

DENYS MATHEUS SANTANA COSTA SOUZA

**FONTES DE LUZ NA MICROPROPAGAÇÃO DE CLONES
HÍBRIDOS DE *Corymbia***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

Ficha catalográfica preparada pela **Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S729f
2018 Souza, Denys Matheus Santana Costa, 1992-
Fontes de luz na micropropagação de clones híbridos de
Corymbia / Denys Matheus Santana Costa Souza. – Viçosa, MG,
2018.

xi, 82 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Aloísio Xavier.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Corymbia*. 2. Propagação in vitro. 3. Clonagem.
4. Diodos emissores de luz. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Engenharia Florestal. Programa de
Pós-Graduação em Ciência Florestal. II. Título.

CDO adapt. CDD 22. ed. 634.918151

DENYS MATHEUS SANTANA COSTA SOUZA

**FONTES DE LUZ NA MICROPROPAGAÇÃO DE CLONES
HÍBRIDOS DE *Corymbia***

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


APROVADA: 19 de fevereiro de 2018.



Diego Silva Batista




Haroldo Nogueira de Paiva



Gléison Augusto dos Santos
(Coorientador)



Edgard Augusto de Toledo Picoli



Aloisio Xavier
(Orientador)

*Aos meus pais Suelene e Espedito,
irmãos Ilana, Daniel e Larissa,
à namorada Marleide,
e aos amigos,
por iluminar o meu caminho com
apoio, afeto e orações.
Ao meu orientador Aloisio Xavier
E aos conselheiros Glêison
Augusto dos Santos e Wagner
Campos Otoni.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, ao Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) e ao Viveiro de Pesquisas do Departamento de Engenharia Florestal da UFV, pelo suporte na realização do mestrado e deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro ao trabalho desenvolvido.

À empresa CMPC – Celulose Riograndense, localizado no município de Guaíba – RS, pelos clones fornecidos na utilização dessa pesquisa.

Aos meus orientadores Aloisio Xavier, Glêison Augusto dos Santos e Wagner Campos Otoni, pelos ensinamentos e pela confiança. Serei eternamente grato.

Aos meus pais Espedito e Suelene, os seus exemplos e amor é a grande riqueza da minha vida.

Aos meus irmãos, pelo incentivo, para que trilhasse sem medo e cheio de esperança essa jornada.

À minha namorada Marleide, pelo apoio nas horas fáceis e difíceis com companheirismo, amor e dedicação.

Ao professor Adalberto Brito de Novaes, pelo incentivo à pesquisa e apoio durante a graduação.

Aos inúmeros amigos do LCT II, pelo companheirismo, ajuda e brincadeiras.

Aos amigos do grupo de Pesquisa em Eucalipto, pela troca de experiências e ajuda.

Aos amigos da UFV, pela troca de experiências, companheirismo e amizade.

Obrigado a todos, que compartilharam de alguma forma com os prazeres e dificuldades dessa jornada.

Posso dizer que vivi, aprendi e envolvo-me de saudade, mas levo a certeza de uma escolha que me formou como pessoa.

BIOGRAFIA

DENYS MATHEUS SANTANA COSTA SOUZA, filho de Espedito Antonio Costa Souza e de Suelene Freire Santana, nasceu em 13 de setembro de 1992, em Vitória da Conquista, Bahia.

Concluiu o 1º e 2º grau, na Escola Interativo COEDUC em Vitória da Conquista, Bahia, nos anos 2007 e 2010 respectivamente.

Em julho de 2010, ingressou no Curso de Engenharia Agrônômica da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, campus de Vitória da Conquista, Bahia, concluindo o curso em novembro de 2015.

Em março de 2016, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, submetendo-se à defesa da dissertação em 19 de fevereiro de 2018.

SÚMARIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Gênero <i>Corymbia</i>	3
2.2 Micropropagação.....	5
2.3 Fonte de luz.....	6
2.4 Benziladenine 6 – BA.....	8
2.5 Sacarose e trocas gasosas.....	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	10
FONTE DE LUZ NA INTRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE CLONES HÍBRIDOS DE <i>Corymbia</i> PELA MICROPROPAGAÇÃO.....	19
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.1 Localização do estudo e material experimental.....	21
2.2 Coleta e preparo dos explantes.....	22
2.3 Introdução <i>in vitro</i>	22
2.4 Fonte de luz.....	23
2.5 Delineamento e avaliações experimentais.....	24
2.6 Análise de dados.....	24
3. RESULTADOS.....	25
4. DISCUSSÃO.....	28
5. CONCLUSÕES.....	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
INFLUÊNCIA DA FONTE DE LUZ E DO REGULADOR DE CRESCIMENTO BA NA MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE CLONES HÍBRIDOS DE <i>Corymbia</i> PELA MICROPROPAGAÇÃO.....	36
1. INTRODUÇÃO.....	37
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	38

2.1	Localização do estudo e material experimental.....	38
2.2	Fonte de luz.....	39
2.3	Regulador de crescimento BA.....	40
2.4	Subcultivo.....	40
2.5	Delineamento e avaliações experimentais.....	40
2.6	Análise de dados.....	41
3.	RESULTADOS.....	41
3.1	Efeito da fonte de luz sobre a multiplicação <i>in vitro</i>	41
3.2	Efeito do regulador de crescimento (BA) sobre a multiplicação <i>in vitro</i>	44
3.3	Efeito do número de subcultivos na multiplicação <i>in vitro</i>	45
4.	DISCUSSÃO.....	48
4.1	Efeito da fonte de luz sobre a multiplicação <i>in vitro</i>	48
4.2	Efeito do regulador de crescimento (BA) sobre a multiplicação <i>in vitro</i>	49
4.3	Efeito do número de subcultivos na multiplicação <i>in vitro</i>	51
5.	CONCLUSÕES.....	52
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
	FONTE DE LUZ E SACAROSE NO ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE CLONES HÍBRIDOS DE <i>Corymbia</i> PELA MICROPRAPAGAÇÃO.....	57
1.	INTRODUÇÃO.....	58
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	59
2.1	Localização do estudo e material experimental.....	59
2.2	Fonte de luz.....	60
2.3	Trocas gasosas e concentrações de sacarose.....	61
2.4	Enraizamento <i>ex vitro</i> das microestacas.....	62
2.5	Delineamento e avaliações experimentais.....	62
2.6	Análise de dados.....	63
3.	RESULTADOS.....	64
3.1	Efeito da fonte de luz sobre o alongamento <i>in vitro</i>	64
3.2	Efeito das trocas gasosas e sacarose sobre o alongamento <i>in vitro</i>	65
3.3	Efeito da fonte de luz sobre o enraizamento <i>in vitro</i> de microestacas.....	67
3.4	Efeito dos tipos de cultivo no enraizamento e sobrevivência das microestacas.....	67

4. DISCUSSÃO.....	68
4.1 Efeito da fonte de luz sobre o alongamento <i>in vitro</i>	68
4.2 Efeito das trocas gasosas e sacarose sobre o alongamento <i>in vitro</i>	69
4.3 Efeito da fonte de luz sobre o enraizamento <i>in vitro</i> de microestacas.....	70
4.4 Efeito dos tipos de cultivo no enraizamento e sobrevivência das microestacas.....	71
5. CONCLUSÕES.....	73
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	80

RESUMO

SOUZA, Denys Matheus Santana Costa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Fontes de luz na micropropagação de clones híbridos de *Corymbia***. Orientador: Aloisio Xavier. Coorientadores: Wagner Campos Otoni e Glêison Augusto dos Santos.

A importância das espécies do gênero *Corymbia* e de seus híbridos interespecíficos tem sido evidenciada nos programas de silvicultura, principalmente devido à sua qualidade da madeira e capacidade de adaptações as condições ambientais. Essas considerações têm estimulado o desenvolvimento de protocolos mais eficientes na propagação vegetativa necessária para a clonagem destas plantas. O presente estudo teve como objetivo geral a micropropagação de clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana*, e especificamente avaliar: i) o efeito da fonte de luz na introdução *in vitro* de clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana*; ii) o efeito da fonte de luz, regulador de crescimento BA e o número de subcultivos na fase de multiplicação *in vitro* de clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana*, e; iii) o efeito da fonte de luz, trocas gasosas e concentração de sacarose no alongamento *in vitro* e porcentagem de enraizamento e sobrevivência *in vitro* e *ex vitro* de microestacas de clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana*. O material experimental utilizado para obtenção dos explantes foi proveniente de minicepas de três clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (TC01, TC02, TC03) e um de *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01). Os experimentos *in vitro* foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), localizado no município de Viçosa/MG, e o experimentos *ex vitro* foram conduzidos no Viveiro de Pesquisas do Departamento de Engenharia Florestal da UFV. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que: i) o uso da fonte de luz LEDs correspondeu aos melhores resultados, para as características avaliadas na introdução *in vitro*; ii) o uso de LEDs vermelho azul obteve os melhores resultados, para os clones analisados na multiplicação *in vitro*; os explantes apresentaram resposta eficiente ao estímulo do regulador de crescimento BA, na concentração de 0,5 mg L⁻¹ para os clones *Corymbia torelliana* x *C. Citriodora* (TC01, TC02 e TC03) e 1,0 mg L⁻¹ para o clone *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01), promovendo maior número de

brotações; quanto ao número de subcultivos os melhores resultados foi diante do nono subcultivo, no qual conseguiu atingir maiores valores para o número de brotos por explante e vigor; iii) o uso de LEDs vermelho azul proporcionou a melhor resposta, para os clones analisados no alongamento e enraizamento *in vitro*; a concentração de 15g L⁻¹ de sacarose apresentou os melhores resultados diante das variáveis analisadas, concentração essa que apresenta redução desse componente no meio nessas condições de cultivo; os explantes alongados (microestacas) apresentaram melhor resposta ao enraizamento e sobrevivência das plantas obtidas na condição *in vitro*.

ABSTRACT

SOUZA, Denys Matheus Santana Costa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Sources of light in micropropagation of *Corymbia* hybrid clones.** Advisor: Aloísio Xavier. Co-Advisors: Wagner Campos Otoni and Glêison Augusto dos Santos.

The importance of the species belonging to the genus *Corymbia* and its interspecific hybrids has been highlighted in the silviculture programs, mainly due to its wood quality and adaptability to the environmental conditions. These considerations have stimulated the development of an efficient protocol for the vegetative propagation necessary for the cloning of these plants. The present study had the general objective of micropropagating hybrid clones of *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* and *Corymbia citriodora* x *C. torelliana*, and specifically to evaluate: i) the effect of the light source on the *in vitro* introduction of hybrid clones of *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* and *Corymbia citriodora* x *C. torelliana*; ii) the effect of the light source, growth regulator BA and the number of subcultures on the *in vitro* multiplication phase of hybrid clones of *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* and *Corymbia citriodora* x *C. torelliana*, and; iii) the effect of light source, gas exchange and sucrose concentration on *in vitro* elongation and percentage of rooting and *in vitro* and *ex vitro* survival of micro-cuttings of hybrid clones of *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* and *Corymbia citriodora* x *C. torelliana*. The experimental material used to obtain the explants was from mini-stumps of three hybrid clones of *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (TC01, TC02, TC03) and one of *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01). The *in vitro* experiments were conducted at the Tissue Culture Laboratory II of the Institute of Applied Biotechnology for Agriculture, Federal University of Viçosa (UFV), Viçosa/MG, and the *ex vitro* experiments were conducted at the Research Nursery of the Forest Engineering Department of UFV. Based on the results, it can be concluded that: i) the use of the LED light source corresponded to the best results, for the characteristics evaluated in the *in vitro* introduction; ii) the use of red blue LEDs generated the best results for the clones analyzed in the *in vitro* multiplication; the explants presented efficient response to BA growth regulator at 0.5 mg L⁻¹ concentration for *Corymbia torelliana* x *C. Citriodora* clones (TC01, TC02 and TC03) and 1.0 mg L⁻¹ for the clone *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01), promoting greater number of shoots; as to the number of subcultures the best results were in the ninth subculture, in which it was able to reach higher values for the number of shoots per explant

and vigor; iii) the use of red blue LEDs provided the best response, for the clones analyzed in the *in vitro* elongation and rooting; the concentration of 15 g L⁻¹ of sucrose presented the best results in relation to the analyzed variables, a concentration that shows a reduction of this component in the medium under these conditions of cultivation; the elongated explants (micro-shoots) showed a better response to the rooting and survival of the plants obtained in the *in vitro* condition.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A expansão de plantios para regiões não tradicionais e a busca de melhor adequação na produção de mudas têm ampliado a utilização de espécies e combinações híbridas. Dessa forma, nos últimos anos, espécies pertencentes ao gênero *Corymbia* como *C. citriodora*, *C. maculata* e *C. torelliana* e alguns de seus híbridos interespecíficos têm sido correntemente mencionadas pela grande importância quanto aos aspectos de qualidade da madeira e adaptação às condições ambientais adversas (ASSIS, 2014).

A maioria das espécies e híbridos do gênero *Corymbia* são consideradas de difícil propagação vegetativa, com exceção do *C. torelliana*, onde o enraizamento tem sido viável. Devido às dificuldades de enraizamento encontradas em algumas espécies e híbridos de *Corymbia* na propagação clonal por estaquia, principalmente no que envolve material adulto, o desenvolvimento de técnicas visando a reversão à juvenilidade e o vigor dos propágulos, como a miniestaquia seriada (WENDLING e XAVIER, 2005) e a microestaquia (XAVIER e COMÉRIO 1996; ASSIS, 2001; ALFENAS et al., 2009) têm permitido avanços consideráveis na propagação clonal.

Nos últimos anos, as pesquisas sobre o gênero *Corymbia* spp. envolvendo a micropropagação, aumentaram significativamente considerando desde o processo de introdução (PINEDO et al., 1990; SHARMA et al., 2009), multiplicação (PINEDO et al., 1990; ROTUNDO, 1993; SHARMA et al., 2009; ALMEIDA, 2012), alongamento (NHUT et al., 2002; WENDLING et al. 2014a, 2014b), aclimatização e enraizamento (HARTMANN et al., 2011, BACCARIN et al., 2015, OLIVEIRA et al. 2015; BRONDANI., et al 2017).

Para solucionar os fatores limitantes de cada processo, fica evidente a necessidade de estudos básicos para maximização da produção de microestacas *in vitro*, entre eles: o conhecimento e adequação de protocolos; a adoção de sistemas com trocas gasosas, como membranas porosas, e a redução da fonte de carbono no meio de cultivo; o conhecimento do ambiente mais eficiente para o sistema; entre outros (SALDANHA et al., 2012; XAVIER et al., 2013).

Além disso, o controle de fatores ambientais, como a temperatura e luz também são importantes para a resposta morfogênica *in vitro* (HERINGER et al., 2017). As diferentes fontes de radiação têm sido o centro de várias pesquisas ao longo dos anos, em especial quanto

aos efeitos da radiação vermelho e vermelho distante sobre o desenvolvimento e fisiologia das plantas (DEMOTES-MAINARD et al., 2016). A luz (qualidade espectral, fluxo de fótons e fotoperíodo) é um dos fatores que influenciam o crescimento e desenvolvimento de diferentes espécies de plantas *in vitro* (GUPTA e JATOTHU, 2013). É utilizada por plantas para fotossíntese como fonte de energia, mas também pode atuar como sinal externo de regulação em vários processos morfogênicos e fisiológicos que altera a arquitetura e o nível de fitoquímicos da planta (OUZOUNIS et al., 2015). No entanto, apesar da importância econômica do gênero *Corymbia* e seus híbridos, estudos sobre o efeito de diferentes comprimentos de onda das lâmpadas LEDs no processo de morfogênese e crescimento ainda são inexistentes.

Outro fator que deve-se levar em conta para a otimização da micropropagação é a redução ou a exclusão da fonte de sacarose no meio, bem como o uso de membranas porosas com ventilação natural ou forçada, pois proporcionam redução da umidade relativa do ar no interior dos frascos de cultivo e aumento significativo da troca gasosa com a atmosfera exterior, aumentando a transpiração e a efetiva absorção de água e nutrientes pela planta, melhorando seu processo de aclimatização *ex vitro* (HAZARIKA, 2006; IVANOVA e VAN STADEN, 2010; XIAO et al., 2011). Vários autores, relataram seu efeito positivo, em diferentes espécies, o que beneficia o cultivo e reduz gastos (MOREIRA et al., 2007; SORACE et al., 2008; SILVEIRA et al., 2012 e GALLO, 2015).

Uma resposta positiva à micropropagação, dentre diversos fatores, deve-se também a um balanço adequado dos reguladores de crescimento, sendo os mais utilizados, as citocininas e as auxinas (XAVIER et al., 2013). As concentrações desses reguladores de crescimento variam de acordo com o estágio de micropropagação e em função da espécie e do tipo de explante (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Na micropropagação de espécies de *Eucalyptus* e *Corymbia*, os reguladores de crescimento mais utilizados são as citocininas, sendo a 6-Benzilaminopurina (BAP) e 6-benziladenina (BA), sendo citadas por vários autores (GÓMEZ et al. 2007; OLIVEIRA 2011; ALMEIDA, 2012; OLIVEIRA, et al., 2014 e OLIVEIRA et al., 2016).

Em vista da necessidade de adequação de um protocolo de micropropagação, para clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana*, visando o rejuvenescimento e, ou, revigoramento clonal, o presente trabalho teve como objetivos específicos avaliar: i) o efeito da fonte de luz na fase de introdução *in vitro*; ii) o efeito da fonte

de luz, regulador de crescimento BA e o número de subcultivos na fase de multiplicação *in vitro*, e; iii) o efeito da fonte de luz, trocas gasosas e concentração de sacarose no alongamento *in vitro* e porcentagem de enraizamento e sobrevivência das microestacas na condição *in vitro* e *ex vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Gênero *Corymbia*

Em uma nova classificação para o gênero *Eucalyptus*, proposta por Hill e Johnson (1995), foram excluídas as espécies chamadas de “bloodwood”, formando com estas um novo gênero denominado *Corymbia*, incluindo nestas 113 espécies. No Brasil destacam-se as espécies *Corymbia citriodora* da região de Queensland e New South Wales (Figura 1A) e o *Corymbia torelliana* de Queensland (Figura 2A), ambas nativas da Austrália, tendo sido introduzida em diversos países do mundo (Figuras 1B e 2B).

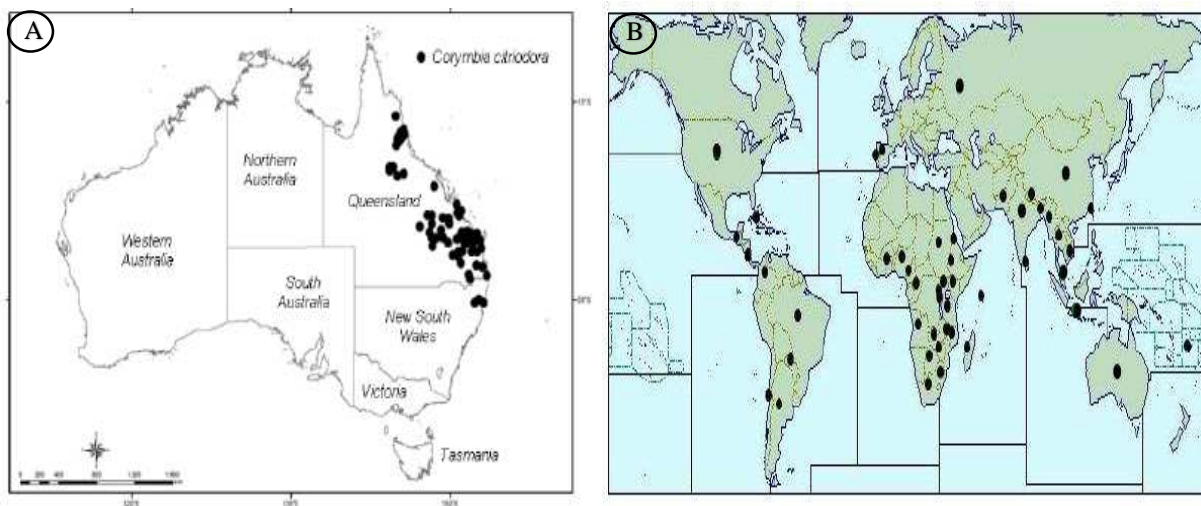


Figura 1: (A) Ocorrência natural do *Corymbia citriodora* na Austrália (REIS et al., 2014); (B) Localização da espécie *Corymbia citriodora* ao redor do mundo (FORESTRY COMPENDIUM, 2014).

Cruzamentos entre *C. torelliana* e *C. citriodora* são ainda pouco explorados, mas têm apresentado forte heterose ou vigor híbrido, para características de crescimento e as chances de clonagem em níveis operacionais, em virtude da participação de *C. torelliana* no cruzamento (LEE, 2007), principalmente se utilizar esta espécie como genitor feminino (REIS et al., 2014).

Esses híbridos têm apresentado elevada densidade da madeira, apropriada para produção de celulose e papel, madeira serrada, carvão vegetal e uso energético, além disso apresenta tolerância a estresses bióticos e abióticos, como ventos, déficit hídrico, geadas, a maioria das pragas e doenças que causam danos econômicos às florestas de eucalipto (ASSIS, 2014).

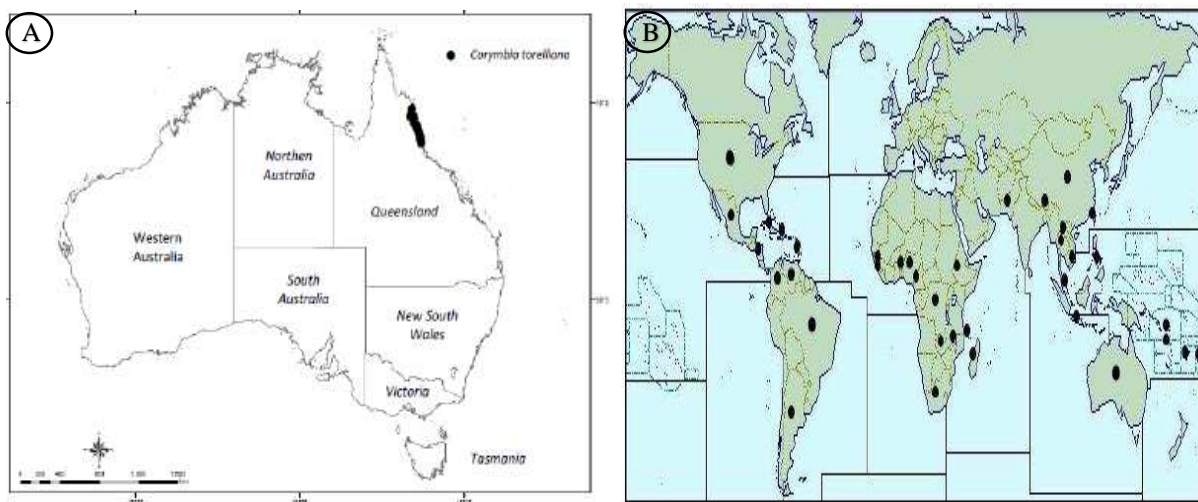


Figura 2: (A) Ocorrência natural do *Corymbia torelliana* na Austrália (REIS et al., 2014); (B) Localização da espécie *Corymbia torelliana* ao redor do mundo (FORESTRY COMPENDIUM, 2014).

A maioria das espécies do gênero *Corymbia* são consideradas de difícil propagação, com níveis de enraizamento normalmente abaixo de 5%, o que tem impedido a sua utilização em programas clonais (ASSIS, 2014), exceto a espécie *C. torelliana* que possui maior capacidade de enraizamento em relação a essas outras espécies. Por esta razão, as plantações comerciais de *Corymbia* têm sido ainda tradicionalmente estabelecidas por via seminal (REIS et al., 2014). Isso sugere que, as ferramentas do melhoramento genético, da silvicultura clonal e do manejo florestal continuam sendo os caminhos mais adequados para assegurar a continuidade do crescimento da produtividade.

Assim, o desenvolvimento de técnicas visando a reversão à juvenilidade e o vigor dos propágulos, como a miniestaquia seriada (WENDLING e XAVIER, 2005) e a microestaquia (ASSIS et al., 1992; XAVIER e COMÉRIO 1996; ASSIS, 2001; ALFENAS et al., 2009) têm permitido avanços consideráveis na propagação clonal.

2.2. Micropropagação

As técnicas de propagação vegetativa são a base da silvicultura clonal, sobretudo pela sua efetividade em capturar os ganhos genéticos obtidos dos programas de melhoramento, constituindo atualmente um dos principais processos de produção de mudas (XAVIER et al., 2013). A propagação clonal representa uma alternativa em situações em que a espécie apresenta limitações na propagação sexuada, sendo amplamente utilizada para as espécies florestais por possibilitar a multiplicação de genótipos selecionados, conservação de germoplasma e pesquisas em geral, com as técnicas de enxertia, estaquia e micropropagação em destaque como as mais difundidas (XAVIER et al., 2013).

O processo produtivo evolutivo das técnicas de propagação de plantas com o desenvolvimento da ciência torna-se necessário para alcançar os objetivos na multiplicação e preservação do material vegetal (XAVIER et al., 2013). Entretanto, formas de resgate que privilegiem a reversão à juvenilidade e o vigor dos propágulos têm sido utilizadas. Para as espécies do gênero *Corymbia* em que as técnicas de propagação vegetativa em larga escala ainda não estão estabelecidas, os estudos têm sido direcionados quanto à adequação desses métodos que são utilizados amplamente na clonagem do gênero *Eucalyptus*.

A micropropagação é uma das técnicas de propagação vegetativa mais utilizadas dentre a cultura de tecidos, em que apresentam importante impacto na multiplicação clonal em várias espécies, incluindo arbóreas (SOARES et al., 2007; PIJUT et al., 2012). Na micropropagação podem ser utilizados como fonte de explantes meristemas, embriões zigóticos ou somáticos, folhas, segmentos caulinares e raízes (RATHORE et al., 2014; SIWACH et al., 2014; ZURAIDA et al., 2017). Estes explantes quando inoculados em condições assépticas, em meio de cultura e com condições ambientais controladas podem expressar a capacidade de formar novos órgãos como brotos e raízes (ROUSSOS et al., 2016; BIANCHETTI et al., 2017).

Como ferramenta de produção de mudas clonais, a micropropagação tem inúmeras vantagens em que se destacam: a possibilidade de propagação massal de clones em curto espaço de tempo; o maior controle nutricional, ambiental e fitossanitário; o transporte do material clonal para grandes distâncias sem danos; o armazenamento por longos períodos; e a retenção do vigor híbrido (BISHT et al., 1999; XAVIER et al., 2013).

Na busca por alternativas para o rejuvenescimento/revigoramento de clones selecionados, visando a melhoria do enraizamento adventício no processo de produção de mudas

clonais a micropropagação via proliferação de gemas axilares tem sido recomendada como técnica para alcançar esse objetivo. Dentre as etapas da micropropagação, em virtude da metodologia adotada para a proliferação das gemas axilares, tem as fases de introdução, multiplicação e alongamento *in vitro*, que é necessária para a obtenção de brotações com tamanho adequado para a fase de enraizamento destas, a qual tem sido realizada *ex vitro* (XAVIER et al., 2013) ou *in vitro* (TRINDADE e PAIS, 1997; BENNETT et al., 2003; NOURISSIER e MONTEUUIS, 2008).

Nos últimos anos aumentaram significativamente as pesquisas sobre o gênero *Corymbia*. Como resultado, os métodos de propagação vegetativa melhoraram significativamente, maximizando a produção clonal, especialmente pelo rejuvenescimento tecidual (WENDLING et al., 2014a, 2015b). Trabalhos envolvendo a micropropagação de *Corymbia* vêm sendo desenvolvidos desde o processo de introdução (PINEDO et al., 1990; SHARMA et al., 2009), multiplicação (PINEDO et al., 1990; ROTUNDO, 1993; SHARMA et al., 2009; ALMEIDA, 2012), alongamento (NHUT et al., 2002; WENDLING et al., 2014a, 2014b), aclimatização e enraizamento (HARTMANN et al., 2011, BACCARIN et al., 2015, OLIVEIRA et al., 2015; BRONDANI et al., 2017).

Para solucionar alguns fatores que podem ser limitantes do processo, fica evidente a necessidade de estudos básicos para maximização da produção de microestacas *in vitro*, entre eles: o conhecimento e adequação de protocolos, bem como o tipo de explante a ser utilizado; o desenvolvimento de tecnologias de produção em recipientes alternativos; a adoção de sistemas com mais trocas gasosas, como membranas porosas, e a redução da fonte de carbono no meio de cultivo; o uso de substratos alternativos, visando à redução com gastos de meios semissólidos; o conhecimento do ambiente mais eficiente para o sistema; entre outros (PENCHEL et al., 2007; SALDANHA et al., 2012; XAVIER et al., 2013).

2.3. Fonte de luz

Na propagação *in vitro*, o controle dos fatores ambientais, como temperatura e luz, é fundamental para a resposta morfogênética. Entre os fatores externos, a luz tem destaque fundamental para espécies fotoautotróficas, atuando na produção de energia pela fotossíntese, e também atuando como estímulo percebido por fotorreceptores que desencadeiam a fotomorfogênese em plantas (GUPTA e JATOTHU, 2013; OLLE e VIRSILE, 2013).

A luz é um fator ambiental importante para as plantas clorofiladas, pois, a morfogênese pode ser controlada por esse fator, sendo denominada fotomorfogênese. Não apenas a morfologia e anatomia do vegetal estão relacionadas à luz, mas a bioquímica das plantas também está sob sua influência (RIBEIRO et al., 2009). Deste modo, o fotoperíodo, o fluxo de fótons e a qualidade de luz interferem no cultivo *in vitro*, pois, o primeiro está relacionado à duração, o segundo à quantidade e o terceiro e último ao comprimento de onda dos espectros de luz sob a planta (RIBEIRO et al., 2009).

As diferentes fontes de radiação têm sido o centro de várias pesquisas ao longo dos anos em especial quanto aos efeitos de espectro de luz vermelho e vermelho distante sobre o desenvolvimento e a fisiologia das plantas (DEMOTES-MAINARD et al., 2016). Os estudos têm centrado nas respostas estimuladas *in vitro* com utilização de fontes artificiais de luz (HERINGER et al., 2017). Diferentes níveis de comprimento de onda afetam diversos metabolismo nas plantas. Luz azul (450 – 495 nm), vermelho (620 – 750 nm), vermelho extremo (750 – 850 nm) e verde (495 -570), atuam de forma específica na morfogênese *in vitro*, crescimento e desenvolvimento da planta (GUPTA e JATOTHU, 2013; GOLOVATSKAYA e KARNACHUK, 2015; WANG et al., 2015; ZIENKIEWICZ et al., 2015; HERINGER et al., 2017).

Diodos emissores de luz (LEDs) são uma fonte de luz alternativa, potencial para o cultivo *in vitro*, devido à sua especificidade de comprimento de onda, largura de banda estreita, baixa quantidade de emissões térmicas, baixa degradação e longa duração (GUPTA e JATOTHU 2013). O uso de lâmpadas de diodos emissores de luz (LED) no vegetal parece ser vantajosa em relação as fluorescentes, uma vez que os LEDs podem fornecer luz com mais eficiência, através de pontos particulares do espectro de luz (GUPTA e JATOTHU 2013). Por causa disso, nos últimos anos, os LEDs estão sendo a fonte de luz predominante em câmaras de crescimento e biorreatores para melhorar o desenvolvimento de plantas *in vitro* (YEH e CHUNG, 2009).

Trabalhos científicos com uso de LEDs na micropropagação de *Corymbia* spp. ainda são recentes, no entanto, são encontrados bons resultados para o alongamento do caule e entrenós em diferentes genótipos de *Vitis riparia* × *V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon (POUDEL et al., 2008), aumento da matéria seca e fresca em algodoeiro (LI e TANG, 2010), aumento na formação de estômatos em cana de açúcar (VIEIRA et al., 2015), maior crescimento em *Vanilla planifolia* (BELLO-BELLO et al., 2016), maiores quantidades de carboidrato solúvel total,

amido e aminoácidos livres em *Phoenix dactylifera* (MADI et al., 2016) e maior quantidade de pigmentos fotossintéticos em *Gossypium hirsutum* (LI et al., 2017).

Estas respostas observadas no desenvolvimento das plantas são controladas por programas genéticos complexos (HOCHHOLDINGER et al., 2006), por ações endógenas e interação com reguladores de crescimento (KUTSCHERA e WANG, 2016) e em resposta a estímulos ambientais, como temperatura, umidade e luz (DENG et al., 2014). É importante salientar que caso haja extrapolação do tempo necessário de exposição em lâmpadas LEDs, pode ser prejudicial para as plantas. Dentre os danos fisiológicos, estão o elevado grau de oxidação aumento de peróxidos (H_2O_2) e a redução da totipotência celular (GUPTA e SAHOO, 2015). As diferentes condições luminosas podem elevar ou diminuir a eficácia da transferência e a absorção de energia capturada pelas plantas (FAGAN et al., 2013).

No entanto, apesar da importância econômica do gênero *Corymbia* e seus híbridos, o efeito de diferentes comprimentos de onda das lâmpadas LEDs no processo de morfogênese e crescimento ainda são inexistentes. A luz, na cultura de tecidos, permite a manipulação das condições de cultivo, que contribui com a otimização dos protocolos de micropropagação, tornando os tecidos melhores e reproduzíveis, contudo, ainda são necessários maiores estudos que reportem a qualidade de luz e o fotoperíodo no cultivo *in vitro* de plantas lenhosas (BRAGA et al., 2009).

2.4. Benziladenine 6-BA

Os reguladores de crescimento são substâncias sintéticas exógenas, que ao serem aplicadas às plantas desempenham funções semelhantes às substâncias endógenas; podendo ser iguais quimicamente aos fito-hormônios, possibilitando alteração no crescimento e desenvolvimento das plantas (SILVA, 2014). De maneira geral, uma resposta positiva à micropropagação, dentre diversos fatores, deve-se também a um balanço adequado dos reguladores de crescimento, sendo os mais utilizados são as citocininas e auxinas (XAVIER et al., 2013), cujas concentrações variam de acordo com o estágio de micropropagação e em função da espécie e do tipo de explante (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A 6-benziladenina (BA) é uma citocinina que possui síntese em ápices radiculares e caulinares e são transportadas pelo xilema e floema (TAIZ e ZEIGER, 2013). Esses reguladores são de grande importância para estimular a formação de brotos *in vitro*, modular sinais

necessários à reprogramação, proliferação de células e também na superação da dominância apical exercida por auxinas, estimulando gemas axilares, e conseqüentemente, o desenvolvimento em diversas espécies do gênero *Eucalyptus* e *Corymbia*, (ALMEIDA, 2012; MOHEBALIPOUR et al., 2012; UZELAC et al., 2012; EL-SHOWK et al., 2013; JUNIOR et al., 2014; OLIVEIRA, et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016).

Uma das maiores exigências do uso da micropropagação tem sido ajustar e aperfeiçoar o processo de cultivo *in vitro*, em especial, a composição do meio, as combinações e concentrações de reguladores de crescimento (CORDEIRO et al., 2014). A aplicação desses hormônios exógenos ao meio de cultivo, devem ser escolhidas cautelosamente, pois, quando a concentração é excedida, pode ser tóxica para o explante, tendo conseqüências como hiper-hidricidade, oxidação, inibição, encurtamento de brotos (VASCONCELOS et al., 2012).

2.5. Sacarose e trocas gasosas

Dentre as diversas formas de carbono no cultivo *in vitro*, a sacarose é a mais utilizada, por ser o hidratado de carbono mais comum na seiva do floema de muitas plantas (GAUCHAN, 2012). Convencionalmente os recipientes onde são cultivadas as plantas *in vitro* têm como característica a alta umidade relativa, reduzidas trocas gasosas e fluxo de fótons, além de meio de cultura com elevada concentração de carboidratos; sendo assim, as plantas neste sistema podem exibir metabolismo heterotrófico ou mixotrófico (KOZAI, 2010) e apresentar desordens anatômicas e metabólicas que acarretam em baixas taxas de sobrevivência durante a aclimatização (HAZARIKA, 2006). Diante disso, diferentes estratégias vêm sendo utilizadas, tais como o aumento da intensidade luminosa nas salas de crescimento, o ajuste do teor de açúcares no meio de cultura e o emprego de sistemas de ventilação dos recipientes (POSPÍŠILOVA et al., 2007; SAÉZ et al., 2012; SILVA et al., 2014), visando criar um ambiente mais favorável para o desenvolvimento das plantas *in vitro*.

A redução ou a exclusão da fonte de sacarose no meio, bem como o uso de membranas porosas com ventilação natural ou forçada, proporcionam redução da umidade relativa do ar no interior dos frascos de cultivo e aumento significativo da troca gasosa com a atmosfera exterior, aumentando a transpiração e a efetiva absorção de água e nutrientes pela planta, melhorando seu processo de aclimatização *ex vitro* (HAZARIKA, 2006; IVANOVA e VAN STADEN, 2010; XIAO et al., 2011). Vários autores, relataram seu efeito positivo, em diferentes espécies,

além, da possibilidade de variações em sua concentração, o que beneficia o cultivo e reduz gastos (MOREIRA et al., 2007; SORACE et al., 2008 e SILVEIRA et al., 2012 e GALLO, 2015). Oliveira et al. (2014) não observou diferença entre os sistemas quem receberam ou não injeção de ar em biorreatores de imersão temporária no processo de multiplicação *in vitro* do clone *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. A propagação *in vitro* com uso de membranas porosas permitem a troca de gases entre a atmosfera externa e interna dos frascos através da ventilação natural, desde que a concentração de CO² seja adequada, resultando em aumento no crescimento (KOZAI, 2010).

A fonte de carbono adicionada ao meio de cultura pode influenciar significativamente o desempenho do cultivo, devido aos seus efeitos sobre o aporte de energia para o explante e a manutenção do potencial osmótico do meio (RIBEIRO et al., 2015). A presença de sacarose no meio de cultura é indispensável para a multiplicação da maioria dos vegetais, contudo, a concentração empregada pode ser ajustada de acordo com a fonte de luz à qual as plantas estão expostas (ROCHA et al., 2013). A concentração de carboidrato utilizado nos meios de cultura para o gênero *Eucalyptus* e *Corymbia* pode variar de acordo com as fases de introdução, multiplicação, alongamento ou enraizamento, mas em geral é mantida entre 15 e 30 g L⁻¹ (BORGES et al., 2011; BRONDANI et al., 2012; NAVROSKI et al., 2013; BACCARIN, 2015).

Na micropropagação fotoautotrófica, por não se utilizar açúcar, o crescimento das culturas ou acumulação de carboidratos depende em grande parte da fotossíntese e absorção de nutrientes inorgânicos (KOZAI e KUBOTA, 2005; BRONDANI, 2012). No cultivo *in vitro*, as plantas perdem parcialmente o autotrofismo e, conseqüentemente, necessitam de uma fonte exógena de carboidratos, sendo a sacarose a mais utilizada na cultura de tecidos vegetais (PARVEEN e SHAHZAD, 2014). Além disso, age como fonte de energia para sustentar o metabolismo fotomixotrófico, garantindo o desenvolvimento ideal, como precursor de carbono e metabólito de sinalização, bem como atua na manutenção do potencial osmótico, garantindo a conservação da água nas células (GAGO et al., 2014).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A. V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2.ed. Viçosa; UFV, 500 p, 2009.

ALMEIDA, L.V. **Técnicas para otimização da multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus Citriodora* (Hook) K.D. Hill & L.A.S. Johnson.** 2012. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

ASSIS, T. F. Melhoramento genético de *Eucalyptus*: desafios e perspectivas. **3º Encontro Brasileiro de Silvicultura**, p. 127-148, 2014.

ASSIS, T.F. Evolution of technology for cloning *Eucalyptus* in large scale. In: IUFRO INTERNATIONAL SYMPOSIUM, Valdivia. **Proceedings...** Chile: EMBRAPA/ CNPF, p.22, 2001.

BACCARIN, F.J.B.; BRONDANI, G.E.; ALMEIDA, L.V.; VIEIRA, I.G.; OLIVEIRA, L.S.; ALMEIDA, M. Vegetative rescue and cloning of *Eucalyptus benthamii* selected adult trees. **New For**, v.46, p.465-483, 2015.

BELLO-BELLO, B.B.; ESTRADA, E.M.; VELÁZQUEZ, J.H.C. Effect of LED light quality on *in vitro* shoot proliferation and growth of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). **African Journal**, v.15, p. 272 – 277, 2016.

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.; DE RESENDE, C. F.; PACHECO, V. S.; DORNELLAS, F. F.; DE OLIVEIRA, A. M. S.; FREITAS, J. C. E.; PEIXOTO, P. H. P. 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.; SHARMA, V.K.; JOSHI, I.; KAPOOR, M.L. 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.

BRAGA, F.T. Qualidade de luz no cultivo *in vitro* de *Dendranthema grandiflorum* cv. Rage: características morfofisiológicas. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, n. 2, 2009.

BORGES, S.R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L.S.; MELO, L.A.; ROSADO, A.M.; Enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Rev Árvore**, v.35, p. 425-434, 2011.

BRONDANI, G.E.; WIT ONDAS, H.W.; BACCARIN, F.J.B.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. **In Vitro Cell Dev Biol Plant**, v.48, p.478-487, 2012.

BRONDANI, G. E.; OLIVEIRA, L.S.; KONZEN, E.R.; DA SILVA, A.L.L.; COSTA, J.C. Mini-incubators improve the adventitious rooting performance of *Corymbia* and *Eucalyptus* microcuttings according to the environment in which they are conditioned. **An Acad Bras Cienc**, p.2-16, 2017.

CORDEIRO, G.M.; BRONDANI, G.E.; OLIVEIRA, L.S.; ALMEIDA, M. Meio de cultura, BAP e ANA na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucalyptus globulus* Labill. **Sci. For**, v. 42, p. 337-344, 2014.

DEMOTES-MAINARD, S.; PÉRON, T.; COROT, A.; BERTHELOOT, J.; LE GOURRIEREC, J.; PELLESCI-TRAVIER, S.; CRESPEL, L.; MOREL, P.; HUCHÉ-THÉLIER, L.; BOUMAZA, R.; VIAN, A.; GUÉRIN, V.; LEDUC, N.; SAKR, S. Plant responses to red and far-red lights, applications in horticulture. **Environmental and Experimental Botany**, v.121, p. 4-21, 2016.

DENG, Z.; OSES-PRIETO, J. A.; KUTSCHERA, U.; TSENG, T. S.; HAO, L.; BURLINGAME, A. L.; ZHI-YONG, W.; BRIGGS, W. R. Blue light-induced proteomic changes in etiolated *Arabidopsis* seedlings. **Journal of Proteome Research**, v.13, p. 2524-2533, 2014.

EL-SHOWK, S.; RUONALA, R.; HELARIUTTA, Y. Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. **Development**, v.140, p. 1373-1383, 2013.

FAGAN, E.B. et al. Lei de Beer e sua relação com a ecofisiologia de plantas. Cerrado Agrociências. **Revista do Centro Universitário de Patos de Minas, Patos de Minas**, v.4, p. 78-97, 2013.

FORESTRY COMPENDIUM. Disponível em:<<http://www.cabi.org/fc>>. Acesso em: 30 nov. 2017.

GAGO, J.; MARTÍNEZ-NÚÑEZ, L.; LANDÍN, M.; FLEXAS, J.; GALLEGO, P. P. Modeling the Effects of Light and Sucrose on In Vitro Propagated Plants: A Multiscale System Analysis Using Artificial Intelligence Technology. **Plos One**, v. 9, p. 1-9, 2014.

GALLO, R. **Produção de microestacas de clones híbridos de *Eucalyptus* spp. pela micropropagação**. 2015. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

GAUCHAN, D. P. Effect of diferente sugars on shoot regeneration of maize (*zea mays* L.). **kathamandu Univrsity Journal of Science, Engineering and Technology**, v. 8, p. 119-124, 2012.

GOLOVATSKAYA, I.F.; KARNACHUK, R.A. Role of green light in physiological activity of plants. **Russ J Plant Physiol**, v.62, p.727–740, 2015.

GOMÉZ, C.; RÍOS, D.; SÁNCHEZ-OLATE, M. **Efecto del subcultivo sucesivo sobre la caulogénesis adventícia de *Eucalyptus globulus***, v. 28, p. 13-17, 2007.

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 lightemitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. **Plant Biotechnol Rep**, v.7, p.211–220, 2013.

GUPTA, S.D.; SAHOO, T.K. Light emitting diode (LED)-induced alteration of oxidative events during *in vitro* shoot organogenesis of *Curculigo orchoides* Gaertn. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.37, n.11, 2015.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; JUNIOR DAVIES, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 8.ed. New Jersey: Englewood Clippis, 900 p, 2011.

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

HERINGER, A. S.; REIS, R. S.; PASSAMANI, L. Z.; SOUZA-FILHO, G. A.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. Comparative proteomics analysis of the effect of combined red and blue lights on sugarcane somatic embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.39, p.52, 2017.

HILL, K.D.; JOHNSON, L.A.S. Systematic studies in the eucalypts 7. A revision of the bloodwoods, genus *Corymbia* (Myrtaceae). **Telopea**, v. 6, p. 185-504, 1995.

HOCHHOLDINGER, F.; SAUER, M.; DEMBINSKY, D.; HOECKER, N.; MUTHREICH, N.; SALEEM, M., LIU, Y. Proteomic dissection of plant development. **Proteomics**, v.6, p.4076-4083, 2006.

IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans. **Plant Growth Regulators**, v.60, p.143-150, 2010.

JUNIOR, F. P. C. P.; RAPOSO, A.; NAGAO, E. O.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Efeito de diferentes citocininas e sistema de cultura dupla-fase na micropropagação de Teca (*Tectona grandis* L.) estabelecida na Amazônia Sul- Ocidental. **Evidência, Joaçaba**, v. 14, p. 7-20, 2014.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. Concepts, definitions, ventilation methods, advantages and disadvantages. In: KOZAI, T.; AFREEN, F; ZOBAYED, S.M.A. (Ed.). **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system**, p. 19-30, 2005.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation. Environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, v.10, p.188-204, 2010.

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.

LEE, D.J. Achievements in forest tree genetic improvement in Australia and New Zealand 2: Development of *Corymbia* species and hybrids for plantations in eastern Australia. **Australian Forestry**, v. 70, p.11–16, 2007.

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 Organ Cult**, v.103, 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. **Food Agric**, v29, Issue. 2, 2017.

MADI, A., AL-MAYAH W. Effect of red and blue light emitting diodes “CRB-LED” on *in vitro* organogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Alshakr. **World J Microbiol Biotechnol**, v.32, p.160, 2016.

MOHEBALIPOUR, N.; AHARIZAD, S.; MOHAMMADI, S.; MOTALLEBIAZAR, A.; AREFI, H. Effect of plant growth regulators BAP and IAA on micropropagation of Iranian lemon balm (*Melissa officinalis* L.) landraces. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v.10, p.280-286, 2012.

MOREIRA, B. M. T.; TOMBA, E. C.; ZONETTI, P. C. Crescimento *in vitro* de plântulas de orquídea (*Laelia purpurata* Lindl var *venosa* X *Cattleya warneri* T. Moore alba) sob diferentes concentrações de sacarose e frutose. **Revista de Saúde e Biologia**, v.2, p.16-21, 2007.

NHUT, D.T.; TAKAMURA, T.; WATANABE, H.; TANAKA, M. Sugar-free micropropagation of *Eucalyptus citriodora* using light-emitting diode (LEDs) and film-rockwool culture system. **Open Life Sci**, v.10, p.310 – 321, 2002.

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.

NOURISSIER, S.; MONTEUUIS, O. *In vitro* rooting of two *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* mature clones. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 44, p. 263-272, 2008.

OLIVEIRA, L. S.; BRONDANI, G.E.; BATAGIN-PIOTTO, K.D.; CALSAVARA, R.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus cloeziana* mature trees. **Aust For**, v.78, p.219-231, 2015.

OLIVEIRA, L. S. XAVIER, A.; LOPES, A. P.; TAKAHASHI, E. K.; OTONI, W. C. Multiplicação e alongamento *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 26, n. 1, p. 235-247, jan.-mar., 2016.

OLIVEIRA, M. C.; SANTANA, D. G.; SANTOS, C.M.; Biometria de frutos e sementes e emergência de plântulas de duas espécies de frutíferas do gênero *Campomanesia*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p.446-455, 2011.

OLIVEIRA, M.L.de.; XAVIER, A.; PENCHEL FILHO, R.M.; REIS, J.P.dos. Efeito do intervalo de imersão e de injeção de ar na multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em biorreator de imersão temporária. **Ciência Florestal**, v.24, p.37-45, 2014.

OLLE, M., VIRŠILE, A. The effects of light-emitting diode lighting on greenhouse plant growth and quality. **Agricultural and Food Science**, v.22, p. 223-234, 2013.

OUZOUNIS, E.; ROSENQVIST, C.-O.; OTTOSEN. Spectral effects of artificial light on plant physiology and secondary metabolism: a review, **Hortscience**, v.50, p.1128–1135, 2015.

PARVEEN, S.; SHAHZAD, A. Factors affecting *in vitro* plant regeneration from cotyledonary node explant of *Senna sophora* (L.) Roxb. – A highly medicinal legume. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 413-422, 2014.

PENCHEL, R.M.; OTONI, W.C.; XAVIER, A. Tecnologia de biorreatores e propagação *in vitro*. In: BORÉM, A. (Ed.) **Biotecnologia florestal**. Viçosa: UFV, p.75-92, 2007.

PINEDO, D. N. H.; GRAÇA, M. E. C.; ARAÚJO, A.J. **Micropropagação de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus tereticornis***. 6º Congresso Florestal Brasileiro. Campos do Jordão - São Paulo - Brasil, de 22 a 27 de setembro de 1990.

PIJUT, P. M.; BEASLEY, R. R.; LAWSON, S. S.; PALLA, K. J.; STEVENS, M. E.; WANG, Y. *In vitro* propagation of tropical hardwood tree species – a review (2001–2011) **Propagation of Ornamental Plants**, v.12, p. 25-51, 2012.

POSPÍŠILOVA, J. Acclimation of plantlets to *ex vitro* conditions: Effects of air humidity, irradiance, CO₂ concentration and abscisic acid. **Acta Horticulturae**, v.748, p.29-38, 2007.

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

RATHORE, J. S.; RAI, M. K.; PHULWARIA, M.; SHEKHAWAT, N. S. 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.

REIS, C.A.F.; ASSIS, T.F.; SANTOS, A.M.; PALUDZYSZYN FILHO, E. ***Corymbia citriodora*: estado da arte de pesquisas no Brasil**. Colombo: Embrapa Florestas, 59 p, 2013. ***Corymbia torelliana*: estado da arte de pesquisas no Brasil**. Colombo: Embrapa Florestas, 50 p, 2014.

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.

RIBEIRO, M. F. A. Fontes de carbono na multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de marmeleiro 'MC' e 'Adams'. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v.11, p. 54-61, 2015.

ROCHA, P. S. G.; OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B. Sugarcane micropropagation using light emitting diodes and adjustment in growth-medium sucrose concentration. **Ciência Rural**, v.43, p. 1168-1173, 2013.

ROTUNDO, C. C. **Efeitos de concentrações de nitrato de amônio na multiplicação e no enraizamento "in vitro" de clones *Eucalyptus cloeziana* F. Muell e *Eucalyptus citriodora* Hook.** 1993. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

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.

SAÉZ, P. L. et al. Increased light intensity during *in vitro* culture improves water loss control and photosynthetic performance of *Castanea sativa* grown in ventilated vessels. **Scientia Horticulturae**, v.138, p.7-16, 2012.

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

SHARMA, S.; ARYA, I. D.; ARYA, S. Micropropagation of superior eucalyptus hybrids FRI-5 (*Eucalyptus camaldulensis* Dehn x *E. tereticornis* Sm) and FRI-14(*Eucalyptus torelliana* F.V. Muell x *E. citriodora* Hook): A commercial multiplication and field evaluation. **African Journal of Biotechnology**, v.8, p. 5718-5726, 2009.

SILVA, T. Germinação de sementes de melância sob diferentes métodos de tratamento com reguladores vegetais. **Scientia Plena**, v.10, p.115, 2014.

SILVA, M. M. A. Effect of blue/red LED light combination on growth and morphogenesis of *Saccharum officinarum* plantlets *in vitro*. **Progress in Biomedical Optics and Imaging**, 8947:89471X, 2014.

SILVEIRA, D. G.; SOUZA, F. V. D.; VIDAL, A. M.; LEDO, C. A. S.; SANTANA, J. R. F. Efeito da sacarose e da aeração dos recipientes no enraizamento *in vitro* de Caroá. In: Embrapa Mandioca e Fruticultura-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS. **Anais...** Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, CD-ROM. 2012. 1

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.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A. D.; NOGUEIRA, R. C.; EMRICH, E. B.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, p.1048-1053, 2007.

SORACE, M.; FARIA, R. T.; JUNIOR, C. V. D.; GOMES, G. P. G.; BARBOSA, C. M.; VIEIRA, F. G. N.; SILVA, G. L. S. DA.; TAKAHASHI, L. S. A.; SCHNITZER, J. A. Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, p. 775-782, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 719p, 2013.

TRINDADE, H.; PAIS, M. S. *In vitro* studies on *Eucalyptus globulus* rooting ability. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, Washington, v. 33, p. 1-5, 1997.

UZELAC, B.; JANOSEVIC, D.; STOJICIC, D.; BUDIMIR, S. Effect of cytokinins on shoot apical meristem in *Nicotiana tabacum*. **Archives of Biological Sciences**, v.64, p.511–516, 2012.

VASCONCELOS, A.G.V. Hiperhidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, p. 837-844, 2012.

VIEIRA, L. N.; FREITAS FRAGA, H. P.; DOS ANJOS, K. G.; PUTTKAMMER, C. C.; SCHERER, R. F.; DA SILVA, D. A.; GUERRA, M. P. 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.

WANG, X.Y.; XU, X.M.; CUI, J. The importance of blue light for leaf area expansion, development of photosynthetic apparatus, and chloroplast ultrastructure of *Cucumis sativus* grown under weak light. **Photosynthetic**, v.53, p.213–222, 2015.

WENDLING, I.; TRUEMAN, S.J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry – part I: concepts, regulation and consequences of phase change. **New For**, v.45, p. 449-471, 2014a.

WENDLING, I.; TRUEMAN, S.J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry – part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. **New For**, v.45, p. 473-486, 2014b.

WENDLING, I.; XAVIER, A. Influência da miniestaquia seriada no vigor radicular de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, v.29, p.681-689, 2005.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v.20, p.9-16, 1996.

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

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

YEH, H.; CHUNG, J.P. High-brightness LEDs—energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. **Renew Sust Energ Rev**, v.13, p.2175–2180, 2009.

ZIENKIEWICZ, M.; DROZAK, A.; WASILEWSKA, W.; BACŁAWSKA, I.; PRZEDPEŁSKA- WASOWICZ, E.; ROMANOWSKA. The short-term response of *Arabidopsis thaliana* (C3) and *Zea mays* (C4) chloroplasts to red and far red light. **Planta**, v. 242, p.1479–1493, 2015.

ZURAIIDA, A. R.; SENTOOR, K. G.; AHMAD, N.; SYAHIRAH, F. M.; AYU, N. O. 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.

FONTE DE LUZ NA INTRODUÇÃO *IN VITRO* DE CLONES HÍBRIDOS DE *Corymbia* PELA MICROPROPAGAÇÃO

RESUMO: A micropropagação via proliferação de gemas axilares tem sido recomendado para o rejuvenescimento/revigoramento de clones selecionados, e conseqüentemente melhoria no enraizamento de mudas clonais. O sucesso de um protocolo de micropropagação depende da fase de introdução *in vitro*, visto que as etapas seguintes de multiplicação, alongamento e posterior transferência para condições *ex vitro* só podem ser executadas com sucesso após o estabelecimento de culturas assépticas e com bom vigor vegetativo. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da fonte de luz na introdução *in vitro* de clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (TC01, TC02 e TC03) e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01), pela técnica de micropropagação via proliferação por gemas axilares. As minicepas, fornecedoras dos explantes para introdução *in vitro*, foram conduzidas em minijardim clonal semi hidropônico. Segmentos nodais de três clones de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* e de um clone de *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* foram coletados, desinfestados e inoculados em meio de cultura JADS, à fim de comparar os efeitos da qualidade da luz de LEDs branco, LEDs vermelho/azul, Lâmpada fluorescente e Escuro/lâmpada fluorescente. Aos 30 dias após a inoculação, foram avaliadas as características porcentagem média de contaminação, oxidação, explantes não reativos, comprimento de brotos maiores que 0,5 cm e o número médio de brotações por explante maiores que 0,5 cm. Com base nos resultados obtidos, o uso da fonte de luz LEDs vermelho/azul obteve os melhores resultados, para todas as características avaliadas na introdução *in vitro*.

Palavras-chave: Propagação *in vitro*; propagação vegetativa; LEDs.

1. INTRODUÇÃO

A micropropagação via proliferação de gemas axilares tem sido recomendado para o rejuvenescimento/revigoramento de clones selecionados na área florestal, principalmente visando a melhoria no processo de produção de mudas clonais pela propagação vegetativa por enraizamento de estacas. Dessa forma, a micropropagação apresenta como grande utilidade no setor florestal, em razão de possibilitar a formação e manutenção de jardins clonais.

O sucesso de um protocolo de micropropagação depende da fase de introdução *in vitro*, visto que as etapas seguintes de multiplicação, alongamento e posterior transferência para condições *ex vitro* só podem ser executadas com sucesso após o estabelecimento de culturas assépticas e com bom vigor vegetativo (GEORGE e DEBERGH, 2008). Entretanto, para o adequado desenvolvimento dos explantes, é necessário o controle dessas fases, já que são dependentes de vários fatores, como características intrínsecas da espécie, disponibilidade de luz, meio nutritivo utilizado e balanço hormonal (PASA et al., 2012).

Nos últimos anos aumentaram significativamente as pesquisas sobre o gênero *Corymbia*. Como resultado, os métodos de propagação vegetativa melhoraram, maximizando a produção clonal, especialmente pelo rejuvenescimento vegetativo (WENDLING et al. 2014a, 2014b). Trabalhos envolvendo a micropropagação de *Corymbia* spp. vêm sendo desenvolvidos desde a fase de introdução *in vitro* até a obtenção da muda na condição *ex vitro* (PINEDO et al., 1990; SHARMA et al., 2009).

Diversas tecnologias vêm sendo propostas com o intuito de automatizar o processo da micropropagação, entre elas: inovações no ambiente de cultivo, como recipientes alternativos permitindo trocas gasosas; uso de substratos alternativos ao sistema semissólido como o ágar; novas fontes de iluminação à base de diodos – LEDs; e automatização das operações dos sistemas de cultura e de procedimentos rotineiros, como preparo de meio, repicagem e aclimatização (PENCHEL et al., 2007).

Estudos recentes mostraram como diferentes níveis de comprimento de onda influenciam em diversos metabolismo nas plantas. Luz azul (450 – 495 nm), vermelho (620 – 750 nm), vermelho extremo (750 – 850 nm) e verde (495 -570) atuam na morfogênese *in vitro*, crescimento e desenvolvimento da planta. (GUPTA e JATOTHU, 2013; GOLOVATSKAYA e KARNACHUK 2015; WANG et al., 2015; ZIENKIEWICZ et al., 2015; HERINGER et al.,

2017). O uso de lâmpadas de diodos emissores de luz (LED) no vegetal parece ser vantajosa em relação as fluorescentes, uma vez que os LEDs podem fornecer luz com mais eficiência, através de pontos particulares do espectro de luz (GUPTA e JATOTHU, 2013). Por causa disso, nos últimos anos, os LEDs estão sendo a fonte de luz predominante em câmaras de crescimento e biorreatores para melhorar o desenvolvimento de plantas *in vitro* (YEH e CHUNG, 2009).

Considerando a importância que o gênero *Corymbia* e seus híbridos representam atualmente para o setor florestal, a obtenção de um protocolo eficiente e repetível quanto à propagação vegetativa, será essencial para estabelecer condições racionais para propagação dessas plantas, refletindo diretamente na produção comercial de mudas clonais nas empresas florestais, produtores e instituições de pesquisas.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da fonte de luz na introdução *in vitro* de clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* pela técnica de micropropagação via proliferação de gemas axilares.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Localização do estudo e material experimental

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa – UFV, localizado no município de Viçosa/MG.

O material utilizado para obtenção dos explantes foi proveniente de minicepas de três clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (TC01, TC02, TC03) e um de *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01), oriundos da empresa CMPC – Celulose Riograndense, localizado no município de Guaíba/RS.

As minicepas foram estabelecidas em minijardim clonal, sob sistema semi hidropônico de canaletão de areia, no Viveiro de Pesquisas do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG. As plantas receberam solução nutritiva por gotejamento, aplicada quatro vezes ao dia, numa vazão total diária de 4 L m⁻². A solução nutritiva foi composta de nitrato de cálcio (0,920 g L⁻¹), cloreto de potássio (0,240 g L⁻¹), nitrato de potássio (0,140 g L⁻¹), monoamônio fosfato (0,096 g L⁻¹), sulfato de magnésio (0,364 g L⁻¹), hidróferro (0,040 g L⁻¹), ácido bórico (2,800 mg L⁻¹), sulfato de zinco (0,480 mg L⁻¹), sulfato de

manganês ($1,120 \text{ mg L}^{-1}$), sulfato de cobre ($0,100 \text{ mg L}^{-1}$) e molibdato de sódio ($0,040 \text{ mg L}^{-1}$). A condutividade elétrica da solução nutritiva foi mantida em torno de $2,0 \text{ mS m}^{-2}$.

2.2. Coleta e preparo dos explantes

Foram coletadas brotações (Figura 1A) provenientes da segunda coleta (primeira introdução) e da quarta coleta (segunda introdução), correspondendo a 60 e 120 dias após a poda do ápice das minicepas, respectivamente. Segmentos nodais medindo entre 3 e 4 cm foram coletados retirando-se as folhas do terceiro e quarto nós, a partir do ápice das brotações (Figura 1B). Posteriormente, os explantes foram imersos em água deionizada autoclavada e transportados ao laboratório de cultura de tecidos. Durante todo o processo, os equipamentos utilizados foram desinfestados com solução de álcool a 70 % (v/v).

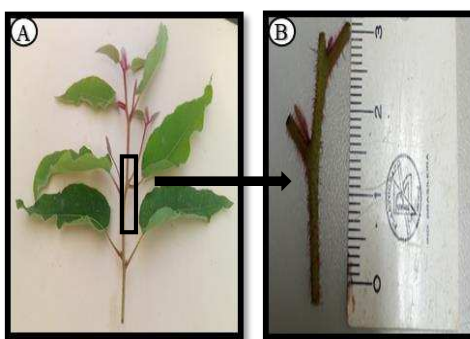


Figura 1. Obtenção de explantes para introdução *in vitro* de clones híbridos de *Corymbia*: (A) brotação recém coletada das minicepas, destacando a porção utilizada para obtenção dos explantes; (B) segmento nodal após preparo.

2.3. Introdução *in vitro*

Os segmentos nodais foram lavados por cinco vezes em água corrente e imersos em solução fungicida contendo $2,4 \text{ g L}^{-1}$ de Orthocide 500[®] (Captan 50 % como princípio ativo) durante 15 minutos. Posteriormente, foram lavados por cinco vezes em água desionizada autoclavada e imersos em solução de álcool a 70 % (v/v) por 30 segundos com agitação constante, dentro da câmara de fluxo laminar horizontal. Em seguida, foram imersos em solução de NaOCl a 1 % (v/v) Clarix[®], acrescida de Tween 20 (3 gotas/100 mL de solução) durante 15 minutos. Finalmente, os segmentos nodais foram lavados em água deionizada autoclavada, por cinco vezes e os explantes preparados e inoculados verticalmente, sob condições assépticas, em tubos de ensaio de 15 cm x 2,5 cm, contendo 10 mL de meio de cultura.

O tempo desde a coleta dos explantes, em condições de campo, até a inoculação em meio de cultura foi inferior a três horas. Durante a coleta, o transporte e intervalos entre a desinfestação e inoculação, os explantes foram mantidos imersos em água desionizada autoclavada para evitar a desidratação.

O meio de cultura utilizado foi o JADS (CORREIA, 1995) adicionados de 0,5 mg L⁻¹ de BA (6-benziladenina – Sigma Co.), 0,1 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético – Sigma Co.), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma Co.), 800 mg L⁻¹ de PVP30 (Polivinilpirrolidona – Synth Ltda), 30 g L⁻¹ de sacarose (Synth Ltda) e 6 g L⁻¹ de ágar (Merck S.A.). O meio de cultura foi preparado utilizando água deionizada e o pH ajustado para 5,8 ± 0,05 com NaOH (0,1 M) e HCl (0,1 M), antes da autoclavagem e da adição do ágar. A autoclavagem do meio de cultura foi realizada à temperatura de 121° C e pressão de aproximadamente 1 kgf cm⁻², durante 20 minutos.

Foram utilizados três clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (TC01, TC02, TC03) e um de *Corymbia. citriodora* x *C. torelliana* (CT01) para realização de duas introduções *in vitro*.

2.4. Fonte de luz

Após inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2 °C por um fotoperíodo de 16 horas de luz e irradiância de 80 μmol m⁻² s⁻¹ (quantificada por radiômetro, LI-COR®, LI-250A Light Meter), sendo testados três fontes de luz diferentes: Lâmpada fluorescente (HO Sylvania T12, 110 W, São Paulo, Brasil), Lâmpada LEDs branco (SMD 100, 18 W, Vilux®, Vitória, ES, Brasil) e Lâmpada LEDs vermelho/azul (LabPARLL-HR / DB-480, 11,6 W, LabLumens®, Carapicuíba, SP, Brasil). Para o tratamento testemunha os explantes foram mantidos durante sete dias no escuro e posteriormente transferidos para Lâmpada fluorescente (HO Sylvania T12, 110 W, São Paulo, Brasil). Os espectros de luz foram obtidos por espectroradiômetro (Ocean Optics Spectra-Suite, Ocean Optics, Dunedin, FL) (Figura 2).

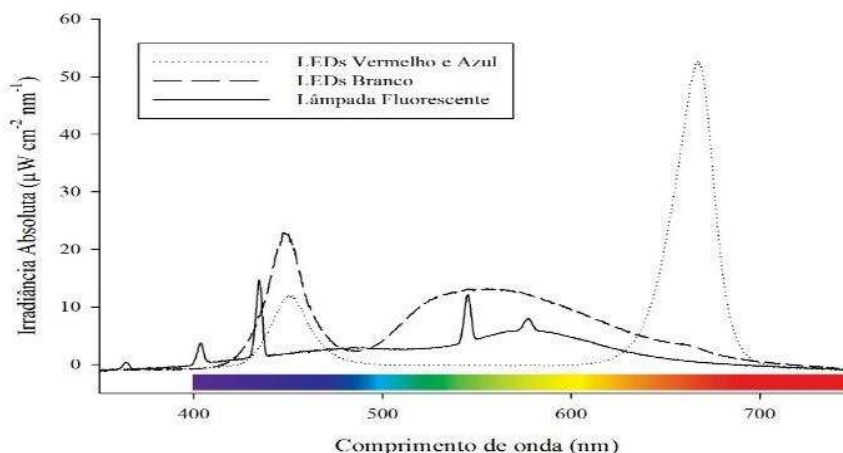


Figura 2. Variações da irradiância absoluta ($\mu\text{W cm}^{-2} \text{nm}^{-1}$) e do comprimento de onda (nm) de luz emitido pelas Lâmpadas fluorescentes (HO Sylvania T12, 110 W), LEDs brancos (Vilux[®] SMD 100, 18 W) e LEDs vermelho/ azul (LabPAR LL-HR / DB-480, 11,6 W) utilizadas na experimentação de indução em explantes na condição *in vitro* de clones híbridos de *Corymbia*, obtidas na sala de crescimento do LCT – II, BIOAGRO/UFV.

2.5. Delineamento e avaliações experimentais

O experimento foi conduzido em arranjo fatorial 4 x 4, no delineamento inteiramente casualizado, sendo quatro clones híbridos de *Corymbia* (três clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (TC01, TC02, TC03) e um de *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01)) e quatro fontes de luz: Escuro / Lâmpada fluorescente (E/LF), Lâmpada fluorescente (L/F), Lâmpada LEDs branco (L/B) e Lâmpada LEDs vermelho/azul (V/A), com quatro repetições, compostas de parcelas com oito explantes.

Aos 30 dias após a inoculação, foram avaliadas as características porcentagem média de contaminação, oxidação, explantes não reativos, comprimento de brotos maiores que 0,5 cm e o número médio de brotações por explante maiores que 0,5 cm.

2.6. Análise de dados

As análises foram processadas em software R, versão 3.0.3 (R Core Team, 2014), com auxílio do pacote ExpDes, versão 1.1.2 (FERREIRA et al., 2013). Os dados dos dois subcultivos na fase de introdução *in vitro* foi feita a média geral. As variáveis contaminação, oxidação, explante não reativo, comprimento e número de brotos não apresentaram distribuição normal

perante teste de Shapiro-Wilkem a 5 % de significância, sendo transformados em arcsen e, respectivamente; e para as variáveis significativas, foi feito o teste Tukey a 5 % significância.

3. RESULTADOS

O aspecto dos explantes, com relação às características estudadas, pode ser observado na Figura 3, indicando diferença na resposta entre clones, bem como nas diferentes fontes de luz utilizadas na introdução *in vitro* de clones híbridos de *Corymbia*.

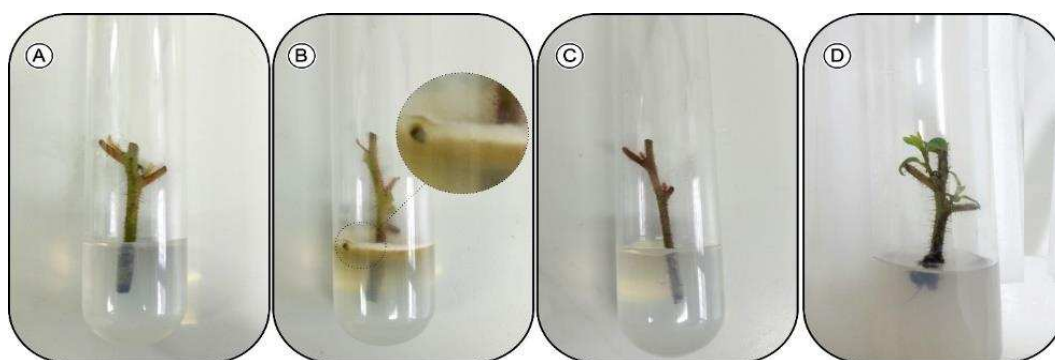


Figura 3. Explantes de clones híbridos de *Corymbia*, aos 30 dias após a inoculação na condição *in vitro*: (A) explante não responsivo; (B) explante contaminado; (C) explante oxidado; (D) explante reativo. Barra = 1 cm.

Na porcentagem de contaminação, observou para os clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (TC01, TC02 e TC03) e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01) a menor média de 5,46% diante da fonte de luz LEDs vermelho/azul (Figura 4A). Já na comparação entre clones não foi observado diferença ($p > 0,05$) (Figura 4B).

Em relação à oxidação fenólica dos explantes, também observou que os quatro clones avaliados diferiram entre as fontes de luz (Figura 4C), tendo a fonte de luz LEDs vermelho/azul com menor média de 2,34%. Já para as condições entre clones os valores foram bem próximos (Figura 4D), não havendo diferença significativa ($p > 0,05$).

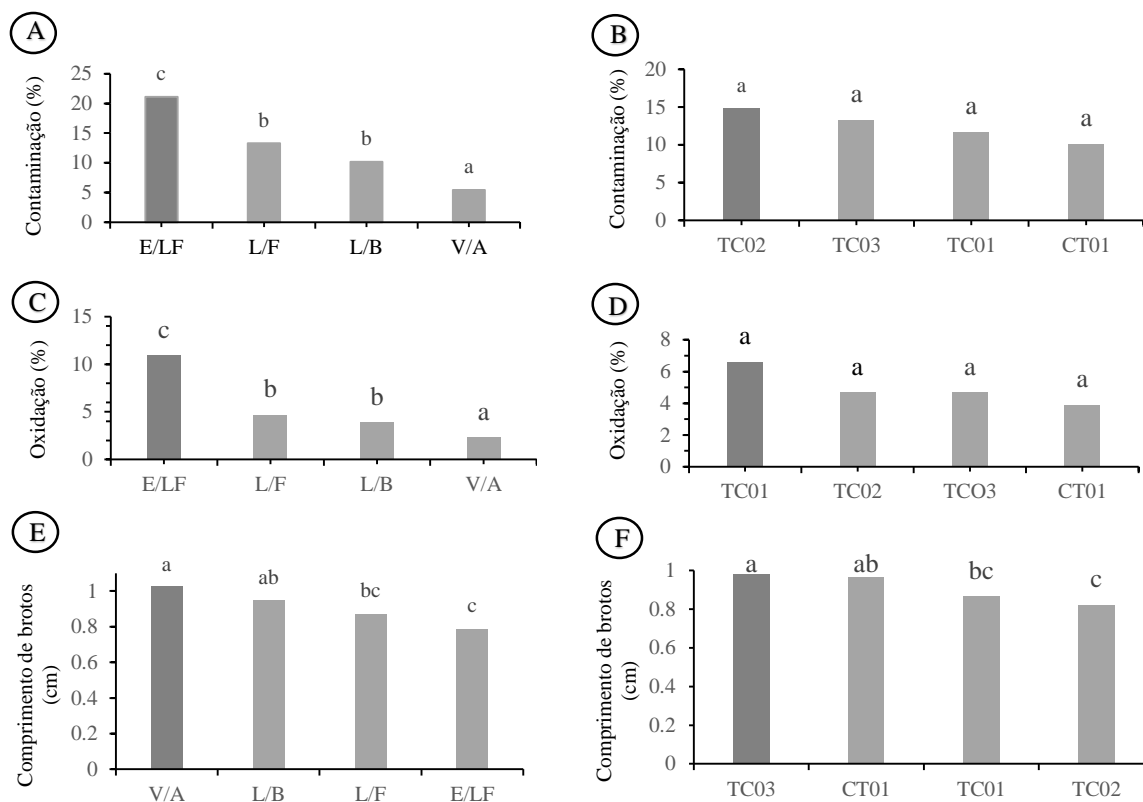


Figura 4. Características observadas na introdução *in vitro* em função das diferentes fontes de luz (E/LF, L/F, L/B e V/A) e clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (TC01, TC02 e TC03) e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01). **(A)** Porcentagem de contaminação em função das diferentes fontes de luz; **(B)** Porcentagem de contaminação em função dos clones híbridos; **(C)** Porcentagem de oxidação em função das diferentes fontes de luz; **(D)** Porcentagem de oxidação em função dos clones híbridos **(E)** Comprimento das brotações em função das diferentes fontes de luz; **(F)** Comprimento das brotações em função dos clones híbridos. *Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Neste sentido, pode-se observar que na combinação de LEDs vermelho/azul foi determinante para a menor porcentagem de contaminação e oxidação, independente dos clones analisados. Por outro lado, os maiores valores para a porcentagem de contaminação e oxidação fenólica foram obtidos na fonte de luz do Escuro/lâmpada fluorescente.

A característica comprimento de brotos maiores que 0,5 cm, observou-se um comportamento variado, tanto entre clones, quanto entre fonte de luz, com diferença significativa ($p < 0,05$) em ambos.

Os brotos (em média $> 0,5$ cm) dos explantes advindos da fonte de luz LEDs vermelho/azul apresentaram maior comprimento (em média 1,02 cm), superior ao tratamento

contendo a luz com Lâmpada fluorescente e Escuro/lâmpada fluorescente. Já para a luz de LEDs branco, não apresentou diferença significativa (Figura 4E).

Entre os clones analisados, o clone TC03 apresentou diferença estatística com maior comprimento de brotos (média 0,98 cm), em comparação com o clone TC02 e ao clone TC01 (Figura 4F). Já o clone CT01 apresentou resposta semelhante ao TC03.

Ao número de brotos maiores que 0,5 cm por explante apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) sob os diferentes tratamentos de fontes de luz, bem como os clones.

De modo geral as fontes de luz LEDs vermelho/azul e LEDs branco apresentaram resultados que proporcionaram maior número de brotos por explante (Figura 5A).

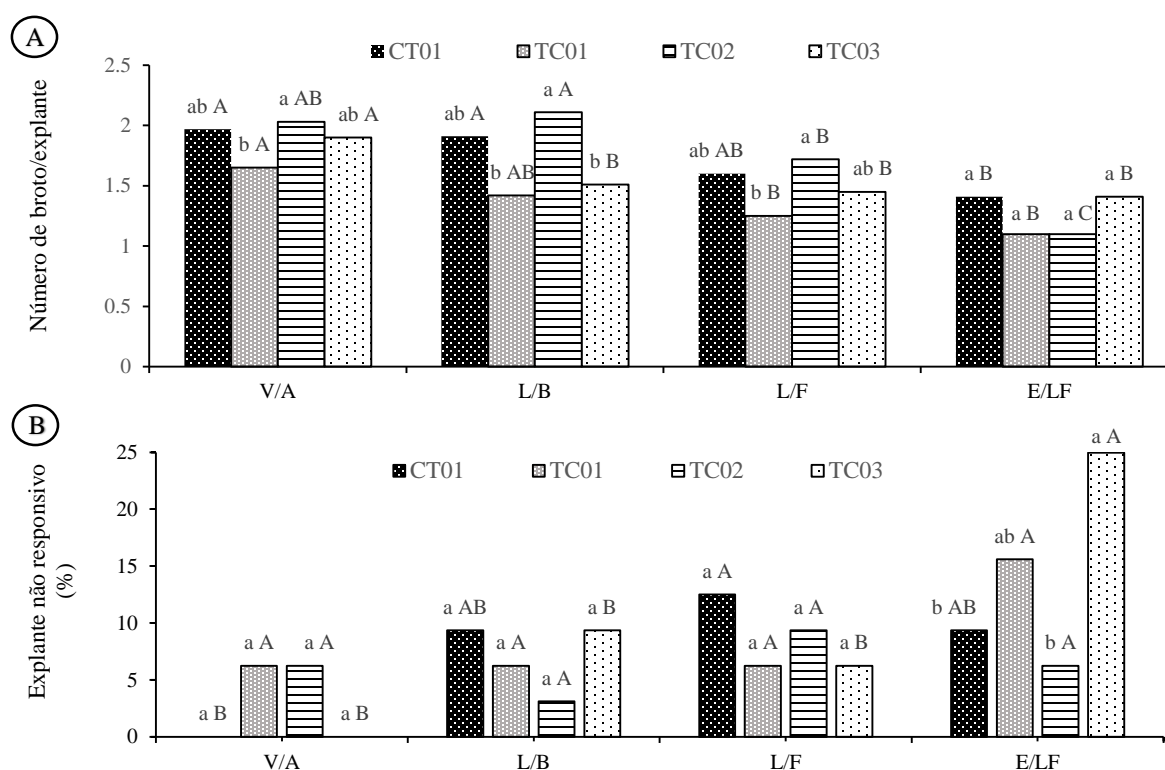


Figura 5. Características observadas na introdução *in vitro* em função das diferentes fontes de luz (E/LF, L/F, L/B e V/A) e clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (TC01, TC02 e TC03) e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01). (A) Número de brotos por explante; (B) Porcentagem de explante não responsivo. Letras minúsculas representam diferenças estatísticas comparando-se os diferentes clones no mesmo tratamento (luz). Letras maiúsculas representam diferenças estatísticas comparando-se os tipos de luz no mesmo tratamento (clone). *Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Os tratamentos envolvendo porcentagem de explantes não responsivos apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) sob as diferentes fontes de luz, bem como os clones. Em relação

ao processo de resposta na indução de brotações nos explantes aos 30 dias após a inoculação, baixos percentuais de explantes sem brotações foram obtidos, sendo que os clones CT01 e o TC03 foram os mais responsivos com 100 % (Figura 5B). As porcentagens foram bem próximas para os clones, não havendo diferença.

Para a melhor fonte de luz dentre os clones, foi observado os clones CT01, TC01 e TC03 com a luz de LEDs vermelho/azul obteve menores porcentagens de explantes não responsivos (Figura 5B). Já para o clone TC02 a menor média de explantes não responsivos foi em detrimento do uso da luz LEDs branco. Por outro lado, as fontes de luz lâmpada fluorescente e escuro/lâmpada fluorescente proporcionaram maior número de explantes não responsivos se comparados aos demais tratamentos.

A fonte de luz teve influência direta sobre o desenvolvimento dos explantes de clones híbridos de *Corymbia*, onde a luz LEDs vermelho/azul proporcionou os melhores resultados baseado em uma menor oxidação, contaminação, maior comprimento, número de brotos e explantes reativos.

4. DISCUSSÃO

A fonte de luz utilizada no cultivo *in vitro* dos explantes teve influência direta na contaminação sobre os clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. Citriodora* e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana*. Neste contexto, a luz LEDs vermelho/azul, mostrou-se melhor resposta, devido à menor porcentagem de contaminação em relação aos demais tratamentos avaliados.

A luz azul é um dos sinais ambientais mais importantes para vários organismos, visto que regula seus processos de desenvolvimento fisiológico via fotorreceptores (SANO et al., 2009). De acordo Kurtzman e Martínez-carrera (2013), vários organismos receptores de luzes azuis e vermelhas absorvem fótons e transduzem a energia para dentro das células regulando as fotorespostas fúngicas através da expressão genética diferencial, na biossíntese de carotenóides e agregação de hifas. A via metabólica dos microorganismos também pode estar sujeita à regulação pela luz (TISCH e SCHMOLL, 2010).

O controle do ambiente é efetivo na modulação das respostas relacionadas ao metabolito secundário no micélio vegetativo (POSTEMSKY E CURVETTO, 2016). Ellis et al. (1999)

demonstraram que a formação de fungos em *Coprinus stercorarius* possuem requisitos separados para a luz, com ambos mostrando atividade máxima no 440-470-nm, mas com valores de pico ligeiramente diferentes.

A resposta dos clones em relação à oxidação fenólica foi de baixa intensidade, principalmente aqueles com influência direta da qualidade de luz LEDs vermelho/azul. Estes resultados estão próximos aos encontrados por Brondani (2011) que obteve oxidação fenólica inferior a 6 % dos explantes, no estabelecimento *in vitro* de clones de *Eucalyptus benthamii* x *E. dunii*.

A oxidação fenólica tem sido um problema associado com a micropropagação de espécies lenhosas, sendo reportada em diversos trabalhos (PINTO et al., 2008; ALMEIDA et al., 2008; BRONDANI, 2011). Essa ocorre pelo corte que danifica as células dos tecidos, promovendo a liberação de compostos fenólicos precursores da síntese de lignina, os quais modificam a composição do meio de cultivo e a absorção de metabólitos (ANDRADE et al., 2000), podendo levar a morte dos tecidos. Esses resultados podem estar ligados a fatores ambientais internos que afetam o desenvolvimento dos explantes, em que menores frascos tendem a apresentar reduzidas concentrações de dióxido de carbono e elevadas concentrações de etileno, como também podem ser afetados por irradiação de luz, temperatura do ar e umidade relativa (XIAO et al., 2011).

No comprimento de brotos maiores que 0,5 cm, verificou-se que a qualidade de luz afeta o desenvolvimento das brotações dos clones híbridos de *Corymbia*, com alterações significativas no crescimento das brotações. Neste sentido, o uso de lâmpadas de LEDs em culturas *in vitro* têm demonstrado ser vantajosos para a regulação de processos fisiológicos de crescimento, como a fotomorfogênese, acarretando na maior qualidade, produção e desenvolvimento de mudas micropropagadas (GUPTA e JATOTHU, 2013).

Processos do desenvolvimento vegetal são afetados pela variação do vermelho e azul, como promoção no desenvolvimento das brotações de *Cedrela fissilis*, com alterações significativas no alongamento (OLIVEIRA, 2017). Estas alterações podem também ser decorrentes da interação entre a qualidade e quantidade de luz, bem como através de reguladores hormonais (LAU e DENG, 2010).

A flexibilidade de combinar os comprimentos de onda dos LEDs para fotorreceptores pode proporcionar uma maior produção de metabólitos, influenciando a morfologia e o

metabolismo das plantas (MORROW, 2008). Embora, os relatórios anteriores tenham confirmado os efeitos fisiológicos e morfológicos da qualidade da luz LEDs na morfogênese e no crescimento de várias plântulas *in vitro* (LIN et al., 2011; LI et al., 2013), estes resultados do estudo mostraram que a luz LEDs é mais adequada para a morfogênese e crescimento da planta do que a lâmpada fluorescente. No entanto, as respostas variam de acordo com as espécies de plantas.

Neste sentido, os comprimentos de onda com espectros de luz na faixa do vermelho e azul, atuou com maior efetividade na morfogênese, havendo maior comprimento de brotações na introdução *in vitro* de *Corymbia*.

Para o número de brotos observou-se variação entre clones e fontes de luz na introdução *in vitro*. A combinação de LEDs vermelho/azul em *Brassica napuse* e *Dendrobium officinale* observou um maior número de brotos por explante (LIN et al., 2011; LI et al., 2013). Esses mesmos autores relataram que o diodo emissor de luz (LED) é uma alternativa eficaz, especialmente durante a regeneração *in vitro* de brotações. De acordo Silva (2014), a relação vermelho/azul dos LEDs influenciou significativamente a resposta de crescimento *in vitro* de plântulas de mamão, onde o LEDs vermelho estimulou fortemente a produção de brotos por explante.

Harun et al. (2013) trabalhando com *Brassica chinensis* revelou que o tratamento sob a relação de 16:4 vermelho/azul é mais eficaz, aumentando a quantidade de brotos e folha. Similarmente, de LEDs com 30% de azul e 70% de vermelho (HUNG et al., 2015). Em clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* para a qualidade de luz, somente o vigor dos brotos teve influência, tendo a lâmpada com 4 LEDs superior à lâmpada de 2 LEDs e à fluorescente (GALLO, 2015).

Em *Fragaria x ananassa* Duch. foi verificado o melhor desenvolvimento *in vitro* de brotações quando mantidas em lâmpadas no comprimento de onda e maior fluxo luminoso, os LEDs influenciam profundamente respostas fotomorfogênicas de explantes cultivados, como a formação de brotos, embriões somáticos, rizogênese e habilidades fotossintéticas de plantas regeneradas durante a aclimatização em uma variedade de espécies de plantas (MACEDO et al., 2011). Nesse sentido Mengxi et al. (2011) considerou a fonte de luz LEDs vantajoso para a micropropagação, sendo uma fonte alternativa para substituição das lâmpadas fluorescentes.

Seguindo o mesmo padrão das demais características estudadas, o número médio de explantes não responsivos variou entre clones e fontes de luz. De modo geral foi observado que os clones apresentaram altas taxas de explantes com resposta à indução de brotações (entre 75% a 100% de explantes responsivos), uma vez que as brotações são necessárias ao prosseguimento a fase de multiplicação. Apesar de alguns explantes não serem responsivos, alguns se mantinham vivos, observado pela manutenção da coloração verde (ERIG e SCHUCH, 2005).

Kapoor e Chauhan (1992) encontraram média de 72 % de explantes responsivos em um híbrido de *Eucalyptus torelliana* x *E. citriodora*; Yang et al. (1995) obtiveram até 100 % de explantes com brotações em *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* e Borges (2011) encontrou 95% de explantes com brotação em um híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *E. globulus*. Em contrapartida, Gomes e Canhoto (2003) obtiveram média de 10 % de explantes com brotações para segmentos nodais de *Eucalyptus nitens*. Dessa forma, observa-se resultados variados para explantes não responsivos na fase de introdução *in vitro*, variando em função do material vegetal (genótipo) e das condições de cultivo utilizadas.

De acordo com Sharma e Ramamurthy (2000) para o sucesso da micropropagação é necessário que apenas alguns explantes emitam brotações livres de contaminação. No entanto, quando se necessita de grande quantidade de material micropropagado, maiores taxas de explantes com brotações podem ser necessárias para aumentar rapidamente a quantidade de material produzido.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho para os clones híbridos *Corymbia torelliana* x *C. Citriodora* (TC01, TC02, TC03) e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01), pode-se concluir que, em virtude da metodologia adotada para a proliferação das gemas axilares, a fonte de luz LEDs vermelho/azul demonstrou ser a mais adequada para a fase de introdução *in vitro*, tendo influência direta sobre o desenvolvimento dos explantes de clones híbridos de *Corymbia*, baseado em uma menor taxa de oxidação e contaminação, maior comprimento de brotos, número de brotações por explante e explantes reativos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J. R.; MARTINS, C. R.; DUTRA, L. F. Desinfestação de segmentos nodais de *Eucalyptus dunnii* visando estabelecimento *in vitro*. **Revista da FZVA**, v. 15, p. 54-60, 2008.
- ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. Alli.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, p. 174-180, 2000.
- BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; GROSSI, F.; HANSEL, F.A.; ARAUJO, M.A. Micropropagation of an *Eucalyptus* hybrid (*Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.33, p. 655-663, 2011.
- BORGES, S.R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L.S.; MELO, L.A.; ROSADO, A.M. Enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Rev Árvore**, v.35, p.425-434, 2011.
- CORREIA, D.; GONÇALVES, A.N.; COUTO, H.Z.do.; RIBEIRO, M.C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. **IPEF**, n.48/49, p.107-116, 1995.
- ELLIS, R.J., BRAGDON, G.A., SCHLOSSER, B.J., **Properties of blue light requirements for primordia initiation and basidiocarp maturation in *Coprinus stercorarius***. **Mycol**, v.103, p.779–784, 1999.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Estabelecimento *in vitro* de Mirtilo a partir de segmentos nodais. **Scientia Agrária**, v. 6, p. 91-96, 2005.
- FERREIRA, E.B.; CAVALCANTI, P.P.; NOGUEIRA, D.A. **ExpDes: Experimental Designs package**. R package version 1.1.2. 2013.
- GALLO. R. **Produção de microestacas de clones híbridos de *Eucalyptus* spp. pela micropropagação**. 2015. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. Micropropagation: uses and methods. **In *Plant propagation by tissue culture***, v.29, 64p, 2008.
- GOLOVATSKAYA, I.F.; KARNACHUK, R.A.; Role of green light in physiological activity of plants. **Russ J Plant Physiol**, v.62, p.727–740, 2015.
- GOMES, F.; CANHOTO, J. M. Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (shining gum). **In *Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant***, v. 39, p. 316–321, 2003.
- GUPTA, S.D.; JATOTHU. B. Fundamentals and applications of lightemitting diodes (LEDs) *in vitro* plant growth and morphogenesis. **Plant Biotechnol Rep**, v.7, p.211–220, 2013.

HARUN, A.N.; ANI, N.N.; AHMAD, R.; AZMI, N.S. Red and blue LED with pulse lighting control treatment for *Brassica chinensis* in indoor farming. In: Open systems (ICOS), 2013 **IEEE conference**, p.231–236, 2013.

HUNG, C. D.; HONG, C. H.; JUNG, H. B.; KIM, S. K.; VAN KET, N.; NAM, M. W.; CHOI, D.H.; LEE, H. I. Growth and morphogenesis of encapsulated strawberry shoot tips under mixed LEDs. **Scientia Horticulturae**, v.194, p.194-200, 2015.

HERINGER, A. S.; REIS, R. S.; PASSAMANI, L. Z.; SOUZA-FILHO, G. A.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. Comparative proteomics analysis of the effect of combined red and blue lights on sugarcane somatic embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.39, p.52, 2017.

LAU, O. S.; DENG, X. W. Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones. **Current opinion in plant biology**, v.13, p.571-577, 2010.

LI, H.M.; TANG, C.; XU, Z. The effects of different light qualities on rapeseed (*Brassica napus* L.) plantlet growth and morphogenesis *in vitro*. **Sci. Hortic**, v.150, p.117-124, 2013.

LIN, Y.; LI, J.; LI, B.; HE, T.; CHUN, Z. Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* *in vitro*. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v.105, p.329-335, 2011.

KAPOOR, M. L.; CHAUHAN, M. S. *In vitro* clonal propagation of mature *Eucalyptus* F1 hybrid (*E. torelliana* F. V. Muell x *E. citriodora* Hook). **Silvae Genetica**, v. 41, p. 305-307, 1992.

KURTZMAN, J.R.R.H.; MARTÍNEZ-CARRERA, D. Light, what it is and what it does for mycology. **Micol**, v.25, p.23–33, 2013.

MACEDO, A.F.; M.V. LEAL-COSTA.; E.S. TAVARES, C.L.S. LAGE.; M.A. ESQUIBEL. The effect of light quality on leaf production and development of *in vitro* cultured plants of *Alternanthera brasiliana* Kuntze. **Environ. Exp. Bot**, p. 43–50, 2011.

MENGXI, L.; ZHIGANG, X.; YANG, Y.; YIJIE, F. Effects of different spectral lights on *Oncidium* PLBs induction, proliferation, and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.106, p.1-10, 2011.

MORROW RC. LED lighting in horticulture. **HortScience**, v.43, p.1947-1950, 2008.

OLIVEIRA, T. R. **Influência dos subcultivos e da qualidade da luz na morfogênese *in vitro* em *Cedrela fissilis* vell. (Meliaceae)**. 2017. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2017.

PASA, M. da S. Qualidade de luz e fitorreguladores na multiplicação e enraizamento *in vitro* da amoreira-preta 'Xavante'. **Ciência Rural**, v.42, p.1392-1396, 2012.

PENCHEL, R.M.; OTONI, W.C.; XAVIER, A. Tecnologia de biorreatores e propagação in vitro. In: BORÉM, A. (Ed.) **Biotecnologia florestal**. Viçosa: UFV, p.75-92, 2007.

PINEDO, D. N. H.; GRAÇA, M. E. C.; ARAÚJO, A.J. **Micropropagação de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus tereticornis***. 6º Congresso Florestal Brasileiro. Campos do Jordão - São Paulo - Brasil, de 22 a 27 de setembro de 1990.

PINTO, G.; SILVA, S.; PARK, Y.-S.; NEVES, L.; ARAÚJO, C.; SANTOS, C. Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill.: basal medium and anti-browning agents. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 95, p. 79-88, 2008.

POSTEMSKY, P.D.; CURVETTO, N.R. *In vitro* studies of secondary metabolite-related responses in some species of genus *Grifola* (Agaricomycetes) from Argentina. **Int. J. Med. Mushrooms** v.18, p.355–363, 2016.

SANO, H., KANEKO, S.; SAKAMOTO, Y.; SATO, T.; SHISHIDO, K. The basidiomycete mushroom *Lentinula edodes* white collar-2 homolog PHRB a partner of putative blue-light photoreceptor PHRA, binds to a specific site in the promoter region of the *L. edodes* tyrosinase gene. **Fungal Genet Biol**, v.46, p.333–341, 2009.

SHARMA, S.; ARYA, I. D.; ARYA, S. Micropropagation of superior eucalyptus hybrids FRI-5 (*Eucalyptus camaldulensis* Dehn x *E. tereticornis* Sm) and FRI-14 (*Eucalyptus torelliana* F.V. Muell x *E. citriodora* Hook): A commercial multiplication and field evaluation. **African Journal of Biotechnology**, v.8, p.5718-5726, 2009.

SHARMA, S. K.; RAMAMURTHY, V. Micropropagation of 4-year-old elite *Eucalyptus tereticornis* trees. **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 511-518, 2000.

SILVA. Photoauto-, Photohetero- and photomixotrophic in vitro propagation of papaya (*Carica papaya* L.) and response of seed and seedlings to light-emitting diodes. **Tham Int J Sci Technol**, v.19, p.57–71, 2014.

TISCH, D.; SCHMOLL, M. Light regulation of metabolic pathways in fungi. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v.85, p.1259–1277, 2010.

WANG, X.Y.; XU, X.M.; CUI, J. The importance of blue light for leaf area expansion, development of photosynthetic apparatus, and chloroplast ultrastructure of *Cucumis sativus* grown under weak light. **Photosynthetica**, v.53, p.213–222, 2015.

WENDLING, I.; TRUEMAN, S.J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry – part I: concepts, regulation and consequences of phase change. **New For**, v.45, p.449-471, 2014a.

WENDLING, I.; TRUEMAN, S.J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry – part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. **New For**, v.45, p.473-486, 2014b.

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

YANG, J.-C.; CHUNG, J.-D.; CHEN, Z.-Z. Vegetative propagation of adult *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* and comparison of growth between micropropagated plantlets and rooted cuttings. **Plant Cell Reports**, v. 15, p. 170-173, 1995.

YEH, H; CHUNG, J.P. High-brightness LEDs—energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. **Renew Sust Energ Rev**, v.13, p.2175–2180, 2009.

ZIENKIEWICZ, M; DROZAK, A; WASILEWSKA, W.; BACŁAWSKA, I.; PRZEDPEŁSKA-WASOWICZ, E.; ROMANOWSKA. The short-term response of *Arabidopsis thaliana* (C3) and *Zea mays* (C4) chloroplasts to red and far red light. **Planta**, v.242, p.1479–1493, 2015.

**INFLUÊNCIA DA FONTE DE LUZ E DO REGULADOR DE CRESCIMENTO
BA NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE CLONES HÍBRIDOS DE *Corymbia*
PELA MICROPROPAGAÇÃO**

RESUMO: Na busca por alternativas para o rejuvenescimento/revigoramento de clones selecionados de *Corymbia*, e conseqüentemente a melhoria do enraizamento adventício no processo de produção de mudas clonais, a micropropagação pela proliferação de gemas axilares tem sido recomendada por ser uma das técnicas mais eficiente para tal propósito. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da fonte de luz, do regulador de crescimento BA e do número de subcultivos na multiplicação *in vitro* de clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (TC01, TC02 e TC03) e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01) pela técnica de micropropagação pela proliferação por gemas axilares. Para a iniciação da fase de multiplicação, as brotações produzidas na fase de estabelecimento *in vitro* foram preparadas isolando-se uma brotação padronizada de 0,5 cm, com bom vigor vegetativo e inoculadas sob condições assépticas, em meio de cultura JADS. Os efeitos da fonte da luz (LEDs branco, LEDs vermelho/azul e Lâmpada fluorescente) e de diferentes concentrações do regulador de crescimento BA (0,5, 1, 1,5 e 2 mg L⁻¹) foram avaliados em dez subcultivos de multiplicação. Aos 30 dias após a inoculação, foram avaliadas as características de comprimento de brotos, número de brotos por explante, oxidação e vigor das brotações. Com base nos resultados obtidos, o uso de LEDs vermelho/azul foi melhor para todos os clones analisados na multiplicação *in vitro*; os explantes apresentaram resposta eficiente ao estímulo do regulador de crescimento BA, tendo as melhores respostas na concentração de 0,5 mg L⁻¹ para os clones *Corymbia torelliana* x *C. Citriodora* (TC01, TC02 e TC03) e de 1,0 mg L⁻¹ para o clone *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01), a qual promoveu maior número de brotações; quanto ao número de subcultivos, os melhores resultados foi diante no nono subcultivo, no qual conseguiu atingir maiores valores para o número de brotos por explante e vigor.

Palavras-chave: Propagação vegetativa; propagação *in vitro*; LEDs.

1. INTRODUÇÃO

Para espécies arbóreas, a micropropagação como técnica de rejuvenescimento/revigoração vegetativo é dependente do número de subcultivos *in vitro*, do meio de cultura, bem como do balanço hormonal necessários para alcançar melhores respostas quanto ao potencial de enraizamento adventício. Em geral, para o rejuvenescimento de clones selecionados na idade adulta, recomenda-se no mínimo de 10 a 12 subcultivos (DUTRA et al., 2009). Contudo, esse rejuvenescimento/revigoração é progressivo e parcial, bem como dependente da espécie e idade ontogenética do material vegetativo utilizado na micropropagação (XAVIER et al., 2013).

Nos últimos anos aumentou significativamente as pesquisas sobre o gênero *Corymbia*. Como resultado, os métodos de propagação vegetativa melhoraram, maximizando a produção clonal, especialmente pelo rejuvenescimento tecidual (WENDLING et al., 2014a, 2014b). Diante disso, alguns estudos envolvendo a multiplicação *in vitro* de *Corymbia* vêm sendo desenvolvidos (PINEDO et al., 1990; ROTUNDO, 1993; SHARMA et al., 2009; ALMEIDA, 2012). Porém, ainda há necessidade de maior conhecimento do número de subcultivos para rejuvenescimento/revigoração, disponibilidade de luz, bem como do balanço hormonal do meio nutritivo nos recipientes *in vitro*, visando a maximização da produção de brotos no processo de multiplicação clonal.

Um dos principais desafios da multiplicação *in vitro* baseia-se em estabelecer as melhores combinações de elementos em meio de cultura, que proporcionem o crescimento e desenvolvimento adequados dos explantes de espécies lenhosas (OLIVEIRA et al., 2013), bem como ajustar as condições ambientais de cultivo. Para a fase de multiplicação *in vitro*, os reguladores de crescimento mais utilizados são as citocininas, sendo a 6-Benzilaminopurina (BAP) e 6-benziladenina (BA) as mais comuns. Para a formação de brotos *in vitro*, se destaca o uso da 6-benziladenina (BA), uma citocinina utilizada para modular sinais necessários à reprogramação e proliferação de células de gemas laterais. Também atua na superação da dominância apical exercida por auxinas, estimulando o desenvolvimento de gemas axilares, e consequentemente, a formação de brotações (SANTOS et al., 2004; MOHEBALIPOUR et al., 2012; UZELAC et al., 2012; EL-SHOWK et al., 2013).

O controle de fatores ambientais, como a temperatura e luz, também são fatores importantes para a resposta morfogênica *in vitro* (HERINGER et al., 2017). Entre os fatores externos, a luz tem destaque fundamental para espécies fotoautotróficas, atuando na produção de energia pela fotossíntese e como estímulo percebido por fotorreceptores que desencadeiam a fotomorfogênese em plantas (OLLE e VIRSILE, 2013). As diferentes fontes de radiação têm sido o centro de várias pesquisas, em especial quanto aos efeitos da radiação vermelho, vermelho distante e azul sobre o desenvolvimento e fisiologia das plantas (DEMOTES-MAINARD et al., 2016). Convencionalmente as lâmpadas fluorescentes são utilizadas na propagação/multiplicação *in vitro*, porém devido ao menor custo, espectro de luz e outras características, as lâmpadas de LED têm sido propostas como uma alternativa mais viável e promissora (GUPTA e JATOTHU, 2013).

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da fonte de luz, regulador de crescimento BA e o número de subcultivos na fase de multiplicação *in vitro* de clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* pela técnica de micropropagação via proliferação de gemas axilares.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Localização do estudo e material experimental

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa - UFV, localizado no município de Viçosa/MG.

O material utilizado para obtenção dos explantes foi proveniente de minicepas de três clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (TC01, TC02 e TC03) e um de *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01), oriundos da empresa CMPC – Celulose Riograndense, localizado no município de Guaíba/RS.

Para a iniciação da fase de multiplicação, as brotações produzidas na fase de estabelecimento *in vitro* foram preparadas, isolando-se uma brotação padronizada de 0,5 cm com bom vigor vegetativo e inoculadas sob condições assépticas, em tubos de ensaio de 15 cm x 2,5 cm, contendo 10 mL do meio de cultura. Foi usado o meio de cultura JADS (CORREIA, 1995), adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose (Vetec®), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma®), 800

mg L⁻¹ de PVP-30 (polivinilpirrolidona - Vetec®), 0,5 mg L⁻¹ de BA (6-benziladenina – Sigma Co.), 0,01 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético – Sigma®) e 6 g L⁻¹ de ágar (Merck®). O meio de cultura foi preparado utilizando água desionizada e o pH ajustado para $5,8 \pm 0,05$ com NaOH (0,1 M) e HCl (0,1 M), antes da autoclavagem e da adição do ágar. A autoclavagem do meio de cultura foi realizada à temperatura de 121° C e pressão de aproximadamente 1 kgf cm⁻², durante 20 minutos.

2.2. Fonte de luz

Após inoculação no meio JADS (Item 2.1), à fim de comparar os efeitos da qualidade da luz, os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2 °C por um fotoperíodo de 16 horas de luz e irradiância de 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (quantificada por radiômetro, LI-COR®, LI-250A Light Meter), sendo testados três fontes de luz diferentes: Lâmpada fluorescente (HO Sylvania T12, 110 W, São Paulo, Brasil), Lâmpada LEDs branco (SMD 100, 18 W, Vilux®, Vitória, ES, Brasil) e Lâmpada LEDs vermelho/azul (LabPARLL-HR / DB-480, 11,6 W, LabLumens®, Carapicuíba, SP, Brasil). Os espectros de luz foram obtidos por espectrorradiômetro (Ocean Optics Spectra-Suite, Ocean Optics, Dunedin, FL) (Figura 2).

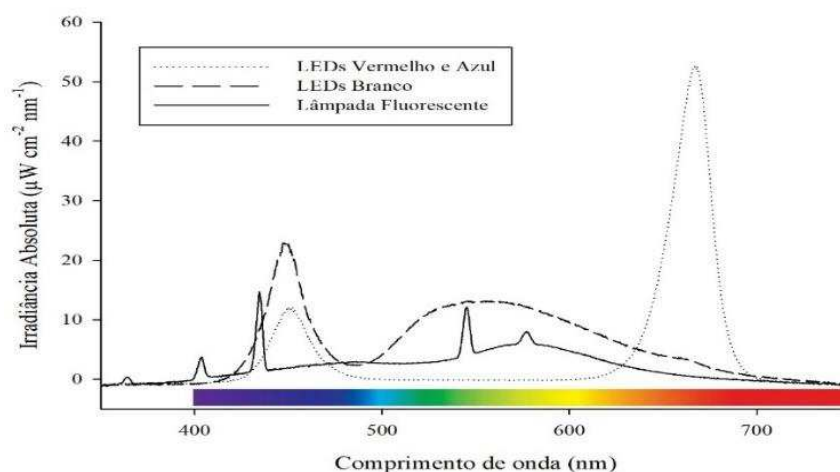


Figura 1. Variações da irradiância absoluta ($\mu\text{W cm}^{-2} \text{nm}^{-1}$) e do comprimento de onda (nm) de luz emitido pelas Lâmpadas fluorescentes (HO Sylvania T12, 110 W), LEDs brancos (Vilux® SMD 100, 18 W) e LEDs vermelho/ azul (LabPAR LL-HR / DB-480, 11,6 W) utilizadas na experimentação da multiplicação em explantes na condição *in vitro* de clones híbridos de *Corymbia*, obtidas na sala de crescimento do LCT – II, BIOAGRO/UFV.

2.3. Regulador de crescimento BA

Com os resultados obtidos no experimento anterior (Item 2.2), para todos os clones analisados foi usado a fonte de luz Lâmpada LEDs vermelho/azul. A inoculação foi feita em meio de cultivo JADS (CORREIA, 1993), constituído de quatro concentrações do regulador de crescimento BA (0,5, 1, 1,5 e 2 mg L⁻¹), adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose (Vetec[®]), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol (Sigma[®]), 800 mg L⁻¹ de PVP-30 (polivinilpirrolidona - Vetec[®]), 0,01 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético – Sigma[®]) e 6 g L⁻¹ de ágar (Merck[®]). O pH do meio de cultura foi ajustado em 5,8 com HCl (0,1 M) ou NaOH (0,1 M), antes da adição do ágar, e autoclavado a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121 °C, por 20 minutos. Os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2 °C por um fotoperíodo de 16 horas de luz e irradiância de 80 µmol m⁻² s⁻¹ (quantificada por radiômetro, LI-COR[®], LI-250A Light Meter).

2.4. Subcultivo

Aos tratamentos que proporcionaram os melhores resultados diante das concentrações de BA (Item 2.3), para os clones TC01, TC02 e TC03 foi usado 0,5 mg L⁻¹ e o clone CT01 1 mg L⁻¹ do regulador de crescimento. Procedeu dez subcultivos das brotações multiplicadas de cada clone para um novo meio de cultura JADS (Item 2.1), de igual composição, a cada 30 dias. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 h e irradiância de 80 µmol m⁻² s⁻¹ (quantificada por radiômetro, LI-COR[®], LI-250A Light Meter), com a fonte de luz Lâmpada LEDs vermelho/azul.

2.5. Delineamento e avaliações experimentais

Visando comparar a fonte de luz, o experimento foi disposto em arranjo fatorial 4 x 3, no delineamento inteiramente casualizado, com quatro clones híbridos de *Corymbia*: três de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (TC01, TC02 e TC03) e um de *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01) e três fontes de luz: Lâmpada fluorescente (L/F), Lâmpada LEDs branco (L/B) e Lâmpada LEDs vermelho/azul (V/A), com quatro repetições, compostas de parcelas com dez explantes.

As concentrações do regulador de crescimento BA, o experimento foi conduzido em arranjo fatorial 4 x 4, no delineamento inteiramente casualizado, com quatro clones híbridos de *Corymbia*: três de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (TC01, TC02, TC03) e um de *Corymbia*

citriodora x *C. torelliana* (CT01) e quatro concentrações do regulador de crescimento BA (0,5, 1, 1,5 e 2 mg L⁻¹), com quatro repetições, compostas de parcelas com dez explantes.

Já para o número de subcultivos o arranjo fatorial foi 4 x 10, em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro clones híbridos de *Corymbia*: três de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (TC01, TC02, TC03) e um de *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01) e dez subcultivos, com quatro repetições, compostas de parcelas com dez explantes.

Aos 30 dias após a inoculação na fase de multiplicação, foram avaliadas nos experimentos: oxidação e vigor (Figura 2A e 2B), comprimento de brotos e o número médio de brotações por explante.

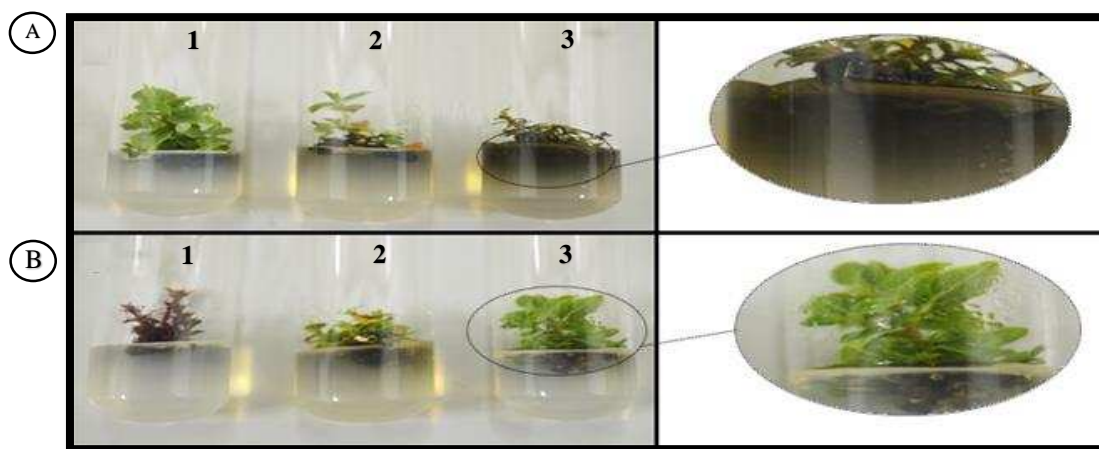


Figura 2. Avaliações de oxidação e vigor de acordo uma escala de notas. **(A)** Oxidação das brotações (1 = Nula: sem oxidação; 2 = Média: reduzida oxidação na base dos explantes (meio de cultura com tom acinzentado); 3 = Alta: oxidação completa das brotações (meio de cultura com tom enegrecido)). **(B)** Vigor das brotações (1 = Baixo: ausência de indução das brotações e, ou, senescência e morte; 2 = Bom: indução de brotações, porém com folhas de tamanho reduzido; 3 = Ótimo: indução de brotações com crescimento ativo, sem deficiência nutricional).

2.6. Análise de dados

As análises foram processadas em software R, versão 3.0.3 (R Core Team, 2014), com auxílio do pacote ExpDes, versão 1.1.2 (FERREIRA et al., 2013). As médias dos tratamentos foram utilizadas para a realização das análises estatísticas e ajustes das equações de regressão. As variáveis de oxidação, vigor, comprimento e número de brotos não apresentaram distribuição normal perante teste de Shapiro-Wilkem a 5 % de significância, sendo transformados em arcsen

e, respectivamente; e para as variáveis significativas, foi feito o teste Tukey a 5 % de significância.

3. RESULTADOS

3.1. Efeito da fonte de luz sobre a multiplicação *in vitro*

De acordo às características estudadas, foi observado diferença na resposta entre clones, bem como nas diferentes fontes de luz utilizadas na multiplicação *in vitro* de clones híbridos de *Corymbia*.

Em relação a variável comprimento de brotos para os explantes aos 30 dias na fase de multiplicação, os maiores valores foram encontrados para o clone CT01 na qualidade de luz vermelho/azul (Figura 3A).

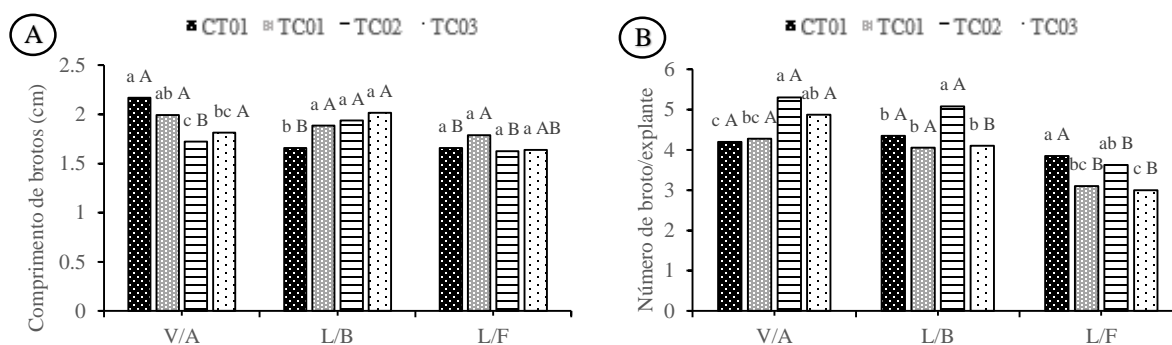


Figura 3. Características observadas na multiplicação *in vitro* em função das diferentes fontes de luz (L/F, L/B e V/A) e clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (TC01, TC02 e TC03) e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01). (A) Comprimento de broto; (B) Número de brotos por explante. Letras minúsculas representam diferenças estatísticas comparando-se os diferentes clones no mesmo tratamento (fonte de luz). Letras maiúsculas representam diferenças estatísticas comparando-se as diferentes qualidades de luz no mesmo tratamento (clone). *Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

As maiores médias para o comprimento das brotações por explante foi encontrado no clone CT01 com a luz de LEDs vermelho/azul, apresentando em média 2,17 cm (Figura 3A). O clone TC01 com a luz LEDs vermelho/azul também obteve valores médios de comprimento de brotações superiores aos demais tratamentos. Em relação ao clone TC02 e TC03 a maior média foi observada com o uso da luz LEDs branco.

Na indução de brotações por explante na etapa de multiplicação para os clones analisados, foi observado que a maior média foi encontrada no clone TC02, apresentando 5,30 brotos (Figura 3B). De modo geral as fontes de luz LEDs vermelho/azul e LEDs branco apresentaram resultados que proporcionaram maior número de brotos por explante

A interação entre as fontes de luz e os clones não foram significativa ($p > 0,05$), para as variáveis oxidação e vigor dos explantes.

O número de explantes oxidados não diferiu quando foram conduzidos sob a luz de LEDs vermelho/azul e LEDs Branco, contudo a LEDs vermelho/azul apresentou menores oxidação se comparadas aos conduzidos pela fonte de luz Lâmpada fluorescente (Figura 4A). Já para as condições de comparação entre clones híbrido de *Corymbia* (Figura 4B), não ocorreu diferença significativa ($p > 0,05$).

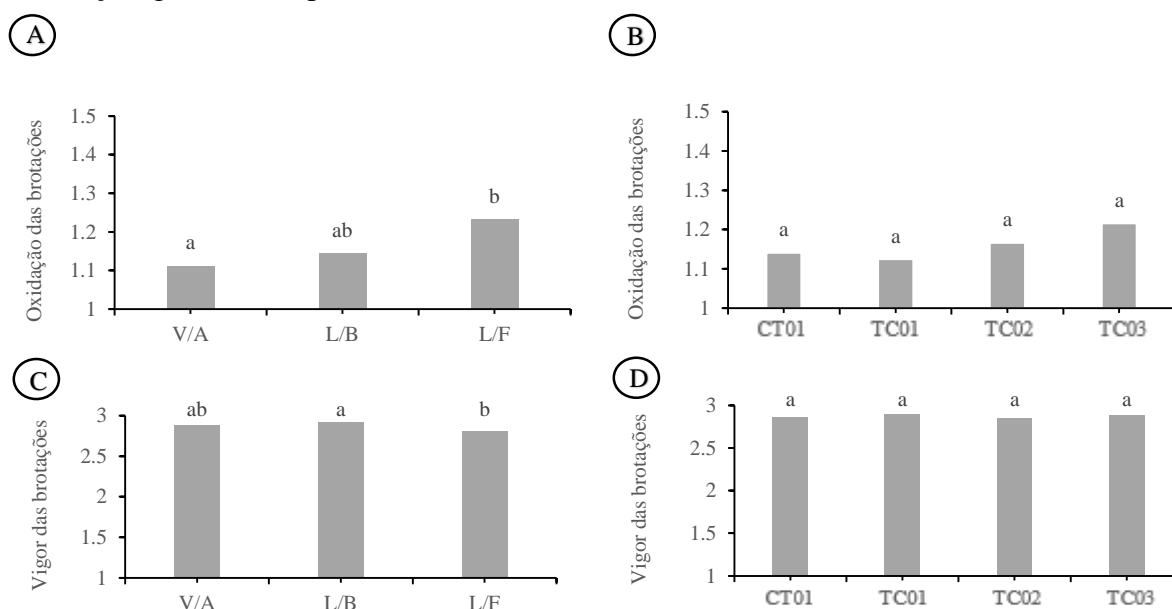


Figura 4. Características observadas na multiplicação *in vitro*. **(A)** Oxidação das brotações em função das diferentes fontes de luz (L/F, L/B e V/A); **(B)** Oxidação das brotações em função dos clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (TC01, TC02 e TC03) e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01); **(C)** Vigor das brotações em função das diferentes fontes de luz (L/F, L/B e V/A); **(D)** Vigor das brotações em função dos clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (TC01, TC02 e TC03) e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01). *Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Em relação ao vigor dos explantes, os melhores resultados foram diante da LEDs Branco com diferença significativa apenas para a Lâmpada fluorescente (Figura 4C). Já para as condições entre clones não houve diferença (Figura 4D).

Neste sentido, pode-se observar que a fonte de luz com LEDs foi determinante para o maior comprimento, número de brotos, oxidação e vigor dos explantes.

3.2. Efeito do regulador de crescimento (BA) sobre a multiplicação *in vitro*

Entre os clones testados, diante dos reguladores de crescimento, observou-se que o clone TC02 apresentou média de 1,85, que superior ao clone TC03 (Figura 5A). Entre as concentrações de BA testadas o comprimento de brotos decresceu com o aumento do regulador de crescimento (Figura 5B).

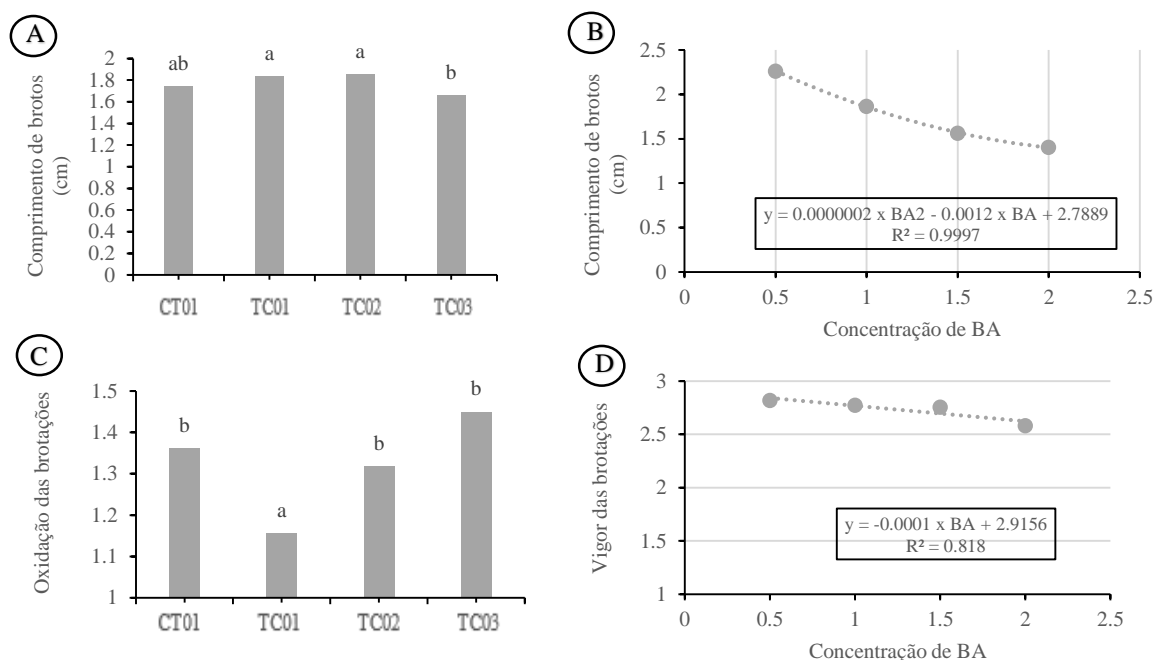


Figura 5. Características observadas na multiplicação *in vitro* dos clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. Citriodora* (TC01, TC02 e TC03) e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01) (A) Comprimento de brotações em função dos clones híbridos; (B) Comprimento de brotações em função de diferentes concentrações de BA; (C) Oxidação das brotações em função dos clones híbridos; (D) Vigor das brotações em função diferentes de concentrações de BA. *Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

O clone TC01 apresentou melhor desenvolvimento das brotações, tendo BA na concentração 0,5 mg L⁻¹ aquela que promoveu resultados positivos quanto ao vigor das brotações (Figura 5D).

Para número de brotações por explante na multiplicação *in vitro*, apresentaram seus fatores (clone e concentrações de BA) com interação significativa ($p < 0,05$). Para os clones

analisados em detrimento das concentrações de BA testadas, verificou-se que, as maiores médias para número de brotações por explante (5,3; 4,4 e 4,77) nos clones CT01, TC01 e TC03 respectivamente, foi com a concentração de 1 mg L⁻¹ (Figura 6A). Em contrapartida para o clone TC02 (em média 4,4 brotos por explante) a concentração de 0,5 mg L⁻¹ obteve os melhores valores. Para os clones analisados em detrimento das concentrações de BA testadas, verificou-se que, os clones TC01, TC02 e TC03 apresentaram comportamento semelhante, independente da concentração de BA. Por outro lado, somente o clone CT01 foi responsivo à concentração de BA, cujo maior número de brotos é estimado na concentração de 1.43 mgL⁻¹ para o clone CT01. (Figura 6B).

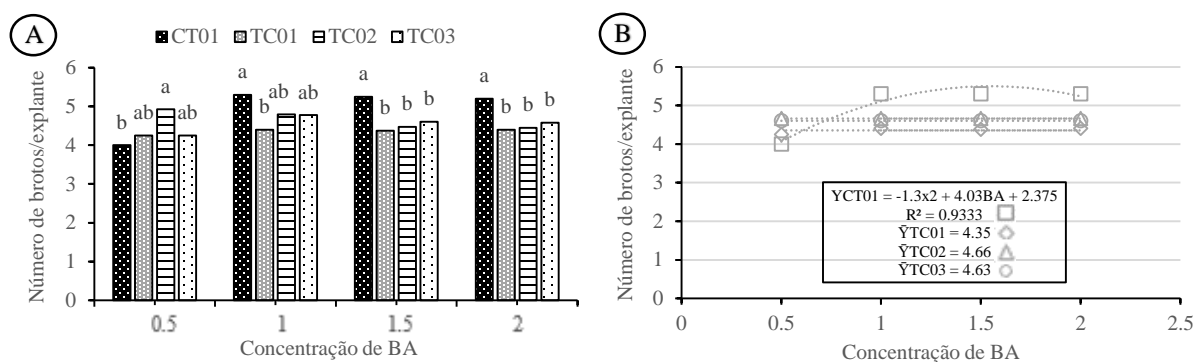


Figura 6. Número de brotos por explante observados na multiplicação *in vitro*. **(A)** Clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. Citriodora* (TC01, TC02 e TC03) e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01); **(B)** Concentrações de BA. *Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

3.3. Efeito do número de subcultivos na multiplicação *in vitro*

As características de comprimento de brotos e oxidação dos explantes observadas na multiplicação *in vitro* apresentaram seus fatores (clone e subcultivo) com interação significativa. Em relação ao número de brotos e vigor dos explantes os fatores atuaram de forma independente.

Os clones TC02 e TC01 se destacaram com maior comprimento de brotos do 3^o ao 7^o subcultivo, porém nos demais não foi observado diferença significativa no comprimento dos brotos entre os clones analisados (Figura 7A).

A curva de regressão diante da correlação dos subcultivo com os clones apresentou comportamento polinomial de segundo grau, no entanto, os pontos críticos para o comprimento das brotações variaram do terceiro a quarto subcultivo, verificando um declínio do tamanho das brotações a partir disso (Figura 7B).

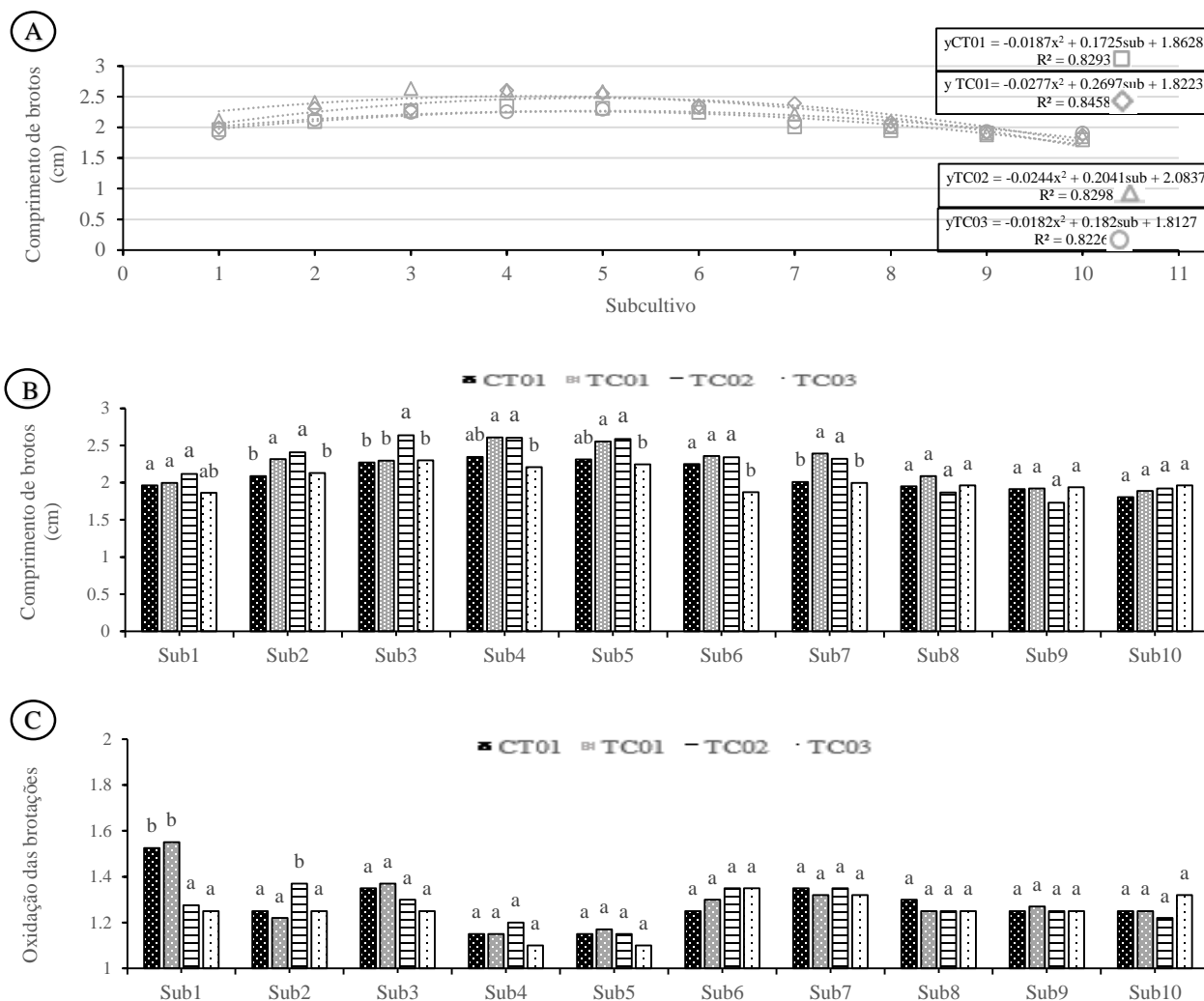


Figura 7. Características observadas na multiplicação *in vitro* dos clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (TC01, TC02 e TC03) e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01). (A) Comprimento de brotações em função do número de subcultivos; (B) Comprimento de brotações em função dos clones híbridos; (C) Oxidação das brotações em função dos clones híbridos. *Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Ao longo dos subcultivos observa-se uma redução significativa na oxidação do 1° ao 4°, porém nos demais não foi observado diferença significativa (Figura 7C). O uso dos clones híbridos CT01, TC01 e TC02 diante do número de subcultivos utilizados, verificou-se as menores médias de oxidação fenólica dos explantes no quarto subcultivo e para o TC03 no quinto subcultivo (Figura 7C).

Para o maior número de brotos e vigor dos explantes dos clones analisados em detrimento dos subcultivos, verificou-se que o ponto crítico foi estabelecido no nono subcultivo. (Figura 6B).

Observou-se variações no número de brotações ao longo dos subcultivos, sendo o maior percentual observado para o clone CT01 (em média 4,15 brotos por explante) (Figura 8A). Os resultados demonstraram diferenças na taxa de multiplicação dos clones analisados em detrimento do número de subcultivos, verificando um aumento gradativo no número de brotos por explante do primeiro ao nono (Figura 8B). Em relação ao vigor dos explantes, os clones que apresentaram os maiores valores foram o CT01 e TC01 (em média 2,74) (Figura 8C). Já para o número de subcultivos os melhores resultados também foram verificados pelo aumento gradativo do primeiro ao nono (Figura 8D).

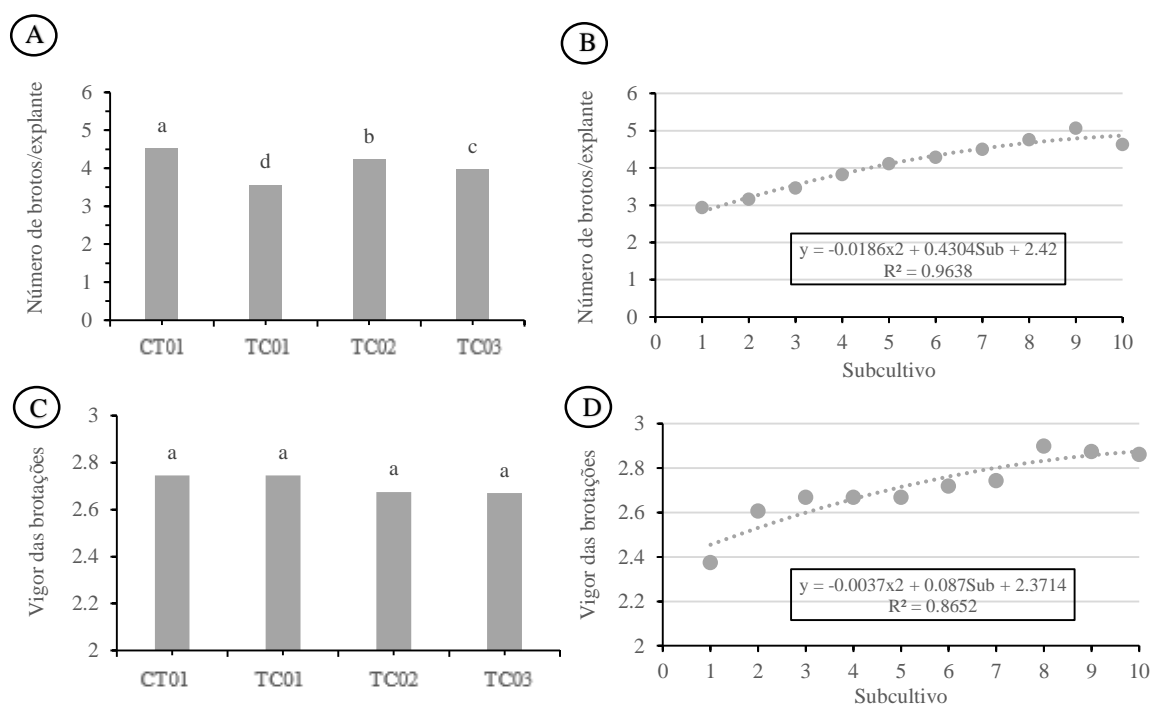


Figura 8. Características observadas na multiplicação *in vitro* dos clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. Citriodora* (TC01, TC02 e TC03) e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01). (A) Número de brotos por explante em função dos clones híbridos; (B) Número de brotos por explante em função de diferentes subcultivos; (C) Vigor das brotações em função dos clones híbridos; (D) Vigor das brotações em função de diferentes subcultivos. *Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

4. DISCUSSÃO

4.1. Efeito da fonte de luz sobre a multiplicação *in vitro*

Verificou-se que a fonte de luz LED foi favorável ao desenvolvimento das brotações na fase de multiplicação para os clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana*, promovendo menor oxidação, maior vigor, comprimento e número de brotos por explante quando comparado a Lâmpada fluorescente. Adicionalmente, estudos têm mostrado o efeito de uso de lâmpadas de LED com espectros específicos de luz nas respostas morfológicas *in vitro* de plantas. A combinação de vermelho e azul, com uso de lâmpadas de LED, tem sido descrito para várias espécies, como para *Cedrela fissilis*, obtendo maior efetividade no crescimento de brotações (OLIVEIRA, 2017). Similarmente, em *Fragaria x ananassa* Duch. foi verificado o melhor desenvolvimento *in vitro* de brotações quando mantidas em lâmpadas de LED com 30% de azul e 70% de vermelho (HUNG et al., 2015). As luzes LED podem eliminar os comprimentos de onda de luz que são inativas para a fotossíntese, causando maior crescimento e desenvolvimento em plantas (GUPTA e JATOTHU, 2013).

Trabalhos envolvendo a multiplicação *in vitro* de *Corymbia* spp. vêm sendo desenvolvidos para otimizar a propagação vegetativa desse gênero (PINEDO et al., 1990; ROTUNDO, 1993; SHARMA et al., 2009; ALMEIDA, 2012). Em amoreira-preta cv. Tupy foi verificado o melhor desenvolvimento *in vitro* ao número brotações quando mantidas em lâmpadas de LEDs vermelho/azul (GOMES da ROCHA et al., 2013). Um estudo de Harun et al. (2013) revelou que o tratamento sob a relação de 16: 4 vermelho/azul é mais eficaz, aumentando a quantidade de brotos e folha. Devido a especificidade no comprimento de onda, os LEDs influenciam profundamente respostas fotomorfogênicas de explantes cultivados, como a formação de brotos, em uma variedade de espécies de plantas (MACEDO et al., 2011).

A resposta dos clones em relação à oxidação fenólica foi de baixa intensidade, principalmente aqueles com influência direta da qualidade de luz LEDs vermelho/azul. Esses resultados podem estar ligados a fatores ambientais internos que afetam o desenvolvimento dos explantes, em que menores frascos tendem a apresentar reduzidas concentrações de dióxido de carbono e elevadas concentrações de etileno, como também podem ser afetados por irradiação de luz, temperatura do ar e umidade relativa (XIAO et al., 2011).

Já o vigor dos explantes apresentaram de bom a ótimo, considerando os valores máximos estimados para essa variável, os clones analisados apresentaram crescimento ativo, sem deficiência nutricional, principalmente aqueles com influência direta da qualidade de luz LEDs. Em clones de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* para a qualidade de luz, somente o vigor dos brotos teve influência, tendo a lâmpada com 4LEDs superior à lâmpada de 2 LEDs e à fluorescente (GALLO, 2015). Resultados similares foi encontrado por Oliveira et al. (2016), em relação a escala de notas para a classificação do vigor, das brotações *in vitro* dos clones de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus globulus*.

4.2. Efeito do regulador de crescimento (BA) sobre a multiplicação *in vitro*

Em relação ao regulador de crescimento BA, nesse estudo permitiu estimular a multiplicação *in vitro*, com o desenvolvimento de brotações, baixos índices de oxidação e um bom vigor vegetativo principalmente com as menores concentrações testadas de 0,5 mg L⁻¹ diante dos clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (TC01, TC02 e TC03) e 1,0 mg L⁻¹ para o *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01).

Quanto a avaliação do comprimento de brotos, verificou-se que a concentração de BA afeta o desenvolvimento das brotações dos clones híbridos de *Corymbia*, com alterações significativas no crescimento das brotações. Os melhores resultados foram observados sob os tratamentos com a concentração de BA 0,5 mg L⁻¹.

Oliveira et al. (2016), trabalhando com multiplicação *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*, verificou que a combinação de BAP 0,5 mg L⁻¹ e ANA 0,01 mg L⁻¹ adotada permitiu estimular o crescimento das brotações, bem como um bom vigor vegetativo. Em *Tectona grandis* os comprimentos da parte aérea dos brotos regenerados, tanto em meio de cultura WPM quanto em MS, os maiores comprimentos foram observados nas menores concentrações de BAP, e os menores comprimentos nas maiores concentrações (JUNIOR et al., 2014).

Em relação ao número de brotos por explante observou-se variação entre clones e concentrações de BA na multiplicação *in vitro*. De acordo com Oliveira et al. (2011) e Gómez et al. (2007), a variação da taxa de multiplicação está relacionada com as condições *in vitro*, bem como relacionada ao balanço de citocininas e auxinas no meio de cultura, visto esse balanço ser bastante variável em função da espécie e do tipo de explante utilizado.

Almeida (2012), trabalhando com *Eucalyptus citriodora* denotou que o aumento gradativo de reguladores de crescimento foi essencial à produção de brotos *in vitro*, uma vez que a adição direta de 0,5 mg.L⁻¹ de benzilaminopurina (BAP) e 0,05 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA) ao meio de cultura, aparentemente promoveu estresse nas microcepas. Na multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus globulus* sob diferentes combinações de ANA e BAP, revelaram que as concentrações próximas a 0,7 mg L⁻¹ de BAP e 0,05 mg L⁻¹ de ANA no meio de cultura WPM, mostraram-se mais eficientes para a obtenção de gemas axilares em quantidade e qualidade adequadas (OLIVEIRA, et al., 2014).

Villa et al. (2006), ao trabalharem com multiplicação *in vitro* de amoreira-preta ‘Brazos’, obtiveram melhores respostas para número de brotações com aplicação de 1,0mg L⁻¹ de BAP ao meio de cultura. De acordo com Cheng et al. (2013), a interação entre baixas concentrações de auxinas e concentrações mais elevadas de citocininas pode favorecer a indução de brotações, por estimular mais ainda as divisões celulares. Resultados contrastantes foi encontrado por Silva et al. (2014) em estudos com espécies lenhosas como a *Caesalpinia pyramidalis*, em que constataram aumento no número de brotações em meio de cultura sem reguladores vegetais, o que evidencia que concentrações mais elevadas dessa citocinina foram inibitórias para o processo de multiplicação.

Para a oxidação dos brotos foi observado um comportamento dos clones de média a nula, considerando os valores mínimos estimados para essa variável. Diante disso foi verificado que a concentração do regulador de crescimento não teve influência nesse estudo, observando apenas diferenças entre os clones avaliados.

Já para o vigor das brotações, foi observado um decréscimo com o aumento gradativo das concentrações de BA. As concentrações de citocininas exógenas aplicadas ao meio de cultivo, devem ser escolhidas cautelosamente, pois, quando a concentração é excedida, pode ser tóxica para o explante, tendo consequências como hiper-hidricidade, inibição, encurtamento de brotos (VASCONCELOS et al., 2012).

Os tratamentos com as concentrações de 1,5 ou 2,5 mg.L⁻¹ de BAP associados com 0,5 mg.L⁻¹ de ANA proporcionaram baixo índice de multiplicação dos explantes, além disso, essas brotações não se desenvolveram satisfatoriamente *Hancornia speciosa* (OLIVEIRA et al., 2016). Também foi observado um decréscimo na porcentagem de sobrevivência conforme o aumento das concentrações de citocinina. A suplementação do meio de cultura com BA é

fundamental para o sucesso da proliferação clonal, pois esta citocinina atua na promoção da morfogênese a partir de tecidos da parte aérea vegetal modulando sinais para reprogramação e proliferação de células de gemas laterais, e também atua na superação da dominância apical exercida por auxinas (UZELAC et al., 2012).

4.3. Efeito do número de subcultivos na multiplicação *in vitro*

Os resultados obtidos neste estudo mostram que o comprimento, oxidação, número de brotos e vigor das brotações, em clones híbridos de *Corymbia* (*Corymbia torelliana* x *C. citriodora* e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana*) foram influenciados pelos subcultivos, nas respostas morfogenéticas *in vitro* de plantas.

Neste contexto, os subcultivos três e quatro, mostraram mais adequados para o crescimento das brotações. Resultados similares foi encontrado por Oliveira et al. (2016), demonstrando variação multiplicação *in vitro* ao longo dos subcultivos, para todos os clones, dificultando distinguir um ponto específico da estabilização. Já em *Cedrela fissilis*, o maior comprimento de brotações foi obtido no primeiro subcultivo, seguido de diminuição ao longo dos demais (OLIVEIRA, 2017).

Para a oxidação das brotações, as respostas dos clones analisados na multiplicação *in vitro* foram observadas de média à nula, considerando os valores mínimos estimados para essa variável. Os resultados diferem dos obtidos por Borges (2011), aonde alguns clones se mostraram recalcitrantes em relação durante a fase de multiplicação *in vitro*, sendo descartados após alguns subcultivos, apresentando sem vigor e necróticos, o que limitou seu cultivo. Brondani (2011) também observou recalcitrância na fase de multiplicação *in vitro* de um clone de *Eucalyptus benthamii* x *E. dunii*, sendo causada pelo elevado índice de oxidação durante a proliferação das gemas. Um dos principais fatores limitantes para a regeneração de explantes é a ocorrência da oxidação fenólica (SILVA et al., 2015), por isso, estratégias que visem a superação ou redução da oxidação fenólica são de extrema relevância.

O número de brotos por explante mostrou tendência de aumento até o nono subcultivo. Para *A. comosus* é observado elevado número de brotos em subcultivos sucessivos (HAMAD e TAHA, 2008). Por outro lado, em *C. fissilis*, foi observada uma redução significativa no número de brotações com o aumento do número de subcultivos nos segmentos nodais cotiledonares a partir do segundo subcultivo (OLIVEIRA, 2017). Dada a sua importância essa variável se

destaca, como ferramenta para avaliar a eficiência da etapa de multiplicação dos explantes nos sucessivos subcultivos (SILVA et al., 2016).

Seguindo o mesmo padrão das demais características estudadas, o vigor dos explantes variou diante dos subcultivos analisados. De modo geral foi observado que os clones apresentaram de bom a ótimo, considerando os valores máximos estimados para essa variável, com crescimento ativo, sem deficiência nutricional, principalmente com aumento gradativo do primeiro ao nono subcultivo. Já para Polesi (2015), estudando a micropropagação de *Eucalyptus benthamii* encontrou os maiores valores para vigor no primeiro subcultivo. As variações entre genótipos também têm sido obtidas em alguns trabalhos quanto a fase de multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus* (BRONDANI, 2012; HARTMANN et al., 2011), demonstrando ser este um fator que exerce grande influência na resposta *in vitro*.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos na fase de multiplicação *in vitro* para os clones híbridos *Corymbia torelliana* x *C. Citriodora* (TC01, TC02, TC03) e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01), pode-se concluir que: 1) O uso de LEDs vermelho/azul foi melhor para todos os clones analisados na multiplicação *in vitro*; 2) os explantes mostraram resposta eficiente ao estímulo do regulador de crescimento BA, sendo a concentração de 0,5 mg L⁻¹ a que apresentou melhor resultado para os clones *Corymbia torelliana* x *C. Citriodora* (TC01, TC02 e TC03) e 1,0 mg L⁻¹ para o clone *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01) promovendo maior número de brotações; 3) Quanto ao número de subcultivos, os melhores resultados foi obtido no nono subcultivo, no qual conseguiu atingir maiores valores para o número de brotos por explante e vigor para os clones avaliados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L.V. **Técnicas para otimização da multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus Citriodora* (Hook) K.D. Hill & L.A.S. Johnson.** 2012. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

BORGES, S.R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L.S.; MELO, L.A.; ROSADO, A.M. Enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Rev Árvore**, v.35, p.425-434, 2011.

BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; GROSSI, F.; HANSEL, F.A. E ARAUJO, M.A. Micropropagation of an *Eucalyptus* hybrid (*Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*). *Acta Scientiarum. Agronomy*, v.33, p. 655-663, 2011.

BRONDANI, G.E.; WIT ONDAS, H.W.; BACCARIN, F.J.B.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. *In Vitro Cell Dev. Biol Plant*, v.48, p.478-487, 2012.

CHENG, Z. J.; WANG, L.; SUN, W.; ZHANG, Y.; ZHOU, C.; SU, Y. H.; LI, W.; SUN, T. T.; ZHAO, X. Y.; LI, X. G.; CHENG, Y.; ZHAO, Y.; XIE, Q.; ZHANG, X. S. Patern of auxin and cytokinin responses for shoot meristema induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by AUXIN RESPNSSES FACTOR 3. *Plant Physiology*, v. 161, p. 240-251, 2013.

CORREIA, D. GONÇALVES, A.N.; COUTO, H.Z.do.; RIBEIRO, M.C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. *IPEF*, n.48/49, p.107-116, 1995.

DEMOTES-MAINARD, S.; PÉRON, T.; COROT, A.; BERTHELOOT, J.; LE GOURRIEREC, J.; PELLESCI-TRAVIER, S.; CRESPEL, L., MOREL, P.; HUCHÉ-THÉLIER, L.; BOUMAZA, R.; VIAN, A.; GUÉRIN, V.; LEDUC, N.; SAKR, S. Plant responses to red and far-red lights, applications in horticulture. *Environmental and Experimental Botany*, v.121, p.4-21, 2016.

DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G.E. A micropropagação de eucalipto. *Pesq Flor Bras*, v.58, p.49-59, 2009.

EL-SHOWK, S.; RUONALA, R.; HELARIUTTA, Y. Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development*, v.140, p.1373-1383, 2013.

FERREIRA, E.B.; CAVALCANTI, P.P.; NOGUEIRA, D.A. **ExpDes**: Experimental Designs package. R packageversion 1.1.2. 2013.

GALLO, R. **Produção de microestacas de clones híbridos de *Eucalyptus* spp. pela micropropagação**. 2015. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

GOMES DA ROCHA, P.S; OLIVEIRA, R.P.; BASTOS, C.R. y SCIVITTARO, W.B. Diodos emissores de luz (LEDs) na micropropagação de amoreira-preta cv. Tupy. *Horticultura Argentina*, v.32, p. 14 – 19, 2013.

GOMÉZ, C.; RÍOS, D.; SÁNCHEZ-OLATE, M. Efecto del subcultivo sucesivo sobre la caulogénesis adventícia de *Eucalyptus globulus*. *Bosque, Valdivia*, v. 28, p. 13-17, 2007.

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.

HAMAD, A. M., TAHA, R. M. Effect of sequential subcultures on in vitro proliferation capacity and shoot formations pattern of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) over different incubation periods. **Scientia Horticulturae**, v.117, p.329-334, 2008.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; JUNIOR DAVIES, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 8.ed. New Jersey: Englewood Clippis, 900 p, 2011.

HARUN, A.N.; ANI, N.N.; AHMAD, R.; AZMI, N.S. Red and blue LED with pulse lighting control treatment for *Brassica chinensis* in indoor farming. In: Open systems (ICOS), 2013 **IEEE conference**, p.231–236, 2013.

HERINGER, A. S.; REIS, R. S.; PASSAMANI, L. Z.; SOUZA-FILHO, G. A.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. Comparative proteomics analysis of the effect of combined red and blue lights on sugarcane somatic embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.39, 52p, 2017.

HUNG, C. D.; HONG, C. H.; JUNG, H. B.; KIM, S. K.; VAN KET, N.; NAM, M. W.; CHOI, D.H.; LEE, H. I. Growth and morphogenesis of encapsulated strawberry shoot tips under mixed LEDs. **Scientia Horticulturae**, v.194, p.194-200, 2015.

JUNIOR, F. P. C. P.; RAPOSO, A.; NAGAO, E. O.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Efeito de diferentes citocininas e sistema de cultura dupla-fase na micropropagação de Teca (*Tectona grandis* L.) estabelecida na Amazônia Sul- Ocidental. **Evidência, Joaçaba**, v. 14 p. 7-20, 2014.

MACEDO. A.F. M.V.; LEAL-COSTA, E.S; TAVARES, C.L.S; LAGE, M.A; ESQUIBEL. The effect of light quality on leaf production and development of in vitro cultured plants of *Alternanthera brasiliana* Kuntze, **Environ. Exp. Bot.** p. 43–50, 2011.

MOHEBALIPOUR, N.; AHARIZAD, S.; MOHAMMADI, S. MOTALLEBIAZAR, A.; AREFI, H. Effect of plant growth regulators BAP and IAA on micropropagation of Iranian lemon balm (*Melissa officinalis* L.) landraces. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v.10, p.280-286, 2012.

OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, p. 439-453, 2013.

OLIVEIRA, L. S. XAVIER, A.; LOPES, A. P.; TAKAHASHI, E. K.; OTONI, W. C. Multiplicação e alongamento *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Ciência Florestal**, v. 26, p. 235-247, 2016.

OLIVEIRA, M. C.; SANTANA, D. G.; SANTOS, C.M.; Biometria de frutos e sementes e emergência de plântulas de duas espécies de frutíferas do gênero *Campomanesia*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p.446-455, 2011.

OLIVEIRA, M.L.de.; XAVIER, A.; PENCHEL FILHO, R.M.; REIS, J.P.dos. Efeito do intervalo de imersão e de injeção de ar na multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em biorreator de imersão temporária. **Ciência Florestal**, v.24, p.37-45, 2014.

OLIVEIRA, T. R. **Influência dos subcultivos e da qualidade da luz na morfogênese *in vitro* em *Cedrela fissilis* vell. (Meliaceae)**. 2017. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – Campos dos Goytacazes, 2017.

OLLE, M.; VIRSILE, A. The effects of light-emitting diode lighting on greenhouse plant growth and quality. **Agricultural and Food Science**, v.22, p.223-234, 2013.

PINEDO, D. N. H.; GRAÇA, M. E. C.; ARAÚJO, A.J. **Micropropagação de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus tereticornis***. 6º Congresso Florestal Brasileiro. Campos do Jordão - São Paulo - Brasil, de 22 a 27 de setembro de 1990.

POLESI, N. P.E. **Estudo da comunidade bacteriana endofítica e de sua manifestação na micropropagação de *Eucalyptus benthamii***. 2015. 151f. Tese (Doutora em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

ROTUNDO, C. C. **Efeitos de concentrações de nitrato de amônio na multiplicação e no enraizamento "in vitro" de clones *Eucalyptus cloeziana* F. Muell e *Eucalyptus citriodora* Hook**. 1993. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

SANTOS, C. C. C.; HERCÍLIO, P.; RODRIGUES, V. **Varição somaclonal em mudas micropropagadas de bananeira, cultivar Pacovan**. **Bragantia**, v.63, p.201-205, 2004.

SHARMA, S.; ARYA, I. D.; ARYA, S. Micropropagation of superior eucalyptus hybrids FRI-5 (*Eucalyptus camaldulensis* Dehn x *E. tereticornis* Sm) and FRI-14(*Eucalyptus torelliana* F.V. Muell x *E. citriodora* Hook): A commercial multiplication and field evaluation. **African Journal of Biotechnology**, v.8, p. 5718-5726, 2009.

SILVA, A. L. L. da Micropropagation of *Eucalyptus saligna* Sm. from cotyledonary nodes. **Pakistan Journal of Botany**, v. 47, p.311-318, 2015.

SILVA, I. M. C. *In vitro* multiplication of pear tree cultivar Cascatense. **Ciências Agrárias**, v. 37, p. 581-594, 2016.

SILVA, T. Germinação de sementes de melância sob diferentes métodos de tratamento com reguladores vegetais. **Scientia Plena**, v.10, p.1-15, 2014.

UZELAC, B.; JANOSEVIC, D.; STOJICIC, D.; BUDIMIR, S. Effect of cytokinins on shoot apical meristem in *Nicotiana tabacum*. **Archives of Biological Sciences**, v.64, p.511–516, 2012.

VASCONCELOS, A.G.V. Hiperhidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, v.42, p. 837-844, 2012.

VILLA, F. Multiplicação *in vitro* de Amoreira-Preta 'Ébano' em diferentes concentrações de meio MS e BAP. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 582-589, 2006.

WENDLING, I.; TRUEMAN, S.J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry – part I: concepts, regulation and consequences of phase change. **New For**, v.45, p.449-471, 2014a.

WENDLING, I.; TRUEMAN, S.J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry – part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. **New For**, v.45, p.473-486, 2014b.

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

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

FONTE DE LUZ E SACAROSE NO ALONGAMENTO E ENRAIZAMENTO DE CLONES HÍBRIDOS DE *Corymbia* PELA MICROPRAPAGAÇÃO

RESUMO: Devido às dificuldades de enraizamento encontradas em algumas espécies e híbridos de *Corymbia* na propagação clonal, principalmente no que envolve material adulto, o desenvolvimento de técnicas visando o rejuvenescimento/revigoração pela micropropagação, assim como a adoção da microestaquia como forma de propagação vegetativa, têm sido considerados importantes no processo de produção de mudas clonais. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da fonte de luz, trocas gasosas e concentração de sacarose no alongamento *in vitro*, bem como a porcentagem de enraizamento e sobrevivência *in vitro* e *ex vitro* de microestacas de três clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* e de um clone de *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* pela micropropagação. A partir de brotações obtidas na fase de multiplicação por micropropagação, os efeitos da fonte de luz no alongamento e enraizamento *in vitro* foram avaliados por meio de três fontes (Lâmpada fluorescente, LEDs branco e LEDs vermelho/azul.). Na avaliação dos efeitos do troca gasosa foram testados diferentes formas de vedação dos frascos na fase de alongamento *in vitro* (tampas rígidas de polipropileno e tampas de polipropileno com dois orifícios (10 mm) cobertos com membranas de 0,45 µm) e de concentração de sacarose (0, 15 e 30 g L⁻¹). Aos 35 dias, foram avaliadas as características de comprimento de brotos, número de brotos por explante, oxidação, vigor das brotações, porcentagem de enraizamento e sobrevivência. Com base nos resultados obtidos para o alongamento e enraizamento *in vitro*, a fonte de luz LEDs vermelho/azul demonstrou ser a mais adequada, a qual foi necessária para a obtenção de brotações com tamanho adequado para a fase de enraizamento; a utilização de 15 g L⁻¹ de sacarose proporcionou os melhores resultados diante das variáveis analisadas, concentração essa que apresenta redução desse componente no meio, visto o emprego usual de sacarose na micropropagação de *Corymbia* ser de 30 g L⁻¹; Os explantes alongados (microestacas) dos clones avaliados apresentaram melhor resposta ao enaizamento e sobrevivência das plantas obtidas na condição *in vitro*.

Palavras-chave: Propagação *in vitro*; propagação vegetativa; LEDs.

1. INTRODUÇÃO

O enraizamento de espécies híbridas de *Corymbia* é um desafio no contexto de sua propagação clonal, particularmente quando o material adulto está envolvido. Entretanto, o rejuvenescimento/revigoração dos propágulos tem permitido avanços consideráveis no enraizamento e outros aspectos da propagação clonal (ASSIS et al., 1992; XAVIER e COMÉRIO, 1996; ASSIS, 2001; ALFENAS et al., 2009; XAVIER et al., 2013). Na busca por alternativas para a melhoria do enraizamento no processo de produção de mudas clonais de *Corymbia*, a micropropagação via proliferação de gemas axilares, tem sido recomendada como técnica de rejuvenescimento de clones selecionados (BRONDANI et al., 2012; XAVIER et al., 2013). Nos últimos anos aumentaram significativamente as pesquisas sobre o gênero *Corymbia*, especialmente em relação aos métodos de propagação vegetativa relacionadas ao revigoração/rejuvenescimento vegetativo (WENDLING et al. 2014a, 2014b), bem como quanto ao enraizamento adventício (HARTMANN et al., 2011, BACCARIN et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015).

Dentre as etapas da micropropagação via proliferação das gemas axilares, a fase de alongamento *in vitro* é primordial na obtenção de brotações com tamanho adequado para a fase de enraizamento das microestacas, a qual tem sido realizada tanto na condição *ex vitro* (XAVIER et al., 2013) ou *in vitro* (TRINDADE e PAIS, 1997; BENNETT et al., 2003; NOURISSIER e MONTEUUIS, 2008). Pesquisas visando a maximização da produção de brotações na fase de alongamento *in vitro* tem sido intensificado, visando principalmente a obtenção de microestacas para a fase de enraizamento. Estudos científicos têm focado quanto ao conhecimento e adequação de protocolos, bem como na redução da fonte de carbono no meio de cultivo, assim como conhecimento do ambiente mais eficiente para o sistema, entre outros (SALDANHA et al., 2012; XAVIER et al., 2013).

O controle de fatores ambientais, como a temperatura e luz são considerados importantes para a resposta morfogênica *in vitro* (HERINGER et al., 2017). As diferentes fontes de radiação têm sido o centro de várias pesquisas ao longo dos anos, em especial quanto aos efeitos da radiação vermelho e vermelho distante sobre o desenvolvimento e fisiologia das plantas (DEMOTES-MAINARD et al., 2016). Investigações sobre o efeito da exposição de luz LED na cultura *in vitro* demonstraram que espectros de luz vermelho, vermelho distante e azul,

isoladamente ou combinadas, atuam positivamente em melhorias na morfogênese das plantas (POUDEL et al., 2008; LI et al., 2010; HERINGER et al., 2017).

De maneira geral, uma resposta positiva à micropropagação, dentre os diversos fatores, deve-se também à redução ou a exclusão da fonte de sacarose. Assim como, uso de membranas porosas com ventilação natural ou forçada proporcionam redução da umidade relativa do ar no interior dos frascos de cultivo e aumento significativo da troca gasosa com a atmosfera exterior, aumentando a transpiração e a efetiva absorção de água e nutrientes pela planta, melhorando seu processo de aclimatização *ex vitro* (IVANOVA e VAN STADEN, 2010; XIAO et al., 2011). Vários autores, relataram seu efeito positivo, em diferentes espécies, além, da possibilidade de variações em sua concentração, o que beneficia o cultivo e reduz gastos (SORACE et al., 2008; SILVEIRA et al., 2012).

Em vista da necessidade de adequação de um protocolo para micropropagação de clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana*, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da fonte de luz, trocas gasosas e concentração de sacarose no alongamento *in vitro* e no enraizamento e sobrevivência *in vitro* e *ex vitro* das microestacas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Localização do estudo e material experimental

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa/MG. O material genético utilizado para obtenção dos explantes foi proveniente de minicepas de três clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (TC01, TC02 e TC03) e um clone de *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01), oriundos da empresa CMPC – Celulose Riograndense, localizado no município de Guaíba/RS.

Na iniciação da fase de alongamento, as brotações produzidas na fase de multiplicação *in vitro* foram preparadas isolando-se quatro brotações padronizada de 0,5 cm e com bom vigor vegetativo e inoculadas sob condições assépticas, em frascos de vidro (250 mL de capacidade), cultivadas durante 35 dias, contendo 50 mL de meio JADS (CORREIA, 1995), adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose (Vetec®), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 800 mg L⁻¹ de PVP-30

(polivinilpirrolidona - Vetec[®]), 6 g L⁻¹ de ágar, 0,05 mg L⁻¹ de BA (6-benziladenina – Sigma Co.) e 0,25 mg L⁻¹ de ácido 3-indolbutírico (AIB) (Sigma[®]).

Para o enraizamento *in vitro*, microestacas com tamanho em torno de dois centímetros foram preparadas a partir de gemas alongadas, dos quatro clones híbridos produzidas na fase de alongamento. As microestacas foram inoculadas sob condições assépticas, as quais foram cultivadas durante 35 dias em frascos de vidro (250 mL de capacidade), contendo 50 mL de meio JADS (CORREIA, 1995), adicionado de 30 g L⁻¹ de sacarose (Vetec[®]), 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 800 mg L⁻¹ de PVP-30 (polivinilpirrolidona - Vetec[®]), 6 g L⁻¹ de ágar e 1 mg L⁻¹ de ácido 3-indolbutírico (AIB) (Sigma[®]).

Os meios de cultura foram preparados utilizando água desionizada e o pH ajustado para $5,8 \pm 0,05$ com NaOH (0,1 M) e HCl (0,1 M), antes da autoclavagem e da adição do ágar. A autoclavagem do meio de cultura foi realizada à temperatura de 121 °C e pressão de aproximadamente 1 kgf cm⁻², durante 20 minutos.

2.2. Fonte de luz

Para avaliar os efeitos da qualidade da luz no alongamento e enraizamento *in vitro*, os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2 °C por um fotoperíodo de 16 horas de luz e irradiância de 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (quantificada por radiômetro, LI-COR[®], LI-250A Light Meter), sendo testados três fontes de luz diferentes: Lâmpada fluorescente (HO Sylvania T12, 110 W, São Paulo, Brasil), Lâmpada LEDs branco (SMD 100, 18 W, Vilux[®], Vitória, ES, Brasil) e Lâmpada LEDs vermelho/azul (LabPARLL-HR / DB-480, 11,6 W, LabLumens[®], Carapicuíba, SP, Brasil). Os espectros de luz foram obtidos por espectrorradiômetro (Ocean Optics Spectra-Suite, Ocean Optics, Dunedin, FL) (Figura 1).

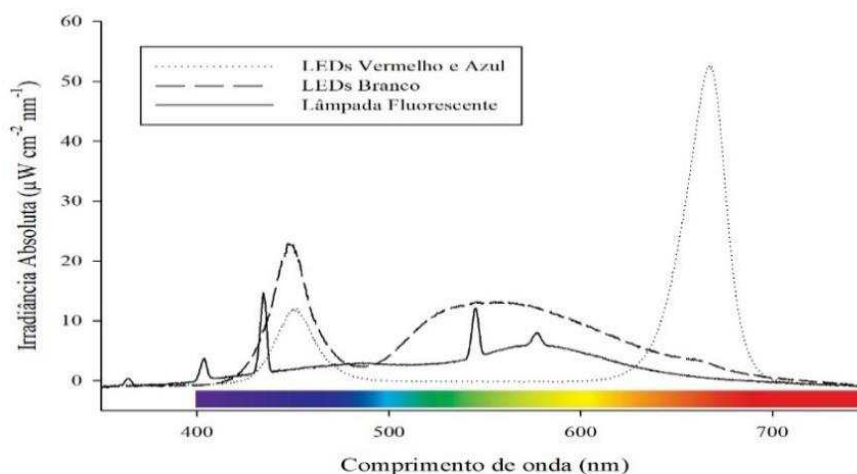


Figura 1. Variações da irradiância absoluta ($\mu\text{W cm}^{-2} \text{nm}^{-1}$) e do comprimento de onda (nm) de luz emitido pelas Lâmpadas fluorescentes (HO Sylvania T12, 110 W), LEDs brancos (Vilux[®] SMD 100, 18 W) e LEDs vermelho/ azul (LabPAR LL-HR / DB-480, 11,6 W) utilizadas na experimentação do alongamento e enraizamento em explantes na condição *in vitro* de clones híbridos de *Corymbia*, obtidas na sala de crescimento do LCT II, BIOAGRO/UFV.

2.3. Trocas gasosas e concentrações de sacarose

Com os resultados obtidos no experimento na fase de alongamento *in vitro* (Item 2.2), para todos os clones analisados, nesse experimento foi usado a fonte de luz Lâmpada LEDs vermelho/azul. Para troca gasosa foi submetido duas formas de vedação: tampas rígidas de polipropileno (TRP), ou seja, sem trocas gasosas; e tampas de polipropileno com dois orifícios (10 mm) cobertos com membranas de 0,45 μm (MilliSeal[®] AVS-045 Air Vent), possibilitando as trocas gasosas. A inoculação foi feita em meio de cultivo JADS (CORREIA, 1995), constituído de três concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L^{-1}), 100 mg L^{-1} de mio-inositol, 800 mg L^{-1} de PVP-30 (polivinilpirrolidona), 6 g L^{-1} de ágar, 0,05 mg L^{-1} de BA (6-benziladenina) e 0,25 mg L^{-1} de ácido 3-indolbutírico (AIB). O pH do meio de cultura foi ajustado em 5,8 com HCl (0,1 M) ou NaOH (0,1 M), antes da adição do ágar, e autoclavado a uma pressão de 1,5 atm e temperatura de 121 $^{\circ}\text{C}$, por 20 minutos.) Os tratamentos foram mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2 $^{\circ}\text{C}$ por um fotoperíodo de 16 horas de luz e irradiância de 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (quantificada por radiômetro, LI-COR[®], LI-250A Light Meter).

2.4. Enraizamento *ex vitro* das microestacas

Esse experimento foi conduzido no Viveiro de Pesquisas do Departamento de Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Viçosa, localizado no município de Viçosa/MG. As microestacas foram obtidas com tamanho de dois centímetros a partir das brotações produzidas na fase de alongamento *in vitro*, dos quatro clones híbridos, as quais foram transferidas em uma caixa de isopor para o viveiro.

As microestacas foram plantadas em tubetes plásticos de 55 cm³ de capacidade, contendo substrato comercial (Tropstrato Vida Verde[®]) e vermiculita de granulometria média, na proporção de (1:1), adicionado de 5 kg m⁻³ de superfosfato simples (Heringer[®]), sendo em seguida acondicionadas em casa de vegetação climatizada (temperatura de 20 a 30 °C e umidade relativa do ar ≥ 80 %), durante 35 dias. Nos primeiros 15 dias em casa de vegetação, foi mantida uma cobertura com Aluminet (50 %) sobre as microestacas, a uma altura de 20 cm dos recipientes.

2.5. Delineamento e avaliações experimentais

No experimento de qualidade de luz no alongamento e enraizamento *in vitro*, foi disposto em arranjo fatorial 4 x 3, no delineamento inteiramente casualizado, com quatro clones híbridos de *Corymbia*: três de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (TC01, TC02, TC03) e um de *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01) e três fontes de luz diferentes: Lâmpada fluorescente (L/F), Lâmpada LEDs branco (L/B) e Lâmpada LEDs vermelho/azul (V/A), com quatro repetições, compostas de parcelas com dez explantes.

Quanto ao experimento com as concentrações de sacarose, em arranjo fatorial 4 x 3, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro clones híbridos de *Corymbia*: três de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (TC01, TC02, TC03) e um de *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01) e três concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L⁻¹). Já para o experimento de troca gasosa, adotou-se o arranjo fatorial 4x2, com os mesmos clones, duas formas de vedação (tampas rígidas de polipropileno (TRP) e tampas de polipropileno com dois orifícios (10 mm) cobertos com membranas de 0,45 μ m). Esses experimentos foram compostos, com quatro repetições e parcelas com dez explantes.

À fim de comparar o enraizamento, o experimento foi conduzido em arranjo fatorial 4 x 2, no delineamento inteiramente casualizado, com quatro clones híbridos de *Corymbia* (três de

Corymbia torelliana x *C. citriodora* (TC01, TC02 , TC03) e um de *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01)) e dois tipos de enraizamento (*in vitro* e *ex vitro*), com quatro repetições, compostas de parcelas com dez explantes.

Aos 35 dias após a inoculação na fase de alongamento, foram avaliadas nos experimentos: porcentagem média de oxidação, vigor, comprimento de brotos, número médio de brotações por explante e trocas gasosas. Para os experimentos de enraizamento *in vitro* e *ex vitro*, foram avaliados a porcentagem média de sobrevivência e enraizamento (raízes observadas na extremidade inferior do frasco ou tubete).

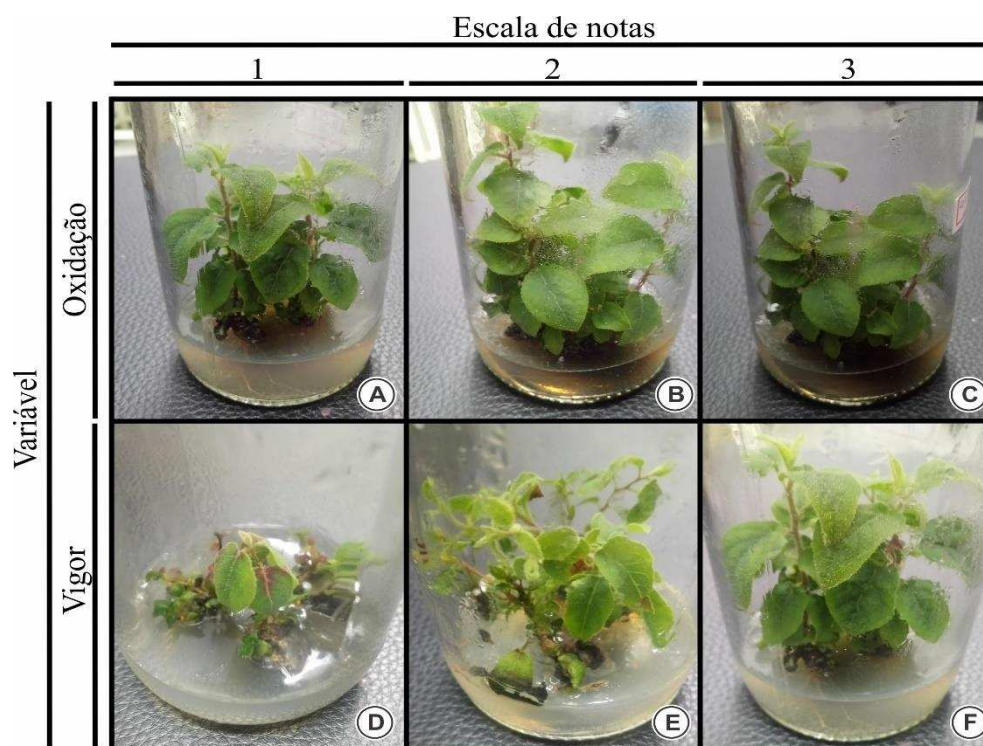


Figura 2. Avaliações de oxidação e vigor de acordo uma escala de notas. **(A)** 1 = Nula: sem oxidação; **(B)** 2 = Média: reduzida oxidação na base dos explantes (meio de cultura com tom acinzentado); **(C)** 3 = Alta: oxidação completa das brotações (meio de cultura com tom enegrecido); **(D)** 1 = Baixo: ausência de desenvolvimento das brotações e, ou, senescência e morte; **(E)** 2 = Bom: brotações com bom crescimento, porém com folhas de tamanho reduzido; **(F)** 3 = Ótimo: brotações com crescimento ativo, sem deficiência nutricional aparente.

2.6. Análise de dados

As análises foram processadas em software R, versão 3.0.3 (R Core Team, 2014), com auxílio do pacote ExpDes, versão 1.1.2 (FERREIRA et al., 2013). As médias dos tratamentos foram utilizadas para a realização das análises estatísticas. As variáveis porcentagem de sobrevivência, enraizamento, oxidação, vigor, comprimento e número de brotos não

apresentaram distribuição normal perante teste de Shapiro-Wilkem a 5 % de significância, sendo transformados em arcsen e, respectivamente; e para as variáveis significativas, foi feito o teste Tukey a 5 % de significância.

3. RESULTADOS

3.1. Efeito da fonte de luz sobre o alongamento *in vitro*

De acordo às características estudadas, foi observado diferença na resposta entre clones, bem como nas diferentes fontes de luz utilizadas no alongamento *in vitro* de clones híbridos de *Corymbia*.

A característica comprimento de brotos, verificou - se um comportamento variado, tanto entre clones, quanto entre qualidade de luz. Entre os clones testados, diante das fontes de luz, observou-se que o clone TC03 apresentou média de 4,54 cm, sendo superior aos demais tratamentos (Figura 3A). Para as fontes de luz, o tratamento que se destacou foi aquele que utilizou o LEDs vermelho/azul (Figura 3B).

Para o vigor das brotações dos clones analisados, foi observado que os maiores valores foi encontrado no clone TC03, apresentando em média 2,84 (Figura 3C). Os tratamentos envolvendo a melhor fonte de luz, foi observado a LEDs vermelho/azul obteve as maiores médias 2,77 (Figura 3D).

Em relação ao número de brotações por explante, verificou-se que a fonte de luz de LEDs vermelho/azul (em média 1,78) obteve os maiores valores (Figura 3E). Já para oxidação, os valores foram bem próximos a classe de nota 1 e os tratamentos foram semelhantes.

3.2. Efeito das trocas gasosas e sacarose sobre o alongamento *in vitro*

De acordo as características observadas *in vitro* para os clones híbridos de *Corymbia*, apresentaram seus fatores (trocas gasosas e concentrações de sacarose) atuando de forma independente. O comprimento de brotos e o vigor dos explantes apresentaram diferença ($p < 0,05$), em relação aos clones e a concentrações de sacarose. Para o número de brotações, só foi observado diferença significativa para as concentrações de sacarose ($p < 0,05$). Já o uso de tampas rígidas (sem trocas gasosas) e com membranas (com trocas gasosas) os resultados diferiram apenas para a variável comprimento de brotos.

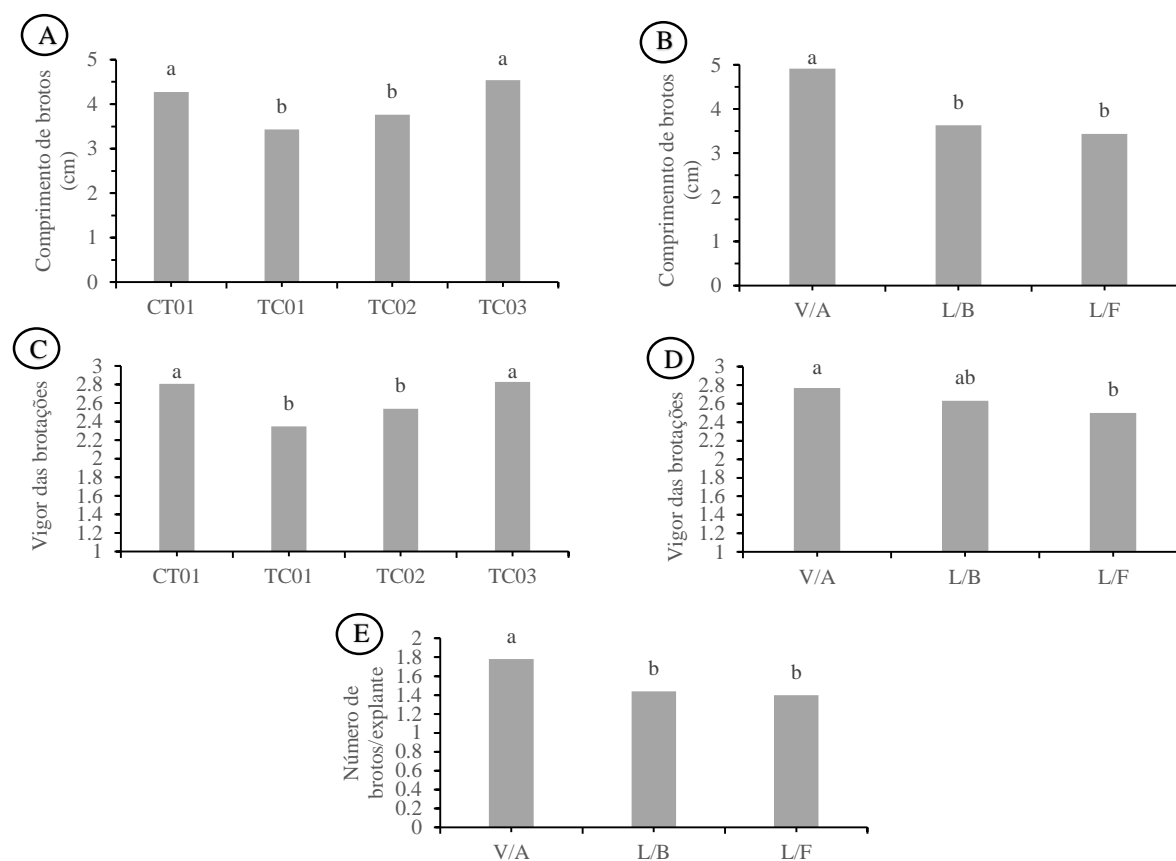


Figura 3. Características observadas no alongamento *in vitro* em função dos diferentes clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (TC01, TC02 e TC03) e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01) e fontes de luz (L/F, L/B e V/A). **(A)** Comprimento de brotos por explante em função dos clones híbridos; **(B)** Comprimento de brotos por explante em função de diferentes fontes de luz; **(C)** Vigor das brotações em função dos clones híbridos; **(D)** Vigor das brotações em função diferentes fontes de luz; **(E)** Número de brotos por explante em função diferentes fontes de luz. *Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

O comprimento dos brotos e vigor mostrou a mesma tendência que o número de brotações por explante, sendo os melhores resultados para os tratamentos com 15 e 30 g L⁻¹ de sacarose (Figuras 4A; 4D e 4E). Diante dos genótipos analisados, para a característica comprimento e vigor de brotos, o clone TC03 foi significativamente superior aos demais (Figura 4B e 4C).

A maioria das características observadas não foi influenciada pelos ambientes com e sem trocas gasosas, no entanto, o uso de tampas rígidas proporcionou maior comprimento de brotos, (Figura 4F), com valores médios de 5,13 cm, sendo superior ao uso de tampas com membranas.

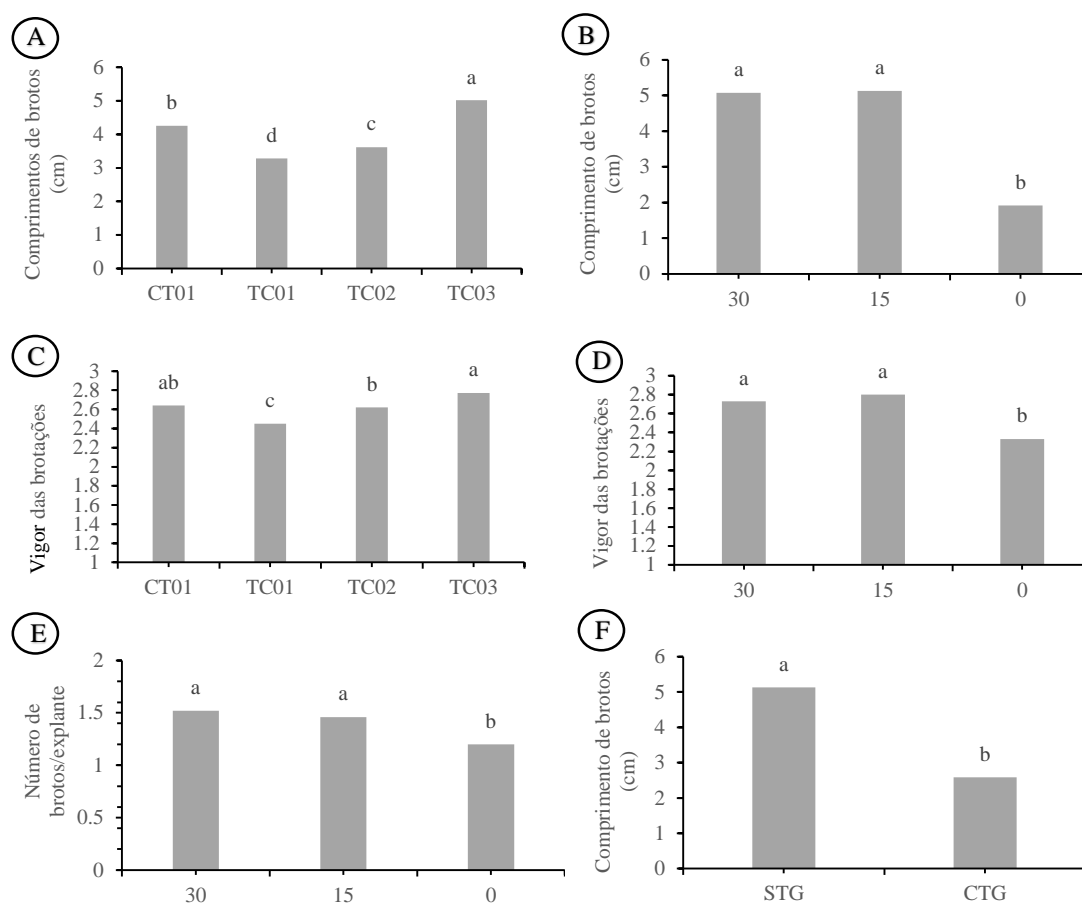


Figura 4. Características observadas no alongamento *in vitro* em função dos diferentes clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (TC01, TC02 e TC03) e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01). **(A)** Comprimento de brotos por explante em função dos clones híbrido; **(B)** Comprimento de brotos por explante em função de diferentes concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L⁻¹); **(C)** Vigor das brotações em função dos clones híbridos; **(D)** Vigor das brotações em função de diferentes concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L⁻¹); **(E)** Número de brotos por explante em função de diferentes concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L⁻¹); **(F)** Comprimento de brotos por explante sem troca gasosa (STG) e com troca gasosa (CTG). *Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

3.3. Efeito da fonte de luz sobre o enraizamento *in vitro* de microestacas

Os tratamentos envolvendo o enraizamento *in vitro* aos 35 dias, apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), sob as diferentes qualidades de luz, bem como os clones, de forma independente. O clone TC03 apresentou as maiores médias para porcentagem de enraizamento dos explantes 85,8% (Figura 5A). Em relação as condições de comparação entre as qualidades de luz, o LEDs vermelho/ azul, apresentou os maiores valores 79,4%, diferindo para a Lâmpada fluorescente (Figura 5B).

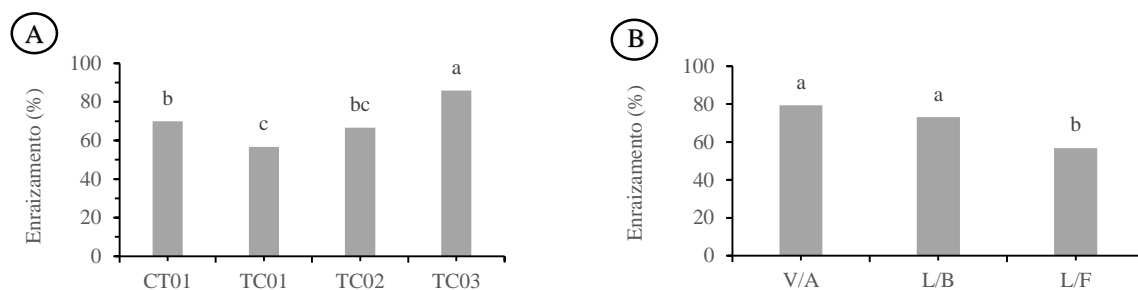


Figura 5. Porcentagem de enraizamento observados de microestacas obtidas a partir de brotações alongadas *in vitro*. **(A)** Clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. Citriodora* (TC01, TC02 e TC03) e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01); **(B)** fonte de luz (L/F, L/B e V/A). *Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

3.4. Efeito dos tipos de cultivo no enraizamento e sobrevivência das microestacas

A porcentagem de enraizamento *in vitro* e *ex vitro* das microestacas aos 35 dias, o maior valor foi encontrado para o clone TC03 (em média 97% e 71%) respectivamente (Figura 6A). Em relação a sobrevivência dos explantes aos 35 dias, altos percentuais foram obtidos nas condições *in vitro*, sendo que o clone TC03 foi o mais responsivo com 100 % (Figura 6B). Já para o melhor tipo de cultivo dentre os genótipos analisados, foi observado que o cultivo dos explantes *in vitro* obteve as maiores porcentagens de sobrevivência dos explantes, para todos os clones analisados. (Figura 6B).

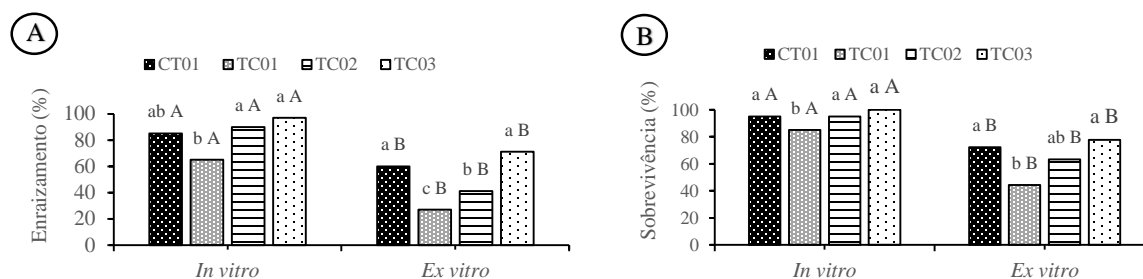


Figura 6. Características observadas no enraizamento *in vitro* e *ex vitro* de clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. Citriodora* (TC01, TC02 e TC03) e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01). **(A)** Porcentagem de enraizamento; **(B)** Porcentagem de sobrevivência. Letras minúsculas representam diferenças estatísticas comparando-se os diferentes clones no mesmo tratamento (enraizamento). Letras maiúsculas representam diferenças estatísticas comparando-se os tipos de enraizamento no mesmo tratamento (clone). *Médias seguidas de uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

4. DISCUSSÃO

4.1. Efeito da fonte de luz sobre o alongamento *in vitro*

A fonte de luz utilizada no alongamento *in vitro* dos explantes influenciou no crescimento dos clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana*, porém havendo variações nas respostas. Diferenças genotípicas no desenvolvimento *in vitro* são relatadas em diferentes espécies do gênero *Eucalyptus* e *Corymbia*, como observado para *E. globulus* (OLIVEIRA., 2016), *C. citriodora* (ALMEIDA, 2012) *E. dunnii* (NAVROSKI et al., 2015), e também em outros híbridos: *C. citriodora* x *C. torelliana* (ARYA, et al., 2009), *E. benthamii* x *E. dunnii* (BRONDANI et al., (2011), *E. grandis* x *E. urophylla* (NAKHOODA et al., 2012), *E. grandis* x *E. nitens* (WATT, 2014).

O uso de LED influencia os efeitos fisiológicos e morfológicos na morfogênese e desenvolvimento de várias espécies vegetais cultivadas *in vitro* (BELO-BELO, 2016; OLIVEIRA, 2017; GUPTA et al., 2017; MOSQUEDA et al., 2017; FAVETTA et al., 2017). Resultados têm mostrados que a luz LED é mais adequada para a morfogênese e crescimento da planta do que a L/F (lâmpada fluorescente), no entanto, as respostas podem variar de acordo com as espécies de plantas. Uma possível causa para essa diferenciação está relacionada ao uso de lâmpadas de LEDs em culturas *in vitro*, no qual têm demonstrado ser um método vantajoso para a regulação de processos fisiológicos de crescimento, como a fotomorfogênese, acarretando na maior qualidade, produção e desenvolvimento de mudas micropropagadas (GUPTA e JATOTHU, 2013).

Para o número de brotos por explante observou-se variação entre as fontes de luz no alongamento *in vitro*, indicando que os comprimentos de onda com espectros de luz na faixa do vermelho e azul, atuam em conjunto na sinalização para a morfogênese, havendo uma maior efetividade nas brotações. Resultados semelhantes foram encontrado para *Cedrella fissilis*, verificando que a qualidade e quantidade da luz afeta o desenvolvimento das brotações, com alterações significativas no alongamento e número de brotos por explante (OLIVEIRA, 2017). Em *Vanilla planifolia* as brotações foram significativamente afetadas por diferentes tratamentos de luz *in vitro*, aonde os resultados indicaram um aumento significativo no número de brotos por explante sob LED vermelho azul (BELLO-BELLO et al., 2016).

Em relação à oxidação fenólica dos explantes os clones apresentaram oxidação com baixa intensidade, principalmente aqueles com influência direta da qualidade de luz LEDs vermelho/azul. Em Foxglove chinês (*Rehmannia glutinosa*) quando a qualidade de luz é acrescida sob LEDs azul, as plantas possuem uma resposta de luz complexa e dinâmica com menores reações de oxidação e otimização na aclimatação. (SZECHYŃSKA - HEBDA et al., 2010). O uso de diodos emissores de luz (LEDs) como fonte de radiação para plantas, tem-se uma maior flexibilidade dos comprimentos de onda para a instalação de fotorreceptores, podendo proporcionar um ótimo vigor, influenciando na morfologia e metabolismo das plantas (MASSA et al., 2008; MORROW, 2008).

4.2. Efeito das trocas gasosas e da sacarose no alongamento *in vitro*

A concentração de sacarose apresentou implicação direta no alongamento de clones híbridos de *Corymbia*. Para as características avaliadas, valores satisfatórios foi apresentado diante de 15 g L⁻¹ de sacarose, concentração essa que apresenta redução desse componente no meio, visto o emprego usual de sacarose na micropropagação de *Eucalyptus* ser de 30 g L⁻¹. Diversos trabalhos relatam o uso entre 15g L⁻¹ e 30 g L⁻¹ de sacarose no processo de micropropagação, sendo responsável pela multiplicação ou alongamento de *Eucalyptus* spp. (BORGES et al., 2011; BRONDANI et al., 2012; NAVROSKI et al., 2013; BACCARIN, 2015).

Costa et al (2017), trabalhando com *Ochroma pyramidale*, verificou as maiores médias para o comprimento das brotações utilizando a concentração de 15g L⁻¹ de sacarose. Vários autores relataram seu efeito positivo em diferentes espécies, o que beneficia o cultivo e reduz gastos (SORACE et al., 2008; SILVEIRA et al., 2012 e GALLO, 2015). Já para *Eucalyptus benthamii*, de acordo com Polesi (2015), a concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose apresentou os melhores resultados nos aspectos morfofisiológicos e também no desenvolvimento dos explantes.

Em trabalho de Monfot et al. (2015) com *Ocimum selloi*, verificaram efeito negativo sobre o número, comprimento, matéria seca da brotação e número de raízes sem sacarose. A ausência de sacarose inibe o desenvolvimento, pois a quantidade de CO₂ presente no frasco é insuficiente para que a planta exerça plenamente seu autotrofismo (JO et al, 2009).

Os sistemas com e sem troca gasosa não influenciaram a maioria das características observadas para o clone em questão. Resultados semelhantes foram encontrados em trabalho de

Oliveira et al. (2014), não tendo havido diferença entre o sistema sem e com injeção de ar em biorreatores de imersão temporária no processo de multiplicação *in vitro* do clone *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*. A propagação *in vitro* com uso de membranas porosas permitem a troca de gases entre a atmosfera externa e interna dos frascos através da ventilação natural, desde que a concentração de CO² seja adequada, resultando em aumento no crescimento (KOZAI, 2010). No entanto, o uso do sistema com troca gasosa afetou o comprimento dos explantes, tendo os maiores valores de comprimento em sistema fechado, resultado que contrasta com diversos estudos com a aplicação de manejo *in vitro* de ambientes gasosos.

No cultivo *in vitro*, as plantas perdem parcialmente o autotrofismo e, conseqüentemente, necessitam de uma fonte exógena de carboidratos, sendo a sacarose a mais utilizada na cultura de tecidos vegetais (PARVEEN; SHAHZAD, 2014). Além disso, age como fonte de energia para sustentar o metabolismo fotomixotrófico, garantindo o desenvolvimento ideal, como precursor de carbono e metabólito de sinalização, bem como atua na manutenção do potencial osmótico, garantindo a conservação da água nas células (GAGO et al., 2014).

4.3. Efeito da fonte de luz na sobrevivência e enraizamento *in vitro* de microestacas

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a porcentagem de enraizamento e sobrevivência das microestacas em clones híbridos de *Corymbia* (*Corymbia torelliana* x *C. citriodora* e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana*) é afetado pela fonte de luz nas respostas morfogênicas no cultivo *in vitro* de plantas. Neste contexto, a fonte de luz LEDs, mostrou-se mais adequado para o enraizamento e sobrevivência das microestacas. Resultados similares foram encontrado por Lim e Feom (2013), Kwon et al. (2015) e Favetta et al. (2017), aonde tem como principal efeito o aumento na porcentagem de enraizamento, número, comprimento e sobrevivência ds microestacas.

Diferenças significativas foram observadas no número de raízes e folhas por explante, através das fontes de luz LEDs vermelho azul em *Vanilla planifolia* (MOSQUEDA et al., 2017). Similarmente Hung et al. (2015) demonstraram que tratamentos misturados com fótons vermelho e azul proporcionaram uma sobrevivência e enraizamento significativamente maior do que as lâmpadas fluorescentes (ou seja, 90-94% vs. 76% em cultivares de Strawberry). Já para foxglove chinês (*Rehmannia glutinosa*) obteve um maior número de raízes quando sob a luz azul, (MANIVANNAN et al. 2015). Investigações sobre o efeito da exposição de luz LED

na cultura *in vitro* demonstraram que espectros de luz vermelho, vermelho distante e azul, isoladamente ou combinadas, atuam significativamente em melhorias na morfogênese das plantas (LI et al., 2010; HERINGER et al., 2017).

De acordo com Mokotedi et al. (2000), as espécies lenhosas têm enraizamento genotípico dependente, requerendo assim diferentes condições de cultivo. Wendling e Xavier (2005) também afirmam que o enraizamento adventício é um processo complexo que é afetado também, dentre diversos fatores, pelas características genéticas.

4.4. Efeito dos tipos de cultivo no enraizamento e sobrevivência das microestacas

Devido às dificuldades de enraizamento encontradas em algumas espécies e híbridos de *Corymbia* na propagação clonal, o desenvolvimento de novas técnicas para a propagação vegetativa e o ajuste dos diversos fatores que influenciam o desenvolvimento da planta foi estudado na tentativa de estabelecer um melhor enraizamento e sistemas eficientes de produção em larga escala.

A porcentagem de enraizamento e sobrevivência das microestacas advindas dos diversos tratamentos, resultou em variações entre os tipos de enraizamento e clones avaliados. A adoção do enraizamento *in vitro* para o clone (TC03), resultou nas melhores resposta desse estudo. Similarmente Júnior et al. (2014) ao conduzir explantes de *Tectona grandis in vitro*, observaram percentual máximo de sobrevivência (100%). Oliveira (2015) também avaliou sobrevivência com resultados superiores a 90% para microestacas de *E. cloeziana*. Assim, observa-se que a porcentagem de sobrevivência teve bons resultados da mesma forma que outros estudos apresentados para técnica semelhante. Em relação ao enraizamento em *Eucalyptus benthamii*, Brondani et al. (2012) verificaram índices de enraizamento acima de 90%, ainda aos 21 dias.

No enraizamento *ex vitro* de microestacas de *Lavandula angustifolia*, Machado et al. (2013) verificaram de 15% a 83% de sobrevivência aos 30 dias. Nas miniestacas intermediárias, os índices de enraizamento variaram entre 25 e 86,1 % entre clones (BORGES, 2011). Tormen (2017) ao induzir o enraizamento de microestacas de *Eucalyptus cloeziana* não utilizou regulador de crescimento e observou um percentual de 70% de enraizamento aos 30 dias.

A propagação vegetativa nos híbridos de *Corymbia* era considerada difícil de ser viabilizada operacionalmente, entretanto foi possível observar os melhores resultados para o clone híbrido de *Corymbia torelliana* x *Corymbia citriodora* (TC03) nas diferentes condições

de cultivo. Recentes modificações nos procedimentos de enraizamento têm possibilitado obter resultados em níveis considerados excelentes (ASSIS, 2014). Um primeiro aspecto se refere à espécie utilizada como genitor feminino; neste sentido, a espécie *C. torelliana* é especialmente importante, por ser a espécie de maior enraizamento dentre todas as espécies de *Corymbia* testadas, sua presença nos cruzamentos é fundamental para se obterem níveis adequados de enraizamento na clonagem desses híbridos (ASSIS, 2014), decorrente da existência do efeito materno para esta característica (ASSIS, 2001). Resultados operacionais de enraizamento de clones de *C. citriodora* x *C. torelliana* e *C. torelliana* x *C. citriodora* obtidos na Arcelor Mittal Bioflorestas confirmam as observações anteriores da existência de efeito materno no enraizamento (ASSIS, 2012).

Outro aspecto relevante é que grande parte das espécies lenhosas, as estacas de mudas juvenis enraízam naturalmente, enquanto outras procedentes de plantas mais velhas o fazem com maior complexidade ou não enraízam (XAVIER et al., 2013). Pode-se admitir que, de uma forma geral, quanto mais juvenil for o explante a ser propagado, maior é a possibilidade de êxito no enraizamento, tanto pelo percentual de enraizamento, qualidade das raízes e rapidez de formação, quanto pela capacidade de crescimento da nova muda (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998; XAVIER et al., 2013). Diante disso a etapa da micropropagação, em virtude da metodologia adotada para a proliferação das gemas axilares, temos a fase de alongamento *in vitro*, a qual é necessária para a obtenção de brotações com tamanho adequado para a fase de enraizamento destas, a qual tem sido realizada normalmente *ex vitro* (XAVIER et al., 2013).

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesse estudo para os clones híbridos de *Corymbia torelliana* x *C. Citriodora* e *Corymbia citriodora* x *C. torelliana*, pode-se concluir que: 1) Em virtude da metodologia adotada para o alongamento e enraizamento *in vitro*, a fonte de luz LEDs vermelho/azul demonstrou ser a mais adequada, apresentando os melhores resultados para vigor, oxidação fenólica, número de brotações por explante, comprimento de brotos, porcentagem de enraizamento e sobrevivência das microestacas; 2) A sacarose adicionada ao meio de cultura influenciou significativamente o desempenho do cultivo, devido aos seus efeitos sobre o aporte de energia para o explante e a manutenção do potencial osmótico do meio, sendo a redução para

15 g L⁻¹ de sacarose com os melhores resultados diante das variáveis analisadas; 3) Os explantes alongados (microestacas) apresentaram melhor resposta ao enaizamento e sobrevivência das plantas obtidas na condição *in vitro*.

6. REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A. V.; MAFIA, R.G.; ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2.ed. Viçosa; UFV, 500 p, 2009.

ALMEIDA, L.V. **Técnicas para otimização da multiplicação *in vitro* de brotações de *Eucalyptus Citriodora* (Hook) K.D. Hill & L.A.S. Johnson**. 2012. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

ARYA, I. D; SHARMA. S; ARYA. S. Micropropagation of superior eucalyptus hybrids FRI-5 (*Eucalyptus camaldulensis* Dehn x *E. tereticornis* Sm) and FRI-14 (*Eucalyptus torelliana* F.V. Muell x *E. citriodora* Hook): A commercial multiplication and field evaluation. **African Journal of Biotechnology**, v.8, p. 5718-5726, 2009.

ASSIS, T.F. 17º Relatório de Visitas à Arcelor Mittal Bioflorestas. **Assistech Ltda**, 15p, 2012.

ASSIS, T. F. Melhoramento genético de *Eucalyptus*: desafios e perspectivas. **3º ncontro Brasileiro de Silvicultura**, p. 127-148, 2014.

ASSIS, T.F. Evolution of technology for cloning *Eucalyptus* in large scale. In: IUFRO INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 2001, Valdivia. **Proceedings...** Chile: EMBRAPA/CNPF, p.22, 2001.

ASSIS, T. F.; ROSA, O. P.; GONÇALVES, S. I. Propagação por microestaquia. In: CONGRESSO FLORESTAL ESTADUAL, 7. Nova Prata. **Anais...** Santa Maria: UFSM, p. 824-836, 1992.

BACCARIN, F.J.B.; BRONDANI, G.E.; ALMEIDA. L.V.; VIEIRA, I.G.; OLIVEIRA. L.S.; ALMEIDA, M. Vegetative rescue and cloning of *Eucalyptus benthamii* selected adult trees. **New For**, v.46, p. 465-483, 2015.

BELLO-BELLO, B.B.; ESTRADA, E.M.; VELÁZQUEZ, J.H.C.; Effect of LED light quality on *in vitro* shoot proliferation and growth of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). **African Journal**, v.15, p.272 – 277, 2016.

BENNETT, I. J. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. **Annals of Botany**, v. 74, p. 53-58, 1994.

BORGES, S.R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L.S.; MELO. L.A.; ROSADO, A.M. Enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Rev Árvore**, v.35, p.425-434, 2011.

BRONDANI, G.E.; DUTRA, L.F.; WENDLING, I.; GROSSI, F.; HANSEL, F.A. E ARAUJO, M.A. Micropropagation of an *Eucalyptus* hybrid (*Eucalyptus benthamii* x *Eucalyptus dunnii*). *Acta Scientiarum. Agronomy*, v.33, p. 655-663, 2011.

BRONDANI, G.E.; WIT ONDAS, H.W.; BACCARIN, F.J.B.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. In *Vitro Cell Dev Biol Plant*, v.48, p.478-487, 2012.

CORREIA, D.; GONÇALVES, A.N.; COUTO, H.Z.do.; RIBEIRO, M.C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. *IPEF*, n.48/49, p.107-116, 1995.

COSTA, M.B.T.; ARRUDA, A.S.; VIEIRA, M.C.; PAULA, M.S.P.; LUZ, J.P. Estabelecimento *in vitro* de *Ochroma pyramidale* em diferentes concentrações de meio ms e sacarose. *Revista grotecnologia, Ipameri*, v.8, p.1-9, 2017.

DEMOTES-MAINARD, S.; PÉRON, T.; COROT, A.; BERTHELOOT, J.; LE GOURRIEREC, J., PELLESCI-TRAVIER, S.; CRESPEL, L.; MOREL, P.; HUCHÉ-THÉLIER, L.; BOUMAZA, R.; VIAN, A.; GUÉRIN, V.; LEDUC, N.; SAKR, S. Plant responses to red and far-red lights, applications in horticulture. *Environmental and Experimental Botany*, v.121, p.4-21, 2016.

FAVETTA1, V.; COLOMBO, R.C.; JÚNIOR, J.F.M.; FARIA, R.T. Light sources and culture media in the *in vitro* growth of the Brazilian orchid *Microlaelia lundii*. *Ciências Agrárias*, v. 38, p. 1775-1784, 2017.

FERREIRA, E.B.; CAVALCANTI, P.P.; NOGUEIRA, D.A. **ExpDes**: Experimental Designs package. R packageversion 1.1.2. 2013.

GALLO, R. **Produção de microestacas de clones híbridos de *Eucalyptus* spp. pela micropropagação**. 2015. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

GAGO, J.; MARTÍNEZ-NÚÑEZ, L.; LANDÍN, M.; FLEXAS, J.; GALLEGO, P. P. Modeling the Effects of Light and Sucrose on *In Vitro* Propagated Plants: A Multiscale System Analysis Using Artificial Intelligence Technology. *Plos One*, v. 9, p. 1-9, 2014.

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

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

GUPTA, S.D.; KARMAKAR, D. Machine vision based evaluation of impact of light emitting diodes (LEDs) on shoot regeneration and the effect of spectral quality on phenolic content and antioxidant capacity in *Swertia chirata*. **Journal of Photochemistry e Photobiology**, v.174, p.162–172, 2017.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; JUNIOR DAVIES, F.T.; GENEVE, R.L. **Plant propagation: principles and practices**. 8.ed. New Jersey: Englewood Clippis, 900 p, 2011.

HERINGER, A. S.; REIS, R. S.; PASSAMANI, L. Z.; SOUZA-FILHO, G. A.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V. Comparative proteomics analysis of the effect of combined red and blue lights on sugarcane somatic embryogenesis. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.39, 52p, 2017.

HUNG, C. D.; HONG, C. H.; JUNG, H. B.; KIM, S. K.; VAN KET, N.; NAM, M. W.; CHOI, D.H.; LEE, H. I. Growth and morphogenesis of encapsulated strawberry shoot tips under mixed LEDs. **Scientia Horticulturae**, v.194, p.194-200, 2015.

IVANOVA, M.; VAN STADEN, J. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schönland ex Pillans. **Plant Growth Regulators**, v.60, p.143-150, 2010.

JO, E.A.; TEWARI, R.K.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. *In vitro* sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 96, p. 307-315, 2009.

JUNIOR, F. P. C. P.; RAPOSO, A.; NAGAO, E. O.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Efeito de diferentes citocininas e sistema de cultura dupla-fase na micropropagação de Teca (*Tectona grandis* L.) estabelecida na Amazônia Sul- Ocidental. **Evidência, Joaçaba**, v.14, p. 7-20, 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 Organ Cult.** v.103, p.155–163, 2010.

LIM, Y.J.; EOM, S.H. Effects of different light types on root formation of cimumbasilicum L. Cuttings. **Scientia Horticulturae**, v.164, p.552–555, 2013.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation - environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of ornamental plants**, v.10, p.188–204, 2010.

KWON, A.R.; CUI, H.Y.; LEE, H.; SHIN.; KANG, K.S.; PARK, S.Y. Light quality affects shoot regeneration, cell division, and wood formation in elite clones of *Populuseur americana*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.37, 65p, 2015.

MACHADO, M.; DESCHAMPS, C.; BIASI, L. A. Application of IBA on *in vitro* and *ex vitro* rooting microcutting of *Lavandula angustifolia* Miller. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, p. 153-161, 2013.

MANIVANNAN, A.; SOUNDARARAJAN, P.; HALIMAH, N.; KO, C.H; JEONG, B.R. Blue LED light enhances growth, phytochemical contents, and antioxidant enzyme activities of *Rehmannia glutinosa* cultured in vitro, **Hortic. Environ. Biotechnol**, v.56, p.105–113, 2015.

MASSA, G.D.; KIM, H.H.; WHEELER, R.M.; MITCHELL, C. Plant productivity in response to LED lighting. **HortScience**, v.43, p.1951–1956, 2008.

MOKOTEDI, M.E.O.; WATT, M.P.; PAMMENTER, N.W. & BLAKEWAY, F.C. In vitro rooting and subsequent survival of two clones of cold-tolerant *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus nitens* Hybrid. **HortScience**, v.35, p.1163-1165, 2000.

MONFORT, L. E. F; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; ROSSI, Z. T.T.; LIMA, A. F.; SILVA, S. T.; SILVA, G. M. Micropropagation and *in vitro* seed germination of atoveran. **Revista Ceres**, v. 62, p. 215-223, 2015.

MORROW, R.C. LED lighting in horticulture. **HortScience**, v.43, p.1947–1950, 2008.

MOSQUEDA, R.M.A.; ANDREU, I.L.G.; SÁNCHEZ, L.I.J. Light quality affects growth and development of *in vitro* plantlet of *Vanilla planifolia* Jacks. **South African Journal of Botany**, v.109, p.288–293, 2017.

NAKHOODA, M.; WATT, M.P. E MYCOCK, D. The properties and interaction of auxins and cytokinins influence rooting of shoot cultures of *Eucalyptus*. **African Journal of Biotechnology**, v.11, p. 16568-16578, 2012.

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.

OLIVEIRA, M.L.de.; XAVIER, A.; PENCHEL FILHO, R.M.; REIS, J.P.dos. Efeito do intervalo de imersão e de injeção de ar na multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* em biorreator de imersão temporária. **Ciência Florestal**, v.24, p.37-45, 2014.

OLIVEIRA, L.S.; BRONDANI, G.E.; BATAGIN-PIOTTO. K.D.; CALSAVARA, R.; GONÇALVES, A.N.; ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus cloeziana* mature trees. **Aust For**, v.78, p. 219-231, 2015.

OLIVEIRA, L. S.; XAVIER, A.; LOPES, A. P.; TAKAHASHI, E. K.; OTONI, W. C. Multiplicação e alongamento *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Ciência Florestal**, v. 26, p. 235-247, 2016.

OLIVEIRA, T. R. **Influência dos subcultivos e da qualidade da luz na morfogênese *in vitro* em *Cedrela fissilis* vell. (Meliaceae)**. 2017. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2017.

PARVEEN, S.; SHAHZAD, A. Factors affecting in vitro plant regeneration from cotyledonary node explant of *Senna sophora* (L.) Roxb. –A highly medicinal legume. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 413-422, 2014.

POLESI, N. P.E. **Estudo da comunidade bacteriana endofítica e de sua manifestação na micropropagação de *Eucalyptus benthamii***. 2015. 151f. Tese (Doutora em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

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

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

SILVEIRA, D. G.; SOUZA, F. V. D.; VIDAL, A. M.; LEDO, C. A. S.; SANTANA, J. R. F. Efeito da sacarose e da aeração dos recipientes no enraizamento *in vitro* de Caroá. In: Embrapa Mandioca e Fruticultura-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS. **Anais...** Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 1 CD-ROM, 2012.

SORACE, M.; FARIA, R. T.; JUNIOR, C. V. D.; GOMES, G. P. G.; BARBOSA, C. M.; VIEIRA, F. G. N.; SILVA, G. L. S. DA.; TAKAHASHI, L. S. A.; SCHNITZER, J. A. Crescimento *in vitro* de *Oncidium baueri* (Orchidaceae) em diferentes concentrações de macronutrientes e sacarose. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, p. 775-782, 2008.

SZECHYŃSKA-HEBDA, M.; KRUK, J.; GORECKA, M.; KARPINSKA, B.; KARPIŃSKI, S. Evidence for light wavelength-specific systemic photoelectrophysiological signalling and cellular light memory of excess light episode in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.22, p.1–18, 2010.

TORMEN, G.C.R. **Multiplicação *in vitro* e enraizamento *ex vitro* de *Eucalyptus cloeziana***. 2017. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais) – Universidade federal de Mato Grosso, Cuibá, 2017.

TRINDADE, H.; PAIS, M. S. *In vitro* studies on *Eucalyptus globulus* rooting ability. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant**, Washington, v. 33, p. 1-5, 1997.

WATT, M.P. Genotypic-unspecific protocols for the commercial micropropagation of *Eucalyptus grandis* × *nitens* and *E. grandis* × *urophylla*. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v.38, p. 125 – 133, 2014.

WENDLING. I.; XAVIER, A. influência da miniestaquia seriada no vigor radicular de clones de *Eucalyptus grandis*. **R. Árvore**, v.29, p.681-689, 2005.

WENDLING, I.; TRUEMAN, S.J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry – part I: concepts, regulation and consequences of phase change. **New For**, v.45, p.449-471, 2014a.

WENDLING, I.; TRUEMAN, S.J.; XAVIER, A. Maturation and related aspects in clonal forestry – part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. **New For**, v.45, p. 473-486, 2014b.

XAVIER, A.; COMÉRIO, J. Microestaquia: uma maximização da micropropagação de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, v.20, p.9-16, 1996.

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

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

CONCLUSÕES GERAIS

A produção de mudas do gênero *Corymbia* e alguns de seus híbridos interespecíficos têm destacado, visto a importância que a espécie tem adquirido no setor florestal. No entanto, diante das dificuldades encontradas atualmente na propagação clonal de clones selecionados de algumas espécies e híbridos desse gênero, como *Corymbia citriodora*, a obtenção de um protocolo eficiente e repetível de propagação vegetativa para o estabelecimento de condições ideais no processo de clonagem dessas plantas tem-se tornado um desafio.

Apesar de apresentarem forte heterose ou vigor híbrido para características de crescimento, os cruzamentos entre *Corymbia torelliana* e *Corymbia citriodora* ainda são pouco explorados. É importante considerar que as chances de clonagem em níveis operacionais são altas, em virtude da participação de *Corymbia torelliana* no cruzamento, gerando uma demanda permanente por novas tecnologias que permitam incrementar a eficiência dos atuais processos de propagação para esta e outras espécies. Um dos principais desafios da micropropagação baseia-se em estabelecer as melhores combinações de elementos em meio de cultura, que proporcionem o crescimento e desenvolvimento adequados dos explantes de espécies lenhosas, bem como ajustar as condições ambientais de cultivo.

Os resultados deste estudo indicam novas possibilidades para propagação vegetativa do gênero *Corymbia* através da micropropagação como ferramenta de produção mudas clonais, cujas vantagens são a possibilidade de propagação massal de clones em curto espaço de tempo; o maior controle nutricional, ambiental e fitossanitário; o transporte do material clonal para grandes distâncias sem danos; o armazenamento por longos períodos; bem como a retenção do vigor híbrido.

Como as espécies do gênero *Corymbia* são consideradas de difícil propagação vegetativa, o desenvolvimento de um protocolo, que foi objeto deste trabalho, possibilitou a maximização na produção de mudas através do estudo de fontes de luz, subcultivos, concentrações de hormônios, sacarose e trocas gasosas, visando a reversão à juvenildade e o revigoramento dos propágulos.

O controle de fatores ambientais, como a temperatura e luz foram fatores importantes para a resposta morfogênica *in vitro* e a luz vermelho (620-750 nm)/azul (450-495 nm), atuou de forma específica na morfogênese, crescimento e desenvolvimento dos explantes. Em virtude

da metodologia adotada para a proliferação das gemas axilares, a fonte de luz LED vermelho/azul apresentou os melhores resultados para as variáveis vigor, número de brotações por explante, comprimento de brotos e porcentagem de enraizamento e sobrevivência, ao mesmo tempo que minimizou a oxidação fenólica e contaminação, demonstrando ser a mais adequada para as fases de introdução, multiplicação, alongamento *in vitro*, que por sua vez, importantes na obtenção de brotações com tamanho adequado para a fase de enraizamento.

O uso de lâmpadas de diodos emissores de luz (LED) no vegetal foi vantajosa em relação as fluorescentes, uma vez que forneceram luz com mais eficiência, através de pontos particulares do espectro de luz. Diante disso, para estes materiais genéticos, os LEDs podem ser a fonte de luz predominante em salas de crescimento para maximizar a produção e o desenvolvimento de plantas *in vitro*.

Para espécies arbóreas, a micropropagação como meio de rejuvenescimento e, ou, revigoramento é dependente do número de subcultivos *in vitro*, necessários para alcançar melhores respostas quanto ao potencial de enraizamento adventício. Com base nos resultados obtidos nesse trabalho desenvolvido, para os clones híbridos selecionados, o nono subcultivo apresentou os maiores valores para o número de brotos por explante e vigor durante a multiplicação. Contudo, esse rejuvenescimento/revigoramento normalmente tem sido progressivo, parcial e dependente do genótipo.

Em relação à utilização de reguladores de crescimento, a aplicação da citocinina 6-benziladenina (BA), induziu a divisão celular e estimulou maior número de brotações. Os explantes apresentaram resposta eficiente principalmente nas concentrações de 0,5 mg L⁻¹ para os clones *Corymbia torelliana* x *C. Citriodora* (TC01, TC02 e TC03) e 1,0 mg L⁻¹ para o clone *Corymbia citriodora* x *C. torelliana* (CT01), destacando-se na fase de multiplicação *in vitro*. É importante considerar que uma resposta positiva na micropropagação pela aplicação desses hormônios exógenos ao meio de cultivo, deve-se principalmente a um balanço adequado, pois quando a concentração é excedida, pode ser tóxica para o explante, tendo consequências como hiper-hidricidade, oxidação, inibição ao desenvolvimento e encurtamento de brotos.

Um outro fator avaliado nesse trabalho diz respeito à fonte de sacarose no meio, bem como o uso de ventilação natural ou forçada na micropropagação. No presente estudo a quantidade utilizada de 15 g L⁻¹ de sacarose apresentou os melhores resultados diante das variáveis analisadas, concentração essa que apresenta redução desse componente no meio,

comparada com o emprego usual na micropropagação de *Eucalyptus* e *Corymbia* que tem sido adotada de 30 g L⁻¹, proporcionando, assim um melhor custo/benefício. Além disso, a redução nas concentrações de carboidrato pode evitar desordens anatômicas e metabólicas, que acarretam em baixas taxas de sobrevivência durante a aclimatização. A fonte de carbono, adicionada, influenciou significativamente o desempenho do explante, devido aos seus efeitos sobre o aporte de energia e a manutenção do potencial osmótico, garantindo a conservação da água nas células. Em relação as trocas gasosas, o uso da ventilação natural obteve os melhores resultados para o comprimento das brotações na fase de alongamento *in vitro*, proporcionando o tamanho adequado para a obtenção de microestacas para a fase de enraizamento, contudo esse resultado contrasta com diversos estudos na literatura, com a aplicação de manejo com uso de membranas porosas.

Como foi visto, devido às dificuldades de enraizamento encontradas em algumas espécies e híbridos de *Corymbia* na propagação clonal, a utilização de novas técnicas para a propagação vegetativa e os ajustes dos diversos fatores avaliados, influenciaram de maneira positiva na obtenção de uma melhor resposta na propagação desses clones. Para porcentagem de enraizamento dos explantes aos 35 dias, o maior valor encontrado foi para o clone híbrido de *Corymbia torelliana* x *C. citriodora* (TC03), em que nos sistemas *in vitro* e *ex vitro* apresentaram em média 97% e 71% de enraizamento, respectivamente. Entretanto, é importante salientar que a espécie *Corymbia torelliana*, possui naturalmente a maior capacidade de enraizamento em relação a outras espécies pertencentes ao gênero *Corymbia*, principalmente se utilizar esta espécie como genitor feminino.

Para o gênero *Coymbia* os níveis de enraizamento dos clones selecionados normalmente são baixos, o que tem limitado a sua utilização em programas clonais. Diante dos objetivos propostos, através do enraizamento *in vitro* e *ex vitro*, foi possível observar, para todos os clones híbridos utilizados nesse estudo, valores superiores aos encontrados na literatura, possibilitando assim sua viabilização no processo da produção de mudas clonais.

Estes resultados podem ser o ponto de partida para novas pesquisas, favorecendo o estabelecimento de protocolos de poliploidia, transgenia, embriogênese somática e organogênese envolvendo o ambiente de cultivo *in vitro*, com o objetivo de otimizar a qualidade das mudas produzidas e contribuindo para a propagação vegetativa do gênero *Corymbia*,

indicando as bases para futuros estudos na área, na procura da melhora contínua dos processos de propagação *in vitro*.