

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Germinação *in vitro* de embriões de *Allagoptera leucocalyx* (Drude) Kuntze,
uma palmeira em perigo de extinção, sob diferentes espectros de luz**

Fabio Santos Rangel Junior

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências, Programa: Recursos Florestais.
Opção em: Conservação de Ecossistemas Florestais

**Piracicaba
2024**

Fabio Santos Rangel Junior
Engenheiro Florestal

Germinação *in vitro* de embriões de *Allagoptera leucocalyx* (Drude) Kuntze, uma palmeira em perigo de extinção, sob diferentes espectros de luz

Orientador:

Prof. Dr.: **PAULO HERCÍLIO VIEGAS RODRIGUES**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa: Recursos Florestais.
Opção em: Conservação de Ecossistemas Florestais

Piracicaba
2024

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Rangel Junior, Fabio Santos

Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *Allagoptera leucocalyx* (Drude) Kuntze, uma palmeira em risco de extinção, sob diferentes espectros de luz / Fabio Santos Rangel Junior. - - Piracicaba, 2024.

33 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Arecaceae 2. Meio de cultura 3. Led I. Título

AGRADECIMENTOS

A Deus por todo dia me dar a oportunidade de evoluir.

A mim, por ter conseguido chegar tão longe. Ainda não cheguei lá, mas estou bem mais longe que dois anos atrás!

A Bruna Lopes, Marcela Sbríça, Octávio Mazzaro, Izabela Santos, Tobias Carioba, Bruno Guastala e Reinaldo Pinto, por serem uma família para mim.

A Marcela Locatelli, Vitória Benatti e Eduardo Ribas, por terem me aceitado em suas vidas e pela amizade tão sincera e genuína. Obrigado por me ajudarem a crescer tanto nesses anos e não ter deixado eu me perder no caminho.

Aos meus pais e minha família por sempre torcerem por mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Hercílio Viegas Rodrigues, ao Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas Ornamentais (LTCPO) pelo apoio e confiança.

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), à Universidade de São Paulo (USP), ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Florestais (PPGRF) e a Giovana por todo suporte e apoio durante essa trajetória.

Ao Jardim Botânico Plantarum e seu diretor Harry Lorenzi, pelo apoio com minha pesquisa.

A professora Luciana Duque e Rayssa Braga pela parceria.

A Brenda Silva e Samara Lazarotto, que não importa onde, nossa amizade e apoio sempre se mantiveram durante todos esses anos.

As amigas que fiz na ESALQ/USP, vocês proporcionaram bons momentos.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	7
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4. CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS	27

RESUMO

Germinação *in vitro* de embriões de *Allagoptera leucocalyx* (Drude) Kuntze, uma palmeira em perigo de extinção, sob diferentes espectros de luz

Allagoptera leucocalyx (Drude) Kuntz (coco-da-chapada) é uma espécie nativa da região do cerrado brasileiro, de importância para o paisagismo e sua fauna de pequeno porte. A escolha do coco-da-chapada se deu principalmente pelo baixo conhecimento da espécie e seu grau de extinção. As sementes de palmeiras, de forma geral, possuem diferentes mecanismos para germinação, gerando assim dificuldade e falta de conhecimento técnico para a germinação dessa espécie. Tratando-se desses fatores limitantes, principalmente o conhecimento científico restrito dessa espécie, este estudo teve como objetivo desenvolver um protocolo a partir da recuperação de embriões zigóticos para a espécie. O estudo consistiu na coleta de material de duas plantas matrizes provenientes do Jardim Botânico Plantarum e, posteriormente, foram levadas para o Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas Ornamentais (LCTPO) da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Para o experimento, foram localizados e excisados os embriões de 180 sementes e inoculados em meios de cultura MS e WPM, além do substrato comercial para avaliação da porcentagem de germinação. A fim de avaliar o efeito de diferentes espectros de luz de LED no desenvolvimento dos embriões foram testados os meios de cultivo MS e WPM, formando fatorial 4 x 2 nos seguintes tratamentos: T1 (MS-CW), T2 (WPM-CW), T3 (MS-R2B), T4 (WPM-R2B), T5 (MS-B), T6 (WPM-B), T7 (MS-R) e T8 (WPM-R). Foram feitas avaliações quinzenais, e os fatores avaliados foram: germinação, contaminação, emissão de parte aérea, emissão de parte radicular e, ao final, peso da massa fresca dos embriões. Após 30 dias, os embriões foram transplantados para novos meios de cultura a fim de manter as qualidades nutricionais para o desenvolvimento dos embriões. Ao final do experimento, as plantas que continham parte aérea e radicular foram transplantadas para tubos comerciais, e iniciaram-se o processo de aclimação em estufa. Com os dados coletados através do software R, foram feitos testes de média comparando os parâmetros avaliados, gerando gráficos para a discussão das análises. No experimento, os resultados apontaram uma germinação significativa dos tratamentos *in vitro* dentro do período de tempo avaliado, em comparação com o tratamento com substrato comercial, no qual não houve germinação dentro do tempo avaliado.

Palavras-chave: Arecaceae, Meio de cultura, Led

ABSTRACT

***In vitro* germination of zygotic embryos of *Allagoptera leucocalyx* (Drude) Kuntz, an endangered palm tree, under different light spectra**

Allagoptera leucocalyx (Drude) Kuntz (coco-da-chapada) is a native species from the Brazilian cerrado region, of importance for landscaping and its small fauna. The choice of the coco-da-chapada was mainly due to the low knowledge of the species and its degree of extinction. Palm seeds, in general, have different mechanisms for germination, thus generating difficulty and lack of technical knowledge for the germination of this species. Considering these limiting factors, mainly the restricted scientific knowledge of this species, this study aimed to develop a protocol based on the recovery of zygotic embryos for the species. The study consisted of collecting material from two mother plants from the Plantarum Botanical Garden and subsequently taken to the Ornamental Plant Tissue Culture Laboratory (LCTPO) at the Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". For the experiment, embryos from 180 seeds were located and excised and inoculated in MS and WPM culture media, in addition to commercial substrate to evaluate the percentage of germination. In order to evaluate the effect of different LED light spectrums on embryo development, MS and WPM culture media were tested, forming a 4 x 2 factorial in the following treatments: T1 (MS-CW), T2 (WPM-CW), T3 (MS-R2B), T4 (WPM-R2B), T5 (MS-B), T6 (WPM-B), T7 (MS-R) and T8 (WPM-R). Biweekly evaluations were carried out, and the factors evaluated were: germination, contamination, emission of aerial part, emission of root part and, at the end, weight of the fresh mass of the embryos. After 30 days, the embryos were transplanted into new culture media in order to maintain nutritional qualities for the development of the embryos. At the end of the experiment, the plants that contained aerial and root parts were transplanted into commercial tubes, and the greenhouse acclimatization process began. With the data collected using the R software, average tests were carried out comparing the evaluated parameters, generating graphs for discussing the analyses. In the experiment, the results showed a significant germination of the *in vitro* treatments within the evaluated period of time, compared to the treatment with commercial substrate, in which there was no germination within the evaluated time.

Keywords: Arecaceae, Culture medium, Led

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. - Média da germinação (%) dos embriões de *Allagoptera leucocalyx*, em função dos meios de cultura, MS e WPM e tratamento controle (TC). (a); (b) significância estatística em relação à interação dos meios de cultura e tc..... 15
- FIGURA 2. Média de contaminação (%) dos tratamentos *in vitro* de *Allagoptera leucocalyx*, dispostos em ordem de cada tratamento avaliado, sendo: T1 (MS-CW), T2 (WPM-CW), T3 (MS-R2B), T4 (WPM-R2B), T5 (MS-B), T6 (WPM-B), T7 (MS-R), T8 (WPM-R). (a); (b) significância estatística em relação à interação dos meios de cultura..... 16
- FIGURA 3. Média de contaminação (%) dos tratamentos *in vitro* de *Allagoptera leucocalyx*, dispostos em ordem de cada tratamento avaliado, sendo: T1 (MS-CW), T2 (WPM-CW), T3 (MS-R2B), T4 (WPM-R2B), T5 (MS-B), T6 (WPM-B), T7 (MS-R), T8 (WPM-R). (a); (b) significância estatística em relação à interação dos meios de cultura..... 18
- FIGURA 4. Média do comprimento (cm) da parte radicular dos embriões de *Allagoptera leucocalyx*, dispostos em ordem de cada tratamento avaliado, sendo: T1 (MS-CW), T2 (WPM-CW), T3 (MS-R2B), T4 (WPM-R2B), T5 (MS-B), T6 (WPM-B), T7 (MS-R), T8 (WPM-R)..... 19
- FIGURA 5. Média do comprimento (cm) da parte aérea dos embriões de *Allagoptera leucocalyx*, dispostos em ordem de cada tratamento avaliado, sendo: T1 (MS-CW), T2 (WPM-CW), T3 (MS-R2B), T4 (WPM-R2B), T5 (MS-B), T6 (WPM-B), T7 (MS-R), T8 (WPM-R)..... 21
- FIGURA 6. Massa fresca (g) dos embriões de *Allagoptera leucocalyx*, dispostos em ordem de cada tratamento avaliado, sendo: T1 (MS-CW), T2 (WPM-CW), T3 (MS-R2B), T4 (WPM-R2B), T5 (MS-B), T6 (WPM-B), T7 (MS-R), T8 (WPM-R)..... 21
- FIGURA 7. Embriões germinados, com parte aérea e sistema radicular estabelecidos, transplantados para tubetes com substrato comercial + vermiculita, em estufa de aclimação. (a) T2R5: (WPM-CW); (b) T4R15: (WPM-R2B); (c): T4R14: (WPM-R2B); (d) T3R18: (MS-R2B); (e): T4R19: (WPM-R2B); (f) bandeja com tubetes de 280cm³ em estufa para aclimação..... 23

1. INTRODUÇÃO

A *Allagoptera leucocalyx* (Drude) Kuntz, também conhecida como coco-da-chapada, Guriri ou Coco-de-vassoura, é uma palmeira nativa do Brasil, pertencente à família Arecaceae. Ocorre em todo o território nacional, especialmente nas regiões do cerrado brasileiro, nos estados da Bahia, Piauí, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais e Paraná, nas fitofisionomias do cerrado *stricto sensu*, mata ciliar e mata de galeria. No exterior, também é encontrada no norte da Argentina, Bolívia e Paraguai (MORAES, 1996, LORENZI et al., 2010; LIMA et al. 2018). Possui grande importância para a fauna nativa e elevado potencial ornamental, podendo ser amplamente utilizada no paisagismo.

Apesar desse potencial, a espécie ainda é pouco utilizada devido à escassez de material vegetal no território nacional (LIMA et al., 2018) e à falta de conhecimento científico. Diante disso, nota-se a necessidade de estudos relacionados à propagação da espécie, a fim de aumentar sua disponibilidade no mercado.

Segundo a IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza), órgão que criou uma padronização de critérios e categorias para sistematizar a avaliação do estado de conservação de espécies e para a criação das chamadas listas Vermelhas, ou "RedLists" (CNCFLORA, 2012), que se fundamenta em taxas para categorizar o risco de extinção de maior para menor grau. Dentre as nove categorias, duas são designadas para espécies não avaliadas (Não Avaliada, NE) e outra em que os dados avaliados não são suficientes para uma tomada de decisão (Dados insuficientes, DD), sendo necessários ao menos três indivíduos da espécie para serem classificada (CNCFLORA, 2012; IUCN, 2012; CATARINO, 2014).

Com isso, de acordo com o seguimento da legislação da lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção do Ministério do Meio Ambiente, a *Allagoptera leucocalyx* não consegue ser classificada em nenhum grau da lista, visto que não possui indivíduos suficientemente identificados para gerar uma referência (BRASIL, 2022). A mesma citação ainda foi mencionada anteriormente por Pinheiro (2011), mas devido à falta de testemunho material e localização incerta, não foram consideradas significativas. Assim, surge a necessidade de formas alternativas para a propagação dessa espécie, tanto em nível experimental, comercial ou na conservação de recursos genéticos florestais (SANTOS et al., 2000; COQUEIRO et al., 2012).

A propagação e germinação de sementes nas palmeiras, em sua maioria, são bastante peculiares, uma vez que os padrões morfológicos de embriões e plântulas são muito variáveis, dificultando a definição de indicadores na germinação (HENDERSON, 2006; RIBEIRO et al.,

2012). Pinheiro & Araújo-Neto (1987) e Ferreira (2023) reforçam a necessidade de estudos descritivos sobre a germinação de sementes da família Arecaeae para aprimorar o entendimento do processo e alcançar resultados eficazes na produção de mudas.

O cultivo *in vitro* é comumente empregado na multiplicação de diversas espécies vegetais, destacando-se frutíferas, hortícolas, florestais e, principalmente, ornamentais. A propagação vegetativa de espécies florestais oferece mudas de elevada qualidade, aumento da produtividade, padronização uniforme, apresentando bom desenvolvimento em campo, além de resistência a pragas e doenças (FERRIANI et al., 2010; AGGARWAL et al. 2012; NAVROSKI et al. 2014; BADILLA et al., 2016). Entre os métodos de cultivo, a técnica de cultivo de embriões zigóticos (ou resgate de embriões) consiste em uma técnica utilizada para o ganho na produção de espécies florestais (MANZUR et al., 2013). Essa auxilia no desenvolvimento do embrião, superando a dormência de sementes no resgate de embriões imaturos em hibridação e, em especial, na produção de mudas (MONNIER, 1995; HU & FERREIRA, 1998; RAGHAVAN, 2003; HASLAM & YEUNG, 2011; LEITE et al., 2021).

Para o sucesso do cultivo, um dos fatores primordiais é o balanço nutritivo ideal para o desenvolvimento do material vegetal. O meio nutritivo de Murashige e Skoog (MS) é vastamente utilizado no cultivo *in vitro* de plantas. Em função de sua aplicação versátil, tem sido empregado em diversas pesquisas com diferentes espécies, como eucalipto (RODRIGUES, 2020), antúrio (DE LIMA., et al 2020), plantas ornamentais (MEZZALIRA, et al., 2021) e jacarandá (SABAH, et al., 2022), o que o torna uma escolha padrão e eficaz na biotecnologia vegetal (MURASHIGE E SKOOG, 1962).

Já o meio nutritivo Woody Plant Medium (WPM), foi desenvolvido para atender espécies lenhosas. Demétrio et al., (2021) observou que essas espécies necessitam de sais básicos relacionados à diminuição de alguns macronutrientes, resultando em uma diluição de 45% da força iônica em comparação ao meio MS (MELLO et al., 2020). Sua composição balanceada favorece a formação de brotos e o desenvolvimento da parte radicular, conforme observado em espécies como falso-pau-brasil (HASS et al., 2022), cerejeira-do-Rio-Grande e cambucizeiro (OLIVEIRA, 2022), tornando um meio eficaz para estudos de propagação vegetativa e melhoramento genético (LLOYD & MCCOWN, 1980).

Outro fator importante para o para o sucesso do cultivo *in vitro* é a luz, desempenhando um papel fundamental nos processos metabólicos das plantas (GONÇALVES et al., 2023). Essa, frequentemente é disponibilizada a partir do uso de LEDs (Light-Eriving Diode) de diferentes espectros, podendo modular a produção de metabólitos secundários (LAURIA et al., 2023),

As luzes LEDs mais empregadas no cultivo *in vitro* incluem os espectros branco, azul, vermelho e uma combinação de azul e vermelho (1:1), influenciando diversas características, como morfologia, metabolismo e fisiologia das plantas. Processos como fotossíntese, fotomorfogênese, germinação, acúmulo de biomassa e síntese fitoquímica podem ser controlados e otimizados pela modulação desses comprimentos de onda da luz (COSTA et al., 2021; HUANG et al., 2022). Além dos benefícios citados, o emprego dos LEDs tem experimentado um impulso em resposta ao aquecimento global e às crescentes preocupações ambientais. Nesse contexto, a busca por dispositivos mais eficientes, menos poluentes e com maior durabilidade tem se intensificado (STEELE, 2007). Com isso, os diodos emissores de luz (LEDs) têm ganhado ampla utilização comercial e, nos últimos anos, estão sendo estudados para sua aplicação na micropropagação de plantas no Brasil (ROCHA et al., 2010; SILVA et al., 2016; FERREIRA et al., 2016; ROCHA et al., 2017).

Diante do exposto, este estudo tem como objetivo avaliar o desenvolvimento *in vitro* de embriões zigóticos maduros de *Allagoptera leucocalyx*, em dois meios de cultura (MS e WPM), sob diferentes espectros de luz LEDs.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado neste experimento foi de embriões zigóticos maduros, originado de frutos coletados de palmeiras *Allagoptera leucocalyx* durante a época de frutificação no mês de setembro de 2022., da coleção do Jardim Botânico Plantarum, localizado na cidade de Nova Odessa – SP, com clima CWA subtropical (GOLFARI et al., 1978).

Em seguida, os frutos foram levados para o Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas Ornamentais (LTCPO) no Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz (ESALQ/USP) para realização do processo de assepsia. O processo teve início com a lavagem dos frutos com o objetivo de retirar impurezas superficiais. Ao final da lavagem, os frutos foram imersos em solução de hipoclorito de sódio, na proporção 1/1 50% (cloro ativo 2,5) por 40 minutos. Em seguida, a solução foi drenada e os frutos foram lavados por três vezes em água destilada autoclavada.

A etapa seguinte consistiu na excisão dos embriões zigóticos das sementes. Posteriormente, retirou-se toda parte do mesocarpo dos frutos com o objetivo de localizar o tegumento. Em seguida, o tegumento foi submetido pelo mesmo processo de assepsia citado anteriormente, mas com redução do tempo para 10 minutos. Com o auxílio de um canivete e um martelo (ambos de ferro), o pirênio foi comprimido até que o endocarpo fosse rompido ao meio, e após isso era novamente rompido no sentido do embrião, no intuito de favorecer a germinação do embrião e deixá-lo em contato ao máximo em contato com o meio nutritivo. Em seguida, localizado e isolado a porção contendo o embrião zigótico, o mesmo foi inoculado individualmente.

Terminada a fase de assepsia e localização dos embriões zigóticos, as porções contendo os embriões foram transferidas para tubos de ensaio Pyrex® (15 cm de comprimento por 2,5 cm de diâmetro), vedados com tampas de polipropileno Kimble de 25 mm de diâmetro, cada um contendo 7 mL de meio de cultivo. Foram utilizados dois tipos de meios de cultivo para avaliação do desenvolvimento dos embriões, sendo eles o MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962) e o meio de cultivo WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980). Para os meios MS e WPM foram utilizadas concentrações totais de sais e vitaminas dos respectivos meios de cultivo. Em ambos foram acrescidos 30 g L⁻¹ de sacarose e 2 g L⁻¹ de phytigel – Sigma i. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem por 20 minutos a 121 C.

Os explantes foram transferidos para os tubos de ensaio (um explante por tubo) e incubados em sala de crescimento sob quatro diferentes espectros de luz de LED –

GreenPowerTLED Philips™, branco (CW), 70% vermelho + 30% azul (R2B), 100% vermelho 645–675nm ® e 100% azul 450–465 nm (B) com fotoperíodo de 14/10h (dia/noite). A intensidade luminosa foi ajustada para 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (LI-200 Liquor), à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em um arranjo bifatorial (4 x 2), em que os níveis do fator A correspondem aos diferentes tipos de espectros utilizados e o fator B aos meios de cultivo, totalizando 8 tratamentos sendo: T1 (MS-CW), T2 (WPM-CW), T3 (MS-R2B), T4 (WPM-R2B), T5 (MS-B), T6 (WPM-B), T7 (MS-R), T8 (WPM-R) + TC. Para o parâmetro da avaliação da germinação dos embriões nos meios de cultivo, foi acrescido um tratamento controle (TC). Esse tratamento foi preparado em uma bandeja de tubetes de 280 cm³ volume contendo uma mistura de substrato comercial e vermiculita, ambos em uma proporção de 1/1 v/v, e inoculados 20 embriões em casa de vegetação aclimatada com 70% de sombreamento (Aluminet®) e submetida a gradiente de umidade relativa a partir de 90% com redução progressiva até 70%.

Após a introdução dos explantes, as avaliações ocorreram nos dias 15, 30, 45 e 60. Foram avaliadas as seguintes características: taxa de germinação (%) (material vivo, sem contaminação, que apresentaram qualquer aspecto de desenvolvimento), taxa de contaminação (%) (material apresentando qualquer tipo de contaminação por colônias fúngica ou bacteriana), comprimento da raiz (cm), comprimento da parte aérea (cm) e ao final do experimento massa fresca total (g).

Terminada a avaliação de 30 dias, os embriões sobreviventes foram subcultivados, mantendo os tratamentos avaliados. Ao final dos 60 dias, as plântulas foram avaliadas, e as que apresentaram raiz e parte aérea bem desenvolvidas foram aclimatizadas em tubetes com o mesmo substrato utilizado para o controle e nas mesmas condições e estufa citadas anteriormente. Os dados obtidos da aclimatização foram demonstrados em porcentagem de plantas vivas.

Os dados foram tabulados e submetidos a teste de normalidade a fim de verificar se os dados atendiam ao pressuposto, após isso, foram realizados testes de comparações múltiplas de médias com ênfase no teste de Tukey (1953), analisados através do software R studio (versão 4.2.1) com nível de significância de ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os tratamentos *in vitro* apresentaram germinação quando comparados com o parâmetro meio de cultura. O meio de cultura MS apresentou uma menor taxa de germinação em comparação ao meio WPM. O TC não apresentou germinação dentro do período de avaliação (Figura 1). Os meios apresentaram diferença significativa em comparação com o TC.

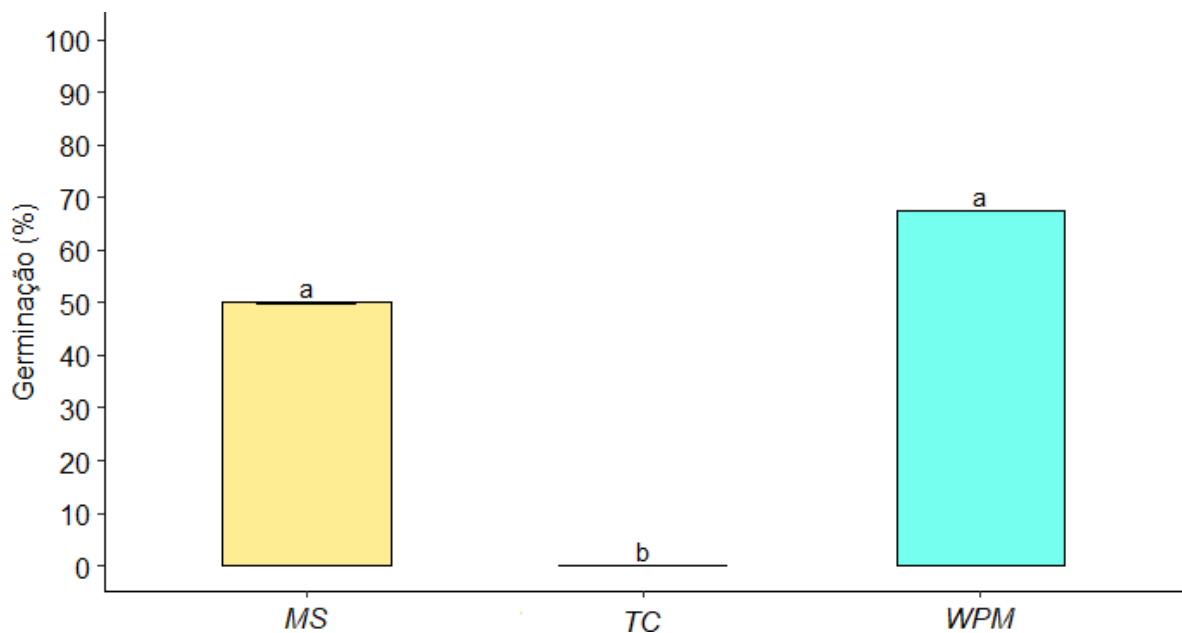


Figura 1. - Média da germinação (%) dos embriões de *Allagoptera leucocalyx*, em função dos meios de cultura, MS e WPM e tratamento controle (TC). (a); (b) significância estatística em relação à interação dos meios de cultura e TC.

Apesar de não apresentar diferença significativa na germinação dos embriões entre os meios de cultivo, o uso da técnica *in vitro* foi eficiente quando comparada ao tratamento controle. Para a *Allagoptera leucocalyx* esse resultado é de grande importância, uma vez que essa espécie se encontra em perigo de extinção e o método de propagação convencional mostrou-se ineficiente como demonstra a Figura 1. Mesmo não apresentando diferença significativa na comparação da germinação dos embriões entre os meios de cultivo, nota-se uma tendência de crescimento mais pronunciada dos embriões ao utilizar o meio de cultura WPM. Esse melhor desenvolvimento está relacionado ao melhor balanço nutricional do meio WPM, mais adaptado à fisiologia de desenvolvimento dessa palmeira, semelhante às espécies lenhosas (CALDAS et al., 1998, GRATAPAGLIA et al., 1998; PASQUAL, 2001). De Faria

et al. (2002) destacaram também a importância da escolha adequada do meio de cultura para assegurar resultados mais significativos, desde que as concentrações ideais para cada espécie sejam alcançadas. Ribeiro et al. (2018) salientam também que a aplicação de balanços ideais na germinação convencional, ou seja, o uso de substratos eficazes, reforça a importância do substrato ideal para facilitar a germinação de plantas nessas condições.

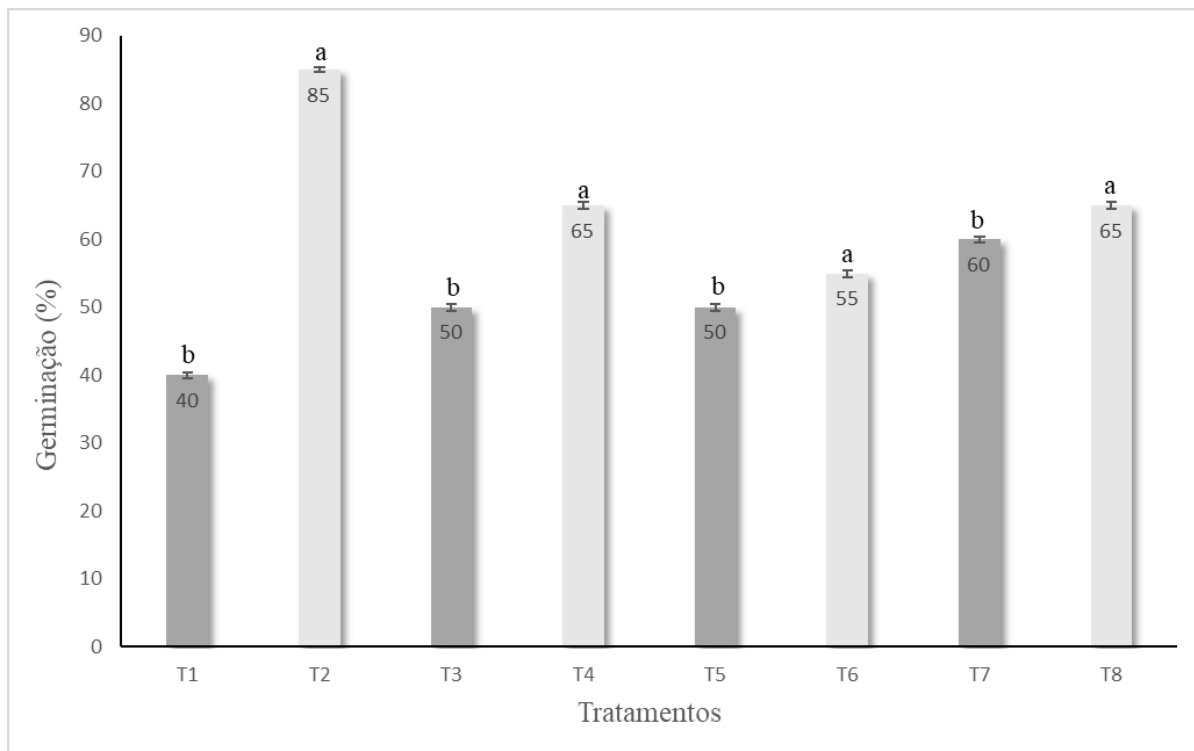


Figura 2. Média de contaminação (%) dos tratamentos *in vitro* de *Allagoptera leucocalyx*, dispostos em ordem de cada tratamento avaliado, sendo: T1 (MS-CW), T2 (WPM-CW), T3 (MS-R2B), T4 (WPM-R2B), T5 (MS-B), T6 (WPM-B), T7 (MS-R), T8 (WPM-R). (a); (b) significância estatística em relação à interação dos meios de cultura

Entre os tratamentos *in vitro* também foi comparado a resposta de germinação, analisando a interação entre os espectros de luz de LED e os meios de cultura. Foi observada diferença significativa apenas para o parâmetro meio de cultivo, entre o fator espectros de luz led não houve diferença significativa, tendo como resultado a comparação das médias dos tratamentos. Mesmo não ocorrendo diferença significativa em relação às luzes, observa-se que em todos os tratamentos onde foi utilizado meio WPM, houve uma maior germinação em comparação ao MS. Com relação às luzes led, a luz branca apresentou maior taxa de germinação, seguindo da interação do led R2B e o led R, todos em combinação com o meio de cultura WPM. MS-CW, MS-R2B e MS-B apresentaram uma menor taxa de germinação,

seguido do tratamento WPM-B e MS-R que resultaram em valores próximos no parâmetro germinação dos embriões zigóticos (Figura 2).

A luz é um fator importante na germinação, uma vez que o fóton é absorvido pelas clorofilas e carotenóides, e finalmente armazenado como energia, fornecido como um complexo de antena, ou seja, coletando luz e transferindo a energia para os centros de reações químicas, levando ao armazenamento de energia a longo prazo (TAIZ & ZEIGER, 2017; LAZZARINI et al., 2017). Sendo assim, afetando amplamente a germinação de forma significativa, uma vez que apresentam fotoblastismo positivo (MEIADO, 2012). Evidenciando que, para o cultivo *in vitro* a intensidade luminosa mais adequada pode variar conforme espécie (FERREIRA et al., 2016).

A luz branca apresenta um maior equilíbrio em comparação com luzes monocromáticas, como azul e vermelho (FRASZCZAK et al., 2014). A utilização de LEDs brancos no crescimento *in vitro* pode favorecer o desenvolvimento dos embriões, pois a luz pode penetrar melhor na folha, auxiliando nos processos fotoquímicos em comparação com LEDs monocromáticos. O mesmo foi observado por Lin et al. (2013) para o cultivo de espécies sob hidroponia. Relacionando o LED vermelho monocromático ou sua interação com o LED azul, o mesmo já foi observado por Brown et al. (1995), o que tem grande importância no desenvolvimento do cultivo de plantas. Assim, diversos estudos já apontaram resultados satisfatórios no desenvolvimento de espécies combinados com LEDs no espectro vermelho, como observado por Jeong & Sivanesan (2015) no cultivo de escrofulária (*Scrophularia takesimensis*), mirtilo (*Vaccinium corymbosum*) (HUNG et al., 2016) e hortelã-pimenta (*Plectranthus amboinicus*) (SILVA et al., 2017).

Os tubos de ensaio dos tratamentos *in vitro* contendo embriões que no decorrer da condução do experimento apresentaram contaminação, foram retirados, contabilizados e analisados, gerando resultados de contaminação em função dos tratamentos T1 a T8. (Figura 4).

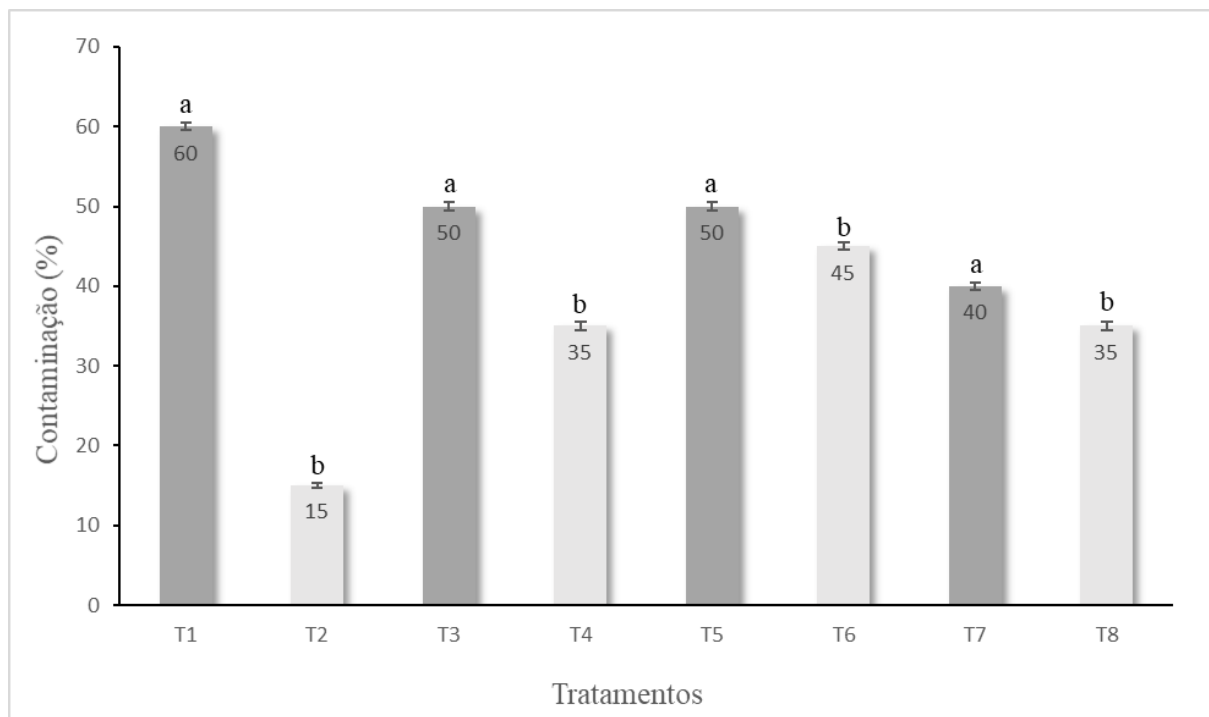


Figura 3. Média de contaminação (%) dos tratamentos *in vitro* de *Allagoptera leucocalyx*, dispostos em ordem de cada tratamento avaliado, sendo: T1 (MS-CW), T2 (WPM-CW), T3 (MS-R2B), T4 (WPM-R2B), T5 (MS-B), T6 (WPM-B), T7 (MS-R), T8 (WPM-R). (a); (b) significância estatística em relação à interação dos meios de cultura.

Foi observado diferença significativa entre os tratamentos acima, apenas na comparação dos meios de cultura utilizados. Sendo o meio MS apresentando maior taxa de contaminação em relação ao WPM. Com relação aos leds não foi observado interação, assim apenas gerando o teste de médias e comparando entre os tratamentos e seus respectivos desvios. Todos tratamentos correspondentes ao meio MS (T1, T3, T5 E T7) apresentaram maior taxa de contaminação em comparação ao meio WPM em cada led submetido, corroborando com a o gráfico de germinação, isto é, sendo inversamente proporcional às taxas observadas no parâmetro germinação dos tratamentos *in vitro*.

A contaminação geralmente ocorre devido ao desenvolvimento de microrganismos que não foram completamente eliminados durante o processo de desinfestação do material vegetal, ou devido a falhas na assepsia de ferramentas, equipamentos, meios de cultivo, operador, entre outros (PANICKER et al., 2007; THOMAS & ASWATH 2013). Esse fato corrobora com a argumentação de Brondani et al. (2009) que, ao estabelecer material de *E. benthamii* x *E. dunni*, proveniente de sistema de semi-hidroponia, observaram uma média de 41,33% de contaminação do material *in vitro*. O mesmo é justificável com base na formulação do meio, considerando que as concentrações nutricionais do meio MS são mais elevadas em comparação ao WPM, acarretando um crescimento maior destes microrganismos no meio de

cultura (YAMAZAKI et al., 1995). Morini & Muleo (2003) também salientam que a qualidade da luz influencia nos balanços fisiológicos das plantas, por meio deste, reduzindo a proliferação de patógenos em determinados espectros de luz.

Após isso, foi feita a análise do parâmetro referente ao comprimento da parte radicular (Figura 4) dos embriões, com o intuito de verificar quais tratamentos demonstraram melhor desempenho no comprimento das raízes dos embriões de coco-da-chapada.

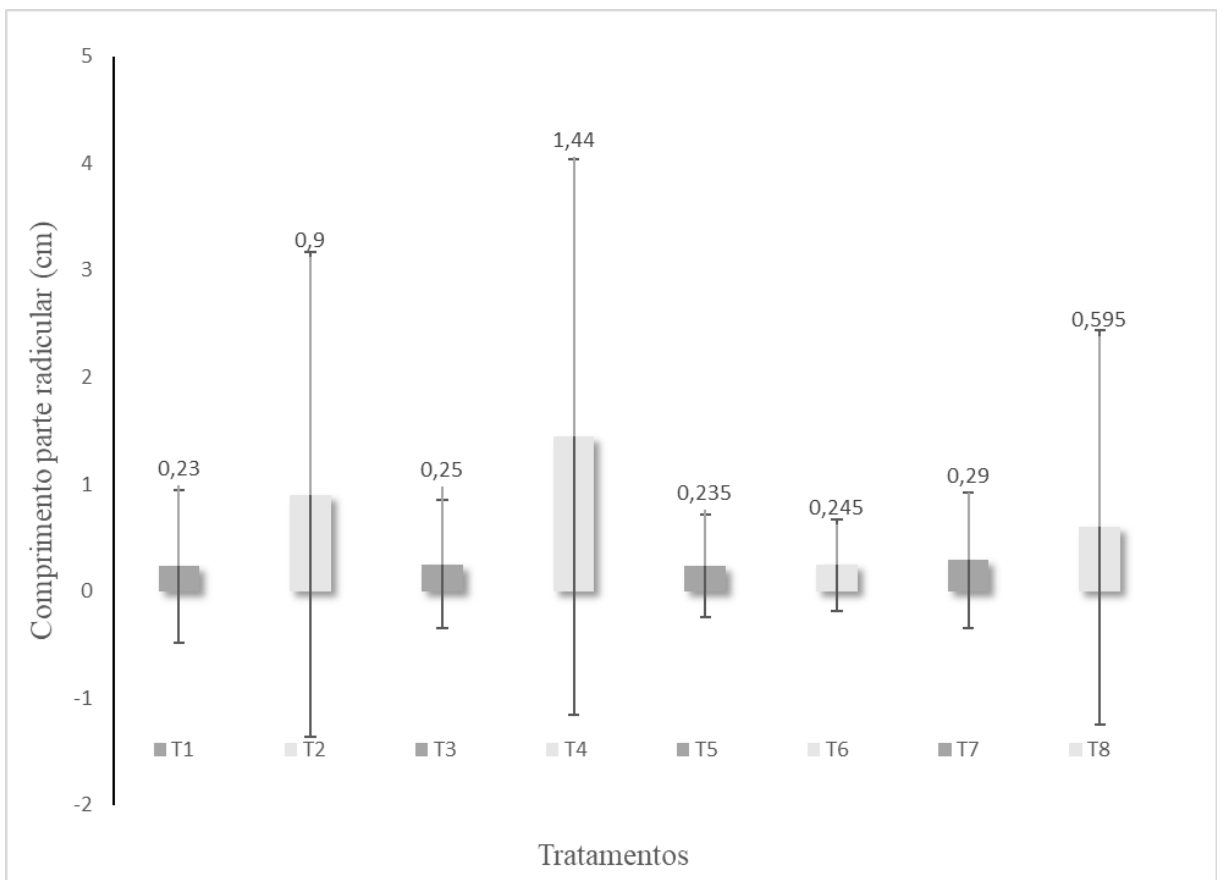


Figura 4. Média do comprimento (cm) da parte radicular dos embriões de *Allagoptera leucocalyx*, dispostos em ordem de cada tratamento avaliado, sendo: T1 (MS-CW), T2 (WPM-CW), T3 (MS-R2B), T4 (WPM-R2B), T5 (MS-B), T6 (WPM-B), T7 (MS-R), T8 (WPM-R)

Dentre o parâmetro comprimento radicular, não foi observada diferença significativa entre o meio de cultura e os espectros testados. Com isso apenas foram comparadas as médias de comprimento em função de cada tratamento onde os embriões inoculados no meio WPM apresentaram maior comprimento de parte radicular. Grattapaglia & Machado (1998) já haviam observado que espécies herbáceas são mais fáceis de enraizarem em cultivo *in vitro*, em comparação a espécies lenhosas. Isso também foi observado em *Saccharum officinarum* (cana-de-açúcar) onde a espécie obteve 100% de enraizamento em todos os espectros de luz a

que foi submetida (DA ROCHA et al., 2018). A ausência de hormônios fitoreguladores pode ser um fator limitante para o enraizamento, visto que, para cerejeira-do-Rio-grande (*Eugenia involucrata*) o uso de Ácido α -Naftaleno Acético (ANA) a 0,5 μM e Thidiazuron (TDZ) a 32 μM , sob diferentes espectros, obteve um resultado satisfatório, o que pode ser utilizado para trabalhos futuro com a espécie do presente estudo (GOLLE et al., 2017). A não diferença significativa dos Leds utilizados também foi observado por Moro (2020), onde os Leds branco, vermelho e verde não diferiram significativamente, indicando, possivelmente, não sendo eficaz na multiplicação de cerejeira-do-Rio-grande.

Xavier et al. (2009) argumentam que o alto índice de carboidratos atua como um determinante para a produção de raízes, já que essa fase demanda energia, auxiliando assim na germinação. Os autores ainda citam a existência de estudos sobre o melhor enraizamento, que ocorre quando mantêm as plantas com uma nutrição eficaz, mas com baixos níveis de nitrogênio. Isso alinha com o fato de que embriões imaturos frequentemente necessitam de níveis elevados de sacarose como fonte de energia, seja devido à sua natureza heterotrófica como para manter um equilíbrio osmótico adequado (MONNIER, 1995), observado em contraponto por Manzur et al. (2013) na germinação de *Capsicum* sp., em que 40 g L⁻¹ de sacarose foi mais eficaz do que 80 g L⁻¹.

Por fim, foram avaliados o comprimento da parte aérea (cm) (Figura 5) e a massa fresca (g) (Figura 6) dos embriões. Os dados foram submetidos ao teste de médias e estão apresentados a seguir.

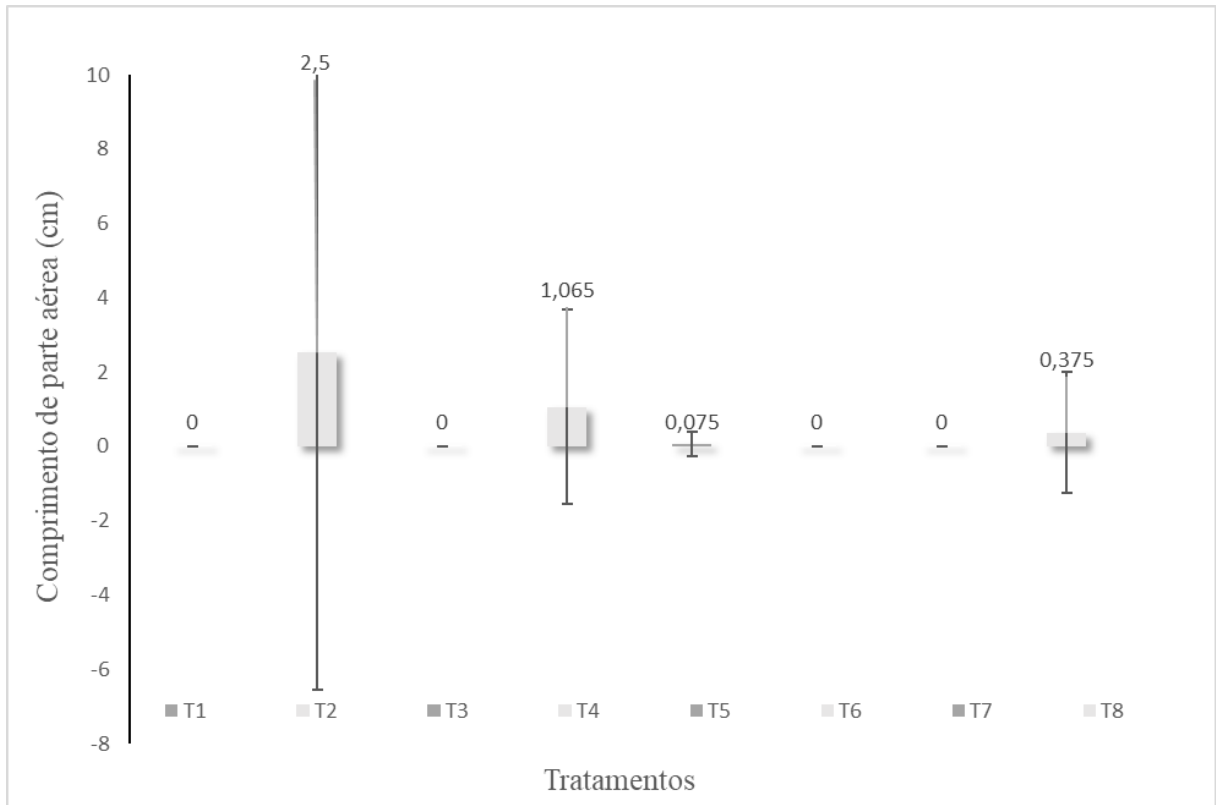


Figura 5. Média do comprimento (cm) da parte aérea dos embriões de *Allagoptera leucocalyx*, dispostos em ordem de cada tratamento avaliado, sendo: T1 (MS-CW), T2 (WPM-CW), T3 (MS-R2B), T4 (WPM-R2B), T5 (MS-B), T6 (WPM-B), T7 (MS-R), T8 (WPM-R)

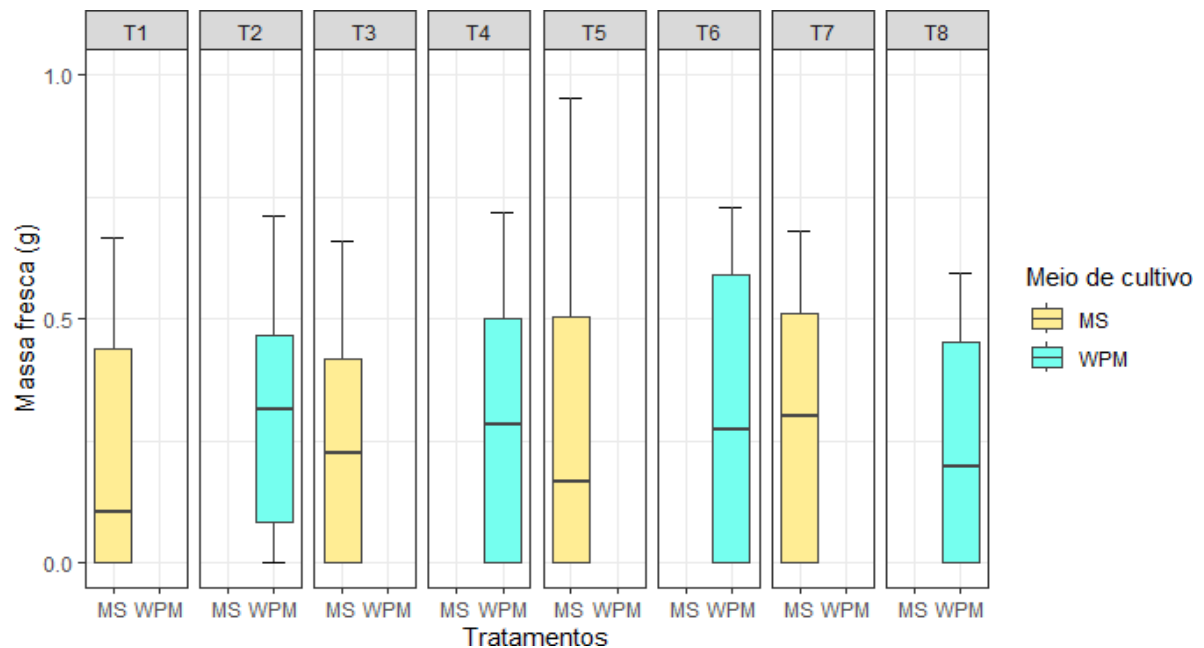


Figura 6. Massa fresca (g) dos embriões de *Allagoptera leucocalyx*, dispostos em ordem de cada tratamento avaliado, sendo: T1 (MS-CW), T2 (WPM-CW), T3 (MS-R2B), T4 (WPM-R2B), T5 (MS-B), T6 (WPM-B), T7 (MS-R), T8 (WPM-R)

Em ambos cenários, não se constatou diferença significativa em comparação dos meios quanto nos espectros de led para permitir a comparação por meio do teste de Tukey, resultando apenas na apresentação dos valores médios avaliados para os comprimentos da parte aérea e a massa fresca dos embriões onde é observado maiores médias nos tratamentos com meio de cultura WPM.

Essa ausência de significância pode ser atribuída à variedade de formulações de meios básicos utilizadas no contexto do cultivo *in vitro*, indicando que a concentração empregada pode não ter sido eficaz para os propósitos deste experimento. Vale salientar que não há uma formulação padronizada, mas o meio de MS, com suas adaptações e diluições, tem sido eficaz em vários casos. Contudo, para espécies lenhosas, o meio MS revela-se insatisfatório em algumas situações, sendo que composições mais diluídas em macronutrientes demonstram um desempenho superior no desenvolvimento, isso corroborando com o baixo comprimento de parte aérea dos embriões inoculados no meio MS (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Alguns resultados similares já foram observados como na germinação de timbó (*Derris urucu*), onde não houve resultados significativos de diferentes concentrações de meio MS (CONCEIÇÃO, 2000) e também em sementes de Ipê-Amarelo (*Tabebuia serratifolia*) estudando os efeitos dos meios MS e WPM (NERY, 2008).

No final, um total de 5 embriões com parte aérea e sistema radicular bem desenvolvidos foram submetidos ao processo de aclimatização. Após as medições, as plantas estabelecidas, ou seja, aquelas com parte aérea e sistema radicular bem formados, foram enxaguadas em água destilada para remover o excesso de meio e, em seguida, transplantadas para tubetes contendo substrato+vermiculita comercial (50/50v) (Figura 10). O objetivo era observar como as plantas responderiam após o período de aclimatação.

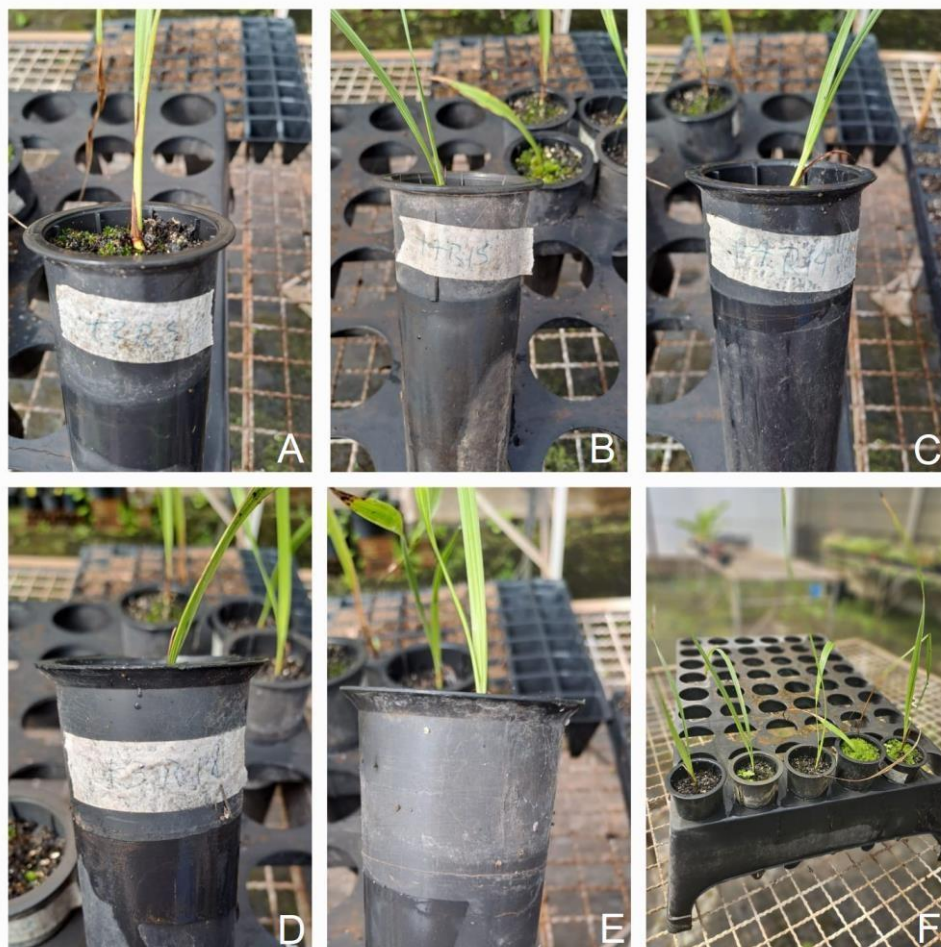


Figura 7. Embriões germinados, com parte aérea e sistema radicular estabelecidos, transplantados para tubetes com substrato comercial + vermiculita, em estufa de aclimação. (A) T2R5: (WPM-CW); (B) T4R15: (WPM-R2B); (C) T4R14: (WPM-R2B); (D) T3R18: (MS-R2B); (E) T4R19: (WPM-R2B); (F) bandeja com tubetes de 280cm³ em estufa para aclimação.

Dos embriões aclimatizados, pode ser observado que a maior parte foi proveniente do tratamento com o meio de cultura WPM no espectro R2B. Essa resposta contribui com o que foi mencionado por Purohit et al., (2002) em que a utilização do meio WPM não apenas resulta em redução de custos, mas também proporciona benefícios significativos para a posterior aclimação das plantas propagadas. Durante a aclimação, as condições ideais de cultivo são gradualmente ajustadas para induzir um processo de rustificação, permitindo que a planta desenvolva a capacidade de sobreviver no ambiente *ex vitro*.

Taiz e Zeiger (2013), também abordam que quanto aos espectros no processo de aclimação, a luz azul auxilia de forma significativa no processo de crescimento e desenvolvimento, enquanto a luz vermelha também exerce papel fundamental no processo fotossintético assim permitindo a aclimação das plantas em condições ambientais externas. Sendo ambos os espectros, o vermelho, via fotocromo e o azul via fotorreceptor, apresentado

efetividade na indução de respostas fotomorogênicas (KEODRICK; KRONENBERG, 1994), sendo uma alternativa de espectros para o cultivo de plantas *in vitro* onde posteriormente serão aclimatadas (GOINS et al., 1997).

Se as plantas enraizadas *in vitro* não passarem por uma adequada rustificação, sua sobrevivência em condições *ex vitro* pode ser comprometida, especialmente devido ao desenvolvimento inadequado de ceras e cutículas, assim como à baixa qualidade do sistema radicular (CURTI, 2014).

4. CONCLUSÃO

Com variações estatisticamente significativas, os meios de cultura apresentaram taxa de germinação maiores do que em condições de viveiro (TC), sendo que o meio WPM destacou-se em relação ao meio MS, uma vez que apresentou maiores taxas de germinação e menores taxas de contaminação, sendo o mais recomendado para a espécie estudada.

Em relação aos LEDs, não houve significância, não interferindo na germinação e no desenvolvimento dos embriões zigóticos. No entanto é recomendável a utilização dos Leds pois o mesmo auxilia de forma positiva na germinação e desenvolvimento dos embriões em conjunto com os meios de cultura.

De modo geral, a pesquisa demonstrou resultados preliminares para a criação de um protocolo para produção de mudas de espécies de *Allagoptera Leucocalyx*, ainda necessitando de estudos complementares envolvendo a utilização de hormônios ou outros métodos de beneficiamento e propagação.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, D., KUMAR, A., SHARMA, J., & REDDY, M. S. Factors affecting micropropagation and acclimatization of an elite clone of *Eucalyptus tereticornis* Sm. ***In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant***, v. 48, p. 521-529, 2012.
- BADILLA, Y., XAVIER, A., MURILLO, O., & PAIVA, H. N. D. Eficiência do AIB no enraizamento de miniestacas de clones de Teca (*Tectona grandis* Linn F.). ***Revista Árvore***, v. 40, p. 477-485, 2016.
- BASSEGIO, C., FOGAÇA, L. A., BALTAZAR, P., & EMMEL, E. Desenvolvimento de ipê-roxo em meios de cultura e concentrações de bap (6-benzilaminopurina) durante a etapa de multiplicação *in vitro*. ***Acta Iguazu***, v. 6, n. 1, p. 72-80, 2017.
- BRASIL. Portaria MMA n.º 148, de 7 de junho de 2022. Atualização da Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção. Diário Oficial da União. p.74. 8 jun. 2022. Seção 1.
- BRASILEIRO, A. C. M., & DUSI, D. D. A. Transformação genética de plantas. ***Cultura de tecidos e transformação genética de plantas***, v. 2, 1999.
- BRONDANI, G. E., DUTRA, L. F., GROSSI, F., WENDLING, J. I., & IORNIG, J. Estabelecimento, multiplicação e alongamento *in vitro* de *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage x *Eucalyptus dunnii* Maiden. ***Revista Árvore***, v. 33, p. 11-19, 2009.
- BROWN, C. S., SCHUERGER, A. C., & SAGER, J. C. Growth and photomorphogenesis of pepper plants under red light-emitting diodes with supplemental blue or far-red lighting. ***Journal of the American Society for Horticultural Science***, v. 120, n. 5, p. 808-813, 1995.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. ***Cultura de tecidos e transformação genética de plantas***, v. 1, p. 87-132, 1998.
- CATARINO, S. R. M. ***Avaliação do estatuto de conservação da flora endêmica de Cabo Verde***. 2014. Tese de Doutorado.
- CNCFlora. ***Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2***. Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <<http://cncflora.jbrj.gov.br>>, 2012.
- COSTA, É. L. G., FARNESE, F. D. S., DE OLIVEIRA, T. C., ROSA, M., RODRIGUES, A. A., RESENDE, E. C., ... & SILVA, F. G. Combinations of blue and red LEDs increase the morphophysiological performance and furanocoumarin production of *Brosimum gaudichaudii* Trécul *in vitro*. ***Frontiers in Plant Science***, v. 12, p. 680545, 2021.
- COQUEIRO DIAS, P., DE OLIVEIRA, L. S., XAVIER, A., & WENDLING, J. I. Estaquia e miniestaquia de espécies florestais lenhosas do Brasil. ***Brazilian Journal of Forest Research/Pesquisa Florestal Brasileira***, v. 32, n. 72, 2012.
- CURTI, A. R. ***Rizogênese in vitro e ex vitro em Peltophorum dubium (Sprengel) Taubert***. 2014. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.

- DA CONCEICAO, H. E. O. Cultivo *in vitro*, nutrição mineral e quantificação de rotenoides em timbó (*Derris* sp). 2000.
- DA ROCHA, P. S. G., DO AMARAL, A. S., MOSELE, S. H., & CANOVA, D. V. Diferentes intensidades de fluxo de fótons com LEDS no enraizamento *in vitro* de cana-de-açúcar. 2018.
- DE FARIA, R. T.; SANTIAGO, D. C.; SARIDAKIS, D. P.; ALBINO, U. B.; ARAÚJO, R. Preservation of the brazilian orchid *Cattleya walkeriana* Gardner using *in vitro* propagation. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 2, n. 3, 2002.
- DE LIMA, I. M. B.; CAMPOS, A. S.; DE CARVALHO, A. C. P. P. The *in vitro* multiplication of anthurium cv. Eidibel. **Revista Agro@ mbiente On-line**, v. 14, 2020.
- DE MELLO, T., DE OLIVEIRA GONÇALVES, E., ALEXANDRE, R. S., SCHMILDT, E. R., & OTONI, W. C. Establishment and *in vitro* morphogenesis of sapucaia explants (*Lecythidaceae*). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 56, p. 882-893, 2020.
- DEMÉTRIO, C. A., DE OLIVEIRA JACOB, J. F., AMBROSANO, G. B., DE OLIVEIRA, Ê. T., & RODRIGUES, P. H. V. *In vitro* propagation of cambuci (*Campomanesia phaea*): An endangered exotic fruit and ornamental plant from Brazilian Atlantic Forest. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 145, p. 203-208, 2021.
- FERREIRA, C. D.; Diversidade genética, germinação e conservação ex situ de *Euterpe precatoria* Mart. (*Arecaceae*). 2023.
- FERREIRA, L. T., DE ARAÚJO SILVA, M. M., DE MACÊDO, C. R., & WILLADINO, L. Fonte de luz e concentração de sacarose no cultivo *in vitro* da cana-de-açúcar (RB 867515). **Plant Cell Culture & Micropropagation-ISSN 1808-9909**, v. 12, n. 2, p. 46-46, 2016.
- FERRIANI, A. P.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; WENDLING, I. Miniestaquia aplicada a espécies florestais. **Revista Agro@ mbiente on-line**, v. 4, n. 2, p. 102-109, 2010.
- FRASZCZAK, B., GOLCZ, A., ZAWIRSKA-WOJTASIAK, R. Growth rate of sweet basil and lemon balm plants grown under fluorescent lamps and LED modules. **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus**, v. 13, n. 2, p. 3-13, 2014.
- GOINS, G. D., YORIO, N. C., SANWO, M. M., & BROWN, C. S. Photomorphogenesis, photosynthesis, and seed yield of wheat plants grown under red light-emitting diodes (LEDs) with and without supplemental blue lighting. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.48, n.7, p.1407-1413, 1997.
- GOLFARI, L.; CASER, R. L.; MOURA, V. P. G. Zoneamento Ecológico Esquemaático para Reflorestamento no Brasil, 2ª aproximação. **Projeto de Desenvolvimento e Pesquisa Florestal (PRODEPEF) Série Técnica**, n. 10, 1978.

- GOLLE, D. P., REINIGER, L. R. S., STEFANEL, C. M., MUNIZ, M. F. B., & SILVA, K. B. D. Combination of NAA and TDZ for *in vitro* multiplication of *Eugenia involucrata* DC. **Revista Árvore**, v. 41, 2018.
- GOMES DA ROCHA, P. S., PEDROSO DE OLIVEIRA, R., BUENO SCIVITTARO, W., & MOSELE, S. H. Uso de LEDs na multiplicação *in vitro* de três cultivares de bananeira. **Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas**, v. 11, n. 2, p. 247-252, 2017.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, p.83-260. 1998.
- HASLAM, T. M.; YEUNG, E, C. Zygotic embryo culture: an overview. **Plant embryo culture: methods and protocols**, p. 3-15, 2011.
- HASS, O. O; ORNELLAS, T. S.; BITTENCOURT, R. Propagação *in vitro* de Colubrina glandulosa Perkins: espécie nativa com potencial para programas de reflorestamento. **Ciência Florestal**, v. 32, p. 287-308, 2022.
- HENDERSON, F. M. Morphology and Anatomy of Palm Seedlings. **The Botanical Review**, v. 72, n. 4, p. 273-329, 2006.
- HU, C.Y.; FERREIRA, A.G.; Cultura de embriões. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.& BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/EMBRAPA, v.1, p.371-394.1998.
- HUANG, X., ZHANG, W., WANG, X., ZHANG, J., GAO, X., & DU, H. Structure and luminescence investigation of Gd³⁺-sensitized perovskite CaLa₄Ti₄O₁₅: Eu³⁺: a novel red-emitting phosphor for high-performance white light-emitting diodes and plants lighting. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 608, p. 3204-3217, 2022.
- HUNG, C. D., HONG, C. H., KIM, S. K., LEE, K. H., PARK, J. Y., NAM, M. W., ... & LEE, H. I. LED light for *in vitro* and ex vitro efficient growth of economically important highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, p. 1-9, 2016.
- International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN). 2012. IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1. Second edition. Gland and Cambridge. 32p.
- JEONG, B. R., & SIVANESAN, I. Direct adventitious shoot regeneration, *in vitro* flowering, fruiting, secondary metabolite content and antioxidant activity of *Scrophularia takesimensis* Nakai. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 123, p. 607-618, 2015.
- KEODRICK, R.E., KRONENBERG, G.H.M. **Photomorphogenesis in plants**. 2.nd edn. Netherlands: KJuw Academic Publishers, 1994.

- LAURIA, G., PICCOLO, E. L., CECCANTI, C., GUIDI, L., BERNARDI, R., ARANITI, F., ... & LANDI, M. Supplemental red LED light promotes plant productivity, “photomodulate” fruit quality and increases *Botrytis cinerea* tolerance in strawberry. **Postharvest Biology and Technology**, v. 198, p. 112253, 2023.
- LAZZARINI, L. E. S., PACHECO, F. V., SILVA, S. T., COELHO, A. D., MEDEIROS, A. P. R., BERTOLUCCI, S. K. V., ... & SOARES, J. D. R. Uso de diodos emissores de luz (led) na fisiologia de plantas cultivadas–revisão. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 16, n. 2, p. 137-144, 2017.
- LEITE, J. P. V., XAVIER, A. A., BATISTA, D. S., VITAL, C. E., DE OLIVEIRA RAMOS, H. J., & OTONI, W. C. Embryo culture, callus induction, and flavonoid profile of *Strychnos pseudoquina* A. St.-Hil., an important medicinal species from the Brazilian Cerrado biome. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 145, p. 579-589, 2021.
- LIMA, G. P. Taxonomia e distribuição potencial da tribo Cocoseae Mart.(Arecaceae) no Estado do Maranhão. 2018.
- LIN, K. H., HUANG, M. Y., HUANG, W. D., HSU, M. H., YANG, Z. W., & YANG, C. M. The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var. capitata). **Scientia Horticulturae**, v. 150, p. 86-91, 2013.
- LLOYD, G., & MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifolia, by use of shoot-tip culture.**, v. 30, p. 421-427, 1980.
- LORENZI, H., NOBLICK, L., KAHN, F., & FERREIRA, E. J. L. Flora Brasileira: Arecaceae (Palmeiras). 2010.
- MANTOVANI, N. C., FRANCO, E. T., GUERRA, M. P., & HOPPE, J. M. MICROPROPAGAÇÃO DE CAIXETA, *Didymopanax morototoni* (Aubl.) Dcne. et Planch. **Ciência Florestal**, v. 9, p. 47-61, 1999.
- MANTOVANI, N. C.; FRANCO, E. T. H.; VESTENA, S. Regeneração *in vitro* de louropardo (*Cordia trichotoma* (Vellozo) Arrabida ex Steudel). **Ciência Florestal**, v. 11, p. 93-101, 2001.
- MANZUR, J. P., PENELLA, C., & RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A. Effect of the genotype, developmental stage and medium composition on the *in vitro* culture efficiency of immature zygotic embryos from genus *Capsicum*. **Scientia Horticulturae**, v. 161, p. 181-187, 2013.
- MEIADO, M. V. Germinação de sementes de cactos do Brasil: fotoblastismo e temperaturas cardeais. **Informativo Abrates**, v. 22, n. 5, p. 20-23, 2012.

- MEZZALIRA, F. K.; KUHN, B. C. APLICAÇÃO DA BIOTECNOLOGIA VEGETAL PARA PADRONIZAÇÃO DE PLANTAS ORNAMENTAIS. In: **Colloquium Agrariae**. ISSN: 1809-8215. 2021. p. 10-17.
- MONNIER, M. Culture of zygotic embryos. In.: Thorpe, T.A. (ed.); ***In vitro embryogenesis in plants***. p.117-153, Kluwer Academic Publishers, 1995.
- MORAES, M. Allagoptera (Palmae). **Flora Neotropica**, p. 1-34, 1996.
- MORINI, S. & MULEO, R. Effects of light quality on micropropagation of woody species. In: Jain, S. M. & Ishi, K. (Ed.). **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2003. p. 3-35.
- MORO STEFANEL, C., SILVEIRA REINIGER, L. R., DA SILVA, L. D., DOS SANTOS RABAIOLLI, S. M., & DA SILVA, K. B. Diodos emissores de luz (LEDs) usados no cultivo *in vitro* de *Eugenia involucrata*. **Brazilian Journal of Forest Research/Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 40, 2020.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NAVROSKI, M. C., REINIGER, L. R. S., ARAÚJO, M. M., CURTI, A. R., & PEREIRA, M. D. O. *In vitro* establishment and multiplication of genotypes of *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Cerne**, v. 20, p. 139-146, 2014.
- NERY, M. C., DE CARVALHO, M. L. M., DE OLIVEIRA, L. M., NERY, F. C., & SILVA, D. G. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de embriões/sementes de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. **Cerne**, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2008.
- OLIVEIRA JUNIOR, M. A. D. **Cultivo *in vitro* de cerejeira-do-Rio-Grande (*Eugenia involucrata* DC.) e de cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum)**. 2022. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- PANICKER, B., THOMAS, P., JANAKIRAM, T., VENUGOPALAN, R., & NARAYANAPPA, S. B. Influence of cytokinin levels on *in vitro* propagation of shy suckering chrysanthemum “Arka Swarna” and activation of endophytic bacteria. ***In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant***, v. 43, p. 614-622, 2007.
- PASQUAL, M. Textos acadêmicos: meios de cultura. **Lavras: FAEPE/UFLA**, v. 127, 2001.
- PINHEIRO, C. U. B., ARAÚJO NETO, A. **Descrição do processo germinativo de sementes de babaçu (*Orbignya phalerata* Martius)**. EMAPA, 1987. 7 p., 1987.
- PINHEIRO, C. U. B. **Palmeiras do Maranhão: onde canta o sabiá**. São Luís: Editora Aquarela, 2011.
- PUROHIT, V. K., TAMTA, S., CHANDRA, S., VYAS, P., PALNI, L. M. S., & NANDI, S. K. *In vitro* multiplication of *Quercus leucotrichophora* and *Q. glauca*: Important Himalayan oaks. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 69, p. 121-133, 2002.

- RAGHAVAN, V. One hundred years of zygotic embryo culture investigations. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, v. 39, p. 437-442, 2003.
- RIBEIRO, L.M.; OLIVEIRA, D.M.T.; GARCIA, Q.S. Structural evaluations of zygotic embryos and seedlings of the macaw palm (*Acrocomia aculeata*, Arecaceae) during *in vitro* germination. *Trees*, v. 26, p. 851-863, 2012.
- RIBEIRO, R. R., BRUN, F. G. K., BRUN, E. J., MEZZALIRA, C. C., FRIGOTTO, T., NAVROSKI, M. C., & DE SOUZA, M. A. M. Desenvolvimento e nutrição de mudas de acácia-negra (*Acacia mearnsii* de Wild. De Wild.) em substratos a base de cama de aviário. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2018.
- ROCHA, P. S. G. D., OLIVEIRA, R. P. D., SCIVITTARO, W. B., & SANTOS, U. L. D. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. *Ciência Rural*, v. 40, p. 1922-1928, 2010.
- RODRIGUES, L. R. S. **Micropropagação e avaliação do enraizamento *in vitro* de diferentes genótipos de eucalipto**. 2020. Dissertação de Mestrado.
- SABAH, S. S., HOSNI, A. M., ABDUL RAZIQ, A. B., & HEWIDY, M. A comprehensive protocol for *in vitro* propagation and acclimatization of Jacaranda mimosifolia trees under the Egyptian conditions. *Egyptian Journal of Agricultural Sciences*, v. 73, n. 4, p. 79-92, 2022.
- SANTOS, G. D., XAVIER, A., WENDLING, I., & OLIVEIRA, M. D. Uso da miniestaquia na propagação clonal de Cedrela fissilis (Cedro-Rosa). In: **Congresso E Exposição Internacional Sobre Florestas**. 2000. p. 203.
- SILVA, S. T., BERTOLUCCI, S. K. V., DA CUNHA, S. H. B., LAZZARINI, L. E. S., TAVARES, M. C., & PINTO, J. E. B. P. 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 (PCTOC)*, v. 129, p. 501-510, 2017.
- STEELE, R. V. The story of a new light source. *Nature photonics*, v. 1, n. 1, p. 25-26, 2007.
- TAIZ, L., ZEIGER, E., MØLLER, I. M., & MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2013.
- TEAM, R. Core et al. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. **Available online: [www. R-project.org/](http://www.R-project.org/)(accessed on 11 September 2020)**, 2018.
- THOMAS, P.; ASWATH, C. Alcohol-mediated horizontal spread of bacillus spores and assessing the recurrent sterilization needs of culture-handling tools contaminated with hardy spores. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, v. 83, p. 207-213, 2013.

- TUKEY, J. Multiple comparisons. **Journal of the American Statistical Association**, v. 48, n. 263, p. 624-625, 1953.
- XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 272p.
- YAMAZAKI, T., OYANAGI, H., FUJIWARA, T., & FUKUMORI, Y. Nitrite reductase from the magnetotactic bacterium *Magnetospirillum magnetotacticum*: a novel cytochrome cd1 with Fe (II): nitrite oxidoreductase activity. **European journal of biochemistry**, v. 233, n. 2, p. 665-671, 1995.
- ZANELLA, L. B., FRANCISCON, L., GRUNENVALDT, R. L., TOMASI, J. D. C., & DEGENHARDT-GOLDBACH, J. Micropropagation of *Pinus tecunumanii*. **Ciência Florestal**, v. 28, p. 651-660, 2018.