico**: versão 2.1. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 1990.

ESPOSITO-POLESI, N. P. *et al.* **Endophytic bacterial communities associated with two explant sources of *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage.** World J Microbiol Biotechnol, v. 11, 2015.

FERREIRA, D.F. **Sisvar**: A computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, nov./dez. 2011.

FLORSHEIM, S. M. B. *et al.* **Variação nas dimensões dos elementos anatômicos da madeira de *Eucalyptus dunnii* aos sete anos de idade.** Revista do Instituto Florestal, São Paulo, v.21, n. 1, p. 79-91, 2009.

FOGAÇA, C. M.; FETT-NETO, A. G. **Role of auxin and its modulators in the adventitious rooting of *Eucalyptus* species differing in recalcitrance.** Plant Growth Regulation, n. 45, p. 1-10, 2005.

FRÁGUAS, C. B. **Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira “Roxo de Valinhos” em diferentes ambientes.** 2003. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Fitotecnia) -Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

GAZOLLA, A. P. *et al.* **The influence of light quality on phenolic acid and biflavonoid production in *Anacardium othonianm* Rizz. seedlings grown *in vitro*.** Australian Journal of Crop Science, v. 11, n. 05, p. 528-534, 2017.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. **Micropropagação.** In: TORRES, A.C. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPQ, v.1, p.99-169, 1998.

GUPTA, S. D.; JATOTHU, B. **Fundamentals and applications of light emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis.** Plant Biotechnol Rep, v. 7, p. 211-220, 2013.

HARTMANN, H. T. *et al.* **Plant propagation: principles and practices.** 8. ed. New Jersey: Englewood Clippis, 900 p., 2011.

HAZARIKA, B. N. **Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants.** Scientia Horticulturae, v.108, p.105-120, 2006.

HÉRAUT-BRON, V. *et al.* **Phytochrome mediated effects on leaves of white clover: consequences for light interception by the plant under competition for light.** Annals of Botany, v. 88, p. 737-743, 2001.

HERINGER, A. S. *et al.* **Comparative proteomics analysis of the effect of combined red and blue lights on sugarcane somatic embryogenesis.** Acta Physiologiae Plantarum, v.39, 52 p., 2017.

HUNG, C. D. *et al.* **Growth and morphogenesis of encapsulated strawberry shoot tips under mixed LEDs.** Scientia Horticulturae, v.194, p. 194-200, 2015.

JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. McGraw-Hill Book, New York, 1940.

JOSHI, I. *et al.* **In vitro clonal propagation of mature *Eucalyptus* F1 hybrid (*Eucalyptus tereticornis* Sm. × *E. grandis* Hill ex. Maiden)**. *Silvae Genetica*, Frankfurt, v. 52, n. 3/4, p. 110-113, 2003.

KERET, R.; NAKHOODA, M.; HILLS, P. N. **Optimisation of *Eucalyptus* micropropagation**. *South African Journal of Botany*, v. 115, 320 p., 2018.

KHAN, S.V. *et al.* **Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions**. *Biologia Plantarum*, v. 46, n. 2, p.161-166, 2003.

KRAUS, J. E.; ARDRUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: EDUR. 1997.

KUTSCHERA, U.; WANG, Z. Y. **Growth-limiting proteins in maize coleoptiles and the auxin brassinosteroid hypothesis of mesocotyl elongation**. *Protoplasma*, v.253, p. 3-14, 2016.

LEVY, A. *et al.* **Profiling microRNAs in *Eucalyptus grandis* reveals no mutual relationship between alterations in miR156 and miR172 expression and adventitious root induction during development**. *BMC Genomics*, v. 15, 524 p., 2014.

LI, H.; XU, Z.; TANG, C. **Effect of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets *in vitro***. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, v. 103, n. 2, p. 155-163, 2010.

LI, H.; TANG, C.; XU, Z. **Effects of different light quality on growth, photosynthetic characteristic and chloroplast ultrastructure of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seedlings**. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, v. 29, n. 2, p. 104-113, jan. 2017.

LICHTENTHALER, H. K. **Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes**. In: Packer, L.; Douce, R. (Ed.). *Methods in enzymology*. Academic Press: New York, v. 148, p. 350-381, 1987.

LIN, BAI-LING; YANG, WEN-JEN. **Blue light and abscisic acid independently induce heterophyllous switch in *Marsilea quadrifolia***. *Plant Physiology*, v. 119, p. 429-434, 1999.

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

MA, X. *et al.* **Effects of green and red lights on the growth and morphogenesis of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets *in vitro***. *Scientia Horticulturae*, v. 190, p. 104-109, 2015.

MANIVANNAN, A. *et al.* **Blue LED light enhances growth, phytochemical contents, and antioxidante enzyme activities of *Rehmannia glutinosa* cultured *in vitro***. *Horticulture, Environment and Biotechnology*, New York, v. 56, n. 1, p. 105-113, 2015.

- MÁXIMO, W. P. F. **Propagação de um híbrido comercial de *Eucalyptus urograndis* em biorreator de imersão temporária (BIT®)**. 2014. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- MORA, A. L.; GARCIA, C. H. **A cultura de eucalipto no Brasil**. 112 p., São Paulo, SP: SBS, 2000.
- NAKHOODA, M.; WATT, M. P. **Adventitious root formation in *Eucalyptus*: the role of phytohormones**. *Acta Hortic*, v. 1155, n. 74, p. 505-511, 2017.
- NAVROSKI, M. C; REINIGER, L. R; PEREIRA, M. O. **Alongamento *in vitro* de rebentos de *Eucalyptus dunnii* em função de diferentes genótipos e concentrações de ácido 1-naftil-acético (ANA)**. *Revista de Ciências Agrárias*, v.38, p.79-86, 2015.
- NIU, F. *et al.* **Morphological response of *eucalypts* seedlings to phosphorus supply through hydroponic system**. *Scientia Horticulturae*, v. 194, p. 295-303, 2015.
- OBERSCHELP, G.P.J.; GONÇALVES, A.N. **Assessing the effects of basal media on the *in vitro* propagation and nutritional status of *Eucalyptus dunnii* Maiden**. *In Vitro Cell. Dev.Biol.-Plant*, v. 52, p. 28-37, 2016.
- OBERSCHELP, G.P.J.; GONÇALVES, A.N. **Analysis of nutrient deficiencies affecting *in vitro* growth and development of *Eucalyptus dunnii* Maiden**. *Physiol Mol Biol Plants*, v. 24, p. 693-702, 2018.
- OBERSCHELP, G. P. J. *et al.* ***Eucalyptus dunnii* Maiden plant regeneration via shoot organogenesis on a new basal medium based on the mineral composition of young stump shoots**. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant* v. 51, p. 626-636, 2015.
- OLIVEIRA, L. S. *et al.* **Micropropagation of *Eucalyptus cloeziana* mature trees**. *Aust For*, v.78, p.219-231, 2015.
- OLIVEIRA, L. S. *et al.* **Multiplicação e alongamento *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus***. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 26, n. 1, p. 235-247, 2016.
- OLIVEIRA, L. S. *et al.* **Assessment of genetic stability of micropropagated *Eucalyptus globulus* Labill hybrid clones by means of flow cytometry and microsatellites markers**. *Revista Árvore*, v. 41, n. 1, 2017.
- OLIVEIRA-CAUDURO, Y. de. *et al.* **Indirect organogenesis from leaf explants and *in vitro* shoots multiplication of *Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii***. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 24, n. 2, p. 347-355, 2014.
- PAIVA, J. G. A. *et al.* **Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável**. *Acta Botanica Brasilica*, v. 20, p. 257-264. 2006.
- PRADO, D. Z. *et al.* **Quercetin and indole 3-butyric acid (IBA) as rooting inducers in *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla***. *Australian Journal of Crop Science*, v. 9, n. 11, p. 1057-1063, 2015.

- RAMÍREZ-MOSQUEDA, M. A.; IGLESIAS-ANDREU, L. G.; BAUTISTA-AGUILAR, J. R. **The effect of light quality on growth and development of *in vitro* plantlet of *Stevia rebaudiana* Bertoni.** Sugar Tech, v. 19, n. 3, p. 331-336, 2017.
- RATHORE, J. S. *et al.* **A liquid culture system for improved micropropagation of mature *Acacia nilotica* (L.) Del. ssp. *indica* and *ex vitro* rooting.** Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: **Biological Sciences**, v.84, p. 193-200, 2014.
- REZENDE, R. N. *et al.* **Wood permeability in *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus dunnii*.** Floresta e Ambiente, Seropédica, v.25, n. 1, p. 1-7, 2018.
- RIBEIRO, M. N. O. *et al.* **Multiplicação *in vitro* de copo-de-leite: espectros de luz e sacarose.** Ciência Rural, v.39, p. 2388-2393, 2009.
- ROUSSOS, P. A.; ARCHIMANDRITI, A.; BELDEKOU, I. **Improving *in vitro* multiplication of juvenile European chestnut (*Castanea sativa* Mill) explants by the use of growth retardants.** Scientia Horticulturae, v.198, p. 254-256, 2016.
- RUEDELL, C. M. *et al.* **Pre and post-severance effects of light quality on carbohydrate dynamics and microcutting adventitious rooting of two *Eucalyptus* species of contrasting recalcitrance.** Plant Growth Regul, v. 69, p. 235-245, 2013.
- RUEDELL, C. M.; ALMEIDA, M. R.; FETT-NETO, A. G. **Concerted transcription of auxin and carbohydrate homeostasis-related genes underlies improved adventitious rooting of microcuttings derived from far-red treated *Eucalyptus globulus* Labill mother plants.** Plant Physiology and Biochemistry, v. 97, p. 11-19, 2015.
- SALDANHA, C. W. *et al.* **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, v. 110, p. 413-422, 2012.
- SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, J. *et al.* **Subtle changes in light intensity affect *in vitro* responses but not *ex vitro* performance of *Limonium sinuatum*.** 3 Biotech, v. 8, 335 p., 2018.
- SANTOS, A. F. dos. *et al.* **Ocorrência de mancha foliar bacteriana em plantios de eucalipto no Estado de Mato Grosso e de Santa Catarina.** Tropical Plant Pathology, Lavras, v. 35, 232 p., 2010.
- SCHUERGER, A. C.; BROWN, C. S.; STRYJEWSKI, E. C. **Anatomical features of pepper plants (*Capsicum annuum* L.) grown under red light-emitting diodes supplemented with blue or far-red light.** Ann Bot, v. 79, p. 273-282, 1997.
- SHARMA, J. **Development of biotechnological tools for the genetic improvement of selected elite clones of *Eucalyptus tereticornis* Sm.** 2007. Dissertation (Masters of Science in Biotechnology)–Thapar Institute of Engineering and Technology, Patiala-India, 2007.
- SHANTI, K. *et al.* **Micropropagation of *Eucalyptus camaldulensis* for the production of rejuvenated stock plants for microcuttings propagation and genetic fidelity assessment.** New Forests, v. 46, p. 357-371, 2015.

SHUKLA, M. R. *et al.* **Application of 3D printing to prototype and develop novel plant tissue culture systems.** *Plant Methods*, v. 13, 6 p., 2017.

SILVA, S. T. **Qualidade, intensidade de luz e sistema de ventilação natural no crescimento e análise por *headspace*-cg/em na micropropagação de *Plectranthus amboinicus*.** 2016. 108 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

SINGH, D. *et al.* **LEDs for energy efficient greenhouse lighting.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Golden, v. 49, p. 139-147, Aug. 2015.

SIWACH, P.; GILL, A. R. **Micropropagation of *Ficus religiosa* L. via leaf explants and comparative evaluation of acetylcholinesterase inhibitory activity in the micropropagated and conventionally grown plants.** *3 Biotech*, v.4, p.477-491, 2014.

SOUZA, D. M. S. C. **Fontes de luz na micropropagação de clones híbridos de *Corymbia*.** 2018. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II.** 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

SOUZA JUNIOR, L.; WENDLING, I. **Propagação vegetativa de *Eucalyptus dunnii* via miniestaquia de material juvenil.** *Boletim de Pesquisa Florestal*, Colombo, n. 46, p. 21-30, 2003.

SOUZA, D. M. C. *et al.* **Light quality in the *in vitro* introduction of *Corymbia* hybrid clones.** *Revista Árvore*, v. 42, n. 6, 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal.** 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 407 p., 2017.

THOLEN, D.; BOOM, C.; ZHU, X. G. **Opinion: prospects for improving photosynthesis by altering leaf anatomy.** *Plant Sci*, v. 197, p. 92-101, 2012.

TRUEMAN, S. J.; HUNG, C. D.; WENDLING, I. **Tissue culture of *Corymbia* and *Eucalyptus*.** *Forests*. n. 9, 84 p., 2018.

TRUEMAN, S. J.; MCMAHON, T. V.; BRISTOW, M. **Production of cuttings in response to stock plant temperature in the subtropical *eucalypts*, *Corymbia citriodora* and *Eucalyptus dunnii*.** *New Forests*, v. 44, p. 265-279, 2013.

VIEIRA, L. N. *et al.* **Light-emitting diodes (LED) increase the stomata formation and chlorophyll content in *Musa acuminata* (AAA) ‘Nanicão Corupá’ *in vitro* plantlets.** *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, v.27, p. 91-98, 2015.

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 Plant Physiology*, v. 144, p. 307-313, 1994.

WENDLING, I.; XAVIER, A. **Ministaquia seriada no rejuvenescimento de clones de *Eucalyptus***. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 38, n. 4, p. 475-480, 2003.

WILKEN, D. *et al.* **Effect of immersion systems, lighting, and TIS designs on biomass increase in micropropagating banana (*Musa spp.* cv. “Grande naine” AAA)**. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, v.50, p. 582-589, 2014.

WILLYAMS, D. **Micropropagation of salt tolerant *eucalyptus* and dieback resistant jarrah facilitated by nodal bud culture**. *Acta Hortic*, v. 1113, n. 17, p. 119-126, 2016.

XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. **Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais**. In: BORÉM, A. (Ed.). *Biotecnologia florestal*. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, p. 55-74, 2007.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa, Editora UFV, 279 p., 2013.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. **Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system**. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, v. 105, p. 149-158, 2011.

ZEIGER, E. **Blue light and stomatal function**. In: Senger H. (eds), *Blue light effects in biological systems*, p. 484-494, Berlin, 1984.

ZURANDA, A. R. *et al.* **Regeneration of *in vitro* shoot and root structure through hormone manipulation of coconut (MATAG F2) zygotic embryos**. *American Journal of Plant Sciences*, v. 8, p. 340-348, 2017.