

## Qualidade de luz na multiplicação *in vitro* de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F.Macbr

## Light quality on *in vitro* multiplication of *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F.Macbr

## Calidad de la luz en la multiplicación *in vitro* de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F.Macbr

João Victor Baptista Silveira<sup>1</sup>

Natane Amaral Miranda<sup>2</sup>

Marcel Carvalho Abreu<sup>3</sup>

**Resumo:** A luz é um dos principais fatores de controle do crescimento vegetal, este estudo avalia a sua influência no crescimento *in vitro* de *Apuleia leiocarpa*. Foram avaliadas diferentes lâmpadas LED (branca, vermelha, azul e vermelha-azul), bem como a intensidade da luz LED branca (15, 30, 60 e 75  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). A utilização da lâmpada LED branca proporcionou maior vigor e tamanho de brotações. Maior produção de gemas, brotações e calos foram observados nas intensidades de luz entre 40 e 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Os diferentes tipos e intensidades de luz testadas permitiram o crescimento da espécie *in vitro*.

**Palavras-chave:** micropropagação; cultura de tecidos; garapa; espécie florestal.

**Abstract:** Light is one of the main factors controlling plant growth, this study evaluates its influence on the *in vitro* growth of *Apuleia leiocarpa*. Different LED lamps (white, red, blue and red-blue) were evaluated, as well as the intensity of the white LED light (15, 30, 60 and 75  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). The use of the white LED lamp provided greater vigor and size of shoots. The highest production of buds, shoots and callus was observed at light intensities between 40 and 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . The different types and intensities of light tested allowed the specie to grow *in vitro*.

**Keywords:** micropropagation; tissue culture; garapa; forest specie.

**Resumen:** La luz es uno de los principales factores que controlan el crecimiento de las plantas, este estudio evalúa su influencia en el crecimiento *in vitro* de *Apuleia leiocarpa*. Se evaluaron diferentes lámparas LED (blanca, roja, azul y rojo-azul), así como la intensidad de la luz LED blanca (15, 30, 60 y 75  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). El uso de la lámpara LED blanca proporcionó mayor vigor y tamaño de los brotes. La mayor producción de yemas, brotes y callos se observó con intensidades de luz entre 40 y 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Los diferentes tipos e intensidades de luz probados permitieron el crecimiento *in vitro* de la especie.

**Palabras-clave:** micropropagación; cultivo de tejidos; garapa; especies forestales.

Submetido 14/09/2023

Aceito 06/05/2024

Publicado 22/07/2024

<sup>1</sup> Graduando em Engenharia Florestal. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. <https://orcid.org/0009-0002-7331-4812>. E-mail: joao.bapt@outlook.com

<sup>2</sup> Doutora em Ciência Florestal. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. <https://orcid.org/0000-0001-8197-5421>. E-mail: nataneamaral@ufrj.com

<sup>3</sup> Doutor em Agronomia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. <https://orcid.org/0000-0002-6457-421X>. E-mail: marcelc\_abreu@ufrj.com

### Considerações iniciais

A Mata Atlântica possui um histórico ininterrupto de degradação ambiental, o mais antigo e contínuo do Brasil (D'Arrigo *et al.*, 2020). Ao longo do tempo, observa-se intensa exploração de seus recursos, apresentando áreas de alta vulnerabilidade e apontada como prioritária para conservação (Marques *et al.*, 2016; Azevedo *et al.*, 2023). Também é considerada uma das florestas mais ricas em biodiversidade de espécies ameaçadas do planeta (Pinto; Hirota, 2022), com espécies nativas com grande potencial de uso.

A *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F.Macbr., espécie nativa da Mata Atlântica, é conhecida popularmente como Amarelão, Mitaroá, Cumaru Cetim, Grápia ou mais comumente como Garapa, e pertence à família *Fabaceae*. A espécie possui importância econômica, social e ambiental devido à valorização de sua madeira, além do potencial apícola, medicinal e energético (Apuleia..., 2014). Em decorrência da exploração em larga escala, principalmente para extração de madeira e fragmentação do habitat, a *Apuleia leiocarpa* sofreu intensa redução nos últimos 100 anos, que resultou na classificação da espécie como “vulnerável” na Lista Vermelha do Centro Nacional de Conservação da Flora (Apuleia..., 2012).

A propagação de *Apuleia leiocarpa* é realizada em maioria por via seminífera (Lencina *et al.*, 2014). No entanto, a propagação vegetativa constitui uma alternativa importante para contornar dificuldades encontradas no processo convencional de produção de mudas, como baixa disponibilidade de sementes, baixas taxas germinativas e sazonalidade de coletas de sementes, possibilitando, assim, o resgate e a conservação de recursos genéticos (Hartmann *et al.*, 2014). Dentre as técnicas de propagação vegetativa de espécies florestais, a cultura de tecidos se encontra entre as principais.

A cultura de tecidos vegetais representa uma ferramenta da biotecnologia que pode agregar valor e contribuir para a expansão, valorização e conservação de plantas (Santos *et al.*, 2022), permitindo o resguardo do material genético, bem como a possibilidade de propagação de espécies com alto risco de extinção (Xavier; Wendling; Silva, 2021). Torna-se, portanto, uma alternativa viável para a propagação de plantas que apresentam dificuldades na reprodução natural e baixo poder germinativo, bem como em cenários em que os métodos convencionais de propagação vegetativa não são eficientes (Hartmann *et al.*, 2014). Entretanto, ainda são escassos os estudos sobre o método de propagação adequado para a maioria das espécies

florestais nativas e que permitam uma produção de mudas saudáveis em larga escala (Sartor *et al.*, 2014).

A cultura de tecidos engloba diferentes técnicas de propagação vegetativa de plantas, sendo a micropropagação uma das mais difundidas e utilizadas. A micropropagação é utilizada na área florestal com diferentes finalidades, como preservação de germoplasma, multiplicação de plantas selecionadas, rejuvenescimento e limpeza clonal (Xavier; Wendling; Silva, 2021). Com a micropropagação é possível produzir um material homogêneo e uniforme, livre de patógenos, vigoroso, em larga escala, em tempo e espaço reduzidos (Trueman; Hung; Wendling, 2018). Neste processo, diferentes fatores são responsáveis pelo desenvolvimento e resposta morfogênica das plantas *in vitro*, como a composição do meio nutritivo, os reguladores de crescimento utilizados e as condições da sala de cultivo em que as plantas são mantidas. A qualidade da luz está entre os principais fatores ambientais controlados no cultivo de plantas *in vitro*, no entanto é raramente abordada em estudos de propagação (Batista *et al.*, 2018).

A luz é um fator fundamental para as plantas, pois serve como um sinal ambiental e de fonte de energia, regulando direta ou indiretamente o crescimento e diferenciação das plantas (Cavallaro *et al.*, 2022). A taxa fotossintética, a morfologia da planta, o desenvolvimento e metabolismo secundário são alguns dos principais fatores afetados pela intensidade e pelo tipo de luz disponível, apresenta influência direta sobre diferentes respostas morfológicas das plantas como taxa de multiplicação, enraizamento, alongamento, produção de pigmentos fotossintetizantes e substâncias voláteis (Alvarenga *et al.*, 2015; Kepenek, 2019). O controle da quantidade de luz disponível para as plantas é fundamental, uma vez que pode haver crescimento reduzido sob baixa intensidade da luz, enquanto o excesso de luz pode danificar as estruturas fotossintéticas (Silva *et al.*, 2017), sendo respostas variáveis entre as espécies.

Deste modo, as propriedades da luz como qualidade espectral, irradiância, intensidade e fotoperíodo desempenham um papel importante na morfogênese, crescimento e metabolismo de muitas vias bioquímicas nas plantas. Os diodos emissores de luz (LEDs) demonstram oferecer perspectivas interessantes em projetos de cultivo de plantas em ambiente controlado e em salas de crescimento de culturas *in vitro*, em comparação às luzes fluorescentes usadas anteriormente, por possuírem especificidade de comprimento de onda, menor radiação de calor, maior durabilidade e menor consumo de energia (Batista *et al.*, 2018; Cavallaro; Muleo, 2022).

O conhecimento sobre aspectos que afetam a resposta vegetal no cultivo *in vitro* é escasso para muitas espécies, principalmente nativas como *Apuleia leiocarpa*. Há carência de estudos que abordem fatores envolvidos na propagação vegetativa, portanto, é necessário o desenvolvimento de metodologias mais eficientes, que viabilizem a produção de mudas em quantidade e qualidade superior. Informações sobre a relação entre luz e o padrão de crescimento das plantas *in vitro* dão suporte para o desenvolvimento de protocolos de cultivo *in vitro* mais eficientes (Miranda *et al.*, 2020). Neste sentido, este estudo avalia o crescimento *in vitro* de plantas de *Apuleia leiocarpa* submetidas à iluminação em diferentes tipos de luz e intensidade luminosa.

### Metodologia

O trabalho emprega uma abordagem quantitativa, utilizando-se de dados numéricos para a descrição e explicação da influência de diferentes tipos de luz e intensidades luminosas no desenvolvimento *in vitro* de *Apuleia leiocarpa*. Trata-se de uma pesquisa estruturada, de natureza aplicada, com a utilização de métodos estatísticos para quantificar os dados e generalizar os resultados. Os procedimentos deste trabalho o caracterizam como pesquisa experimental para levantamento e coleta dos dados em ambiente controlado. Os objetivos são de característica explicativa e abordam o comportamento das plantas em diferentes condições de cultivo, indicando a importância de tais informações para a espécie que atualmente não são encontradas na literatura.

Dessa maneira, atribui-se a esta pesquisa uma abordagem quantitativa de natureza aplicada cujo intuito explicativo é a estimação da melhor qualidade de luz no desenvolvimento *in vitro* de *Apuleia leiocarpa*. Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Recursos Genéticos Florestais (Laborgen) do Núcleo de Biotecnologia Florestal (NBF), do Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica - RJ.

### Material vegetal

Para obtenção de plantas *in vitro* isentas de contaminação, realizou-se a assepsia e quebra de dormência das sementes de *A. leiocarpa* em ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) na concentração

de 98% por 20 minutos sob agitação constante. Após, foi realizado enxague com água destilada e autoclavada por 5 minutos (Fabris; Gerber; Sartoretto, 2016).

Após desinfestação, as sementes foram inoculadas em frascos contendo 30 mL de meio de cultura WPM (Lloyd; Mccown, 1981), acrescido de 0,1 g L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 0,8 g L<sup>-1</sup> de polivinilpirrolidona (PVP), 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 2,3 g L<sup>-1</sup> de phytigel, com pH ajustado para 5,7 ± 0,1. Antes da inoculação, o meio de cultura foi autoclavado por 20 minutos à temperatura de 120 °C e pressão de 1 atm. Foram inoculadas 3 sementes por recipiente, mantidas em sala de cultura com temperatura (25 ± 2 °C) e fotoperíodo de 16 h. Após 30 dias, as plântulas estabelecidas *in vitro* foram utilizadas como fonte de explantes.

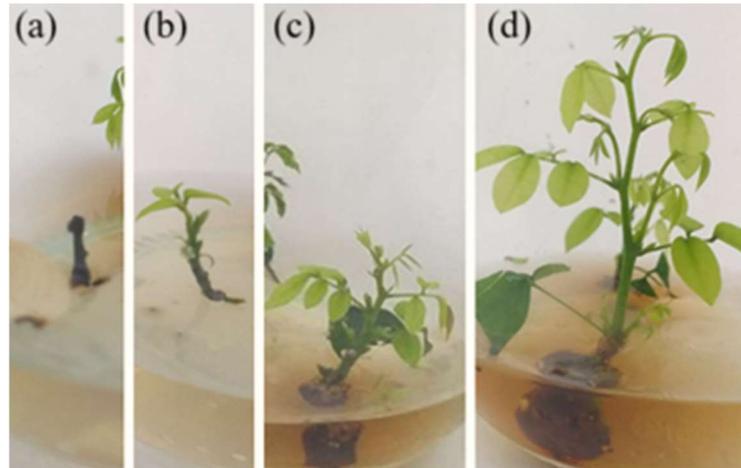
### Experimento 1: tipos de luz

Em câmara de fluxo laminar, segmentos nodais apresentando cerca de 2 cm de comprimento foram inoculados em frascos contendo 30 mL de meio de cultura WPM acrescido de 0,1 g L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 0,8 g L<sup>-1</sup> de PVP, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 2 mg L<sup>-1</sup> de benzilaminopurina (BAP) e 2,3 g L<sup>-1</sup> de phytigel, com pH ajustado para 5,7 ± 0,1. Antes da inoculação, o meio de cultura foi autoclavado por 20 minutos à temperatura de 120 °C e pressão de 1 atm. Foram inoculados 2 segmentos nodais em cada frasco de cultivo.

Os frascos com os explantes foram mantidos em sala de cultivo em temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h, intensidade de 60 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e diferentes tipos de luz, sendo: LED branco (420-695 nm, Tubular T8, 9w, Inmetro), LED vermelho (610-693 nm, Tubular T8, 10w, Inmetro), LED azul (390-480 nm, Tubular T8, 10w, Inmetro) e LED vermelho-azul (linha de LED vermelho e linha de LED azul). Adotou-se um delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos (tipos de luz), 17 repetições, cada unidade experimental composta por um frasco com dois explantes.

Aos 35 dias de cultivo, avaliou-se: o número e o tamanho médio de brotações formadas; o tamanho da maior brotação; o número de gemas; vigor das plantas, classificado em uma escala de 0 a 3, onde 0 – morto, 1 - ruim, 2 - bom, 3 – ótimo (Figura 1).

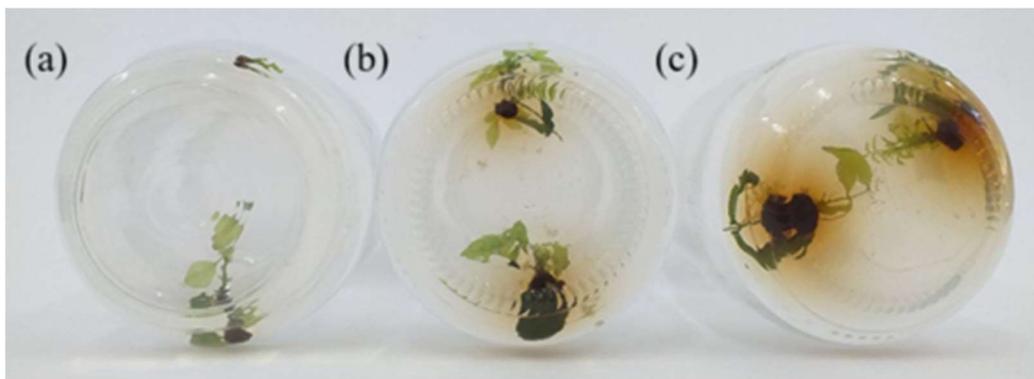
Figura 1 - Classificação de vigor para *Apuleia leiocarpa* cultivada *in vitro* sob diferentes condições de luz, variando entre 0 para morto (a), 1 para ruim (b), 2 para bom (c) e 3 para ótimo (d).



Fonte: elaboração própria (2023).

Além disso, também foi avaliada a oxidação do meio de cultura, classificada em uma escala de 0 a 2, onde 0 - ausente, 1 - baixa, 2 - alta (Figura 2); quantificações de clorofilas; e carotenoides totais.

Figura 2 - Classificação de oxidação do meio de cultivo de *Apuleia leiocarpa* sob diferentes condições de luz, em escala de 0 para ausente (a), 1 para baixa (b) e 2 para alta (c).



Fonte: elaboração própria (2023).

Para quantificação de clorofilas e carotenoides, cinco discos foliares de 5 mm de diâmetro foram retirados de folhas expandidas, localizadas no primeiro ou segundo par de folhas, e inoculados por 48 horas no escuro em 5 mL de solução de dimetilsulfóxido (DMSO)

saturado com carbonado de cálcio, seguindo metodologia de Santos *et al.* (2008). Para determinar a absorvância das amostras, utilizou-se cubeta de quartzo de 10 mm de caminho ótico, em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda 665, 649 e 480 nm. O cálculo das concentrações de clorofilas e carotenoides totais foi realizado a partir do método descrito por Wellburn (1994).

### **Experimento 2: intensidade da luz**

Para o preparo de meio de cultura e inoculação dos explantes, seguiu-se o mesmo protocolo descrito no experimento de tipo de luz, descrito anteriormente (Experimento 1). Os frascos foram mantidos em sala de cultura com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16h, sob luz LED branca nas intensidades de 15, 30, 60 e  $75 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , obtidas por luxímetro digital (AKSO, modelo AK310). Adotou-se um delineamento inteiramente casualizado com 4 tratamentos (intensidades luminosas), 12 repetições, cada unidade experimental composta por um frasco de cultivo com dois explantes cada.

Aos 35 dias de cultivo, avaliou-se: o número e o tamanho médio de brotações formadas; o tamanho da maior brotação; o número de gemas; vigor das plantas, classificado em uma escala de 0 a 3, onde 0 – morto, 1 - ruim, 2 - bom, 3 – ótimo (Figura 1); oxidação do meio de cultura, classificado em uma escala de 0 a 2, onde 0 - ausente, 1 - baixa, 2 – alta (Figura 2); e o tamanho dos calos.

### **Análise dos dados e resultados**

As pressuposições para a realização de análise de variância dos dados foram executadas por meio dos testes: Bartlett para verificar a homogeneidade de variância e o teste de Shapiro-Wilk para normalidade de resíduos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial (4 tipos de luz e 4 intensidades) e análise complementar do experimento com teste de Tukey para a comparação de qualidade da luz e análise de regressão para intensidade da luz. O nível de significância de 5% de probabilidade de erro foi adotado como padrão nas análises realizadas em ambiente R versão 4.2.3 (R Core Team, 2023), utilizando o pacote ExpDes (Ferreira; Cavalcanti; Nogueira, 2014). Para a variável número de brotações do experimento de qualidade de luz, realizou-se a transformação para  $\sqrt{x + 0,5}$  para posterior

análise de variância e teste de Tukey. Os valores médios apresentados para esta variável representam valores não transformados.

### Experimento 1: tipos de luz

Para a variável maior altura média das brotações formadas, altura da maior brotação, o vigor e a concentração de clorofila b das plantas cultivadas *in vitro* foram influenciados pelos tratamentos de tipos de luz. Enquanto para as variáveis número de gemas, número de brotações, oxidação do meio e concentrações de clorofila a, clorofila total e carotenoides não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultado da análise de variância para as variáveis número de gemas formadas, número de brotações, tamanho de brotações, tamanho da maior brotação, vigor das plantas e oxidação do meio a partir de segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa* inoculados *in vitro* em função dos diferentes tipos de luz, 35 dias após a inoculação.

| VARIÁVEL                  | P                    | CV (%) |
|---------------------------|----------------------|--------|
| Número de gemas           | 0,9519 <sup>ns</sup> | 52,0   |
| Número de brotações       | 0,6071 <sup>ns</sup> | 25,6   |
| Tamanho de brotações      | 0,0066*              | 45,2   |
| Tamanho da maior brotação | 0,0016*              | 42,6   |
| Vigor                     | 0,0193*              | 33,6   |
| Oxidação                  | 0,6272 <sup>ns</sup> | 50,9   |
| Clorofila a               | 0,0674 <sup>ns</sup> | 11,7   |
| Clorofila b               | 0,0473*              | 6,2    |
| Clorofila total           | 0,0578 <sup>ns</sup> | 8,7    |
| Carotenoides              | 0,1069 <sup>ns</sup> | 19,9   |

CV: Coeficiente de Variação; P: probabilidade do valor P; \*:  $p < 0,05$ ; ns:  $p \geq 0,05$ .

Fonte: elaboração própria (2023).

A luz LED branca permitiu maior crescimento em altura das brotações (Tabela 2), quando comparada à luz LED azul e LED vermelho. Quanto ao vigor, observou-se plantas mais vigorosas na exposição à luz LED branca quando comparada à LED azul. Para estas variáveis, a luz LED branca proporcionou resultados semelhantes aos observados sob luz LED vermelho-azul.

Tabela 2 - Valores médios de tamanho de brotações, tamanho da maior brotação e vigor de *Apuleia leiocarpa* sob diferentes tratamentos de tipos de luz, após 35 dias de cultivo *in vitro* (Médias seguidas de letras iguais não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey em nível de 95% de probabilidade).

| QUALIDADE DE LUZ LED | TAMANHO DE BROTAÇÕES (cm) | TAMANHO DA MAIOR BROTAÇÃO (cm) | VIGOR   | CLOROFILA B ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) |
|----------------------|---------------------------|--------------------------------|---------|---------------------------------------|
| Branca               | 1,85 a                    | 1,64 a                         | 2,03 a  | 5.97 b                                |
| Vermelho             | 1,17 a                    | 1,01 bc                        | 1,53 ab | 6.63 ab                               |
| Vermelho-azul        | 1,57 ab                   | 1,54 ab                        | 1,61 ab | 7.14 a                                |
| Azul                 | 1,04 b                    | 0,93 c                         | 1,40 b  | 6.49 ab                               |

Fonte: elaboração própria (2023).

As plantas detectam e respondem aos diferentes comprimentos de onda da luz por meio de fotorreceptores, no entanto a condução do sinal realizada pelos fotorreceptores é dependente de outros fatores do ambiente e até das atividades fisiológicas da planta (Burgie *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2019). A clorofila absorve mais eficientemente as luzes vermelha e azul e, assim as lâmpadas LED vermelho-azul, por emitirem comprimentos de ondas no espectro visível nas regiões de interesse para a fotossíntese (Batista *et al.*, 2018) poderiam permitir melhor desenvolvimento das plantas. Todavia, a exposição à luz vermelha e azul não precisa ser simultânea (Chen *et al.*, 2019) e outras qualidades de luz, como a branca por exemplo, também abrangem estes comprimentos de onda, indicando necessidade de avaliação mais detalhada.

A variação na qualidade de luz pode exercer um papel essencial na micropropagação de espécies vegetais, estimulando o crescimento *in vitro*, bem como a multiplicação e o enraizamento de explantes, possibilitando uma maior eficiência biológica (Cunha *et al.*, 2019; Cruz *et al.*, 2021). Também exerce grande influência em fatores como germinação de sementes, expansão dos cotilédones e das folhas, coloração e biossíntese de pigmentos, alongamento do caule e indução ao florescimento em plantas propagadas convencionalmente (Cunha *et al.*, 2019; Almeida *et al.*, 2021). Destaca-se também a alteração estrutural da anatomia das folhas, parecendo exercer maiores efeitos durante a expansão foliar, exibindo alto grau de plasticidade anatômico, morfológico e fisiológico, bem como variações no balanço hormonal e translocamento de fotoassimilados (Stefano; Rosario, 2003; Cunha *et al.*, 2019).

A luz vermelha (620-700 nm) apresenta um efeito direto na fotomorfogênese de algumas espécies vegetais, mediante atuação em fatores como estímulo a germinação, desestiolamento e expansão foliar (destacando-se o desenrolamento foliar), aumento da taxa de crescimento, formação e desenvolvimento do primórdio foliar e de folhas primárias, inibição do florescimento e do alongamento de entrenós, além de promover a orientação dos cloroplastos em relação à luz fraca direcional (Taiz *et al.*, 2017)

Por sua vez, a luz azul (350-500 nm) também apresenta uma grande influência no desenvolvimento das plantas, destacando-se um acentuado fototropismo, redução de crescimento por meio da inibição de alongamento caulinar e do hipocótilo em plântulas, a estimulação de floração, síntese de clorofilas, carotenoides e outros biocompostos, abertura estomática, trocas gasosas e aumento de brotações (Taiz *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2019).

Dentro da faixa espectral da luz visível (400-700 nm), muitos pesquisadores se concentraram no estudo do papel da luz vermelha e azul na definição de uma combinação ideal, uma vez que os comprimentos de onda estão próximos da absorbância dos pigmentos fotossintéticos que efetivamente se relacionam com a fotossíntese (Nguyen *et al.*, 2021). Contudo, a luz branca, por possuir um espectro mais amplo, também abrange os comprimentos de onda, muito utilizada no cultivo de plantas *in vitro*. Além disto, plantas expostas à combinação de luzes vermelhas e azuis podem ter aparência cinza-arroxeadas ao olho humano, o que dificulta na avaliação visual da saúde das plantas (Kim *et al.*, 2005). Caso seja um problema, o uso de LED branca surge como uma solução, além de ser eficaz no crescimento das plantas (Nguyen *et al.*, 2021).

As clorofilas são um grupo de moléculas especializadas na absorção de luz e transferência de energia e elétrons durante a fotossíntese, as quais atuam principalmente nas regiões do azul e vermelho do espectro luminoso. As folhas de sombra ou de baixa luminosa aumentam a captura de luz por terem mais clorofila total por centro de reação e uma razão mais alta entre clorofila b e clorofila a (Taiz *et al.*, 2017). A clorofila a é o pigmento utilizado para realização da reação fotoquímica, primeiro estágio do processo fotossintético, desempenhando um papel na captação de luz, bem como na conversão da energia dos fótons absorvidos em energia química (Björn *et al.*, 2009), enquanto a clorofila b e os demais pigmentos apenas

auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação (Taiz *et al.*, 2017).

Os carotenoides são denominados pigmentos acessórios, encontrados em todos os organismos fotossintetizantes naturais, possuem função de absorver a energia luminosa e transferir a clorofila para o processo de fotossíntese, além disto, desempenham um papel essencial na fotoproteção, ou seja, ajudam a proteger o aparelho fotossintético de danos causados pela luz devido a absorção de grandes quantidades de energia, ocasionada essencialmente pela alta intensidade e exposição por grandes períodos. Destaca-se que apresentam um papel importante na coloração de flores, frutos e no amadurecimento (Taiz *et al.*, 2017).

Segundo Andrade (2022), ao avaliar a influência da luz na morfogênese de *Eucalyptus dunnii* e *Eucalyptus benthamii*, obteve uma importante correlação entre o tipo de luz e o desenvolvimento das plantas, em que o uso de luz LED azul proporcionou aumento da multiplicação dos explantes, mediante o maior número de brotações axilares, além da redução de oxidações e incremento em altura. Por sua vez, Rocha *et al.* (2023), ao avaliarem a influência do espectro luminoso em *Physalis peruviana L.*, observaram que a regeneração e comprimento de raízes, bem como a massa fresca total, é maior sob condições de luz LED vermelha, enquanto a luz azul ocasionou um incremento no número de folhas, apesar de afetar negativamente o crescimento em altura. Contudo, Santos Junior *et al.* (2022) constataram em *Cedrela odorata L.* que a utilização da luz LED branca permitiu um alongamento das brotações e reduziu a oxidação em meio de cultura na fase de multiplicação.

Em trabalhos com genótipos de *Populus euramericana*, descobriu-se que uma combinação de luz vermelha e azul produziu a maior percentagem de regeneração de brotos em comparação com a luz monocromática ou fluorescente. Estudos adicionais sobre a qualidade da luz e crescimento *in vitro* das plântulas, demonstraram que a adequação de combinações de luz vermelha (50%) e azul (50%) permitiu melhorar a maioria das características morfológicas estudadas (Kwon *et al.*, 2015). Ainda neste estudo, no entanto, os autores afirmaram que as respostas às diferentes condições de luz podem variar entre os genótipos de uma mesma espécie. Assim, compreende-se que a influência do tipo de luz sobre o processo de morfogênese de

plantas *in vitro* está associada à espécie, mas também é dependente dos demais fatores que interferem no crescimento vegetal.

### Experimento 2: intensidade da luz

Na avaliação de intensidade luminosa de lâmpadas LED branca no desenvolvimento *in vitro* de *Apuleia leiocarpa*, as variáveis influenciadas pelos tratamentos foram número de gemas, número de brotações e tamanho do calo ( $p < 0,05$ ). Para as variáveis vigor, tamanho médio da brotação, tamanho da maior brotação e oxidação do meio, não foram observadas diferenças significativas (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultado da análise de variância para o número de gemas emitidas, número de brotações, tamanho de brotações, tamanho da maior brotação, vigor das plantas, oxidação do meio e tamanho de calos a partir de segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa* inoculados *in vitro* em função das diferentes intensidades de luz, 35 dias após a inoculação.

| VARIÁVEL                  | P                     | CV (%) |
|---------------------------|-----------------------|--------|
| Número de gemas           | 0,03170*              | 57,1   |
| Número de brotações       | 0,04378*              | 66,8   |
| Tamanho de brotações      | 0,52237 <sup>ns</sup> | 41,6   |
| Tamanho da maior brotação | 0,6506 <sup>ns</sup>  | 45,0   |
| Vigor                     | 0,09870 <sup>ns</sup> | 53,0   |
| Oxidação                  | 0,21021 <sup>ns</sup> | 48,5   |
| Tamanho do calo           | 0,01068*              | 55,5   |

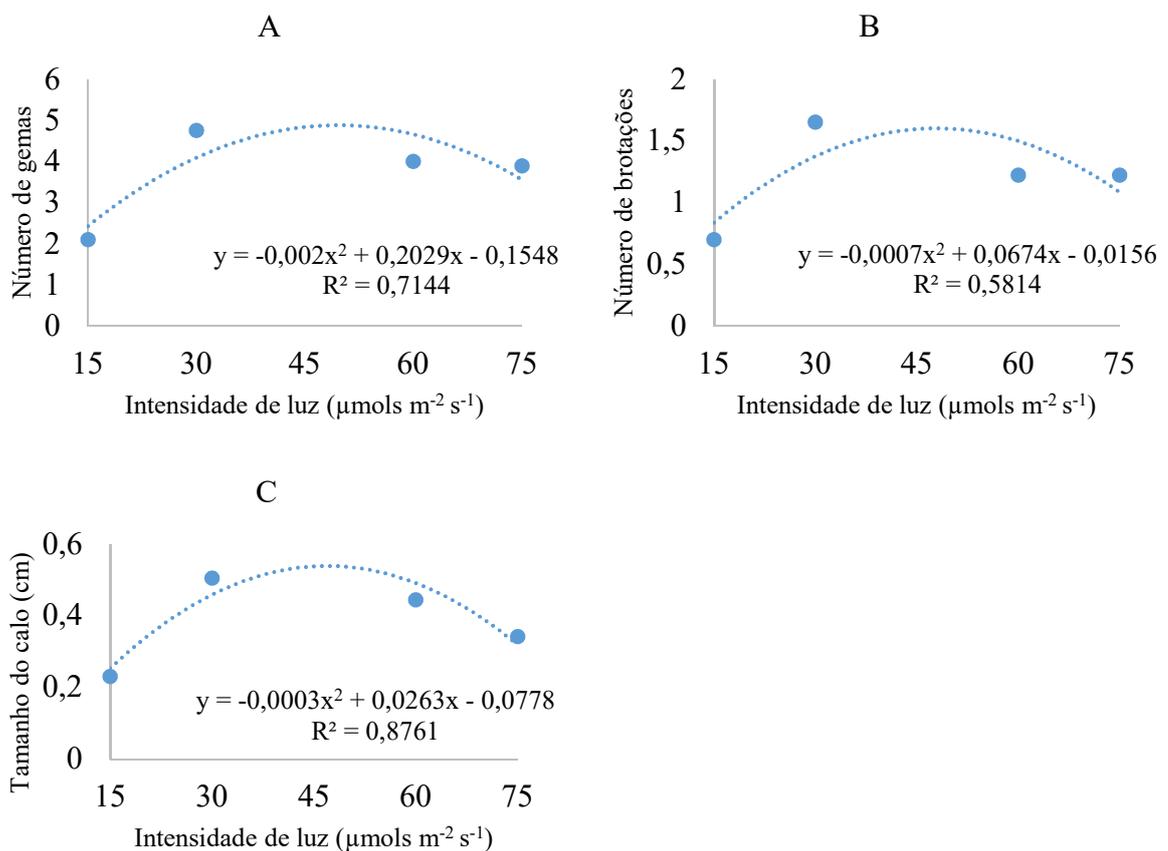
CV: Coeficiente de Variação; P: probabilidade do valor P; \*:  $p < 0,05$ ; ns:  $p \geq 0,05$ .

Fonte: elaboração própria (2023).

Ao avaliar o número de gemas obtidas *in vitro* no cultivo de *A. leiocarpa* sob diferentes intensidades luminosas, infere-se que na intensidade de  $51 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$  há maior produção de gemas (Figura 3A). Para a variável número de brotações, o ajuste quadrático indicou que sob a intensidade luminosa de  $48 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$  há maior produção de brotos para a espécie (Figura 3B). Na produção de calos tem o maior valor observado na intensidade de  $44 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 3C). Para todas estas variáveis que foram influenciadas pela intensidade de luz, observou-se tendência semelhante de ascendência com o aumento da intensidade, atingindo um ponto máximo com posterior diminuição (Figura 3).

No processo de micropropagação da espécie, quanto maior a produção de gemas e brotações na etapa de multiplicação, maior é a probabilidade de sucesso. Na produção de calos, apesar de não ser comumente indicativo de sucesso, aponta para uma resposta morfogênica da planta em relação à condição ambiental, que pode ser explorada com outros objetivos. Assim, os resultados deste trabalho indicam que intensidades de luz LED branca entre 40 e 60  $\mu\text{mol s}^{-1}$  são mais adequadas para multiplicação de *Apuleia leiocarpa in vitro*.

Gráfico 1 - Número de gemas (A), número de brotações (B) e tamanho do calo (C) em função das intensidades de luz LED branca na multiplicação *in vitro* de segmentos nodais de *Apuleia leiocarpa*, aos 35 dias após a inoculação.



Fonte: elaboração própria (2023).

A intensidade luminosa afeta o crescimento e desenvolvimento das plantas, provocando alterações fisiológicas e anatômicas, interferindo em fatores como altura, número de folhas,

espessura e área foliar, produção de raízes e brotações, relação de massa seca radicular/aérea, balanço hormonal e teor de clorofila e carotenoides (Araújo *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2023). Em situações de baixa intensidade luminosa, tem-se o rápido crescimento em altura, o que pode ser atribuído ao maior alongamento celular, visando uma busca maior de luz, bem como o aumento da área foliar, resultando em uma maior superfície fotossintetizante. Ademais, nestas condições, a fotossíntese pode ser ineficiente, limitando o crescimento das plantas (Silva *et al.*, 2017; Taiz *et al.*, 2017). Por sua vez, em maiores intensidades luminosas ocorre diminuição da área foliar juntamente ao aumento de número de folhas, além de maior concentração de clorofila por unidade de área foliar que promove uma absorção de luz mais eficiente. Apesar disto, também podem ocorrer danos às estruturas fotossintéticas e prejudicar a produtividade em diferentes intensidades de acordo com as espécies e variedades utilizadas (Fernandes *et al.*, 2013; Araújo *et al.*, 2019).

A resposta à intensidade luminosa é variável entre as diferentes espécies cultivadas *in vitro*. Para *Eucalyptus urophylla*, observou-se que microestacas podem ser obtidas *in vitro* utilizando intensidades de luz entre 60 e 140  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , sem observar danos nos explantes cultivados ou diferenças no crescimento (Miranda *et al.*, 2020). No entanto, Rojas-Vargas *et al.* (2023), ao avaliarem *Pinus ponderosa*, constataram que a utilização de LED na intensidade luminosa de 61,01  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , proporcionou maior alongamento das brotações, enquanto a utilização prévia de lâmpadas fluorescentes na intensidade de 61,71  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para a aclimatização permitiu maiores taxas de plantas aclimatadas.

O conhecimento sobre a melhor qualidade e quantidade de luz para cultivo *in vitro* de espécies vegetais também é importante para viabilizar o uso da micropropagação como técnica alternativa para produção de mudas. Além disto, a escolha do tipo de lâmpada e da quantidade de luz a ser disponibilizado para o crescimento das plantas em sala de crescimento nos laboratórios reflete no custo para produção do material vegetal. Assim, no cultivo de plantas, a manipulação, as condições e fontes de luz artificial é essencial para obter economia nos custos de eletricidade e equilibrar o rendimento e a qualidade das plantas.

O crescimento e a morfogênese da planta são fortemente influenciados pela luz, não apenas pelo tempo de exposição ou fotoperíodo, mas também pela quantidade de luz que são submetidas (intensidade luminosa) e pela qualidade da luz que é utilizada (composição do

comprimento de onda) (Batista *et al.*, 2018; Paradiso; Proietti, 2022). Desta forma, é importante que haja maior atenção ao controle eficiente das variáveis para proporcionar melhores condições ambientais para plantas cultivadas *in vitro*, aumentando a produtividade e tornando mais viável o uso da técnica para produção de mudas.

### Considerações finais

O tipo (cor/comprimento de onda) e a intensidade de luz são fatores que influenciam a multiplicação *in vitro* de *Apuleia leiocarpa*, e seu controle permite a otimização do desenvolvimento e crescimento da cultura.

As lâmpadas LED branca e LED vermelho-azul proporcionam melhores condições de luz no crescimento *in vitro* da espécie para a maioria das variáveis analisadas. As lâmpadas LED branca, vermelha e vermelho-azul permitiram melhores respostas para vigor e tamanho das brotações. Também em lâmpada vermelho-azul houve maior teor de clorofila B quando comparada ao uso de lâmpada LED branca.

Recomenda-se a utilização de lâmpadas LED branca no cultivo *in vitro* de *Apuleia leiocarpa* pois permitem as melhores condições para a multiplicação, além de possuírem menor custo e serem de fácil acesso.

Quanto à intensidade de luz, valores entre 40 e 60  $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de LED branca proporcionaram melhores respostas, permitindo a produção de maiores números de gemas, brotações e calos. A maior produção de gemas foi obtida na intensidade luminosa de 51  $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , o maior número de brotações foi observado na intensidade de 48  $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e o maior tamanho de calos na intensidade de 44  $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Assim, a utilização de lâmpadas LED branca na intensidade de luz entre 40 e 60  $\mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$  permitem a produção de maior número de explantes, portanto, são mais adequadas para multiplicação *in vitro* de *Apuleia leiocarpa*.

### Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro e ao Núcleo de Biotecnologia Florestal do Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

## Referências

- ALMEIDA, V. G. S. da *et al.* Influência da luminosidade sobre a fitomassa e qualidade da planta de *Ocimum basilicum* L. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 6, p. 58404-58415, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n6-303>. Acesso em: 17 ago. 2023.
- ALVARENGA, I. C. A. *et al.* *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 122, p. 299-308, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0766-7>. Acesso em: 20 ago. 2023.
- ANDRADE, R. S. de. **Micropropagação e desenvolvimento de mudas clonais de *Eucalyptus dunnii* e *Eucalyptus benthamii* usando diodos de emissão de luz (LEDs)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2022. Disponível em: [https://www.udesc.br/arquivos/cav/id\\_cpmenu/3428/Disserta\\_\\_o\\_Ramon\\_1685017461925\\_3428.pdf](https://www.udesc.br/arquivos/cav/id_cpmenu/3428/Disserta__o_Ramon_1685017461925_3428.pdf). Acesso em: 17 maio 2023.
- APULEIA leiocarpa (Vogel) J.F.Macbr. *In: Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 17 ago. 2014. Disponível em: <http://floradobrasil2015.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22796>. Acesso em: 01 jun. 2023.
- APULEIA leiocarpa (Vogel) J.F.Macbr. *In: Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2*. Rio de Janeiro: CNCFlora, 4 abr. 2012. Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Apuleia%20leiocarpa>. Acesso em: 10 set. 2023.
- ARAÚJO, L. L. N. *et al.* Intensidade de radiação influenciando características morfofisiológicas em folhas de *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd. **Iheringia, Série Botânica**, Porto Alegre, v. 74, e2019001, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.21826/2446-82312019v74e2019001>. Acesso em: 10 set. 2023.
- AZEVEDO, T. R. de. *et al.* **Relatório Anual do Desmatamento no Brasil 2022**. São Paulo: MapBiomias, 2023.
- BATISTA, D. S. *et al.* Light quality in plant tissue culture: does it matter? **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 54, n. 3, p. 195-215, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9902-5>. Acesso em: 10 set. 2023.
- BJÖRN, L. O. *et al.* A viewpoint: why chlorophyll a? **Photosynthesis research**, Dordrecht, v. 99, p. 85-98, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11120-008-9395-x>. Acesso em: 13 set. 2023.
- BURGIE, E. S. *et al.* Crystal structure of the photosensing module from a red/farred light-absorbing plant phytochrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**, Washington, v. 111, n. 28, p. 10179-10184, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1403096111>. Acesso em: 17 jul. 2023.

CAVALLARO, V. *et al.* Light and plant growth regulators on *in vitro* proliferation. **Plants**, Basel, v. 11, n. 7, e844, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants11070844>. Acesso em: 17 maio 2023.

CAVALLARO, V.; MULEO, R. The effects of LED light spectra and intensities on plant growth. **Plants**, Basel, v. 11, n. 15, e1911, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants11151911>. Acesso em: 20 jul. 2023.

CHEN, X. L. *et al.* Sugar accumulation and growth of lettuce exposed to different lighting modes of red and blue LED light. **Scientific Reports**, London, v. 9, n. 1, e6926, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43498-8>. Acesso em: 14 set. 2023.

CRUZ, J. G. *et al.* Qualidade de luz na multiplicação e enraizamento *in vitro* de mirtilheiro 'Woodard'. **Research, Society and Development**, Vargem Grande Paulista, v. 10, n. 2, e48510212790, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12790>. Acesso em: 10 set. 2023.

CUNHA, S. H. B. da *et al.* Influência da qualidade de luz no crescimento e acúmulo de voláteis de *Mentha spicata* cultivada *in vitro*. **Scientia Plena**, São Cristóvão, v. 15, n. 9, e090201, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2019.090201>. Acesso em: 9 set. 2023.

D'ARRIGO, R. C. P. *et al.* A seleção de áreas para conservação na Mata Atlântica Brasileira: revisão dos estudos voltados para priorização espacial. **Biodiversidade Brasileira-BioBrasil**, Brasília, v. 10, n. 2, p. 36-49, 2020. Disponível em: <https://revistaelectronica.icmbio.gov.br/BioBR/article/view/1462>. Acesso em: 17 ago. 2023.

FABRIS, D.; GERBER, T.; SARTORETTO, L. M. Desinfestação, germinação e micropropagação *in vitro* de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) Macbride. **Scientific Electronic Archives**, Rondonópolis, v. 9, n. 3, p. 17-26, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.36560/932016215>. Acesso em: 17 maio 2023.

FERNANDES, V. F. *et al.* Light intensity on growth, leaf micromorphology and essential oil production of *Ocimum gratissimum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 23, n. 3, p. 419-424, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000041>. Acesso em: 17 ago. 2023.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI P. P.; NOGUEIRA, D. A. ExpDes: an R package for ANOVA and experimental designs. **Applied Mathematics**, Irvine, v. 5, n. 19, p. 2952-2958, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4236/am.2014.519280>. Acesso em: 25 jun. 2023.

HARTMANN, H. T. *et al.* **Plant propagation: principles and practices**. 8. ed. Upper Sanddle River: Prentice Hall, 2014.

- KEPENEK, K. Photosynthetic effects of light-emitting diode (LED) on *in vitro*-derived strawberry (*Fragaria x Ananassa* cv. Festival) plants under *in vitro* conditions. **Erwerbs-Obstbau**, Heidelberg, v. 61, n. 2, p. 179-187, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10341-018-00414-0>. Acesso em: 17 ago. 2023.
- KIM, H. H. *et al.* Light-emitting diodes as an illumination source for plants: a review of research at Kennedy Space Center. **Habitation**, Elmsford, v. 10, n. 2, p. 71-78, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.3727/154296605774791232>. Acesso em: 13 set. 2023.
- KWON, A. *et al.* Light quality affects shoot regeneration, cell division, and wood formation in elite clones of *Populus euramericana*. **Acta Physiologiae Plantarum**, Kraków, v. 37, n. 65, p. 1-9, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1812-0>. Acesso em: 12 set. 2023.
- LENCINA, K. H. *et al.* *In vitro* establishment and growth of *Apuleia* seedlings. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 6, p. 1025-1030, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782014000600012>. Acesso em: 17 ago. 2023.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially feasible micro-propagation of *Mountain laurel*, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society**, Seattle, v. 30, p. 421-427, 1981.
- MARQUES, M. C. M. *et al.* Mata Atlântica: o desafio de transformar um passado de devastação em um futuro de conhecimento e conservação. In: PEIXOTO, A. L.; LUZ, J. R. P.; BRITO, M. A. **Conhecendo a biodiversidade**. Brasília: MCTIC, CNPq, PPBio, 2016. p. 50-67.
- MIRANDA, N. A. *et al.* Quality and intensity of light in the *in vitro* development of microstumps of *Eucalyptus urophylla* in a photoautotrophic system. **Forest Science**, Oxford, v. 66, n. 6, p. 754-760, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/forsci/fxaa027>. Acesso em: 17 ago. 2023.
- NGUYEN, T. K. L. *et al.* Effects of white LED lighting with specific shorter blue and/or green wavelength on the growth and quality of two lettuce cultivars in a vertical farming system. **Agronomy**, Basel, v. 11, n. 11, e2111, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agronomy11112111>. Acesso em: 27 ago. 2023.
- PARADISO, R.; PROIETTI, S. Light-quality manipulation to control plant growth and photomorphogenesis in greenhouse horticulture: the state of the art and the opportunities of modern LED systems. **Journal of Plant Growth Regulation**, Dresden, v. 41, n. 2, p. 742-780, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10337-y>. Acesso em: 17 ago. 2023.
- PINTO, L. P.; HIROTA, M. M. **30 anos de conservação do hotspot de biodiversidade da Mata Atlântica**: desafios, avanços e um olhar para o futuro. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica, 2022.

R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, 2023. Disponível em: <https://www.r-project.org/>. Acesso em: 10 set. 2023.

ROCHA, P. S. G. da *et al.* Utilização de diodos emissores de luz (LEDS) na produção de mudas de *Physalis peruviana* L. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 9, n. 1, p. 6120-6129, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv9n1-414>. Acesso em: 17 ago. 2023.

ROJAS-VARGAS, A. *et al.* Testing explant sources, culture media, and light conditions for the improvement of organogenesis in *Pinus ponderosa* (P. Lawson and C. Lawson). **Plants**, Basel, v. 12, n. 4, e850, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants12040850>. Acesso em: 14 ago. 2023.

SANTOS JUNIOR, C. F. dos *et al.* Efeito da qualidade de luz na multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Cedrela odorata* L. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 32, n. 4, p. 2419-2432, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.5902/1980509866513>. Acesso em: 17 jul. 2023.

SANTOS, M. Á. S. dos *et al.* Aplicações da cultura de tecidos vegetais em plantas medicinais da Amazônia: uma revisão. In: LIESENFELD, M. V. A. *et al.* (Org.) **Ciências Ambientais na Amazônia**. Rio Branco: Editora Amazônia, 2022, p. 77-97. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.29327/546273.1-6>. Acesso em: 09 set. 2023.

SANTOS, P. R. *et al.* Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 55, n. 4, p. 356-364, 2008. Disponível em: <https://locus.ufv.br/handle/123456789/20649>. Acesso em: 07 set. 2023.

SARTOR, F. R. *et al.* Morfogênese *in vitro* em explantes foliares e radiculares de Jacarandá da Bahia. **Revista Agrotecnologia**, Anápolis, v. 5, n. 2, p. 82-93, 2014. Disponível em: <https://www.revista.ueg.br/index.php/agrotecnologia/article/view/570/pdf>. Acesso em: 17 maio 2023.

SILVA, A. C. B. da *et al.* Efeito da intensidade de luz no desenvolvimento de espécies medicinais e aromáticas em condições *in vitro*. **Contribuciones a Las Ciencias Sociales**, São José dos Pinhais, v. 16, n. 5, p. 2632-2649, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.55905/revconv.16n.5-040>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SILVA, A. E. da *et al.* Brotação e sobrevivência de estacas de *Moringa oleifera* sob variações de luz e extrato aquoso. **Caderno Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 9, n. 7, p. 7056-7061, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.18378/cvads.v9i7.7056>. Acesso em: 17 maio 2023.

SILVA, S. T. *et al.* Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 129, n. 3, p. 501-510, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1195-6>. Acesso em: 10 set. 2023.

STEFANO, M.; ROSARIO, M. Effects of light quality on micropropagation of woody species. In: JAIN, S. M.; ISHII, K. (Eds) **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Springer, 2003, p. 3-35. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-94-010-0125-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-010-0125-0_1). Acesso em: 17 maio 2023.

TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2017.

TRUEMAN, S. J.; HUNG, C. D.; WENDLING, I. Tissue culture of *Corymbia* and *Eucalyptus*. **Forests**, Basel, v. 9, n. 2, e84, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/f9020084>. Acesso em: 10 ago. 2023.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of plant physiology**, Jena, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2). Acesso em: 17 maio 2023.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. 3. ed. Viçosa, Editora UFV, 2021. *E-book*.