

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

**MICROPROPAGAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE MUDAS CLONAIAS DE  
*Eucalyptus dunnii* e *Eucalyptus benthamii* USANDO DIODOS DE EMISSÃO DE LUZ  
(LEDs)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Ramon Silveira de Andrade**

**Lages - SC, Brasil  
2022**

**Micropropagação e desenvolvimento de mudas clonais de *Eucalyptus dunnii* e *Eucalyptus benthamii* usando diodos de emissão de luz (LEDs)**

**Ramon Silveira de Andrade**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Produção Florestal, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Florestal.

**Orientador: Prof. Dr. Marcio Carlos Navroski**

**Lages - SC, Brasil**

**2022**

## RESUMO

Apesar da boa atuação do eucalipto no Brasil, ainda se encontram dificuldades no estabelecimento do gênero nas regiões mais frias do país, devido as baixas temperaturas e ocorrência de geadas. Uma das soluções encontradas foi o uso de espécies de boa resistência, como o *E. dunnii* e *E. benthamii*. Uma alternativa para a produção clonal das espécies, destacada pelo controle e melhor qualidade de clones, é a micropropagação *in vitro*. Uma das técnicas mais recentes para produção, também é a utilização de díodos de emissão de luz (LEDs), visando uma influência ainda maior nos processos fisiológicos das plantas. O presente trabalho teve como objetivos gerais, avaliar metodologias para a desinfestação superficial, o estabelecimento e a multiplicação *in vitro* de genótipos selecionados de *Eucalyptus dunnii* e *Benthamii*, aplicando doses entre 0,5 e 1,5% de concentração de hipoclorito de sódio (NaOCl), com imersão entre 10 a 20 minutos, e avaliação do desenvolvimento e resistência de mudas de *E. benthamii* a estresse hídrico, sendo avaliado em todos os experimentos, a influência do uso de LEDs de coloração azul, vermelha e mista com ambas cores. O uso de NaOCl a concentração de 1,5% com imersão por 10 minutos se mostrou o método mais eficaz de desinfestação do material. Quanto ao estabelecimento e multiplicação dos explantes, o uso de LEDs de luz azul acarretou em maior taxa de brotação durante o estabelecimento e maior aparecimento de calos (não houve brotação nesta fase), durante a multiplicação. Nos experimentos com mudas de *E. benthamii*, o uso de LEDs se destacou, principalmente luz azul, a qual contribuiu para maior desenvolvimento das mudas, e também auxiliou na resposta das mesmas ao estresse hídrico aplicado. Os resultados obtidos garantem maior qualidade durante a micropropagação e geração de explantes e mudas de melhor qualidade ao fim do processo.

**Palavras-chave:** Micropropagação, Eucalipto, Estresse hídrico

## ABSTRACT

Despite the good performance of *Eucalyptus* in Brazil, there are still difficulties in establishing the genus in the coldest regions of the country, due to low temperatures and frost. One of the solutions found was the usage of resistant species, such as *E. dunnii* and *E. benthamii*. An alternative for the clonal production of species, highlighted by the control and better quality of clones, is *in vitro* micropropagation. One of the most recent techniques for production is the use of light emitting diodes (LEDs), aiming at an even greater influence on the physiological processes of plants. The general objectives of the present work were to evaluate methodologies for the superficial disinfection, utilizing doses of sodium hypochlorite (NaOCl) and immersion ranging from 0.5 to 1.5% and 10 to 20 minutes respectively. establishment and *in vitro* multiplication of selected genotypes of *Eucalyptus dunnii* and *Benthamii*, as well as evaluation of development and resistance of *E. benthamii* seedlings to water stress, evaluating as well in all experiments, the influence of use of LEDs of LEDs of blue, red and mixed coloration. The use of NaOCl at a concentration of 1.5% with immersion for 10 minutes proved to be the most effective method of disinfecting the material. As for the establishment and multiplication of explants, the use of blue light LEDs resulted in a higher rate of sprouting during establishment and a greater appearance of calluses (no sprouting at this stage) during multiplication. In the experiments with *E. benthamii* seedlings, the use of LEDs stood out, mainly blue light, which contributed to the greater development of the seedlings, and also helped in their response to the applied water stress.

**Keywords:** Micropropagation, *Eucalyptus*, Water stress.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aspecto da sala de crescimento onde foram conduzidos os experimentos de micropropagação e crescimento/tolerância de mudas.	17
Figura 2:Lâmpada de LED utilizadas durante o trabalho.	22
Figura 3. Exemplo de alocação de mudas nas bancadas.	32
Figura 4: Representação de avaliação fisiológica ao longo do experimento.	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sobrevivência (%), contaminação (%) e oxidação fenólica (%) em diferentes clones e desinfestação com NaClO no estabelecimento in vitro de <i>Eucalyptus benthamii</i> e <i>Eucalyptus dunnii</i> . 24	24
Tabela 2: Sobrevivência (%), contaminação (%) e oxidação fenólica (%) em diferentes clones e colorações de LEDs no estabelecimento in vitro de <i>Eucalyptus benthamii</i> e <i>Eucalyptus dunnii</i> . .....26	26
Tabela 3: Aparecimento de calos (%) em diferentes clones e colorações de LEDs no estabelecimento in vitro de <i>Eucalyptus benthamii</i> e <i>Eucalyptus dunnii</i> . .....27	27
Tabela 4: Avaliação de variáveis morfológicas mensuradas em função do uso de LEDs no desenvolvimento de mudas de <i>Eucalyptus benthamii</i> . .....34	34
Tabela 5: Avaliação de variáveis fisiológicas em função do uso de LEDs na resposta de mudas de <i>Eucalyptus benthamii</i> ao estresse hídrico. ....35	35

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO GERAL</b> .....	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS (GERAL)</b> .....	<b>16</b>
3.1	Origem do material.....	16
3.2	Local de estudo.....	17
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>18</b>
4.1	Resumo.....	18
4.2	Abstract .....	18
4.3	Introdução.....	19
4.4	Material e Métodos.....	20
4.5	Resultados e discussão .....	23
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>29</b>
5.1	Resumo.....	29
5.2	Abstract .....	29
5.3	Introdução.....	30
5.4	Materiais e Métodos .....	31
5.5	Resultados e discussão .....	33
5.6	Conclusões .....	39
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>40</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O setor florestal brasileiro tem sido destaque em nível mundial, sendo o gênero *Eucalyptus* um grande contribuidor em plantios florestais comerciais que visam a produção de papel, celulose, madeira e carvão, por apresentar crescimento rápido e ter se adaptado bem as condições edafoclimáticas do país.

Por sua adaptabilidade em diferentes ambientes e alta produtividade, a cultura do eucalipto se consolida no setor florestal brasileiro, como uma das principais fontes de matéria-prima renovável e produtos derivados. No entanto, a viabilidade do cultivo depende da capacidade produtiva do local e do manejo aplicado (CASTRO et al., 2019).

Segundo Gonçalves et al. (2016), as áreas de produção de eucalipto apresentam um cenário ecológico com diversos mosaicos ambientais, onde estratos naturais podem ser reconhecidos pela diferenciação climática como uso edáfico, fisiográfico, biótico e de sustentabilidade do solo. A capacidade produtiva de toras de eucalipto é diretamente influenciada por essa variedade de condições. Portanto, para garantir a produção de uma matéria-prima mais homogênea, é importante que os clones sofram o menor efeito em suas características tecnológicas devido ao meio ambiente (GOUVÊA et al., 2012).

O uso da propagação vegetativa de espécies florestais é vital quando a disponibilidade de matrizes e, ou, a semente se torna um insumo limitado, impossibilitando a produção comercial de mudas. Sendo assim, as técnicas de propagação assexuada surgem como alternativa de superação das dificuldades na propagação de espécies florestais, podendo ser utilizadas para fins comerciais, ou ainda no resgate e conservação de recursos genéticos florestais (DIAS et al., 2012).

Entre as alternativas supracitadas, pode-se destacar a técnica de miniestaquia, pois tem potencial de ser empregada em diversas espécies arbóreas de interesse econômico e ecológico (GIMENES et al., 2015). Dentre os principais benefícios deste método de propagação vegetativa destacam-se o maior potencial de enraizamento do material propagado e o alto número de propágulos fornecidos, o que pode viabilizar a produção de mudas em grande escala.

Apesar de todas as vantagens apresentadas pela miniestaquia, pouco se conhece sobre essa com espécies florestais nativas da Amazônia, tanto em nível experimental quanto comercial. Espécies como Aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão) e Jacarandá (*Jacaranda mimosifolia* (D. Don)), conhecidas pelo seu potencial madeireiro e atual uso em

projetos de reflorestamento (FERRONATO et al., 2015), são exemplos de espécies que possuem a produção de mudas de qualidade limitadas por falta de aperfeiçoamento de suas formas de propagação.

Até o momento, diversas técnicas e protocolos de micropropagação foram desenvolvidos para cultura de tecidos de eucalipto. Apesar dos avanços, a micropropagação de eucalipto tem encontrado sucesso e aplicabilidade limitados. Isso se deve à falta de estudos focados nos mecanismos, estratégias e interações de fatores internos e externos em condições *in vitro* (ABIRI et al., 2020).

A iluminação usando tecnologia de diodo emissor de luz (LED) representa uma abordagem fundamentalmente diferente e energeticamente eficiente para a indústria de casas de vegetação que tem vantagens proficientes sobre lâmpadas gasosas de descarga (lâmpadas de sódio de alta pressão) atualmente usadas na maioria das estufas (MITCHELL et al., 2012).

Um LED pode ser facilmente integrado a sistemas de controle digital que facilitam programas de iluminação complexos, como intensidade variável ou composição espectral ao longo de dos estágios de desenvolvimento de uma planta. A luz sob a qual as plantas são cultivadas afeta seu crescimento e fisiologia (floração e eficiência fotossintética). A qualidade e a quantidade de luz afetam a sinalização de fotorreceptores específicos (fitocromos, criptocromos e fototropinas) que alteram a expressão de muitos genes. Utilizando LEDs como fonte de iluminação, é possível não só otimizar a qualidade espectral para várias plantas e diferentes processos fisiológicos, mas também para criar um ambiente digitalmente controlado e um sistema de iluminação energeticamente eficiente. (SINGH et al., 2015).

Considerando a importância da propagação clonal de *Eucalyptus* e a carência de estudos nesta área, o objetivo geral deste trabalho, foi avaliar metodologias para a desinfestação superficial, o estabelecimento e a multiplicação *in vitro* de genótipos selecionados de *Eucalyptus dunnii* e *Eucalyptus benthamii* e avaliação de desenvolvimento e resistência de mudas de *E. benthamii* a estresse hídrico, sendo avaliado em todos os experimentos, a influência do uso de LEDs de diferentes colorações.

O trabalho está dividido em dois capítulos, organizados de acordo com objetivos específicos, a saber:

- no capítulo I, avaliou-se a desinfestação de explantes de diferentes clones de *Eucalyptus dunnii* e *Eucalyptus benthamii* submetidos a diferentes tempos de imersão e concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl), o estabelecimento dos explantes visando o seu estabelecimento *in vitro* e a multiplicação dos explantes *in vitro*, utilizando LEDs de diferentes colorações;
- no capítulo II, avaliou-se o desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus benthamii*

utilizando LEDs de diferentes colorações, e a influência do uso dos LEDs na resistência de mudas a estresse hídrico.

## 2 REVISÃO GERAL

### 2.1 Gênero *Eucalyptus*

O Brasil possui uma área total de 851 milhões de hectares. Destes, 516 milhões, ou seja, 60% do território nacional é constituído por florestas, sendo 509,8 milhões de hectares são florestas naturais e 6,8 milhões de hectares florestas plantadas (HEIMANN; DRESCH; ALMEIDA, 2015). Entre as espécies mais utilizadas no plantio de florestas no território brasileiro estão o eucalipto (correspondendo a 66,58%) e o pinus (correspondendo a 26,46%), que juntos representam o total de 93% de todos os plantios desta natureza (HEIMANN; DRESCH; ALMEIDA, 2015).

Os plantios de eucalipto no Brasil ocupam uma área de 7,47 milhões de hectares, o que representa 78% do total da área de árvores plantadas no país, sendo os plantios localizados principalmente em Minas Gerais (27,6%), São Paulo (18,1%), Mato Grosso do Sul (15,1%), Bahia (7,8%), Rio Grande do Sul (6,6%) e Paraná (3,6%) (IBÁ, 2021).

O eucalipto é uma das melhores opções para a produção de carvão vegetal, devido à sua rusticidade, produtividade e as características gerais da sua madeira. Pelo fato de produzirem árvores de tronco reto, uniformes e madeira com massa específica adequada para esta operação, se apresentam como uma ótima escolha para a adequada obtenção de carvão vegetal de boa qualidade. Adicionalmente a importância do eucalipto remete ao seu rápido crescimento, sua grande adaptabilidade aos mais variados ambientes, sua alta produtividade e principalmente à diversidade de espécies e híbridos, tornando-o apto para utilização em ambientes mais variados possíveis (SANTOS; GONÇALVES; SILVA, 2016)

A alta produtividade do eucalipto, caracterizada pelo seu rápido crescimento e rápido ciclo, pode ser considerada como um dos principais fatores que determinaram sua vasta e crescente utilização em diversos mercados produtivos, como no mercado de papel, carvão, e celulose. No Estado de Minas Gerais, a madeira de eucalipto é a mais utilizada para a produção de carvão vegetal para o setor siderúrgico, em virtude da facilidade operacional oferecida pelo formato retilíneo de suas árvores, somado à qualidade do carvão vegetal obtido durante o processo de carbonização (SANTOS, 2010).

#### 2.1.1 *Eucalyptus dunnii* Maiden

O *Eucalyptus dunnii* Maiden pertence ao subgênero *Symphomyrtus* e seção Maidenaria. Uma espécie subtropical de restrita distribuição natural encontrada apenas nas

altitudes de 28°S e 30°S na faixa litorânea dos estados australianos de Queensland e Nova Gales do Sul entre 100 e 900 m de altitude (FLORES et al., 2016).

Na região de ocorrência natural o clima da região é quente e úmido, porém sujeito a frequentes geadas no inverno, cujos intervalos de temperaturas médias, máximas de 24 a 29 °C e mínimas de 2 a 5 °C. Nessas áreas naturais as geadas podem ocorrer de 30 a 60 dias. A precipitação pluviométrica média anual situa-se em torno de 1.000 a 1.600 mm, sendo relativamente bem distribuída em todos os meses do ano. (FONSECA et al., 2010).

O *E. dunnii*, no Brasil, é a espécie mais procurada para ser implantada em locais de clima temperado, atingindo produtividade anual de madeira maior que 50 m<sup>3</sup>/ha. Sua principal utilização é direcionada para o abastecimento de matéria-prima para as indústrias de celulose, carvão vegetal, chapas de partículas e laminação. Tem potencial também para usos mais nobres ou produtos de maior valor agregado. É importante ressaltar que existem diferenças significativas na produtividade devido a fatores ambientais, sendo possível obter povoamentos com 30 cm de diâmetro aos nove anos em sítios produtivos (DOBNER JUNIOR et al., 2017).

Uma das dificuldade com a espécie é a produção de sementes, que é tardia, apresentando variação entre os anos e o aumento do florescimento com a idade. A clonagem também é uma outra dificuldade da espécie, sendo essa uma característica da seção Maidenaria (SILVA et al., 2018).

### **2.1.2 *Eucalyptus benthamii* Maiden Canbage**

*E. benthamii* é originária do sul da Austrália, onde é conhecida como Camden White Gum, e está ameaçada de extinção, com ocorrência somente em duas populações pouco extensas. O maior grupo está localizado no Blue Mountains National Park, a menor população está presente ao longo do Rio Nepean a oeste de Sidney. É uma espécie de clima subtropical muito utilizada devido a sua rusticidade, bom crescimento e forma do fuste, e tolerância às baixas temperaturas e à ocorrência de geadas na região sul do Brasil (SBRAVATTI JUNIOR, et al., 2016).

O *E. benthamii* apresentou grande importância no Sul do Brasil pela sua alta tolerância ao frio, além da boa adaptação e do crescimento volumétrico. Na área de distribuição natural dessa espécie, ocorriam em média, de 4 a 10 geadas por ano. A ocorrência de geadas é um dos fatores que limitam a produção de madeira e prejudicam a formação de plantios homogêneos de *Eucalyptus* no Sul do Brasil, bem como em outras regiões do mundo (ELOY et al., 2013; MORAES et al., 2014; SANTOS et al., 2015).

No geral, o *E. benthamii* apresenta boas características energéticas da madeira, dessa forma, esta espécie de eucalipto também pode ser indicada como matéria prima para a produção de energia (SILVA et al., 2012), sendo uma boa alternativa para produção de carvão vegetal para a Região Sul do Brasil (LIMA et al., 2012).

## 2.2 Micropropagação

A micropropagação, ou propagação de plantas in vitro, é vista como uma alternativa às técnicas clássicas de propagação de plantas. A micropropagação possibilita a obtenção tanto de variedades autoenraizadas (por diferenciação de raízes adventícias) para solos com boas condições de drenagem, como de porta-enxertos clonais, eliminando assim a utilização de portaenxertos seminais e todas as desvantagens de heterogeneidade ao nível das plantas no pomar que lhes estão associadas. A vantagem da propagação vegetativa in vitro relativamente às técnicas tradicionais, é que a micropropagação tem a capacidade de gerar rapidamente um grande número de plantas geneticamente idênticas e com elevada qualidade sanitária, pois todo o processo é feito em condições de assepsia, num menor espaço de tempo (CARLOS; PEIXE, 2014; PAYGHAMZADEH & KAZEMITABAR, 2011).

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 (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; ZURANDA et al., 2017).

Diversos tecidos vegetais juvenis, derivados de plantas maduras podem ser utilizados para iniciar culturas in vitro. Porém, os mais utilizados em protocolos de organogênese são os segmentos nodais (MUDOI et al., 2013). Após o estágio inicial ou indução das culturas, essas passam pelo estágio de multiplicação, no qual, geralmente, utiliza-se citocininas (MUDOI, 2013). As citocininas contribuem na eficiência do estímulo as brotações adventícias e podem favorecer reversão às características juvenis.

Durante a fase de multiplicação pode acontecer a rizogênese espontânea em algumas culturas. Já em outras, é necessário passarem por mais um estágio in vitro para que haja a indução do enraizamento precedente à aclimatização. Após estabelecer as raízes, as plantas in vitro podem ser aclimatizadas. Este procedimento, muitas vezes, é considerado ponto crítico no processo de micropropagação, pois, as plantas passam por rigorosas mudanças ambientais e

faz-se necessário a adaptação às novas condições ambientais (ORNELLAS, 2017).

### **2.3 Uso de diodo emissor de luz (LED) em produção de mudas**

Para a realização da fotossíntese, as plantas necessitam de luz como fonte de energia e de acordo com a intensidade da luz, comprimento de onda e o sentido da luz que está sendo emitida, a planta consegue responder a essa energia luminosa. Por meio dos fotorreceptores como os fitocromos e os criptocromos as plantas conseguem perceber a luz e responder a esses estímulos gerando várias respostas fisiológicas (MUNEER et al., 2014).

Os diodos emissores de luz (LED) têm sido utilizados como fonte luminosa em ambientes onde as instalações agrícolas são controladas. Os LEDs são capazes de controlar a composição espectral, permitem alta durabilidade e emitem comprimentos de onda específicos. Além de possuírem tamanhos menores do que as lâmpadas tradicionais, os LEDs são relativamente mais frios evitando assim que as plantas esquentem com o calor gerado pelo mesmo, o que favorece a instalação e manejo mais simples (MUNEER et al., 2014).

Recentemente, a criação de LEDs azuis permitiu a ampliação do alcance do espectro e também a realização de LEDs de luz branca. Este progresso revolucionário no setor de iluminação foi endossado pela Academia Real de Ciências da Suécia, que em 2014 conferiu o Prêmio Nobel de Física pela “invenção dos diodos emissores de luz azul”. Coerente com este reconhecimento, a Assembleia Geral das Nações Unidas declarou 2015 como o “Ano Internacional da Luz e das Tecnologias Baseadas na Luz”, com o objetivo de promover o conhecimento sobre o potencial da ciência da luz para contribuir para o desenvolvimento sustentável e melhorar a qualidade de vida no mundo. (PARADISO; PROIETTI, 2022).

### **2.4 Estresse hídrico**

O estresse hídrico é definido como um fator externo o qual atua sobre as plantas de maneira desvantajosa, sendo o mesmo causado pela escassez ou pelo excesso de água. Por conseguinte, a produtividade das plantas está diretamente relacionada com a disponibilidade hídrica, sendo determinante para a distribuição das espécies vegetais. Em função disso, muitas espécies têm desenvolvido uma série de adaptações morfofisiológicas, bioquímicas e moleculares necessárias a sua sobrevivência em meio a essa escassez de água (TAIZ; ZEIGER, 2013)

A tolerância à seca é um dos mecanismos de resistência ao déficit hídrico o qual permite

à planta manter seu metabolismo mesmo com potencial hídrico de seus tecidos reduzido. Esse mecanismo resulta geralmente em modificações nas plantas tais como mudanças nos processos morfofisiológicos e metabólicos. Em consequência disso ocorre redução do acúmulo de massa, crescimento das plantas, dimensão e número de folhas, além de diminuição do crescimento do caule (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A área foliar também é uma variável sensível às condições hídricas do solo. Sua redução permite uma diminuição da transpiração evitando, assim, a perda de água. Ademais, o estresse por déficit hídrico ocasiona redução nos processos fisiológicos como transpiração, fotossíntese e condutância estomática (TAIZ; ZEIGER 2013).

A fotossíntese é particularmente sensível à deficiência hídrica, visto que, a fim de conservar água no interior da planta, ocorre o fechamento estomático, que afeta a assimilação do carbono atmosférico e consequente fixação pela enzima ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), ocorrendo, conseqüentemente, a diminuição da fotossíntese e da produtividade (TAIZ; ZEIGER 2013).

O estresse por déficit hídrico também ocasiona redução das clorofilas, essenciais ao processo fotossintético, cuja função é a captação da energia luminosa através dos complexos coletores de luz para os centros de reações fotoquímicas. As análises do teor estimado de clorofila nos permite avaliar a integridade dos aparatos internos das células em meio ao processo fotossintético, sendo esperado que plantas que mantêm maiores conteúdos de pigmentos fotossintéticos, sob condições hídricas reduzidas, possuem maior capacidade de tolerar tal condição (TAIZ; ZEIGER, 2013).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS (GERAL)

#### 3.1 Origem do material

O material vegetal utilizado no presente estudo foi fornecido por empresa florestal da região, com sede em Otacílio Costa, SC. Para os experimentos envolvendo estaquia e micropropagação, foram utilizados cinco clones de *Eucalyptus benthamii*, e um clone de *Eucalyptus dunnii*, sendo o material composto por seis mudas de cada clone. No viveiro da florestal da UDESC em Lages (SC), estas mudas foram transferidas dos recipientes onde foram produzidas (tubetes de 55 cm<sup>3</sup>) para vasos com capacidade de 5L, os quais foram preenchidos com solo da região, (cambissolo) disponível no local.

Após 23 dias de aclimação dentro de casa de vegetação, foi realizada a poda a 50% da altura das mudas, visando a indução de brotação, e formação do minijardim clonal de vasos, e para uso nos experimentos. Durante a aclimação, e período de utilização das mudas para obtenção de material, estas recebiam semanalmente aplicação de solução de 2 g L<sup>-1</sup> de fungicida Cerconil<sup>®</sup>. A adubação dos vasos foi realizada com fertilizante de liberação controlada (14-14-14) na dose de 6 g L<sup>-1</sup>, sendo realizada a reaplicação a cada 4 meses.

A primeira coleta de material vegetal foi descartado, visando a adaptação das mudas ao sistema. O minijardim foi mantido em casa de vegetação com microaspersão realizada 4 vezes ao dia, durante 6 minutos, o qual fornece em média 8 mm diários. Dependendo da época do ano a frequência de irrigação pode ser maior ou menos.

As mudas de *E. benthamii* utilizadas durante os experimentos de desenvolvimento e resistência ao estresse hídrico, foram também de empresa florestal da região, situada em Otacílio Costa, Santa Catarina, de procedência clonal, produzidas através de estacas vindas de planta-mãe conduzida pela empresa, em tubetes de 55 cm<sup>3</sup>. As mudas foram mantidas em casa de vegetação durante 60 dias, sendo transferidas para o viveiro florestal da Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, em Lages, SC.

Para o experimento envolvendo desenvolvimento das mudas, estas foram transferidas para vasos de 2L, os quais foram preenchidos com solo da região (cambissolo), os quais foram alocados dentro da sala de crescimento, sendo divididos em 4 tratamentos, sob luz branca (testemunha), luz azul, luz vermelha e luz mista, sendo 8 vasos por tratamento.

Para o experimento envolvendo resposta ao estresse hídrico, 56 mudas foram mantidas nos tubetes, e alocados dentro da sala de crescimento, divididos nos mesmo 4 tratamentos, sendo divididos em 14 mudas por tratamento.

### 3.2 Local de estudo

O trabalho foi realizado entre os meses de maio de 2020 e janeiro de 2022, no Laboratório de Propagação e Melhoramento de Espécies Florestais (LAPROMEFL), no campus do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), parte da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), em Lages, SC.

Para o desenvolvimento do estudo, foi utilizada uma sala de crescimento com temperatura de 23°C ( $\pm$  2°C), fotoperíodo de 16 horas luz e radiação fotossinteticamente ativa de 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fornecidas por lâmpadas do tipo LED de diferentes colorações (Figura 1).

Figura 1 - Aspecto da sala de crescimento onde foram conduzidos os experimentos de micropropagação e crescimento/tolerância de mudas.



## 4 CAPÍTULO I

### ESTABELECIMENTO E MULTIPLICAÇÃO *in vitro* DE CLONES DE *Eucalyptus dunnii* E *Eucalyptus benthamii* USANDO DIODOS DE EMISSÃO DE LUZ (LEDs)

#### 4.1 Resumo

A cultura de tecidos tem se apresentado como uma das principais técnicas de propagação vegetativa, tendo importância as medidas de controle e prevenção de contaminação. O uso dos diodos emissores de luz (LEDs), e diferentes colorações dos mesmos, pode se destacar como auxílio para o estabelecimento e multiplicação de explantes desinfestados. O presente capítulo teve como objetivos específicos a desinfestação de explantes de diferentes clones de *Eucalyptus dunnii* e *Eucalyptus benthamii* submetidos a diferentes tempos de imersão e concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl), variando entre 0,5 a 1,5% e 10 a 20 minutos respectivamente. E também o estabelecimento dos explantes visando sua multiplicação *in vitro*, utilizando LEDs de coloração azul, vermelha e mista com ambas. O uso de NaOCl a concentração de 1,5% com imersão por 10 minutos se mostrou o método mais eficaz de desinfestação do material. Quanto ao estabelecimento e multiplicação dos explantes, o uso de LEDs de luz azul acarretou em maior taxa de brotação durante o estabelecimento e maior aparecimento de calos (não houve brotação nesta fase), durante a multiplicação.

**Palavras-chave:** Micropropagação, Eucalipto, Desinfestação

#### 4.2 Abstract

Tissue culture has been presented as one of the main techniques in vegetative propagation, highlighting the importance of measures in controlling and preventing contamination. The use of light-emitting diodes (LEDs), and certain colors, can be highlighted as an aid for the establishment and multiplication of disinfested explants. The specific objectives of the present chapter had were the disinfestation of explants belonging to different clones of *Eucalyptus dunnii* and *Eucalyptus benthamii* submitted to different immersion times and concentrations of sodium hypochlorite (NaOCl), ranging from 0.5 to 1.5% and 10 to 20 minutes respectively. Also the establishment of explants aiming for their multiplication *in vitro*, using LEDs of blue, red and mixed coloration. The use of NaOCl at a concentration of 1.5% with immersion for 10

minutes proved to be the most effective method of disinfesting the material. As for the establishment and multiplication of explants, the use of blue light LEDs resulted in a higher rate of sprouting during establishment and a greater appearance of calluses (no sprouting at this stage) during multiplication.

**Keywords:** Micropropagation, Eucalyptus, Disinfestation.

### 4.3 Introdução

A micropropagação é um método cada vez mais utilizado para produção de plantas em larga escala, possibilitando a propagação de espécies difíceis de clonar através de técnicas de propagação mais convencionais, permitindo também entre outras vantagens, assegurar o estado fitossanitário dos propágulos mantidos em condições assépticas. (CANHOTO, 2010)

Os meios de cultura utilizados para a cultura de tecidos vegetais fornecem as substâncias essenciais (vitaminas, minerais, açúcares) para o desenvolvimento dos tecidos e condições ideais de pH e esterilidade de acordo com as necessidades da espécie, entre outros. No entanto, são os hormônios, ou os reguladores de crescimento, adicionados ao meio que têm um papel determinante na manipulação do desenvolvimento dos tecidos mantidos *in vitro*. Embora alguns não existam nos tecidos vegetais, estes provocam respostas análogas às induzidas pelos hormônios, sendo as mais importantes as auxinas, citocininas e giberelinas (CANHOTO, 2010).

O sucesso da micropropagação depende da sequência de fases ou etapas, em que o êxito de cada uma é necessário para o êxito da próxima etapa e a introdução do explante no meio de cultivo (estabelecimento), cujo sucesso depende de uma eficiente assepsia dos explantes a serem estabelecidos. Logo, a assepsia, tanto dos explantes quanto do material, torna-se necessária para a realização do cultivo (BARRUETO CID & TEIXEIRA, 2010).

O processo de seleção e clonagem de árvores via propagação vegetativa (por exemplo, estaquia, miniestaquia e microestaquia) avançou muito devido a crescente demanda por variedades de árvores de rápido crescimento, desde empresas florestais a pequenos proprietários (XAVIER; SILVA, 2010).

A micropropagação é uma das principais aplicações de cultura de tecidos vegetais, definida como uma técnica de propagação vegetativa utilizando pequenos propágulos (TRUEMAN et al., 2018). Esta técnica visa clonar espécies ou híbridos com altas taxas de crescimento, tolerância a baixas temperaturas e salinidade, e resistência a pragas e doenças

(WENDLING et al., 2014). A possibilidade de obter muitas microestacas clonais em um curto espaço de tempo e em área reduzida, levou a um aumento da uso comercial da micropropagação (HARTMANN et al. 2011).

Certos estudos têm demonstrado que o uso de diodos de emissão de luz (LEDs) e utilização de tons diferentes de luz podem influenciar a multiplicação e o enraizamento de explantes in vitro (IACONA e MULEO, 2010). O uso de LEDs afeta a eficiência biológica dos fitorreguladores adicionados ao meio de cultura, bem como o balanço hormonal nos tecidos, podendo contribuir para um melhor desenvolvimento dos explantes em todas as fases da micropropagação.

Através do presente trabalho, se objetivou avaliar o efeito de diferentes tempos de imersão e concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl), na desinfestação de explantes de clones de *Eucalyptus benthamii* e *Eucalyptus dunnii*, avaliar o estabelecimento e multiplicação in vitro de explantes vindos dos clones, utilizando LEDs de coloração azul, vermelha e mista.

#### **4.4 Material e Métodos**

O material vegetal (brotações) utilizado para o experimento de desinfestação superficial foram originados do de mudas mencionadas previamente no item 3.2. As brotações foram coletadas, acondicionadas em frascos de vidro contendo água estéril com solução de água destilada, acrescida de 2 g L<sup>-1</sup> de fungicida Cerconil 500 WP® e 800 mg L<sup>-1</sup> de polivinilpirrolidona (PVP), para minimizar o efeito da oxidação fenólica. Os frascos contendo as brotações foram então transportados para o laboratório de melhoramento e biotecnologia. Entre a coleta e o início do processo de desinfestação o tempo não foi superior a 30 minutos.

No Laboratório, as brotações foram transformadas em microestacas de 1,5 a 2 cm as quais foram lavadas em água corrente, por cerca de 10 minutos, para promover lixiviação de substâncias fenólicas e a redução de contaminantes superficiais. Após esta limpeza inicial, as estacas foram submersas em álcool 70% por 30 segundos, a seguir, enxaguadas com água estéril por duas vezes.

##### **4.4.1 Experimento 1 – Clones e desinfestação com NaClO no estabelecimento in vitro.**

Microestacas foram submetidos a diferentes tempos de agitação e concentrações NaOCl, divididos em testemunha, sem uso de NaOCl; 0,5% de NaClO, 20 minutos de agitação;

1% de NaClO, 10 minutos de agitação; 1% de NaClO, 20 minutos de agitação; 1,5% de NaClO, 10 minutos de agitação e 1,5% de NaClO, 20 minutos de agitação.

O experimento de desinfestação foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema bifatorial 6 x 6, em que os níveis do fator “A” referiram-se aos seis diferentes clones que originaram os explantes, os níveis do fator “B” foram os seguintes: T1 (testemunha, sem uso de NaClO); T2 (0,5% de NaClO, 20 minutos de agitação); T3 (1% de NaClO, 10 minutos de agitação); T4 (1% de NaClO, 20 minutos de agitação); T5 (1,5% de NaClO, 10 minutos de agitação) e T6 (1,5% de NaClO, 20 minutos de agitação). De acordo com a quantidade de material disponível, foram alocadas 6 repetições por tratamento de cada clone, sendo cada repetição um frasco com 3 explantes.

Após a aplicação dos tratamentos de desinfestação, os explantes foram lavados três vezes com água estéril. Por fim as estacas foram mantidas em frascos com água previamente autoclavada, até sua inoculação em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Após a preparação do material e do meio de cultura, as microestacas foram inoculadas em posição vertical, nos frascos com meio de cultura uma câmara de fluxo laminar, visando maior segurança contra contaminação. Extremidades das microestacas foram removidas antes da inoculação. Os frascos identificados e levados a sala de crescimento usando somente luzes brancas do tipo LED.

O meio de cultura foi preparado com água deionizada, adicionando-se 4,5 g L<sup>-1</sup> de ágar, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 800 mg L<sup>-1</sup> de polivinilpirrolidona (PVP). O valor do pH foi ajustado para 5,8 com HCl (0,1M) e NaOH (0,1M) anterior a adição do ágar ao meio nutritivo, alocados em frascos de vidro cobertos por papel filme e então autoclavados a temperatura de 121 °C (≈ 1,0 kgf cm<sup>-2</sup>) durante 20 minutos.

Trinta dias após a inoculação dos explantes foram avaliadas a percentagem de sobrevivência dos explantes, contaminação e oxidação, determinadas mediante avaliação visual da presença de fungos e/ou manchas de oxidação no meio de cultura e/ou no explante.

#### 4.4.2 Experimento 2 – Clones e luzes LED no estabelecimento in vitro

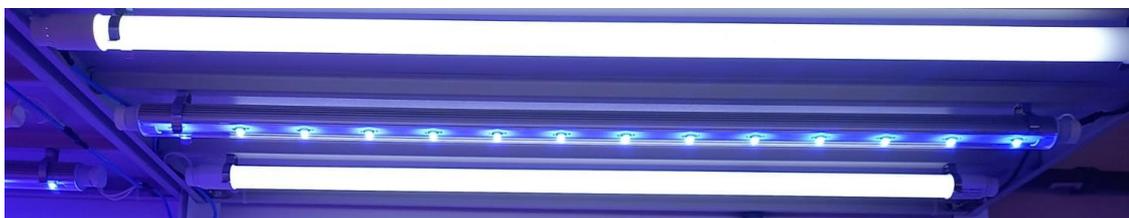
A desinfestação foi efetuada conforme o tratamento adequado encontrado durante a realização do experimento descrito no capítulo I, ou seja, as estacas foram lavadas em água corrente, por cerca de 10 minutos. Após esta limpeza inicial, as estacas foram submersas em álcool 70% por 30 segundos e enxaguadas com água estéril por duas vezes, e por fim, submergidas em solução com concentração de 1,5% de NaClO, e 10 minutos de agitação.

Após a desinfestação, os explantes foram lavados três vezes com água estéril. Por fim as estacas foram mantidas em frascos com água previamente autoclavada, até sua inoculação em meio de cultura MS reduzido à metade da concentração de sais ( $1/2$  MS).

Os meios de cultura foram preparados com água deionizada, adicionando-se  $4,5 \text{ g L}^{-1}$  de ágar,  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose e  $800 \text{ mg L}^{-1}$  de polivinilpirrolidona (PVP). O valor do pH foi ajustado para 5,8 com HCl (0,1M) e NaOH (0,1M) anterior a adição do ágar ao meio nutritivo, alocados em frascos de vidro cobertos por papel filme e então autoclavados a temperatura de  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $\approx 1,0 \text{ kgf cm}^{-2}$ ) durante 20 minutos.

O presente experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema bifatorial  $6 \times 4$ , em que os níveis do fator “A” referiram-se aos seis diferentes clones que originaram os explantes, e os níveis do fator “B” foram: T1 (testemunha, com luz branca); T2 (luz azul); T3 (luz vermelha) e T4 (misto de luzes azul e vermelha) (Figura 2). De acordo com a quantidade de material disponível, foram alocadas 7 repetições por tratamento de cada clone, sendo cada repetição um frasco com 3 explantes.

Figura 2- Lâmpada de LED utilizadas durante o trabalho.



Após a inoculação dos explantes, os frascos foram mantidos em sala de cultivo com temperatura de  $23^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  fornecida por lâmpadas fluorescentes de cores branca, azul, vermelha e mista de azul e vermelha.

Trinta dias após a inoculação dos explantes foi realizada a avaliação do estabelecimento *in vitro* (aparecimento de brotações em cada explante) da oxidação fenólica (escurecimento dos explantes) e da contaminação fúngica (aparecimento de bolor e estruturas fúngicas sobre o meio ou explantes), registrados por meio de percentagem.

#### 4.4.3 Experimento 3 – Clones e luzes LED na multiplicação *in vitro*

Para a fase de multiplicação *in vitro*, foram utilizadas brotações provenientes de explantes de clones de *E. benthamii* e *E. dunnii* previamente estabelecidos *in vitro*. As brotações

foram inoculadas, em frascos contendo meio nutritivo MS, suplementado com 1  $\mu\text{M}$  de ácido indolbutírico (AIB) e 0,05  $\mu\text{M}$  de ácido naftalenoacético (ANA).

O experimento de multiplicação foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema bifatorial 6 x 4, em que os níveis do fator “A” referiram-se aos seis diferentes clones que originaram os explantes, e os níveis do fator “B” foram: T1 (testemunha, com luz branca); T2 (luz azul); T3 (luz vermelha) e T4 (misto de luzes azul e vermelha). De acordo com o material disponível, derivado do experimento de estabelecimento, foram alocadas 8 repetições por tratamento de cada clone, sendo cada repetição um frasco com 3 explantes.

O meio de cultura foi preparado com água deionizada, adicionando-se 4,5 g L<sup>-1</sup> de ágar, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 800 mg L<sup>-1</sup> de polivinilpirrolidona (PVP). O valor do pH foi ajustado para 5,8 com HCl (0,1M) e NaOH (0,1M) anterior a adição do ágar ao meio nutritivo, alocados em frascos de vidro cobertos por papel filme e então autoclavados a temperatura de 121 °C ( $\approx$  1,0 kgf cm<sup>-2</sup>) durante 20 minutos.

Após a inoculação dos explantes, os frascos foram mantidos em sala de cultivo com temperatura de 23°C  $\pm$  2 °C, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fornecida por lâmpadas fluorescentes de cores branca, azul, vermelha e mista de azul e vermelha.

Trinta dias após a inoculação dos explantes foi avaliada a quantidade de brotações indicando multiplicação, porém, como não houve nenhum sinal de brotação, foi avaliado então, em percentagem, a ocorrência de calos nos explantes.

#### 4.4.4 Análise estatística

Após testar a normalidade dos dados por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov os dados foram submetidos à análise de variância. Quando o valor de “F” foi significativo, dados de tratamentos qualitativos tiveram as médias comparadas por meio do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. O programa estatístico SISVAR foi utilizado para a análise estatística dos dados.

### 4.5 Resultados e discussão

#### 4.5.1 Experimento 1 – Clones e desinfestação com NaClO no estabelecimento in vitro

Não foi observada interação significativa entre os fatores clones e NaOCl na

desinfestação in vitro. Porém, obteve-se efeito significativo para o fator NaOCl (concentração e tempo de imersão) (Tabela 1). Foi observado que o tratamento utilizando 1,5% de NaOCl e 10 minutos de imersão, resultou em maior sobrevivência, com 68% dos explantes sobrevivendo ao processo. Os demais tratamentos envolvendo uso de hipoclorito não diferenciaram entre si, e a testemunha, resultou em menor média (nenhum explante sobrevivendo)

Tabela 1 - Sobrevivência (%), contaminação (%) e oxidação fenólica (%) em diferentes clones e desinfestação com NaClO no estabelecimento in vitro de *Eucalyptus benthamii* e *Eucalyptus dunnii*.

Tratamento	% de sobrevivência	% de contaminação	% de oxidação
Testemunha	0% c*	100% d	0% d
0,5% - 20 min	31% b	63% c	5% ab
1% - 10 min	35% b	56% bc	9% ab
1% - 20 min	34% b	46% abc	20% bc
1,5% - 10 min	68% a	26% a	7% ab
1,5% - 20 min	32% b	34% ab	33% c

\* Tratamentos com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de erro.

Para contaminação fúngica (Tabela 1), também foi observada diferença significativa entre os tratamentos com influência do NaOCl, mas não houve efeito entre os clones. O tratamento com 1,5% de NaOCl e 10 min de imersão apresentou menor percentual de contaminação (26%), porém não diferenciou estatisticamente do tratamento com 1,5% e 20 min de imersão e tratamento com 1% e 20 min de imersão. O tratamento testemunha demonstrou maior percentagem de contaminação, sendo que todos seus explantes acabaram sendo contaminados.

Para oxidação (Tabela 1), também foi observada diferença significativa entre os tratamentos de NaOCl. A testemunha não apresentou nenhum sinal de oxidação porém isso não é indicação de sucesso, pois todos seus frascos haviam apresentado contaminação anteriormente. O tratamento com 0,5% de NaOCl e 20 min de imersão, apresentou menor taxa de oxidação, com 5% dos explantes oxidados, não diferenciando estatisticamente dos tratamentos em 10 min de imersão, tanto com concentrações de 1 e 1,5%.

A utilização de 20 minutos de imersão se mostra excessiva em maiores dosagens de NaOCl, em ambos casos de 1 e 1,5% de concentração, a taxa de oxidação duplica e mais que triplica, respectivamente. Isso significa que o ponto ideal do procedimento se encontra em 10

minutos de imersão.

Quanto a taxa de sobrevivência, com exceção do tratamento testemunha, em que não houve sobrevivência nenhuma, todos os tratamentos analisados apresentaram ao menos 30% de sobrevivência.

O hipoclorito de sódio (NaOCl), inibe o crescimento microbiano devido ao seu alto pH, que interfere totalmente na integridade da membrana plasmática dos microrganismos com inibição enzimática irreversível, além disso há alterações biossintéticas no metabolismo celular e também na degradação de fosfolipídios. O álcool na concentração de 70% age diretamente na desnaturação de proteínas e o formaldeído atua na formação de radicais livres fazendo com que as proteínas não sejam capazes de realizar suas funções. Além do mais, a utilização de álcool e formaldeído em conjunto, potencializa ainda mais a ação de ambos (RUI et al., 2011)

A etapa de introdução de material vegetal em condições *in vitro* é complexa devido aos altos percentuais de contaminação pela proliferação de bactérias e fungos, difíceis de serem eliminados. O uso de substâncias desinfestantes como etanol, hipoclorito de sódio e de cálcio, peróxido de hidrogênio, ácido clorídrico, ácido sulfúrico são relatados como eficientes na descontaminação de diferentes explantes de espécies vegetais (SILVA et al. 2015; MÜLLER et al. 2017)

Para o estabelecimento *in vitro* de mirtilheiro, Pelizza et al. (2013) consideraram o uso de solução de álcool 70% (por 1 min) ou hipoclorito de sódio 2% (por 10 min) como procedimentos adequados para desinfestação, observando baixa oxidação *in vitro* dos explantes..

#### 4.5.2 Experimento 2 – Clones e luzes LED no estabelecimento *in vitro*

Não houve interação significativa entre os fatores testados nestes experimentos. Em nenhuma das três variáveis avaliadas houve variação significativa entre os clones, somente entre os diferentes espectros de luz utilizados. Em relação ao surgimento de brotos nos explantes (Tabela 2), houve efeito significativo entre as diferentes colorações de LEDs, mas não entre os diferentes clones. Os explantes submetidos a luz azul, em geral obtiveram maior percentagem de brotação (64%). As demais cores, e testemunha de luz branca não diferenciaram estatisticamente entre si.

Tabela 2 - Sobrevivência (%), contaminação (%) e oxidação fenólica (%) em diferentes clones e colorações de LEDs no estabelecimento in vitro de *Eucalyptus benthamii* e *Eucalyptus dunnii*.

Tratamento	% de brotação	% de contaminação	% de oxidação
Testemunha (Luz Branca)	26% b*	15% ab	59% b
Luz Azul	64% a	11% a	26% a
Luz Vermelha	34% b	21% ab	46% b
Luz Mista	31% b	25% b	45% b

\* Tratamentos com letras iguais não diferem entre si de acordo com Tukey a 95% de confiança.

Para contaminação fúngica (Tabela 2), os explantes submetidos a luz azul apresentaram menor ocorrência (11%), porém estes não diferenciaram estatisticamente da luz branca (15%), e vermelha (21%). Os explantes sob o LED de luz mista, sofreram maior contaminação (25%), mas não diferenciaram estatisticamente dos submetidos a luz vermelha, ou da testemunha.

Já para a oxidação fenólica (Tabela 2), os explantes sob luz azul, apresentaram menor ocorrência (26%). Os demais tratamentos e testemunha não diferenciaram estatisticamente entre si, sendo que 59% dos explantes que compunham a testemunha oxidaram.

Em termos numéricos, se nota benefício no uso de todas as LEDs coloridas em relação a luz branca da testemunha, sendo que a taxa de brotação foi elevada em todos os casos, porém, o uso de LED azul é recomendado, em comparação ao vermelho ou mesmo ao misto das duas colorações. A taxa de brotação dobrou sob essa coloração quando comparada as outras duas.

A luz azul também foi superior nas demais variáveis analisadas, sendo que suas taxas de contaminação fúngica e oxidação ficaram abaixo dos demais tratamentos avaliados, o fato de ser mais próxima da luz verde no espectro de luzes pode ter ajudado. A luz vermelha se mostrou superior a luz branca em brotações, aumentando essa taxa, porém, também subiram as taxas de contaminação e oxidação, seu uso pode ser recomendado quando comparado a LEDs brancas, mas não se azuis também estiverem disponíveis.

Resultados observados no presente trabalho corroboram aqueles verificados no cultivo in vitro de *Platycodon grandiflorum*, em que também foi obtido o maior número de folhas sob os LEDs azuis (LIU et al., 2014). Stefanel et al. (2020), trabalhando com *Eugenia involucrata*, também obtiveram maior número de brotações sob luz azul.

Em trabalho com pepino tipo snack, Freitas et al. (2021), demonstraram aumento de 1,4 vezes na taxa fotossintética de plantas submetidas a LEDs coloridas em relação a iluminação comum, além de maior eficiência no uso de água e menor perda por transpiração.

A luz azul realiza uma série de funções morfogênicas, além de regular processos

metabólicos, influenciar a produção e o crescimento vegetal, influenciar positivamente o desenvolvimento de cloroplastos e a biossíntese de moléculas de clorofila (TAIZ; ZEIGER, 2013; LAZZARINI et al., 2017).

A luz vermelha é o principal comprimento de onda para a estimulação de clorofila e tem um impacto direto no crescimento das plantas. Além disso, a luz vermelha também estimula a síntese de clorofila e desenvolvimento de cloroplastos (OLLE e VIRŠILLÈ, 2013).

#### 4.5.3 Experimento 3 – Clones e luzes LED na multiplicação in vitro

Não houve resposta morfológica neste experimento para a multiplicação, não sendo observado nenhuma emissão de novas brotações. Para a ocorrência de calos, não houve diferença significativa entre os fatores de estudos (Tabela 3). A formação de calos variou entre 13% na luz mista (vermelha/azul) e 25% na luz azul.

Tabela 3: Aparecimento de calos (%) em diferentes clones e colorações de LEDs no estabelecimento in vitro de *Eucalyptus benthamii* e *Eucalyptus dunnii*.

Tratamento	Aparecimento de calos
Testemunha (Luz Branca)	19% a*
Luz Azul	25% a
Luz Vermelha	19% a
Luz Mista	13% a

\* Tratamentos com letras iguais não diferem entre si de acordo com Tukey a 95% de confiança.

O resultado atual indica possível capacidade dos explantes de multiplicação, porém se fazem necessários mais estudos, na busca por concentrações ideais de reguladores de crescimento, e método de trabalho que favoreça a multiplicação.

#### 4.6 Conclusões

Para o controle da contaminação em explantes vindos dos clones de *Eucalyptus dunnii* e *benthamii*, recomenda-se a imersão em hipoclorito de sódio a 1,5% durante 10 minutos.

O efeito dos LEDs no estabelecimento dos explantes pode ser considerado significativo, principalmente do espectro de coloração azul, que resultou em maior taxa de brotação.

Não houve sucesso na fase de multiplicação como se esperava, apenas surgimento de

calos em certos explantes, sem particular diferença entre as luzes utilizadas. Se recomenda realização de mais estudos, confirmando possível efeito de diferentes concentrações de ANA e AIB do que as utilizadas.

## 5                   CAPÍTULO II

### USO DE DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs) NO DESENVOLVIMENTO E RESPOSTA A ESTRESSE HÍDRICO EM MUDAS DE *Eucalyptus benthamii*

#### 5.1    Resumo

As plantas utilizam a luz como fonte de energia no processo de fotossíntese. Diferentes níveis de luminosidade causam mudanças fisiológicas e morfológicas na planta, e o seu sucesso depende da sua adaptação a esses diferentes níveis. Diodos de emissão de luz (LED) têm sido propostos como fonte luminosa para ambientes controlados. O presente capítulo teve como objetivos específicos avaliar o desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus benthamii* utilizando LEDs de coloração azul, vermelha e mista de ambas, mensurando incremento em altura e diâmetro, a relação entre as duas variáveis, massa seca aérea, radicular e total, e índice de qualidade de Dickson (IQD). E também determinar a influência do uso dos mesmos na resistência de mudas a estresse hídrico, mensurando as variáveis fisiológicas de fotossíntese, condutância estomática, transpiração, relação entre carbono interno da folha e do meio externo e eficiência no uso de água. O uso de ambas as cores de LEDs se destacou, principalmente luz azul, a qual contribuiu para maior desenvolvimento das mudas, e também auxiliou na resposta das mesmas ao estresse hídrico aplicado.

**Palavras-chave:** Produção de mudas, Eucalipto, Estresse hídrico.

#### 5.2    Abstract

Plants use light as a source of energy in the process of photosynthesis. Different levels of luminosity cause physiological and morphological changes in the plant, and its success depends on its adaptation to these different levels. Light emitting diodes (LED) have been proposed as a light source in controlled environments. The specific objectives of the present chapter were to evaluate the development of *Eucalyptus benthamii* seedlings using LEDs of blue, red and mixed coloration, measuring increase in height and diameter, the relation between both variables, shoot, root and total dry mass, and Dickson quality index (DQI). Also aimed to determine the influence of their use in the resistance of seedlings to water stress, measuring physiological variables of photosynthesis, stomatal conductance, leaf transpiration, relation between internal leaf carbon and the outside environment carbon and water use efficiency. The

use of both LED colors stood out, but mainly the blue light, which contributed to the further development of the seedlings, and also helped in their response to the applied water stress.

**Keywords:** Seedling production, Eucalyptus, Water stress.

### 5.3 Introdução

As plantas utilizam a luz como fonte de energia no processo de fotossíntese e respondem a essa energia luminosa de acordo com a sua intensidade, comprimento de onda e direção em que estão sendo emitidas. Plantas percebem a luz através de fotorreceptores, como os fitocromos e criptocromos, e respondem a esses receptores gerando uma série de respostas fisiológicas específicas (MUNEER et al., 2014).

As lâmpadas de diodo emissor de luz (LED) são frequentemente usadas no lugar de lâmpadas fluorescentes, pois as fontes de luz LED são mais eficientes, versáteis e economicamente viáveis para o crescimento e regeneração de plantas *in vitro*, oferecendo alternativas para obter resultados positivos no campo de micropropagação em escala comercial (MONTEUUIS, 2015).

Diferentes estudos indicam melhor crescimento de plantas *in vitro* cultivadas sob condições de iluminação LED (HUNG et al., 2015; FERREIRA et al., 2017; LERIN et al., 2019). No entanto, o efeito das fontes de luz na morfogênese das espécies e clones de interesse precisam ser avaliados para otimização do protocolo. Os comprimentos de onda vermelho e azul correspondem ao pico de absorção da clorofila a (660 nm) e clorofila b (460 nm) (TAIZ; ZEIGER, 2013)

Segundo Dong et al. (2014) e Samuolienė et al. (2013) o grande desafio do cultivo com luz artificial é fornecer de maneira controlada intensidades de luz em quantidade e qualidade suficientes para o desenvolvimento das plantas. Diodos de emissão de luz (LED) têm sido propostos como fonte luminosa para ambientes controlados em instalações agrícolas ou em câmaras de crescimento de plantas. Eles apresentam características desejáveis, como a capacidade de controlar a composição espectral, longa durabilidade, capacidade de emitir comprimentos de onda específicos, superfícies de emissão relativamente frias, além de apresentarem um tamanho reduzido, o que facilita manejo e instalação nas câmaras de crescimento (LI et al., 2010; MUNEER et al., 2014).

Um dos principais fatores que contribuem para diminuição do desenvolvimento de mudas, além de causar alterações negativas morfológicas, fisiológicas e nutricionais, que influenciam na capacidade da muda em resistir às condições adversas do meio e

consequentemente na sua qualidade é o estresse hídrico (LISAR et al., 2012). O estresse hídrico a que uma planta está submetida pode ser caracterizado como déficit hídrico, mais comum, ou como saturação hídrica (alagamento). O estresse por deficiência de água induz uma ampla gama de alterações fisiológicas e bioquímicas nas plantas; o bloqueio de crescimento celular e de fotossíntese, além de alteração na respiração, estes sendo os primeiros efeitos (VELÁZQUEZ; HERNÁNDEZ, 2013).

Objetivou-se no presente trabalho avaliar o desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus benthamii* e sua resposta a estresse hídrico utilizando LEDs de diferentes colorações.

#### 5.4 Materiais e Métodos

Experimento 1 – Influência do uso de LEDs e colorações no crescimento de mudas.

Para o experimento de desenvolvimento das mudas de *Eucalyptus benthamii*, mudas foram transferidas para vasos com capacidade de 2L, os quais foram preenchidos com substrato comercial a base de casca de *Pinus*, com adição de 6 g L<sup>-1</sup> de Osmocote®. Os vasos foram alocadas na sala de crescimento, sendo divididas em 4 tratamentos, usando 8 repetições de uma muda cada.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em qual os tratamentos foram definidos como: T1 (testemunha, com luz branca); T2 (luz azul); T3 (luz vermelha) e T4 (misto de luzes azul e vermelha).

As especificações de cada lâmpada foram: (i) lâmpadas brancas- 36”, 1W, AC85 – 265 V e (ii) lâmpadas coloridas- 36”, 1W, AC85 – 265 V. Foram alocadas três lâmpadas por bancada, sendo três brancas no tratamento testemunha, e duas coloridas para uma branca nos tratamentos de luz colorida (Figura 3).

Figura 3 - Exemplo de alocação de mudas nas bancadas.



Nas mudas foram realizadas avaliações biométricas de altura e diâmetro, as quais realizaram-se em duas etapas, sendo a primeira, no dia da implantação do experimento e a segunda no final do período experimental, 33 dias após a implantação. A altura das mudas foi determinada com o auxílio de uma régua milimetrada, medindo-se da base da planta até a inserção da folha mais alta. O diâmetro do caule foi determinado com o auxílio de um paquímetro digital. As medidas foram realizadas na região do colo das mudas. Os dados destas avaliações foram utilizados para obtenção do incremento em altura e diâmetro do colo, assim como da relação altura-diâmetro (h/d).

Ao término do período experimental, pelo método destrutivo, procedeu-se a coleta manual da biomassa total das plantas. As amostras foram separadas em raiz, e parte aérea, e acondicionadas em sacos de papel mantidos em estufa com circulação forçada de ar ( $60 \pm 3^\circ\text{C}$ ) até atingirem massa constante (gramas) após 96 horas. Após, foram efetuadas pesagens para determinação dos teores de matéria seca dos componentes em balança de precisão (0,01 g). Também foi determinado o índice de qualidade de Dickson (IQD). Este foi determinado em função da altura da parte aérea (H), do diâmetro do coleto (DC), do peso de matéria seca da parte aérea (PMSPA) e do peso de matéria seca das raízes (PMSR), por meio da fórmula (DICKSON et al., 1960).

#### Experimento 2 – espectros de luz LED e estresse hídrico

Para a avaliação de resposta das mudas de *Eucalyptus benthamii* ao estresse hídrico, estas foram mantidas em tubetes de  $55 \text{ cm}^3$ , e alocadas na sala de crescimento, sob as diferentes

luzes. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em qual os tratamentos foram definidos como: T1 (testemunha, com luz branca); T2 (luz azul); T3 (luz vermelha) e T4 (misto de luzes azul e vermelha). Foram usadas 14 repetições (de uma planta cada) por tratamento. O experimento foi realizado após 14 dias de aclimatação das mudas. Após a mensuração inicial, a irrigação dos tubetes foi suspensa por 24 horas, para indução do estresse, durante essas 24 horas, foram realizadas mensurações em intervalos de tempo previamente definidos, inicialmente a cada duas horas, para definição do efeito do estresse nas mudas durante esse período. Para a mensuração de fotossíntese foram selecionadas cinco plantas para cada tratamento, sendo essas realizadas com o medidor portátil de fotossíntese IRGA (Infra-Red Gas Analyzer), modelo LI-6400 (LI-COR). As análises fotossintéticas foram realizadas 24, 30 e 48 horas após a indução do estresse, respeitando-se a aleatoriedade entre os tratamentos.

Com o IRGA foram analisadas as variáveis de taxa fotossintética líquida ( $A$  -  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $G_s$  -  $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), transpiração ( $E$  -  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  no mesófilo ( $C_i$  -  $\mu\text{mol CO}_2$ ) e concentração de  $\text{CO}_2$  externa atual ( $C_a$  -  $\mu\text{mol CO}_2$ ). Estas variáveis permitiram posteriormente calcular as relações de concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  no mesófilo sobre a concentração de  $\text{CO}_2$  externa atual ( $C_i/C_a$  -  $\mu\text{mol CO}_2$ ) e de eficiência do uso da água da planta ( $WUE - [\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}]^{-1}$ ).

## 5.5 Resultados e discussão

### Experimento I: Desenvolvimento de mudas em função do uso de LEDs

Na avaliação de variáveis morfológicas (Tabela 4), incremento de diâmetro a altura do coleto (IDAC), relação altura/diâmetro ( $h/d$ ) e massa seca radicular (MSR) não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. As demais variáveis apresentaram diferença significativa em função da coloração de LED utilizado.

Tabela 4 - Avaliação de variáveis morfológicas mensuradas em função do uso de LEDs no desenvolvimento de mudas de *Eucalyptus benthamii*.

Tratamento	Variáveis						
	IH	IDAC	h/d	MSA	MSR	MST	IQD
Testemunha (Luz Branca)	5,48 b*	0,95	13,74	1,60 c	0,76	2,37 c	0,15 b
Luz Azul	14,10 a	1,16	14,44	2,80 ab	0,95	3,76 ab	0,22 b
Luz Vermelha	10,38 ab	1,46	12,31	3,72 a	1,00	4,73 a	0,30 a
Luz Mista	8,22 ab	0,95	14,1	2,58 bc	0,80	3,38 bc	0,20 b

\*Letras iguais não diferem entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Onde: IH: Incremento em altura; IDAC: Incremento em diâmetro a altura do coleto; h/d: Relação altura/diâmetro; MSA: Massa seca aérea; MSR: Massa seca radicular; MST: Massa seca total; IQD: Índice de qualidade de Dickson.

As mudas sob luz azul, apresentaram maior incremento em altura (IH), porém, não diferenciaram estatisticamente das mudas sob luz vermelha e mista. As mudas sob luz vermelha apresentaram maior massa seca aérea (MSA) e massa seca total (MST), não diferenciando estatisticamente das mudas sob luz azul em ambas variáveis. Em índice de qualidade de Dickson (IQD), as mudas sob luz vermelha também apresentaram maior valor, diferenciando estatisticamente de todos os demais tratamentos. Destaca-se imediatamente o aumento significativo no incremento em altura das mudas sob LEDs coloridas, na comparação entre azul e luz branca de testemunha. Estudos apontam que a luz vermelha promove a elongação foliar e caulinar via estímulo da biossíntese de giberelina, através do controle da mitose e proliferação celular (MANIVANNAN et al., 2015).

Na produção de mudas de framboeseira cultivares Batum e Dorman Red, Rocha et al. (2013) observaram que a massa fresca da planta cultivada sob os LEDs vermelhos apresentaram resultados superiores aos das plantas cultivadas sob os LEDs azuis e verdes. Bello-Bello et al. (2016), avaliando a qualidade da luz (lâmpada fluorescente, LEDs brancos, LEDs vermelhos, LEDs azuis e LEDs azuis mais LEDs vermelhos) no crescimento de brotações de *Vanilla planifolia* Andrews, verificaram que a maior média de massa fresca por planta foi obtida com o tratamento constituído por LEDs azuis mais LEDs vermelhos.

#### Experimento 2 – espectros de luz LED e estresse hídrico

Para a avaliação de resposta das mudas ao estresse hídrico, foi observada diferença

significativa entre os tratamentos em todas as avaliações realizadas durante as 48 horas de acompanhamento após a indução de estresse hídrico (Tabela 5).

Tabela 5 - Avaliação de variáveis fisiológicas em função do uso de LEDs na resposta de mudas de *Eucalyptus benthamii* ao estresse hídrico.

Tratamento	Variáveis				
	Fotossíntese ( $\mu\text{mol CO}_2$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Condutância Estomática ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Ci/Ca ( $\mu\text{mol CO}_2$ )	Transpiração ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	WUE ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
Início (0 horas)					
Testemunha (Luz Branca)	3,36 a*	0,03a	2,21a	0,84a	1,52a
Luz Azul	5,1 a	0,08a	2,91a	0,7a	1,8a
Luz Vermelha	4,0 a	0,05a	1,55a	0,66a	3,15a
Luz Mista	4,19 a	0,07a	2,27a	0,79a	1,85a
24 horas					
Testemunha (Luz Branca)	1,23b	0,01b	0,18b	0,9a	4,02a
Luz Azul	4,73a	0,07a	1,52a	0,66a	3,33a
Luz Vermelha	4,6a	0,09a	2,16a	0,76a	2,2a
Luz Mista	3,58ab	0,03ab	0,72ab	0,3a	5,36a
30 horas					
Testemunha (Luz Branca)	0,43b	0b	0,13b	2,35a	0c
Luz Azul	3,3a	0,03a	0,63ab	0,51b	3,58a
Luz Vermelha	1,38b	0,02ab	1,03a	0,76b	1,38b
Luz Mista	2,21ab	0,02ab	0,82a	0,58b	2,72b
48 horas					
Testemunha (Luz Branca)	0b	0b	0,13b	1,23a	0a
Luz Azul	0,35a	0,01ab	1,41a	1,21a	0,15a
Luz Vermelha	0,11ab	0,04a	0,72ab	1,61a	0a
Luz Mista	0b	0b	0,05b	1,62a	0a

\* Letras iguais não diferem entre os tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para a fotossíntese (Figura 4a) não houve diferença significativa entre os tratamentos na avaliação realizada antes da indução. A partir das 24 horas percebe-se queda significativa da fotossíntese sob a luz branca (testemunha), queda moderada nas mudas sob luz mista e leve redução em ambas luzes azul e vermelha. A partir das 30 horas, a fotossíntese das mudas sob luz branca se aproxima de zero, e por fim zera após 48 horas, demonstrando o rápido efeito do

estresse sobre o metabolismo das mudas. A fotossíntese sob luz mista cai a partir das 30 horas, terminando o experimento após 48 horas também zeradas. Até as 30 horas, a queda das mudas sob luz azul é leve, se mantendo quase três vezes superior a taxa fotossintéticas das mudas sob luz vermelha, que sentem maior efeito a partir do mesmo ponto, ambas terminam o experimento com fotossíntese próxima de zero, mas não totalmente zerada.

O crescimento das plantas, o potencial hídrico das folhas e a produção das culturas são criticamente limitadas ou mesmo suprimidas pela restrição hídrica (HOSSAIN et al. 2016). Foi relatado que o tratamento de dois genótipos de *Melissa officinalis* com luzes LED melhorou significativamente a tolerância ao estresse hídrico (AHMADI et al. 2019) provavelmente por manter a pressão de turgescência nas folhas em níveis satisfatórios e atenuando os efeitos do estresse. Além disso, resultados promissores indicam que tolerância à seca em dois genótipos de erva-cidreira aumentou por pré-tratamento de LEDs, uma vez que o teor relativo de água nas plantas tratadas com LED permaneceu semelhante ao as mudas mantidas em casa de vegetação (AHMADI et al. 2019).

A menor diminuição da fotossíntese das plantas conduzidas sob a luz azul durante o processo de estresse hídrico pode estar relacionada ao processo fisiológico que ocorre. A luz azul possui um papel crucial nas relações hídricas e trocas gasosas, e conseqüentemente no crescimento e tolerância a fatores de estresse. Além disso, ela exerce uma influência positiva e coordenada no genoma da planta e no plastídeo, que influencia o desenvolvimento de cloroplastos nas células das plantas e a síntese de clorofila. A absorção da luz azul pelas clorofilas promove um estado energético maior do que em relação à luz vermelha devido à maior energia existente na luz azul (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Para condutância estomática (Figura 4b), a queda nas mudas sob luz azul é mais leve, com estas sendo notáveis a partir de 30 horas de experimento, enquanto as demais apresentam efeito a partir das 24 horas para luz branca e mista, e 30 horas para luz vermelha. As mudas sob luz branca e mista terminaram o experimento com condutância zerada.

Para relação de carbono externo e interno ( $C_i/C_a$ ) (Figura 4c), nas mudas sob luz azul, a queda foi leve, sendo notável a partir das 30 horas, e apresentando leve recuperação após 48 horas de experimento. A relação em mudas sob luz vermelha teve leve aumento após 24 horas, e forte queda após 30, também apresentou leve recuperação, porém voltou a cair após 48 horas, o mesmo comportamento foi observado nas mudas sob luz mista. A relação em mudas sob luz branca teve brusca queda a partir de 24 horas, e se manteve estável após isso.

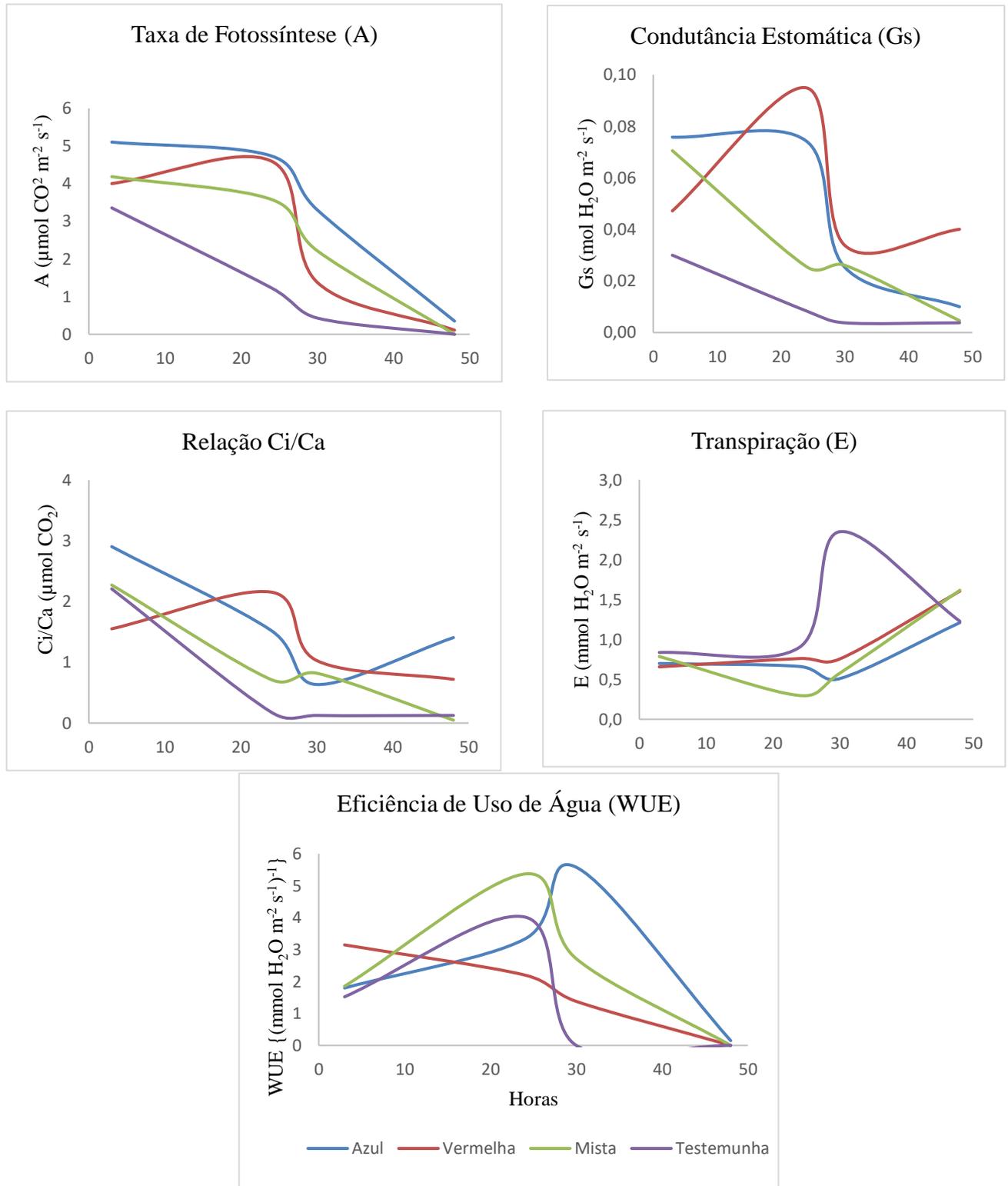


Figura 4 – Taxa fotossintética líquida ( $A$  -  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $G_s$  -  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), transpiração ( $E$  -  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  no mesofilo ( $C_i$  -  $\mu\text{mol CO}_2$ ) e concentração de  $\text{CO}_2$  externa atual ( $C_a$  -  $\mu\text{mol CO}_2$ ) em mudas de *E. benthamii* submetidas a diferentes cores de luz LED.

A transpiração (Figura 4d) se manteve estável em todos os tratamentos até as 24 horas. Após 30 horas, a transpiração de mudas sob luz branca aumentou bruscamente e teve leve recuperação após 48. A transpiração das demais mudas continuou estável até 48 horas de experimento, onde então se nota efeito significativo do estresse nessa variável.

A eficiência de uso de água (WUE) (Figura 4e), de todas as mudas se manteve estável até 24 horas de experimento. Após 30 horas, somente as mudas sob luz azul não demonstram queda nessa variável, sendo que a eficiência das mudas sob luz branca já havia zerado nesse ponto. Após 48 horas, somente as mudas sob luz azul não haviam zerado em termos de WUE. Entre as várias luzes de espectro estreito, os LEDs azul e vermelho são usados principalmente para o crescimento das plantas porque seus comprimentos de onda de aproximadamente 460 e 660 nm, respectivamente, são altamente eficazes para absorção de clorofila, o que resulta em eficiência fotossintética ideal (JOHKAN et al. 2010; GUPTA; JATOTHU, 2013).

O experimento indica vantagens em uso de LEDs coloridos quanto a resposta das mudas ao estresse hídrico, sendo que as mudas sob LEDs brancas apresentaram efeitos fisiológicos mais severos e de forma mais rápida. Porém, pode se recomendar o uso de LEDs de coloração azul, sendo que as mudas deste tratamento resistiram por mais tempo, e quando apresentara quedas, estas foram mais leves.

## **5.6 Conclusões**

A luz vermelha resultou em maior desenvolvimento na maioria das características avaliadas, e nas características em que não obteve melhores resultados, esta não diferenciou estatisticamente das mudas sob luz azul.

Na resposta ao estresse hídrico, as LEDs de luz azul resultaram em melhor resposta das mudas, mantendo sua taxa fotossintética e demais processos fisiológicos estáveis durante a aplicação do estresse.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho forneceu fundamentação científica para a propagação *in vitro*, e demonstrou o efeito positivo do uso de LEDs de coloração variada na micropropagação de explantes de *Eucalyptus dunnii* e *benthamii*. Também forneceu demonstração do efeito das LEDs na produção de mudas de *E. benthamii*.

Para o controle da contaminação em explantes vindos dos clones de *Eucalyptus dunnii* e *benthamii*, recomenda-se a imersão em hipoclorito de sódio a 1,5% durante 10 minutos.

O efeito dos LEDs no estabelecimento dos explantes pode ser considerado significativo, principalmente do espectro de coloração azul, que resultou em maior taxa de brotação.

Não houve sucesso na fase de multiplicação como se esperava, apenas surgimento de calos em certos explantes, sem particular diferença entre as luzes utilizadas. Se recomenda realização de mais estudos, confirmando possível efeito de diferentes concentrações de ANA e AIB do que as utilizadas.

Para o desenvolvimento de mudas de *E. benthamii*, se demonstrou efeito positivo no uso de LEDs, principalmente azul e vermelha, separadamente. A luz vermelha resultou em maior desenvolvimento na maioria das características avaliadas, e nas características em que não obteve melhores resultados, esta não diferenciou estatisticamente das mudas sob luz azul.

Na resposta ao estresse hídrico em mudas de *E. benthamii*, as LEDs de luz azul resultaram em melhor resposta das mudas, mantendo sua taxa fotossintética e demais processos fisiológicos estáveis durante as horas de estresse.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIRI, R. et al. The Prospect of Physiological Events Associated with the Micropropagation of *Eucalyptus* sp. **Forests**. v. 11. P. 1-29, 2020

AHMADI, T.; SHABANI, L.; SABZALIAN, M.R. Improvement in drought tolerance of lemon balm, *Melissa officinalis* L. under the pretreatment of LED lighting. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 139, p. 548–557, 2019.

BARRUETO CID, L. P.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: BARRUETO CID, L. P. **Cultivo in vitro de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 19-25, 2010.

BELLO-BELLO, J.J.; ESTRADA, E.M.; CAAMAL, H.; RAMOS, V.M. Effect of LED light quality on in vitro shoot proliferation and growth of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). **African Journal of Biotechnology**, v.15, n.8, p.272-277, 2016.

CANHOTO, J.M. **Biotecnologia vegetal - da clonagem de plantas à transformação genética**. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra, p. 44-103, 2010.

CARLOS, R.; PEIXE, A. **Multiplicação in vitro de Cultivares e Porta- Enxertos de Nogueira (*Juglans regia* L.); Estudo das Fases de Enraizamento e Climatização**. Universidade de Évora, 2014.

CASTRO, R. V. O.; ATAÍDE, G. M.; CASTRO, A. F. N. M.; ARAÚJO JÚNIOR, C. A.; SANTOS, R. C.; COSTA, L. S. Feasibility of wood production according to productivity class and rotation criteria. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.54, e00778, 2019.

DIAS, P.C; OLIVEIRA, L.S; XAVIER, A; WENDLING, I. Estaquia e mini estaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**. Colombo, v. 32, n. 72, p. 453-462, out./dez, 2012.

DOBNER JUNIOR, M.; BATISTA, K. M.; SARTÓRIO, I. P.; ARCE, J. E.; QUADROS, D. S. Crescimento e desempenho econômico de *Eucalyptus dunnii* em diferentes sítios no planalto sul do Brasil. **Floresta**, Curitiba, v. 47, n. 4, p. 397 - 406, 2017.

DONG, C. et al. Low light intensity effects on the growth, photosynthetic characteristics, antioxidant capacity, yield and quality of wheat (*Triticum aestivum* L.) at different growth stages in BLSS. **Advances in Space Research**, Saint-Mandé, v.53, n.11, p.1557-1566, 2014.

ELOY, E. et al. Avaliação da qualidade de mudas de *Eucalyptus grandis* utilizando parâmetros morfológicos. **Floresta**, v. 43, n. 4, p. 373–384, 2013.

FERREIRA, L.T. et al., Using LED lighting in somatic embryogenesis and micropropagation of an elite sugarcane variety and its effect on redox metabolism during acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 128, n. 1, p. 211–221, 2017.

FERRONATO, M. L.; BONAVIDO, P. H.; LIMA, N. L.; de SOUZA, M. A.; FERRONATO, D. R. C. F.; MOREIRA, S. N. S.; de SOUZA, D. B. Viveiro Cidadão –**Recuperação de Florestas de áreas degradadas na Zona da Mata Rondoniense**. Rolim de Moura –RO, 1º

edição. ECOPORE, 2015.

FLORES, T. B.; ALVARES, C. A.; SOUZA, V. C. STAPE, J. L. ***Eucalyptus no Brasil: Zoneamento climático e guia para identificação***. Piracicaba: IPEF, 2016. 447p.

FONSECA, S. M.; RESENDE, M. D. V.; ALFENAS, A. C.; GUIMARÃES, L. M. S.; ASSIS, T. F.; GRATTAPAGLIA, D. **Manual prática de melhoramento genético do eucalipto**. Viçosa: UFV, 2010. 200p

FREITAS, I.S.; ROLDÁN, G.Q.; MACEDO, A.C.; MELLO, S.C. The responses of photosynthesis, fruit yield and quality of mini-cucumber to LEDinterlighting and grafting. **Horticultura Brasileira** v.39, p. 86-93, 2021

GIMENES, E.S.; KIELSE, P.; HAYGERT, K.L.; FLEIG, F.D.; KEATHLEY, D.E.; BISOGNIN, D.A. Propagação de *Cabralea canjerana* por miniestacas. **Journal of Horticulture and Forestry**, v. 7, n. 1, p. 8-15. 2015.

GONÇALVES, J. L. M; ALVARES, C. A.; SOUZA, A. H. B. N.; ARTHUR JUNIOR, J. C. Caracterização edafoclimática e manejo de solos das áreas com plantações de eucalipto. In: Schumacher, M.V.; Viera, M. **Silvicultura do Eucalipto no Brasil**. Santa Maria- RS: Editora UFSM, 2016. p.111-154.

GOUVÊA, A. F. G.; GOMES, C. M.; MATOS, L. M.; SOUZA, T. A.; KUMABE, F. J. B.; BENITES, P. K. R. M. Efeito do sítio nas características tecnológicas da madeira de *Eucalyptus* para produção de celulose kraft. **Ciência da Madeira**, v.3, n.2, p.102-115, 2012.

GUPTA, SD.; JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. **Plant Biotechnology Reports** v. 7, p. 211–220, 2013.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, J.R.F.; GENEVE, R.L. **Hartmann & Kester's Plant propagation: principles and practices. 8ª edition**, Ed. Prentice Hall, New Jersey. 928 pp. 2011.

HEIMANN, J. P.; DRESCH, A. R.; ALMEIDA, A. N. Demanda dos Estados Unidos por carvão vegetal brasileiro. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 25, n. 2, p.437-445, jun. 2015.

HOSSAIN, M.A. et al. **Drought stress tolerance in plants, vol 1**. Springer International Publishing, Switzerland, 2016.

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

IACONA, C.; MULEO, R. **Light quality affects in vitro adventitious rooting and ex vitro performance of cherry rootstock colt**. *Scientia Horticulturae*, v.125, p.630-636, 2010.

IBÁ. (2021) Indústria Brasileira de Árvores. **Indicadores do setor brasileiro de árvores plantadas, Ano base 2021**. Brasília, 176 p.

JOHKAN, M.; SHOJI, K.; GOTO, F.; HASHIDA, S.; YOSHIHARA, T. Blue light-emitting

diode light irradiation of seedlings improves seedling quality and growth after transplanting in red leaf lettuce. **HortScience** v. 45, p. 1809–1814, 2010.

LAZZARINI, L. E. S. et al. Uso de diodos emissores de luz (LED) na fisiologia de plantas cultivadas: revisão. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 16, n. 2, p. 137-144, 2017.

LERIN, J. et al.,. Proteomic profile and polyamine contents are modulated by light source to promote *in vitro* shoot development in *Cariniana legalis* (Martius) O. Kuntze (*Lecythidaceae*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 137, n. 2, p 329–342, 2019.

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

LIMA, E. A.; SILVA, H. D; TUSSOLINI, E. L. **Potencial do Eucalyptus benthamii para produção de carvão em fornos convencionais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2012. 4p.

LIU, M. et al. Evaluation of leaf morphology, structure and biochemical substance of balloon flower (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) plantlets in vitro under different light spectra. **Scientia Horticulturae**, v. 174, n. 1, p. 112-118, 2014.

LISAR, S. Y. S.; MOTAFAKKERAZAD, R.; HOSSAIN, M. M.; RAHMAN, I. M. M. **Water Stress in Plants: Causes, effects and responses**. InTech, v. Water Stress, p. 1–14, 2012.

MANIVANNAN, A., SOUNDARARAJAN, P., HALIMAH, N., KO, C. H. Blue LED light enhances growth, phytochemical contents, and antioxidant enzyme activities of *Rehmannia glutinosa* cultured *in vitro*. **Horticulture Environment and Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 105–113, 2015.

MITCHELL, C.A., BOTH, A., BOURGET, C.M., KUBOTO, C., LOPEZ, R.G., MORROW, R.C., RUNKLE, S. LEDs: the future of greenhouse lighting. **Chron Hortic**, v.55, p.6–12, 2012.

MONTEUUIS, O. 2015. Micropropagation and production of forest trees. P. 32–55 in **Vegetative propagation of forest trees**. PARK, Y.S., BONGA J.M., and MOON, H.K. (eds.). National Institute of Forest Science, Seoul

MORAES, C. B. DE et al. Estimativas de parâmetros genéticos para seleção precoce de clones de *Eucalyptus* para região com ocorrência de geadas. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, v. 42, n. 102, p. 219–227, 2014.

MUDOI, K. M.; SIDDHARTHA, P. S.; ADRITA, G.; ANIMESH, G.; DEBASHISHA, B.; MINA, B.,. Micropropagation of important bamboos: a review, **African Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 2770– 2785, 2013.

MÜLLER, D.; GIMÉNEZ, P.G.; TRAVACIO, A.; BUENO, M. Establecimiento in vitro de *Zephyranthes* spp. **Biotecnología Vegetal**, v. 17, n. 1, p. 19–24, 2017.

MUNEER, S. et al. Influence of green, red and blue light emitting diodes on multiprotein complex proteins and photosynthetic activity under different light intensities in lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v.15, n.3, p.4657-

4670, 2014

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

ORNELLAS, T. S. et al.. **Micropropagação do bambu americano *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & PM Peterson**. 2017. 66 p. Dissertação (mestrado).

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**, v.41, p. 742–780, 2022.

PAYGHAMZADEH, K.; KAZEMITABAR, S. In vitro propagation of walnut - A review. **African Journal of Biotechnology**, v. 10 n. 3, p. 290–311, 2011.

PELIZZA, T. R. et al. Estabelecimento in vitro de mirtilheiro: cultivares Bluecrop, Duke e Misty. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 9, n. 1-2, p. 17-23, 2013.

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.

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.

ROCHA, P.S.G.; OLIVEIRA, R.P.; SCIVITTARO, W.B. Uso de LEDs na multiplicação e enraizamento *in vitro* de framboeseiras. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v.19, n.1, p.95-101, 2013.

RUI, B. R.; ANGRIMANI, D. S. R.; CRUZ, L. V.; MACHADO, T. L.; LOPES, H. C. principais métodos de desinfecção e desinfetantes utilizados na avicultura: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 9, n. 16, 2011

SAMUOLIENĖ, G. et al. LED irradiance level affects growth and nutritional quality of *Brassica microgreens*. **Central European Journal of Biology**, Szczecin, v.8, n.12, p.1241-1249, 2013

SANTOS, G. A. et al. Interação genótipos x ambientes para produtividade de clones de *Eucalyptus* L'Hér. no estado do Rio Grande do Sul. **Revista Árvore**, v. 39, n. 1, p. 81–91, 2015.

SANTOS, R. C. **Parâmetros de qualidade da madeira e do carvão vegetal de clones de eucalipto**. 2010. 159 f. Tese (Doutorado) - Curso de O Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia da Madeira, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

SANTOS, R. S.; GONÇALVES, R.; SILVA, N. A. Primeiro registro do besouro-amarelo-do-eucalipto em plantio de eucalipto no Estado do Acre. **Revista Ceres**, [s.l.], v. 63, n. 4, p.584-587, ago. 2016

SBRAVATTI JUNIOR, J.A.; et al. Redução da severidade do mofo cinzento em mudas de *Eucalyptus benthamii* tratadas com *Trichoderma atroviride*. **Summa Phytopathology**, Botucatu, v. 42, n. 4, p. 363-365, 2016.

SILVA, D. A. et al. **Caracterização Energética do *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage**. In: IV Congresso Florestal Paranaense, 2012, Curitiba/PR. IV Congresso Florestal Paranaense, 2012.

SILVA, J.A.T. da.; WINARTO, B.; DOBRÁNSZKI, J.; ZENG, S. Disinfection procedures for in vitro propagation of Anthurium. **Folia Horticulturae**, v. 27, n. 1, p. 3–14, 2015.

SILVA, P. H. M.; PAULA, R. C.; MORAES, M. L. T. **Melhoramento de Populações de Eucaliptos**. Piracicaba: IPEF, 2018. 108p.

SINGH, D.; BASU, C.; MEINHARDT-WOLLWEBER, M.; ROTH, B. LEDs for energy efficient greenhouse lighting. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.49, p.139–147, 2015.

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

STEFANEL, C. M.; REINIGER, L. R. S.; SILVA, L. D. da; RABAIOLLI, S. M. dos S.; DA SILVA, K. B. Diodos emissores de luz (LEDS) no cultivo in vitro de *Eugenia involucrata*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 40, 2020.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. (Ed.). **Fisiologia vegetal**. 5 ed. Porto Alegre: Artemed, 2013. 820 p.

TRUEMAN, S.J.; HUNG, C.D.; WENDLING, I. Tissue culture of *Corymbia* and *Eucalyptus*. **Forests**, v. 9 n. 2, 84 p., 2018

VELÁZQUEZ, S. F.; HERNÁNDEZ, V. E. B. **Abiotic Stress in Plants and Metabolic Responses**. InTech, p. 25–48, 2013.

XAVIER, A.; SILVA, R.L. Evolução da silvicultura clonal de *Eucalyptus* no Brasil. **Agronomía Costarricense**, v. 34, n.1, p 93-98, 2010.

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

ZURANDA, 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.