



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

**MICROPROPAGAÇÃO DE *Melaleuca alternifolia*: EFEITOS DE 6-  
BENZYLAMINOPURINE E DO COMPRIMENTO DE ONDA FORNECIDOS POR  
DIODOS EMISSORES DE LUZ**

**ANTONY CRISTHIAN GONZALES ALVARADO**

**Araras**

**2023**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

**MICROPROPAGAÇÃO DE *Melaleuca alternifolia*: EFEITOS DE 6-  
BENZYLAMINOPURINE E DO COMPRIMENTO DE ONDA FORNECIDOS POR  
DIODOS EMISSORES DE LUZ**

**ANTONY CRISTHIAN GONZALES ALVARADO**

ORIENTADOR: PROF. DR. JEAN CARLOS CARDOSO

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Produção  
Vegetal e Bioprocessos Associados  
como requisito parcial à obtenção do  
título de MESTRE EM PRODUÇÃO  
VEGETAL E BIOPROCESSOS  
ASSOCIADOS

Araras

2023

Gonzales Alvarado, Antony Cristhian

Micropropagação de *Melaleuca alternifolia*: efeitos de 6-benzylaminopurine e do comprimento de onda fornecidos por diodos emissores de luz / Antony Cristhian Gonzales Alvarado -- 2023.  
73f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras

Orientador (a): Jean Carlos Cardoso

Banca Examinadora: Jean Carlos Cardoso, Fernando

César Sala, Jorge Arturo Mori Vásquez

Bibliografia

1. Citocininas, Teor de clorofila, Condutividade elétrica..  
I. Gonzales Alvarado, Antony Cristhian. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática  
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8  
7083



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Agrárias

Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Antony Cristhian Gonzales Alvarado, realizada em 25/04/2023.

**Comissão Julgadora:**

Prof. Dr. Jean Carlos Cardoso (UFSCar)

Prof. Dr. Fernando César Sala (UFSCar)

Prof. Dr. Jorge Arturo Mori Vásquez (UNU)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me dar vida, saúde e sabedoria e por me permitir estar presente nestes momentos deste mundo.

Aos meus pais, Martha Alvarado Inuma e Fredy Fernando Ojanama Gonzales, pelo apoio incondicional e por estarem comigo nos bons e maus momentos, incentivando-me a continuar quando senti que não conseguiria, vocês são a razão do meu sucesso.

A meus queridos irmãos, Jhon Jeremy Ojanama Alvarado e Freddy Gael Yenco Ojanama Alvarado, que também me apoiaram nesta longa jornada.

Ao meu querido orientador Dr. Jean Carlos Cardoso, Professor, Pesquisador científico e grande amigo que é meu Mentor, agradeço muito a ele pela grande oportunidade e confiança depositada em mim, pelos grandes conselhos, pela grande paciência, pelo apoio constante em realizar o presente trabalho.

Aos professores da Universidade Federal São Carlos, do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados como Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini e Dr. Fernando César Sala por me darem seus sábios e ótimos conselhos, que ainda permanecem na minha memória.

Ao Laboratório de Fisiologia Vegetal e Cultura de Tecidos Vegetais (LFVCTV), a todos os amigos e amigas que fiz nele, a Ana pela paciência, ensinamentos e ajuda durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo valioso apoio que vocês proporcionam na pesquisa desenvolvida.

A meus queridos amigos da republica MST, em especial Matheus Henrique dos Santos.

## SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>04</b>
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>05</b>
3.1 Taxonomia e Características botânicas.....	05
3.2 Cultivo de melaleuca.....	07
3.2 Cultivo <i>in vitro</i> de plantas.....	07
3.2.1 Fatores influentes.....	08
3.3 Citocininas.....	11
3.4 Fontes de iluminação e os LEDs no cultivo <i>in vitro</i> .....	12
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
4.1 Local experimental e origem do material vegetal.....	16
4.2 Origem do material vegetal.....	16
4.3 Fase experimental.....	16
4.3.1 Meio de cultura.....	16
4.3.2 Explantes utilizado e inoculação <i>in vitro</i> .....	17
4.3.3 Condições de cultivo.....	17
4.3.4 Delineamento experimental e tratamentos.....	19
4.3.5 Avaliações das plântulas de melaleuca obtidas <i>in vitro</i> .....	20
4.3.6 Densidade e diâmetro dos estômatos das folhas.....	23
4.3.7 Análises de alterações de pH, absorção de nutrientes por médio da condutividade elétrica (CE) e dos macronutrientes Cálcio, Fósforo e Magnésio do meio de cultura.....	24
4.3 Analise dos dados.....	28
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
5.1 Efeitos de 6-Benzylaminopurine (BAP) e comprimento de onda no cultivo e desenvolvimento de melaleuca <i>in vitro</i> .....	29

5.2	Efeito da interação entre BAP e comprimento de onda na densidade e diâmetro de estômatos (DEE; DIE) das folhas.....	44
5.3	Efeito da interação entre BAP e comprimento de onda no pH, absorção de nutrientes por médio da condutividade elétrica (CE), e dos macronutrientes Cálcio (Ca), Fósforo (P) e Magnésio (Mg) do meio de cultura.....	49
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>61</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Anova da interação de BAP e comprimento de onda em número de brotos.....	29
Tabela 2. Anova da interação de BAP e comprimento de onda do comprimento de brotos.....	31
Tabela 3. Anova da interação de BAP e comprimento de onda na altura da planta.....	33
Tabela 4. Anova da interação de BAP e comprimento de onda de Massa fresca da parte aérea.....	37
Tabela 5. Anova da interação de BAP e comprimento de onda em Massa seca da parte aérea.....	37
Tabela 6. Anova da interação de BAP e comprimento de onda no teor de clorofila a.....	41
Tabela 7. Anova da interação de BAP e comprimento de onda no teor de clorofila b.....	41
Tabela 8. Anova da interação de BAP e comprimento de onda no teor de clorofila total.....	41
Tabela 9. Anova da interação de BAP e comprimento de onda em densidade de estômatos.....	45
Tabela 10. Anova da interação de BAP e comprimento de onda em diâmetro de estômatos.....	45
Tabela 11. Anova da interação de BAP e comprimento de onda no pH do meio de cultura.....	50
Tabela 12. Anova da interação de BAP e comprimento de onda na na absorção de nutrientes por médio de CE do meio de cultura.....	50
Tabela 13. Anova da interação de BAP e comprimento de onda na absorção de cálcio.....	53
Tabela 14. Anova da interação de BAP e comprimento de onda na absorção de fosforo.....	54
Tabela 15. Anova da interação de BAP e comprimento de onda na absorção de magnésio.....	54



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Explantes do tipo segmentos nodais de <i>M. alternifolia</i> utilizados para iniciar o experimento.....	17
Figura 2. Intensidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) de diferentes fontes de LEDs, em $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ; A. módulo difusor de cor Branco (100%). B. cor Escuro (100%). C. LEDs de cor Azul(100%). D. LEDs de cor Vermelho (100%). E. LEDs de cor Vermelho + Branco (50%: 50%). F. LEDs de cor Azul + Vermelho (40%: 60%).....	19
Figura 3. Croqui experimental.....	20
Figura 4. Fluxo de pesagem e medições de massa fresca e seca das amostras de <i>M. alternifolia</i> .....	21
Figura 5. Fluxo de experimento de obtenção da clorofila A, B e Total de <i>M. alternifolia</i> .....	22
Figura 6. Fluxo de análises de densidade dos estômatos de <i>M. alternifolia</i> .....	23
Figura 7. Fluxo de análises de cálcio no meio de cultura de <i>M. alternifolia</i> .....	25
Figura 8. Fluxo de análises de fosforo no meio de cultura de <i>M. alternifolia</i> .....	26
Figura 9. Fluxo de análises de magnésio no meio de cultura de <i>M. alternifolia</i> .....	27
Figura 10. Número de brotações de <i>M. alternifolia</i> , no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda com e sem presença de BAP.....	30
Figura 11. Comprimento de brotos (CB) de <i>M. alternifolia</i> , no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda com e sem presença de BAP.....	32
Figura 12. Altura aérea (AA) de plantas de <i>M. alternifolia</i> , no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda com e sem presença de BAP.	33
Figura 13. Taxa de enraizamento (%) (TE) das plantas de <i>M. alternifolia</i> foi avaliada ao longo de um período de 30 dias.....	35

Figura 14. Desenvolvimento <i>in vitro</i> de melaleuca em diferentes comprimentos de onda e 6-Benzylaminopurine (BAP). A. Luz cor Branco com e sem BAP. B. cor Escuro com e sem BAP. C. LEDs de cor Azul com e sem BAP. D. LEDs de cor Vermelho com e sem BAP. E. LEDs de cor Vermelheo + Branco com e sem BAP. F. LEDs de cor Azul + Vermelho com e sem BAP.....	37
Figura 15. Massa fresca da parte aérea de <i>M. alternifolia</i> , no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda com e sem presença de BAP.	38
Figura 16. Massa seca da parte aérea de <i>M. alternifolia</i> , no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda com e sem presença de BAP.....	38
Figura 17. Plost de correlação das variáveis desenvolvida de melaleuca, Mg, P, Ca, CE, PH, DIE, DEE, CLT, CLB, CLA, MS, MF, AA, CB e NB (Magnésio, fósforo, cálcio, Ph, Diâmetro de estômatos, Densidade de estômatos, Clorofila total, Clorofila b, Clorofila a, Massa seca, Massa fresca, Altura aérea, Comprimento de brotos, Numero de brotos) .....	40
Figura 18. Teor de clorofila A (CLA), no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda com e sem presença de BAP.....	42
Figura 19. Teor de clorofila B (CLB), no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda com e sem presença de BAP.....	42
Figura 20. Teor de clorofila Total (CLT), no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda com e sem presença de BAP.....	43
Figura 21. Efeito da interação entre comprimento de onda e presença de BAP na densidade e diâmetro de estômatos das folhas. A. módulo difusor de cor Branco com e sem BAP. B. cor Escuro com e sem BAP. C. LEDs de cor Azul com e sem BAP. D. LEDs de cor Vermelho com e sem BAP. E. LEDs de cor Vermelheo + Branco. E. LEDs de cor Azul + Vermelho com e sem BAP.....	46
Figura 22. Densidade de estômatos de <i>M. alternifolia</i> , no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda e presença de BAP.....	47
Figura 23. Diâmetro de estômatos de <i>M. alternifolia</i> , no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda e presença de BAP.....	47
Figura 24. pH do médio de cultura, no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda e com e sem presença de BAP.....	51

Figura 25. Porcentagem de absorção de nutrientes por meio da condutividade elétrica (mS/cm) no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda e com e sem presença de BAP.....	51
Figura 26. Consumo de cálcio de melaleuca ( $\text{mg L}^{-1}$ ) em condições <i>in vitro</i> , no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda e com e sem presença de BAP.....	54
Figura 27. Consumo de fósforo de melaleuca ( $\text{mg L}^{-1}$ ) em condições <i>in vitro</i> , no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda e com e sem presença de BAP.....	55
Figura 28. Consumo de magnésio de melaleuca ( $\text{mg L}^{-1}$ ) em condições <i>in vitro</i> , no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda e com e sem presença de BAP.....	55
Figura 29. Coeficientes de correlação do desenvolvimento de melaleuca. Mg, P, Ca, CE, PH, DIE, DEE, CLT, CLB, CLA, MS, MF, AA, CB e NB (Magnésio, fósforo, cálcio, Ph, Diâmetro de estômatos, Densidade de estômatos, Clorofila total, Clorofila b, Clorofila a, Massa seca, Massa fresca, Altura aérea, Comprimento de brotos, Numero de brotos) .....	59
Figura 30. Análise dos componentes principais a partir da média dos fatores BAP e comprimento de onda.....	59

## MICROPROPAGAÇÃO DE *Melaleuca alternifolia*: EFEITOS DE 6-BENZYLAMINOPURINE E DO COMPRIMENTO DE ONDA FORNECIDOS POR DIODOS EMISSORES DE LUZ

**Autor:** ANTONY CRISTHIAN GONZALES ALVARADO

**Orientador:** Prof. Dr. JEAN CARLOS CARDOSO

### RESUMO

*Melaleuca alternifolia* ou melaleuca é uma espécie utilizada na indústria farmacêutica e cosmética por conter óleos essenciais com propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, anti-inflamatórias e analgésicas. O cultivo *in vitro* de melaleuca pode contribuir para a produção clonal de mudas provenientes de genótipos superiores, aumentando a produtividade de massa e óleo nessa cultura. No entanto, é necessário o desenvolvimento de métodos e estudos de fatores que afetam a micropropagação da espécie, como os fitorreguladores, e associando esse cultivo a novas tecnologias, como o uso de diodos emissores de luz (LEDs) visando melhorar a eficiência do cultivo *in vitro*. O objetivo deste trabalho foi testar diferentes comprimentos de onda fornecidos por LEDs e a presença da citocinina N6-Benzylaminopurine (BAP) (0,0 e 0,25 mg L<sup>-1</sup>), na multiplicação e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de melaleuca. Os segmentos nodais foram inoculados em meio de cultura Murashige & Skoog contendo a metade da concentração dos macronutrientes (MS ½). Os tubos de ensaio contendo os segmentos nodais individuais foram dispostos em cultivo sob diferentes comprimentos de onda fornecidos por LEDs: Branca, Azul, Vermelho, Vermelho e Branca, Vermelho e Azul, além de condições de escuro. Foram realizadas medições do desenvolvimento das plântulas, bem como a quantificação de clorofila por espectrofotometria. Também foram realizadas análises da absorção dos nutrientes Ca, Mg e P do meio de cultura nos diferentes tratamentos. O delineamento estatístico foi em fatorial 2 x 6, e as variáveis analisadas foram: altura da planta, número de brotações, número de raízes, clorofila A, clorofila B, Clorofila Total, além da absorção de Ca, Mg e P do meio de cultura. Os principais resultados obtidos demonstram um aumento significativo do número de brotações, aumento na massa fresca e seca, reduzindo a altura do broto, inibição da taxa de enraizamento diminuindo significativamente o teor de clorofila e a absorção de nutrientes, como o fósforo, das plantas *in vitro* com presença de 0,25 mg L<sup>-1</sup> de BAP.

**Palavras-chave:** altura de parte aérea, citocininas, condutividade elétrica, teor de clorofila, nutrientes

# MICROPROPAGATION OF *Melaleuca alternifolia*: EFFECTS OF 6-BENZYLAMINOPURINE AND WAVELENGTH PROVIDED BY LIGHT-EMMITTING DIODES

**Author: ANTONY CRISTHIAN GONZALES ALVARADO**

**Adviser: Prof. Dr. JEAN CARLOS CARDOSO**

## ABSTRACT

*Melaleuca alternifolia*, or tea tree, is a species used in the pharmaceutical and cosmetic industries due to its essential oils containing antibacterial, antifungal, antiviral, anti-inflammatory, and analgesic properties. In vitro cultivation of *Melaleuca* can contribute to the clonal production of seedlings from superior genotypes, increasing the biomass and oil productivity in this crop. However, the development of methods and studies on factors affecting the micropropagation of the species, such as plant growth regulators, and the integration of new technologies, such as the use of light-emitting diodes (LEDs), is necessary to improve the efficiency of in vitro cultivation. The objective of this study was to test different wavelengths provided by LEDs and the presence of the cytokinin N6-Benzylaminopurine (BAP) (0.0 and 0.25 mg L<sup>-1</sup>) on the in vitro multiplication and development of *Melaleuca* seedlings. Nodal segments were inoculated on Murashige & Skoog culture medium with half-strength macronutrients (MS ½). The test tubes containing individual nodal segments were cultured under different wavelengths provided by LEDs: White, Blue, Red, Red and White, Red and Blue, and dark conditions. Measurements of seedling development were taken, as well as chlorophyll quantification using spectrophotometry. Analysis of nutrient absorption (Ca, Mg, and P) from the culture medium was also performed in the different treatments. The statistical design was a 2 x 6 factorial, and the variables analyzed were plant height, number of shoots, number of roots, chlorophyll A, chlorophyll B, Total Chlorophyll, and nutrient absorption (Ca, Mg, and P) from the culture medium. The main results obtained showed a significant increase in the number of shoots and fresh and dry weight, reduction in shoot height, inhibition of rooting rate, significant decrease in chlorophyll content, and nutrient absorption, such as phosphorus, in in vitro plants with the presence of 0.25 mg L<sup>-1</sup> BAP.

**Key-words:** height of aerial part:, cytokinins, electrical conductivity, chlorophyll content, nutrients

## 1. INTRODUÇÃO

A família Myrtaceae, com cerca de 130 gêneros e aproximadamente 4000 espécies tem distribuição predominantemente tropicais e subtropicais e estão concentradas nas regiões neotropical e Austrália (DA SILVA, 2007).

O gênero *Melaleuca*, pertencente à família das Myrtaceae, tem cerca de 150 espécies com predominância de sua ocorrência natural na Austrália e ilhas do oceano Índico, regiões de clima quente, com solos argilosos, pobres e geralmente mal drenados (MARTINHO; RODRIGUES, 2009).

As espécies de melaleuca são utilizadas para produção de óleos essenciais em escala industrial, em especial a espécie *Melaleuca alternifolia* Cheel (PINHEIRO, 2003), que é uma árvore de pequeno porte, atingindo altura média de 5 a 7 m, apresentando folhas estreitas e alongadas, de tamanho pequeno (10 x 35 mm), e inflorescências de cor branca, sem pedicelo, grudadas ao caule em arranjo (MARTINHO; RODRIGUES, 2009).

A planta contém óleo essencial (oe) que é extraído de suas folhas e ramos, sendo amplamente utilizado na fabricação de medicamentos, conservantes de alimentos, cosméticos e produtos de saúde (CHEN *et al.*, 2006).

Pesquisas demonstram a interação dos óleos essenciais com membranas celulares e que podem ajudar com o tratamento de melanoma humano (GIORDANI *et al.*, 2006). A espécie tem também diferentes propriedades, como: anti-inflamatória (CALDEFIE-CHEZET *et al.*, 2006; LAHKAR; KUMAR DAS; BORA, 2013), antimicrobiana (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006; FERRARESE *et al.*, 2006; LAHKAR; KUMAR DAS; BORA, 2013; SILVA *et al.*, 2003), fungicida (LAHKAR; KUMAR DAS; BORA, 2013; TONG; ALTMAN; BARNETSON, 1992), e acaricida (LORI

*et al.*, 2005), e seu reconhecido efeito para tratamento de picadas de inseto e infecções de pele (BUDHIRAJA *et al.*, 1999; LAHKAR; KUMAR DAS; BORA, 2013).

A propagação a partir de sementes de melaleuca, embora utilizada comercialmente, apresenta um problema comum, que é a segregação de características desejadas (herança completa), que não são necessariamente transferidas de seus pais (árvores mães), sendo que as mudas obtidas de sementes demonstram grande desuniformidade. Além disso, a taxa de multiplicação e enraizamento de estacas caulinares, um método de propagação vegetativa, portanto clonal é relativamente baixa. Por estas razões é de grande interesse o desenvolvimento de protocolos de micropropagação visando avaliar a viabilidade dessa técnica, do ponto de vista comercial e de performance de mudas provenientes desse sistema de produção de mudas (CHEN *et al.*, 2006).

Também tem sido necessário o desenvolvimento de pesquisas de sistemas de produção de mudas de plantas medicinais com alta demanda por parte das indústrias farmacêutica e cosmética (COSTA *et al.*, 2007). Poucos trabalhos em melaleuca reportaram a micropropagação *in vitro*, com a multiplicação em meio de cultura líquido (DE OLIVEIRA, 2009) e também em meio semi-sólido (IYAMA; CARDOSO, 2021), no qual as pesquisas demonstraram bons resultados de multiplicação e proliferação de múltiplas brotações com citocininas, como por exemplo 6-Benzilaminapurine (BAP) em diferentes concentrações (IYAMA; CARDOSO, 2021).

O desenvolvimento de mudas ou plântulas *in vitro*, derivadas da micropropagação é influenciado por diversos fatores ambientais, como por exemplo a temperatura e a luz do ambiente (GUPTA; JATOTHU, 2013). Os diodos emissores de luz ou 'Light Emitting Diodes' (LEDs) com diferentes comprimento de onda e/ou espectro de luz (cores), tem sido atualmente os mais utilizados na iluminação artificial

de salas de crescimento para plântulas micropropagadas e tem demonstrado efeitos importantes e respostas significativas no cultivo *in vitro*. O uso de LEDs é também uma alternativa na produção de mudas em grande escala, principalmente na questão de restrições ambientais, como mudanças climáticas e redução de terras cultiváveis (BANTIS *et al.*, 2018). As cores azul, vermelha, verde e branca, bem como suas combinações atuam no processos fisiológicos onde as ondas são absorvidas pelos pigmentos fotossintéticos e pelos fotorreceptores clorofila, fitocromo e criptocromo, controlando processos fotossintéticos e fotomorfogênicos (TERASHIMA *et al.*, 2009, CHEN *et al.*, 2014)

A cor azul está envolvida em vários processos fisiológicos da planta, como o fototropismo, morfogênese, abertura de estômatos e funcionamento fotossintético das folhas (WHITELAM; HALLIDAY, 2007), também atuando no alongamento do caule e folhas (HOENECKE *et al.*, 1992), enquanto a cor vermelha emite um espectro de luz muito próximo do máximo de absorbância, tanto da clorofila quanto dos fitocromos. A cor verde, de maneira geral, promove a redução fotossintética em plantas *in vitro*, onde vários estudos em que foram avaliadas a eficiência e deficiência de luz verde sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas comprovaram esse fato (SUN *et al.*, 1998).

Atualmente existem muitos estudos demonstrando os efeitos do uso de LEDs com diferentes comprimento de onda (cores) sobre o desenvolvimento *in vitro* de *Vitis riparia* (POUDEL *et al.*, 2008), bananeira (NHUT *et al.*, 2001), morangueiro (NHUT *et al.*, 2003), algodoeiro (Li e Tang, 2010), *Anthurium andreanum* L. (BUDIARTO, 2010), *Cedrela fissilis* VELL (TADEU, 2017), sendo reportado o melhor desenvolvimento das culturas sem a indução de dano ou fotoestresse (GUPTA; JATOTHU, 2013). Embora em *Melaleuca alternifolia*, se tenha trabalhos com o desenvolvimento e obtenção de



mudas a partir da micropropagação, ainda não foi descrito ou avaliado a influência de diferentes comprimentos de onda sobre seu cultivo e desenvolvimento em condições *in vitro*.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

O objetivo desse estudo foi realizar a micropropagação *in vitro* de melaleuca cultivadas em diferentes comprimentos de onda fornecidos por LEDs e sua interação com a presença de BAP no meio de cultura.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Comparar o desenvolvimento *in vitro* de melaleuca cultivados sob diferentes comprimentos de onda.
- Comparar o desenvolvimento *in vitro* de melaleuca com e sem presença da citocinina BAP.
- Quantificar o conteúdo de clorofila em melaleuca em resposta aos comprimentos de luz e BAP.
- Quantificar a absorção dos macronutrientes Ca, Mg e P por plântulas *in vitro* de melaleuca.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. Taxonomia e Características botânicas

A família Myrtaceae com distribuição Pantropical, sendo particularmente diversificado na Austrália e na América do Sul (WATSON; DALLWITZ, 1992; WILSON *et al.*, 2001), divide-se em duas subfamílias: Myrtoidea e Leptospermoideae, a primeira de ampla ocorrência na América tropical e o último ocorre principalmente na Austrália, Malásia e Polinésia (REYNEL *et al.*, 2003). O gênero *Melaleuca*, pertence a esta última, com aproximadamente 100 espécies nativas da Austrália e Ilhas do Oceano Índico (CRONQUIST, 1981). Este gênero tem uma recente introdução no país, mostrando-se tolerante nas variações climáticas e de solo, podendo ser cultivado em todo o território brasileiro (Lorenzi, 2003).

Foi descrita pela primeira vez por (MAIDEN; BETCHE, 1905) como *Melaleuca linariifolia* var. *alternifolia*, mas foi renomeado (CHEEL, 1924) como *Melaleuca alternifolia*.

Classificação sistemática de *M. alternifolia* segundo CHEEL, (1924); PROENÇA *et al.* 2022; THE ROYAL BOTANIC GARDENS, DOMAIN TRUST, (2022):

Reino: Plantae

Filo: Traqueófitas

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Myrtales

Família: Myrtaceae

Gênero: *Melaleuca* L.

Espécie: *Melaleuca alternifolia* Maiden & Betche Cheel.

Nome comum: melaleuca.

A *Melaleuca alternifolia* Cheel é conhecida como “tea tree” ou árvore de chá (RIEDL, 1997; ANPSA, 2023), desenvolve-se bem em regiões onde as temperaturas oscilam entre 25°C e 32°C (COLTON, 2005), quase todo Brasil principalmente no litoral, também na floresta tropical atlântica (LORENZI; MATOS, 2002; GOMES, 2010). É uma espécie perenifólia que pode crescer até cerca de 7 metros, possui casca fina. As folhas afiladas, simples alternas de aproximadamente 2 cm de comprimento, são ricas em óleo com as glândulas proeminentes (SILVA *et al.*, 2002). As flores pequenas, ocorrem em massas de espigas brancas ou de cor creme, com 3-5 centímetros de comprimento, principalmente da primavera ao início do verão. O pequeno fruto lenhoso em forma de taça, com 2-3 milímetros, de diâmetro estão espalhados ao longo dos galhos. As inflorescências são axilares, em espigas cilíndricas, com grande número de estames e com coloração variando de branca a amarelada. Seus frutos são agrupados em cápsulas globosas, com numerosas sementes diminutas (LORENZI *et al.*, 2003).

Tem como produto principal o óleo essencial, geralmente armazenados e isolados do processo fisiológico (DEANS; WATERMAN, 1993), nas folhas e ramos (JOHNS *et al.*, 1992; LEACH *et al.*, 1993; INTERNATIONAL STANDARDS ORGANISATION 1996; STANDARDS AUSTRALIA, 1997; JARMYN, 1998), possui aproximadamente 100 componentes, sendo o Terpinen-4-ol, o  $\gamma$ -Terpineno e o  $\alpha$ -Terpineno (CARSON *et al.*, 2006), sendo os principais consumidores a América do Norte e Europa, principalmente indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de limpeza, devido as suas propriedades antifúngica (BRUN *et al.*, 2019; COMIN *et al.*, 2016; FELIPE *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2016; PIEKARZ *et al.*, 2017; SHARRIFI-RAD *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2019; YU *et al.*, 2015); antibacteriana (BRUN *et al.*, 2019; COMIN *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016; NOUMI *et al.*, 2018; OLIVA *et al.*, 2018; PAZYAR *et al.*, 2013;

SOUZA *et al.*, 2019; UCKER, 2016); antiviral (BRUN *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2013); antiprotozoária (BRUN *et al.*, 2019; GRANDO *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2009); antioxidante (ASSMANN *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2019; UCKER, 2016; ZHANG *et al.*, 2018); anti-inflamatória (ASSMANN *et al.*, 2018; MORSOLETO *et al.*, 2015; NOUMI *et al.*, 2018); analgésica (CARSON *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2009; PIEKARZ *et al.*, 2017), antitumoral (ASSMANN *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2009; RAMADAN *et al.*, 2019), inseticida (SHARIFI-RAD *et al.*, 2017) e de cicatrização (ASSMANN *et al.*, 2018; KONG *et al.*, 2019; PIEKARZ *et al.*, 2017; SHARFI-RAD *et al.*, 2017).

O cultivo comercial da espécie foi bem-sucedida na China, Indonésia, Tailândia, Brasil, Quênia, Madagascar, Malásia, África do Sul, Tanzânia, Zimbábue e Estados Unidos a produção anual mundial seja de 900 a 1000 toneladas, com mais de 6 mil hectares plantados (BROPHY *et al.*, 2004; BEJAR, 2017).

### **3.2. Cultivo de melaleuca**

A germinação da Melaleuca apresenta índices baixos (HARTMAN, 1999), alen de isso, a sobrevivência também é baixa (WOODALL, 1982) com um 15% de sementes com embriões (RAYACHHETRY *et al.*, 1998) e, dessas sementes, 62% eram viáveis, e das sementes viáveis, 73% germinaram em casa-de-vegetação após 10 dias. Por outro parte os outores RAYACHHETRY *et al.* (1998) indicaram que 27% das sementes restantes que não germinaram após este período.

Estudos sobre a propagação desta espécie ainda são escassos, para COSTA *et al.* (2007), o enraizamento pode-se obter ate um 82,5% com 1500 mg L<sup>-1</sup> de AIB, mas OLIVEIRA *et al.* (2008) encontraram apenas 41,25% de enraizamento com a mesma concentração de AIB.

### **3.3. Cultivo *in vitro* de plantas**

É um conjunto de técnicas e método (FROTA *et al.*, 2006; ERIG; SCHUCHH, 2005), é baseado na totipotência celular (FREITAS, 2014; DOGAN, 2019), a micropropagação é uma técnica conhecida como clonagem *in vitro* (CANHOTO, 2010), que permite a produção de mudas (TORRES, *et al.*, 1998; TERMIGNONI, 2005) em larga escala em um curto período de tempo e com espaço reduzido (CID, 2001).

### **3.2.1. Fatores Influentes**

#### **a) Seleção de explantes**

Geralmente são utilizados explantes de tecidos jovens com tamanhos que podem variar de 0,2 a 20mm para a sobrevivência e desenvolvimento (WILLADINO; CÂMARA, 2005).

O explante deve ser selecionado cuidadosamente, pode ser provenientes de sementes e partes juvenis de plantas adultas, preferencialmente devem ser retirados de plantas em crescimento ativo e que não estejam passando por qualquer tipo de estresse e ataque de pragas ou doenças (TEIXEIRA, 2005). Diversos explantes podem ser utilizados como: ápices caulinares, gemas axilares e meristemas isolados para o desenvolvimento *in vitro* (ARAÚJO; CARVALHO, 2005).

#### **b) Desinfestação de explante**

A desinfestação do explante é uma etapa essencial na qual podem ser utilizadas diversas substâncias, pode-se iniciar com pré-tratamentos aplicados na planta matriz, principalmente para combater patógenos, quando se utilizam explantes de plantas de campo, deve-se dar preferência aos ramos novos em crescimento ativo, cuja coleta deve ser feita no início do período de brotação (TEIXEIRA, 2005). Este controle deve ser feito desde a desinfestação do material vegetal até a esterilização dos instrumentos e recipientes utilizados na manipulação do explante. Os instrumentos

(pinças, bisturis, etc.) devem ser submergidos em etanol 70 ou 96%; flambados e colocados sobre um suporte limpo, dentro da câmara de fluxo laminar. Para a desinfecção do explante se pode utilizar etanol, hipoclorito de sódio e o de cálcio, detergentes de cozinha ou Tween 20, em concentração dos agentes desinfetantes e o tempo de exposição (WILLADINO e CÂMARA, 2005).

### **c) Contaminação do explante**

A contaminação por microrganismos é um dos principais fatores limitantes para o estabelecimento de cultivo *in vitro* (RIBAS *et al.*, 2003). A contaminação por bactérias acontece, geralmente, devido à contaminação endógena dos explantes e plântulas. A contaminação por fungo ocorre em virtude da deficiência na manipulação durante o subcultivo e à presença de esporos no ambiente onde o subcultivo é realizado ou a infestação por ácaros (ABREU *et al.*, 2002). Para minimizar essas contaminações é recomendável cultivar a planta, da qual serão coletados os explantes, em condições parcialmente controladas (TEIXEIRA, 2005).

### **d) Oxidação**

A oxidação fenólica é altamente dependente da espécie e do genótipo. Ela depende igualmente do tipo de explante utilizado. Em geral, explantes jovens oxidam menos que os velhos; outro fator que influencia a oxidação *in vitro* é a época do ano. Nos períodos do ano mais favoráveis ao crescimento, a oxidação fenólica dos explantes *in vitro* é menor. Essa oxidação representa um dos mais sérios problemas, especialmente na fase de estabelecimento da cultura *in vitro* de explantes de espécies lenhosas. Menores danos físicos e químicos no momento da excisão e desinfestação podem contribuir para minimizar o impasse; além do mais, a adição de compostos antioxidantes, como cisteína, ácido ascórbico e adsorventes, como carvão ativado e

PVP, pode ser decisiva na prevenção à oxidação, a qual é mais acentuada nas fases iniciais de cultivo (TEIXEIRA, 2005).

### **e) Meios de cultura**

No cultivo *in vitro* o meio deve conter de micro e macronutrientes, vitaminas, reguladores de crescimento, fontes de carbono (sacarosa) e oxigênio para que a planta possa desenvolver como se estivesse em condições naturais (CALDAS *et al.*, 1998), Há inúmeras formulações dos meios de cultura, não existindo um meio padrão, embora o mais amplamente difundido seja o meio idealizado por Murashige e Skoog, conhecido mundialmente como meio MS (MANTELL *et al.*, 1994).

De acordo com MANTELL *et al.* (1994) o meio consiste dos seguintes grandes grupos de ingredientes:

- Macronutrientes inorgânicos (N, K, Ca, Mg, P, S)
- Micronutrientes inorgânicos (Cl, Fe, B, Mn, Na, Zn, Cu, Ni, Si, Mo)
- Vitaminas (ácido nicotínico, piridoxina e tiamina)
- Fontes de nitrogênio orgânico (glicina e inositol),
- Açúcares (sacarose)
- Reguladores de crescimento (auxina, citocinina, ácido giberélico)
- Agente gelatinoso (ágar ou phytigel).

A consistência do meio de cultura pode ser ajustada pela adição de agentes gelificantes. Os cultivos em meio líquido devem ser mantidos sob agitação para assegurar a aeração dos explantes; outra possibilidade é inocular o explante sobre um suporte de algodão ou sobre pontes de papel, evitando que fiquem submersos (WILLADINO; CÂMARA, 2005).

### **f) Fitohormônios e fitorreguladores**

Fitohormônios ou hormônios vegetais são aqueles produzidos pela própria planta; em baixas concentrações, são biologicamente ativos, podendo promover, inibir ou modificar o crescimento, geralmente em um local diferente daquele onde foi produzido.

Os fitorreguladores são substâncias sintéticas que produzem efeitos semelhantes aos produzidos pelos hormônios naturais. Os mais utilizados são auxinas, citocininas e giberelinas (SANTOS, 2003).

### 3.3 Citocininas

As citocininas são muito utilizadas em cultura de tecido vegetais, porque elas estimulam a divisão celular, quebra da dominância apical (PREECE; SUTTER, 1991), em concentrações elevadas induzem a formação de brotos adventícios e inibem a formação de raízes; as mais frequentes, são: kinetina (KIN), zeatina (citocinina natural) cinetina (CIN), 6-bencilaminopurina (BAP ou BA) (TAIZ; ZEIGER, 2004), thidiazuron (TDZ) (MATSUMOTO, 2000) e 6-(g, g-dimetilaliminol) purina (2iP) (CARVALHO, 1999).

A 6-Benzilaminapurina (BAP) ou A 6-Benzylaminopurine (BAP) (N-(fenilmetil)-7H-purina-6-amina) é uma citocinina sintética (TEIXEIRA, 2012), com massa molecular 225,25, sua fórmula molecular é  $C_{12}H_{11}N_5$ ; desenvolve o crescimento e desenvolvimento das mudas (D'AGOSTINO; KIEBER 1999), o BAP quebra a dormência apical e estimula a proliferação de gemas axilares (HU; WANG, 1984; XAVIER *et al.*, 2009). É usado a indução da divisão celular em consequência promove a brotação de numerosas espécies (REASE; BURST, 1983) aumentando o conteúdo de clorofila através da diferenciação do cloroplasto, também aumenta a atividade fotossintética (DAVIES *et al.*, 1995). Segundo BAIRU, *et al.* (2007, 2008, 2009) algumas mudas *in vitro* apresentam fitotoxicidade obtendo mudas sem desenvolvimento



ao longo do tempo, assim como também apresentam anomalias morfofisiológicas (CASSELLS; CURY, 2001; GASPAR *et al.* 2002).

### **3.4 Fontes de iluminação e os LEDs no cultivo *in vitro*.**

O sol é a fonte responsável pela iluminação e calor (TAIZ, 2017) as plantas utilizam esta 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. A luz é um fator muito importante para desenvolver os processos fisiológicos indispensável das plantas, como a fotossínteses (CALDARI, 2017), porque faz o processo de conversão de energia física em energia química, para poder ser utilizada no desenvolvimento. A iluminação artificial é utilizado para aumentar a luz diária durante dias com baixa intensidade luminosa (CRAIG; RUNKLE, 2016; BIAN *et al.*, 2018; PAUCEK *et al.*, 2020). As plantas percebem a luz através de fotorreceptores e respondem a esses receptores gerando uma série de respostas fisiológicas específicas (MUNEER *et al.*, 2014). A qualidade ou intensidade de luz afeta a fotossíntese, que são reações fotoquímicas que ocorrem dentro dos cloroplastos, presentes nas células das plantas (NISHIO, 2000; MORROW, 2008; MITCHELL *et al.*, 2012; KOZAI *et al.*, 2016).

As lâmpadas fluorescentes são geralmente a principal fonte de luz para micropropagação comercial de plantas. No entanto, elas produzem uma vasta gama de comprimentos de onda (350-750 nm) enquanto consumindo uma grande quantidade de energia. Em contraste, a luz LED (Light emitting Diode) podem emitir comprimentos de onda específicos, tais como o vermelho e o azul, que são utilizados para a fotossíntese (NGUYEN *et al.*, 2020).

O LED (Light emitting Diode), foram as primeiras fontes de luz com o controle da composição espectral para melhorar o rendimento das culturas (BANTIS *et al.*, 2018),

como o conteúdo químico, valor nutricional, controle da floração, o sucesso de transplante de mudas, crescimento das culturas, produção de novos indivíduos regenerados (MORROW, 2008). O desenvolvimento das plantas é fortemente influenciado pelos comprimentos de ondas pelos LEDs, dentre as quais são a luz azul, vermelha, verde e combinações (WHITELAM; HALLIDAY, 2007). As plantas não absorvem todos os comprimentos de ondas, elas selecionam o comprimento de acordo com suas necessidades. A parte mais importante do espectro da radiação solar é 400 a 700 nm (HUERTAS, 2008), a qual é conhecida como radiação fotossinteticamente ativa (RFA), que corresponde praticamente ao espectro visível do olho humano. Na luz visível entre 610 a 720 nm, que contém a banda do vermelho, uma grande quantidade de luz é absorvida pelas plantas, afetando fortemente o crescimento vegetativo e a fotossíntese (SAEBO *et al.*, 1995; SENGER, 1982).

A luz vermelha (600-700 nm) geralmente leva a um ganho na massa seca, alongamento do caule e expansão da área foliar de muitas espécies de plantas, além de melhorar a eficiência fotossintética. O fitocromo é o fotorreceptor responsável pela absorção desses espectros. O crescimento e o desenvolvimento das plantas melhoram significativamente quando é adicionado baixas proporções de luz azul. A luz vermelho-distante (710 - 850 nm) também exerce forte influência na fotomorfogênese (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A luz azul (400 - 500 nm) promove alterações no crescimento e desenvolvimento, que levam as plantas a se adaptar às mudanças nas condições ambientais. 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. Essa energia de excitação das moléculas de clorofila pode ser utilizada na etapa fotoquímica da fotossíntese, ser perdida na forma de calor ou até mesmo gerar danos ao aparato

fotossintético, como a formação de radicais livres (TAIZ; ZEIGER, 2013). Sendo assim, a quantidade de luz azul ou a quantidade ótima exigida pelas diferentes espécies de plantas é uma constante pergunta feita pelos pesquisadores, a luz azul é também importante para a síntese de clorofila, desenvolvimento de cloroplastos, abertura estomatal e fotomorfogênese (SAEBO *et al.*, 1995; SENGER, 1982).

A luz vermelha e azul são básicas nos espectros de iluminação para a maioria das culturas, sendo que, para algumas hortaliças como folhosas, tomate, pepino e pimentão, a luz vermelha distante foi importante para os processos fotomorfogênicos e também na promoção do crescimento. No entanto, composições espectrais, como verde ou amarelo, também mostraram efeitos fisiológicos significativos nessas plantas (OLLE; VIRSILÉ, 2013).

A luz verde (500 – 580 nm) foi por muito tempo desconsiderada no crescimento de plantas pelo fato dos pigmentos em sua maioria refletirem esse comprimento de onda, porém, alguns estudos utilizando LEDs vermelho e azul isolados ou em combinação verificaram que o crescimento das plantas era melhor no LED branco. A partir destes estudos, foi verificado que essa melhoria no crescimento estava relacionada à presença de espectro de luz verde no LED branco. WANG; FOLTA (2013) acrescentaram que o espectro verde pode penetrar mais eficientemente nas folhas e aumentar a fixação de carbono, principalmente em ambientes sombreados. KIM *et al.* (2004) trabalhando com alface (*Lactuca sativa*), demonstraram que as plantas cultivadas com luz vermelha, azul e no máximo 24% de luz verde, apresentaram maior massa seca e maior área foliar do que as cultivadas com 51% de incidência de luz verde, ou somente vermelho e azul.

As pesquisas com LED evidenciam que as plantas necessitam de amplo espectro luminoso para otimizar os processos fotossintéticos, e essa necessidade

varia com a espécie vegetal. A luz LED branca (460 – 560 nm) apresenta em seu espectro uma maior proporção de luz azul e verde, uma menor proporção de ultravioleta (UV) e uma menor relação vermelho e vermelho distante em comparação às lâmpadas fluorescentes (FRASZCZAK *et al.*, 2014).

MOE *et al.* (2005) ressaltaram que, para estabelecer uma produção bem sucedida ao longo do ano, é necessário levar em consideração que a alta taxa de fotossíntese, crescimento e desenvolvimento é baseada em uma interação muito complexa entre luz e vários outros fatores de crescimento como temperatura, umidade do ar e disponibilidade de CO<sub>2</sub> e de nutrientes. Neste contexto, SCHROETER-ZAKRZEWSKA *et al.* (2014) afirmaram que é possível obter um maior número de plantas por unidade de área com o uso de iluminação artificial e, então reduzir os custos com aquecimento e investimento com expansão de área para cultivo de plantas em estufas agrícolas.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Local experimental e origem do material vegetal**

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia Vegetal e Cultura de Tecidos Lfvct ([www.lfvct.ufscar.br](http://www.lfvct.ufscar.br)) do Departamento de Biotecnologia, Produção Vegetal e Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, Campus Araras – SP, Brasil.

### **4.2 Origem do material vegetal**

O material vegetal utilizado foram plântulas cultivadas *in vitro* de *M. alternifolia*, obtidas a partir do estabelecimento *in vitro* de ápices caulinares contendo de 2 – 4 mm de comprimento e que foram multiplicados e desenvolvidos no Lfvct por 9 meses, até a obtenção de números suficiente de plantas para a fase experimental, sendo que essas plantas tinham aproximadamente 10 – 15 cm de comprimento, e foram cultivadas em meio de cultura Murashige & Skoog (1962), contendo a metade da concentração de macronutrientes ( $MS\frac{1}{2}$ ), contendo 6,4 g L<sup>-1</sup> de ágar, 2% de sacarose, 0,1 g L<sup>-1</sup> inositol, e pH ajustado para 5,8 (IYAMA; CARDOSO, 2021).

### **4.3 Fase experimental**

#### **4.3.1 Meio de cultura**

Para a preparação do meio de cultura, foi utilizado o protocolo desenvolvido por IYAMA; CARDOSO, (2021), sendo o meio de cultura baseado na formulação de Murashige & Skoog (1962), contendo a metade da concentração de macronutrientes ( $MS\frac{1}{2}$ ), 2% de sacarose, 0,1 g L<sup>-1</sup> inositol, e pH ajustado para 5,8. Após o ajuste do pH foram adicionados 6,5 g L<sup>-1</sup> de agar (Agargel, João Pessoa-PB, Brasil). Esse meio de cultura foi utilizado como base para todo o período experimental, sendo formulado sem presença de 6- bencilaminopurina (BAP) (0,0 mg L<sup>-1</sup>) e na concentração de 0,25 mg L<sup>-1</sup>. O meio de cultura foi então vertido em volumes individuais de 15 mL por tubo

de ensaio (dimensões do tubo – 15 mm comprimento e 25 mm diâmetro de boca), sendo o conjunto tubo e meio de cultura autoclavados a temperatura de 121 °C; 1,1 atm, durante 25 min.

#### 4.3.2 Explantes utilizados e inoculação in vitro

Como explantes foram utilizados segmentos nodais a partir das plantas doadoras descritas no item 4.1, e que em condições de fluxo laminar foram divididas em segmentos nodais com 1,0 – 1,5 cm de comprimento introduzidos de forma individual em tubos de ensaio contendo 15 mL dos meios de cultura descrito no item 4.2.1, contendo ou não a BAP (Figura 1).



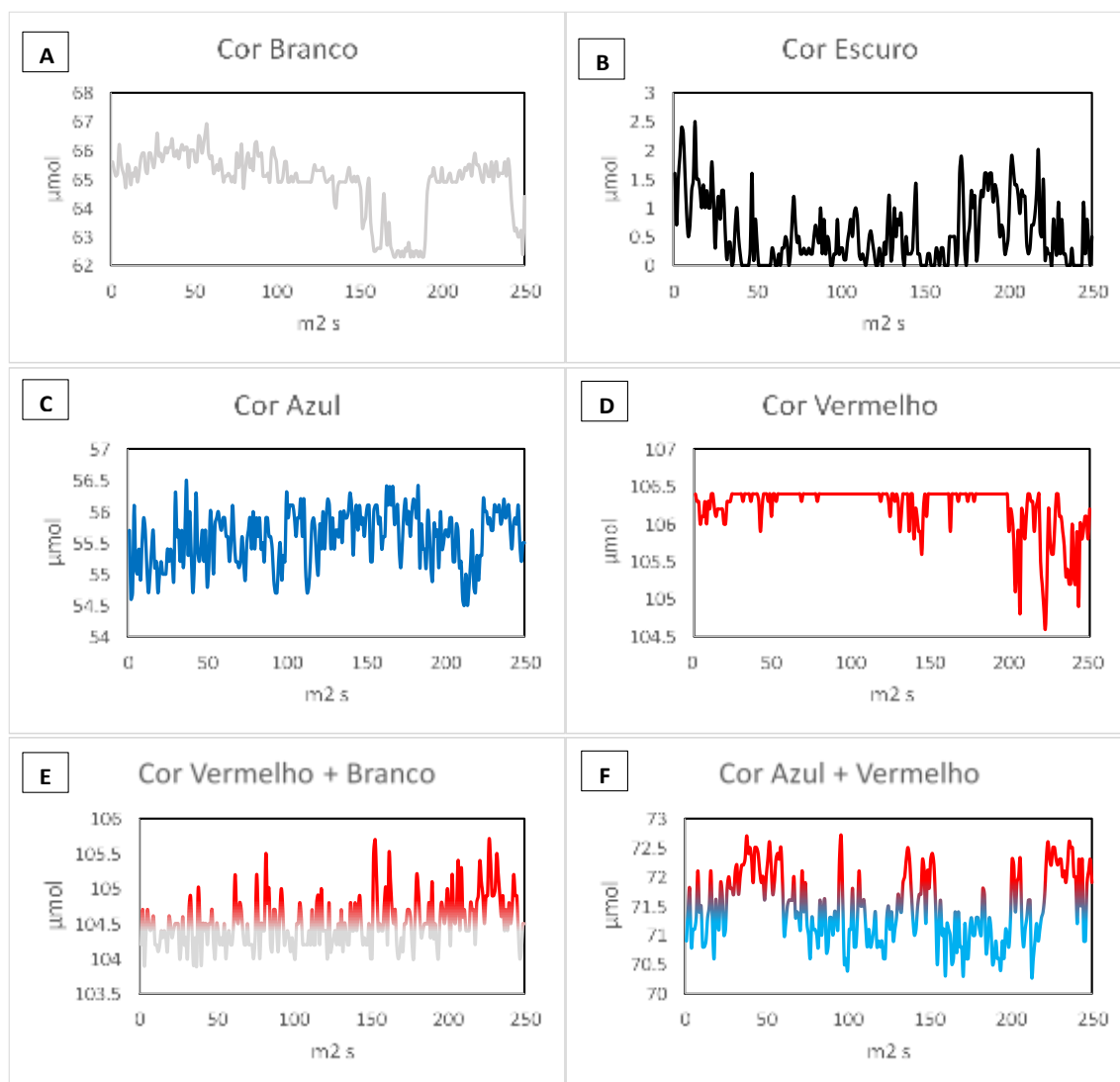
**Figura 1.** Explantes do tipo segmentos nodais de *M. alternifolia* utilizados para iniciar o experimento.

#### 4.3.3 Condições de cultivo

Os tubos de ensaio contendo os segmentos nodais foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo ajustado para 14 horas e temperatura de 25 °C ± 2 °C. O cultivo de todas as plântulas foi feito pelo uso de diodos emissores de luz (LEDs), sendo utilizado como tratamentos LEDs contendo diferentes espectros de luz: azul (Az) obtida por LEDs do tipo bulbos com 15 watts de potência, de marca Phillips Greenpower LED Research Module Blue; vermelho (Ve) obtida por LEDs do tipo bulbos, com 10 watts de potência, de marca Phillips Greenpower LED module HF

deep red; vermelho+branco (VB) obtida por LEDs do tipo bulbos com 11,6 watts de potência de marca LabPar e azul+vermelho (AV) obtida por LEDs do tipo bulbo com 11,6 – 11,7 watts de potência, de marca LabPar. A luz branca (Br) obtida por módulo difusor tipo espiral, com 23 watts de potência, de marca Ouralux®, Brasil; também foi mantido um tratamento no escuro (Es), em tubos de ensaio contendo os segmentos nodais em caixas fechadas, na ausência de luz. Em todos os espectros de luz, foi quantificada a densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) utilizando-se para isso o medidor Quantum SQ-520 (Apogee Instruments, USA).

Os tratamentos com diferentes comprimentos de onda foram compostos por seis tipos de comprimento de onda fornecidos por: 1) 100% de luz branco (Br) ( $64,09 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ), 2) 100% de escuro (Es) ( $0,58 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{s}$ ), 3) 100% de luz azul (Az) ( $55,58 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{s}$ ), 4) 100% de luz vermelho (Ve) ( $106,22 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{s}$ ), 5) 50%: 50% de luz vermelho e branco (VB) ( $104,51 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{s}$ ), e 6) 40%: 60% de luz azul e vermelho (AV) ( $71,48 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{s}$ ), e os meios da cultura sem e com ( $0, \text{mg L}^{-1}$  e  $0,25 \text{mg L}^{-1}$  de BAP). Os diferentes comprimentos de onda estão ilustrados na Figura 2.

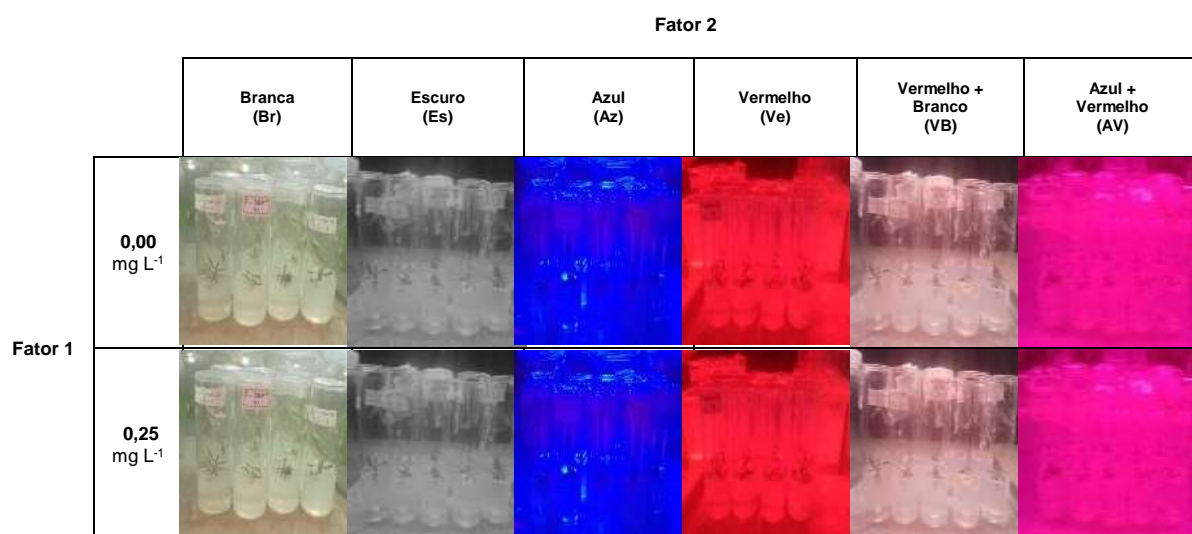


**Figura 2.** Densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) de diferentes fontes de LEDs, em  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ; A. módulo difusor de cor Branco (100%). B. cor Escuro (100%). C. LEDs de cor Azul(100%). D. LEDs de cor Vermelho (100%). E. LEDs de cor Vermelheo + Branco (50%: 50%). F. LEDs de cor Azul + Vermelho (40%: 60%).

#### 4.3.4 Delineamento experimental e tratamentos.

O experimento foi conduzido no esquema fatorial 2 (concentrações de BAP:  $0 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ ) x 6 (espectros de luz: Br, Es, Az, Ve, VB e AV), com 10 repetições por tratamento, sendo a unidade experimental um tubo de ensaio contendo um segmento nodal. O experimento foi repetido duas vezes e foram disposta como ilustra a Figura 3.



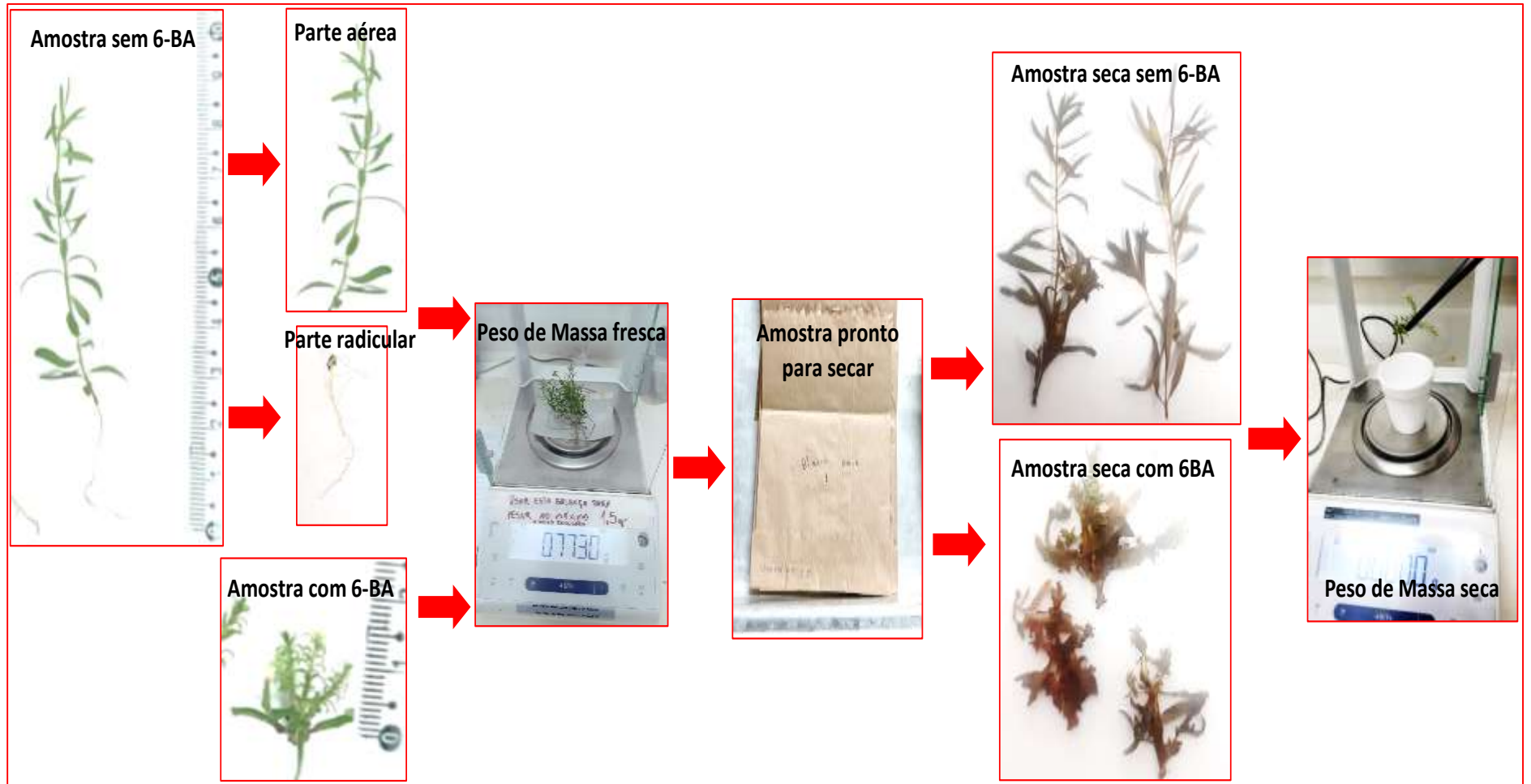


**Figura 3.** Croqui experimental

#### 4.3.5 Avaliações das plântulas de melaleuca obtidas *in vitro*

As análises do desenvolvimento de melaleuca foram realizadas semanalmente no período de 30 dias, após da introdução de segmentos nodais nos meios de cultura (Figura 1), onde as variáveis avaliadas foram: número de brotações, comprimento de brotações, altura de parte aérea, taxa de enraizamento, massas fresca e seca total, de parte aérea. Também foram analisadas as concentrações de clorofilas a, b e total.

Para as análises de massa fresca e seca, as unidades experimentais (mudas) foram retiradas do tubo de ensaio e limpadas, depois foram divididas em duas partes (parte aérea e raízes) e foram pesadas em uma balança analítica digital com precisão de 0,1 mg. A massa seca das partes divididas (aérea e radicular) foram então colocadas para secagem em estufa de secagem e esterilização, a 70 °C por 72 h, sendo novamente pesadas em uma balança analítica de precisão (Figura 4).



**Figura 4.** Fluxo de pesagem e medições de massa fresca e seca das amostras de *M. alternifolia*

Para o análises de teor de clorofila a, b e total um novo experimento foi desenvolvido (experimento dois) como indica a Figura 3, a quantificação das concentrações de clorofilas a, b e total de *M. alternifolia*, foram realizada após 30 dias de desenvolvimento *in vitro* dos tratamentos. As folhas de melaleuca são muito pequenas e, portanto, o método não destrutivo não é muito eficiente, por isso foi escolhido o método destrutivo. Para tanto, as análises da concentração de clorofila a, b e total, foram obtidas pela utilização de 100 mg de folhas das melaleucas *in vitro*. Essas foram maceradas e foi adicionada 2-3 ml de acetona pura (99.5%). Após a maceração e liberação da clorofila na acetona, foi completada com acetona até atingir o volume final de 10 ml. As amostras foram colocadas em frasco de vidro transparente visando a medição de sua absorbância no espectrofotômetro IRIS-HI801 (Hanna Instruments). As leituras de absorbância foram realizadas à 664 nm e 647 nm, similar ao descrito por LICHTENTALER (1987).

Como padrão zero foi utilizado 10 ml de acetona pura. As concentrações de clorofila foram determinadas, em  $\text{mg L}^{-1}$  pelas seguintes equações: clorofila a= $12.70 (A_{664}) - 2.97 (A_{647})$ ; clorofila b= $20.70 (A_{647}) - 4.62 (A_{664})$  e clorofila total= $17.90 (A_{647}) - 8.08 (A_{664})$ , conforme proposto por LICHTENTHALER *et al.* (1984).

As variáveis avaliadas foram: clorofila 'a', clorofila 'b' e clorofila total (a + b) por tratamento.

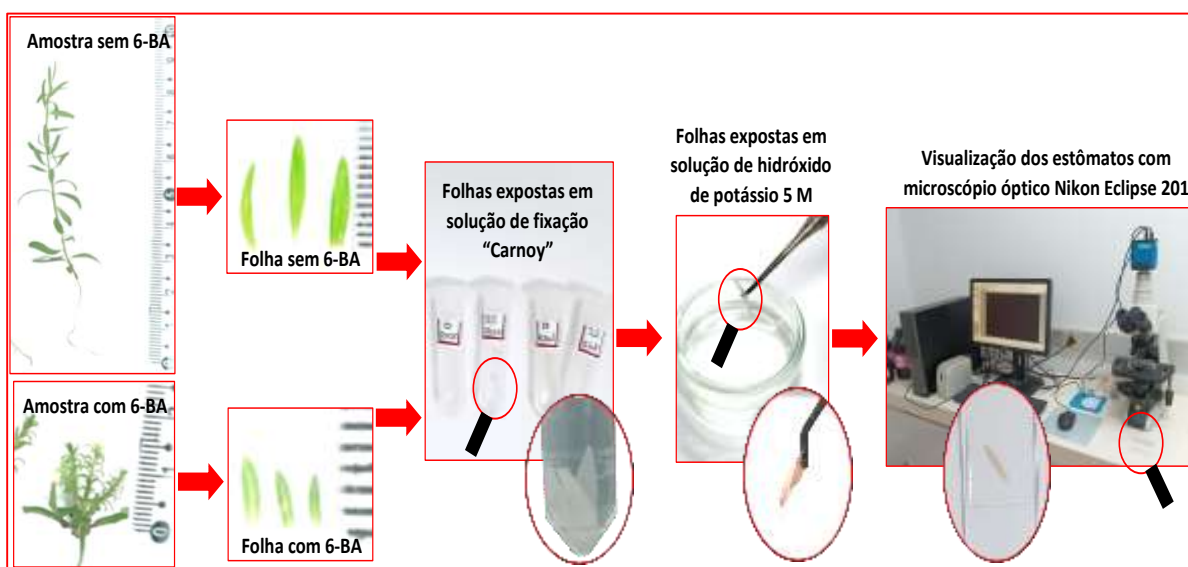


**Figura 5.** Fluxo de experimento de obtenção da clorofila A, B e Total de *M. alternifolia*.

#### 4.3.6 Densidade e diâmetro dos estômatos das folhas.

A fim de verificar a existência de uma correlação entre os vários comprimentos de onda e a presença de BAP foram avaliadas a densidade e diâmetro dos estômatos das folhas. Para isso foram utilizadas folhas do quarto ao sexto nodo da plântula *in vitro* (IIYAMA; CARDOSO, 2021). As folhas foram expostas na solução de fixação “Carnoy” composta de 3 etanol:1 acético glacial ácido) (v/v) no período de 48h, depois as amostras foram armazenadas em solução de álcool 70% a 8°C até o momento da avaliação. Para a visualização dos estômatos, as folhas foram previamente imersas em álcool 70% por um minuto, e logo após em solução de hidróxido de potássio 5 M a 45°C por 20-30 segundos, sendo que a reação foi parada com uso de água destilada, seguido de preparo da lâmina com lamínula e visualização em microscópio de luz Nikon Eclipse 201 com ampliação total de 100x, juntamente com a câmera de alta resolução (5 Mp) Optica, os estômatos foram quantificados no campo de visão 0,06 mm<sup>2</sup>.

As variáveis avaliadas foram: densidade de estômatos (DEE) e diâmetro de estômatos (DIE) por tratamento.



**Figura 6.** Fluxo de análises de densidade dos estômatos de *M. alternifolia*.

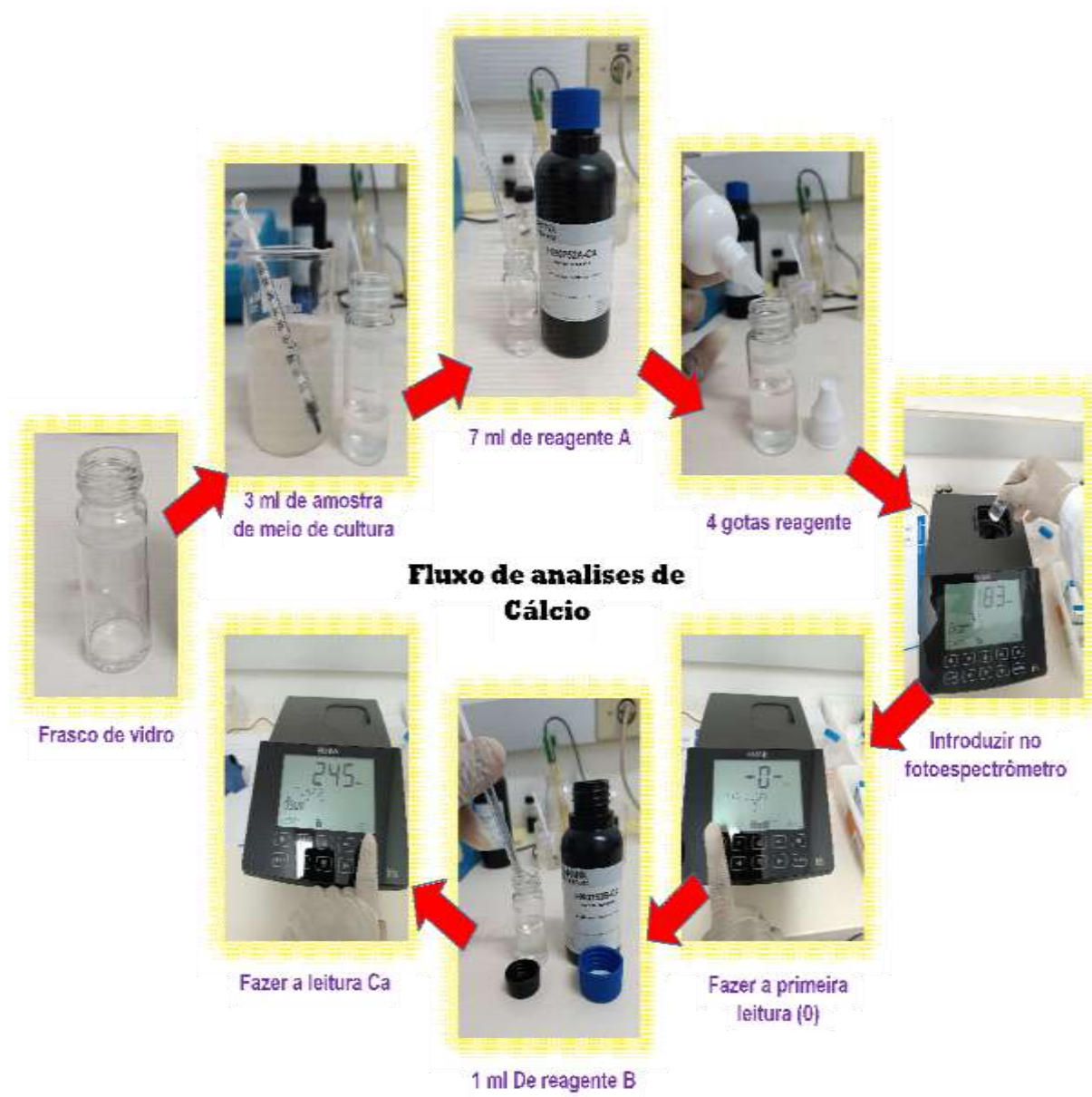
#### **4.3.7 Análises de alterações de pH, absorção de nutrientes por médio da condutividade elétrica (CE) e dos macronutrientes Cálcio, Fósforo e Magnésio do meio de cultura.**

Para as análises de pH e CE dos meios de cultura, foram coletados os dados de pH e C.E iniciais a partir dos meios de cultura após a autoclavagem. Após o período de cultivo *in vitro*, os meios de cultura foram separados das plantas, e congelados a temperatura de -20°C por 48 horas. Em seguida, foram descongelado para fundir os meios de cultura e analisá-los, com o objetivo de obter os valores finais de pH e CE. O pH foi medido usando um pHmetro de bancada da marca Mettler, enquanto a condutividade elétrica foi medida usando um condutímetro portátil da Hanna Instruments. Os dados iniciais e finais de pH foram utilizados para determinar o comportamento ou alteração do pH ao longo do tempo. Os dados iniciais e finais de CE foram utilizados para calcular a diferença e trabalhar em porcentagem de CE dos meios de cultura após o cultivo das melaleucas *in vitro*.

Para a análise da absorção dos macronutrientes cálcio, fosforo e magnésio, foi utilizado o equipamento Espectrofotômetro IRIS-HI801 (Hanna Instruments). É importante seguir as instruções específicas do equipamento e dos reagentes utilizados, conforme fornecido pelo fabricante (Hanna Instruments), para garantir resultados precisos e confiáveis.

Para o análises de cálcio foi utilizado 3 ml do meio de cultura, 7 ml do reagente A (HI93752-Ca) e 4 gotas do reagente Buffer, estas foram colocadas em frasco de vidro transparente e misturados. Em seguida, a amostra foi introduzida no espectrofotômetro, onde foi feita a primeira leitura. Posteriormente, foi adicionado 1ml de reagente B (HI93752B-Ca) e as soluções foram misturadas novamente. A amostra

foi reintroduzida no espectrofotômetro, onde foi realizada a leitura após um período de espera de 5min.



**Figura 7.** Fluxo de análises de cálcio no meio de cultura de *M. alternifolia*.

Para a análises de fosforo foi utilizado 10ml do meio de cultura e foram colocados em frasco de vidro transparente. Em seguida, a amostra foi introduzida no espectrofotômetro, onde foi feita a primeira leitura. Após a leitura inicial, foram adicionadas 10 gotas de reagente A (HI93717A-0) e um pacote de reagente B (HI93717B-0) à amostra. As soluções foram misturadas e, em seguida, o frasco de

vidro foi novamente introduzido no espectrofotômetro para realizar a análise de nutrientes.



**Figura 8.** Fluxo de análises de fósforo no meio de cultura de *M. alternifolia*.

Para o análises de magnésio, foram utilizados 1ml do reagente A (HI93752A-Mg) e 9ml do reagente B (HI93752B-Mg). Esses reagentes foram misturados em um frasco de vidro e a solução resultante foi introduzida no espectrofotômetro, onde foi

realizada a primeira leitura. Logo em seguida, adicionado 0.5 ml meio da cultura cultura à amostra e as soluções foram misturadas. O frasco de vidro foi novamente introduzido no espectrofotômetro para a análise de nutrientes.

As variáveis avaliadas foram teor de absorção de cálcio, magnésio e fósforo por tratamento.



**Figura 9.** Fluxo de análises de magnésio no meio da cultura de *M. alternifolia*.



#### 4.4 Análise dos dados

Todos os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA. Os dados foram verificados quanto à normalidade utilizando o teste de Shairo-Wilk. Quando os dados apresentaram normalidade, as médias foram comparados pelo teste de comparação de médias de Duncan, com um nível de significância de 5%. No caso em que os dados dados apresentaram ausência de normalidade e não foi possível normalizá-los por meio de transformação dos dados, foi utilizado o teste de Games-Howel para comparar as médias, também com um nível de significância de 5%. As análises estatísticas o software R Studio (HILL *et al.*, 2022).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Efeitos de 6-Benzylaminopurine (BAP) e comprimento de onda no cultivo e desenvolvimento de melaleuca *in vitro*.

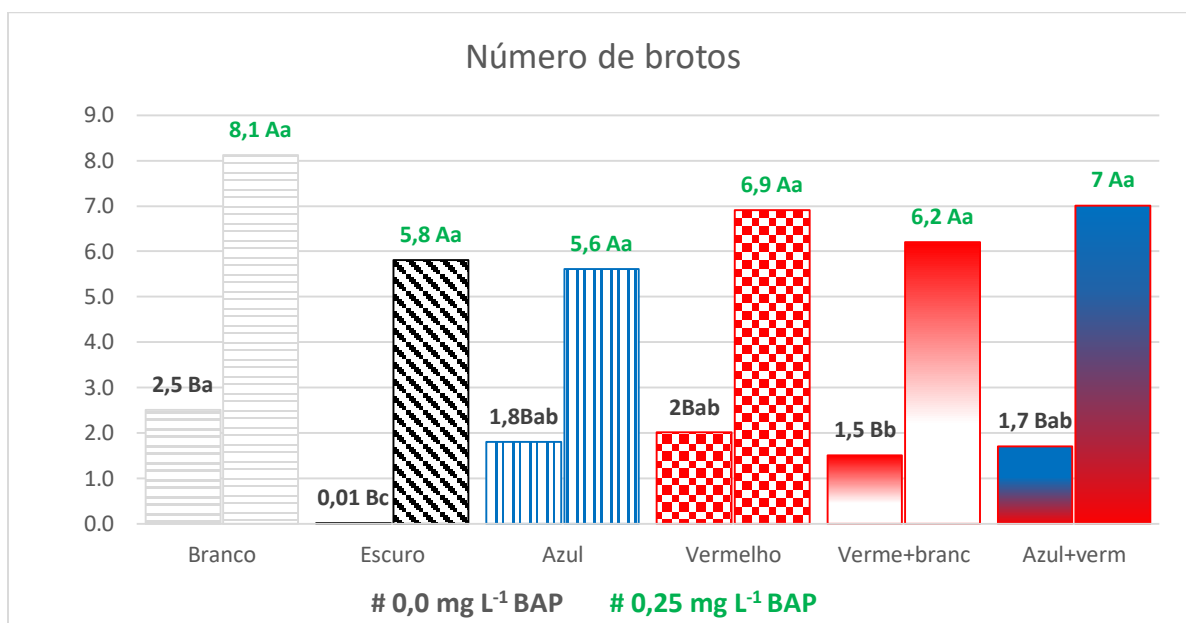
Os resultados de número de brotações (NB), comprimentos dos brotos (CB), altura parte aérea (AA), massa fresca e seca da parte aérea (MF e MS), clorofila a, b e total (CLA, CLB e CLT) e dos efeitos da interação entre comprimento de onda e presença de BAP estão demonstrados nas Figuras 10 a 18. Para a Taxa de enraizamento (TE) foram tratados em porcentagem (%).

De acordo com os resultados da Tabela 1, observou-se que o efeito do BAP, do comprimento de onda utilizado e da interação entre esses fatores foi estatisticamente significativo na proliferação de brotos. Verificou-se que a maior taxa de proliferação (8,1 brotos/segmento nodal) foi obtida quando a luz branca foi utilizada em conjunto com a presença de BAP. Por outro lado, na mesma fonte de luz, porém sem a adição de BAP ao meio de cultivo, foi registrada uma proliferação de apenas 2,5 brotos/segmento nodal (Figura 10).

Esses resultados indicam que tanto o BAP quanto o comprimento de onda da luz exercem um impacto significativo na proliferação de brotos. A combinação da luz branca com a presença de BAP mostrou-se a condição mais favorável para alcançar uma maior taxa de proliferação. Essas diferenças na proliferação observadas entre os diferentes tratamentos podem ter implicações importantes no desenvolvimento e crescimento das plantas em estudo.

**Tabela 1.** Anova da interação de BAP e comprimento de onda em número de brotos

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	P
BAP (A)	1	21,456	21,456	76,201**	< 0,0001
Comprimento de onda (B)	5	37,149	7,4299	26,388**	< 0,0001
Interação (AXB)	5	20,821	4,1642	14,789**	< 0,0001
Resíduo	105	29,564	0,2816		
Total	116	108,99			
Coeficiente de variação (%)	38,933				
Média	4,1	Número de observações		120	



**Figura 10:** Número de brotações de *M. alternifolia*, no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda com e sem presença de BAP. Letras maiúsculas diferentes entre si demonstram diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade utilizando-se o teste de Duncan, para o fator presença e ausência de BAP no meio de cultura. Letras minúsculas mostram as diferenças entre os espectros de luz.

De acordo com IYAMA e CARDOSO (2021), a adição de BAP em concentrações baixas (0,55  $\mu\text{M}$ ) resultou em um aumento considerável na proliferação de brotos, com uma média de 6,54 brotos/planta. Esses resultados são semelhantes aos obtidos no presente estudo, onde a média da concentração de BAP com adição foi de 5,6 brotos/segmento nodal a 8,1 brotos/segmento nodal. Resultados semelhantes também foram encontrados por Oliveira et al. (2010), onde foi relatado que a adição de 0,55  $\mu\text{M}$  de BAP ao meio de cultura MS resultou na melhor proliferação de brotos (5,6 brotos/segmento nodal) em mudas de melaleuca. A utilização de BAP promove uma alta frequência de brotações, o que está em linha com as descobertas de Dogan (2019) e Iiyama e Cardoso (2021), pois o BAP estimula o desenvolvimento de gemas laterais e a proliferação de novos brotos nos tecidos

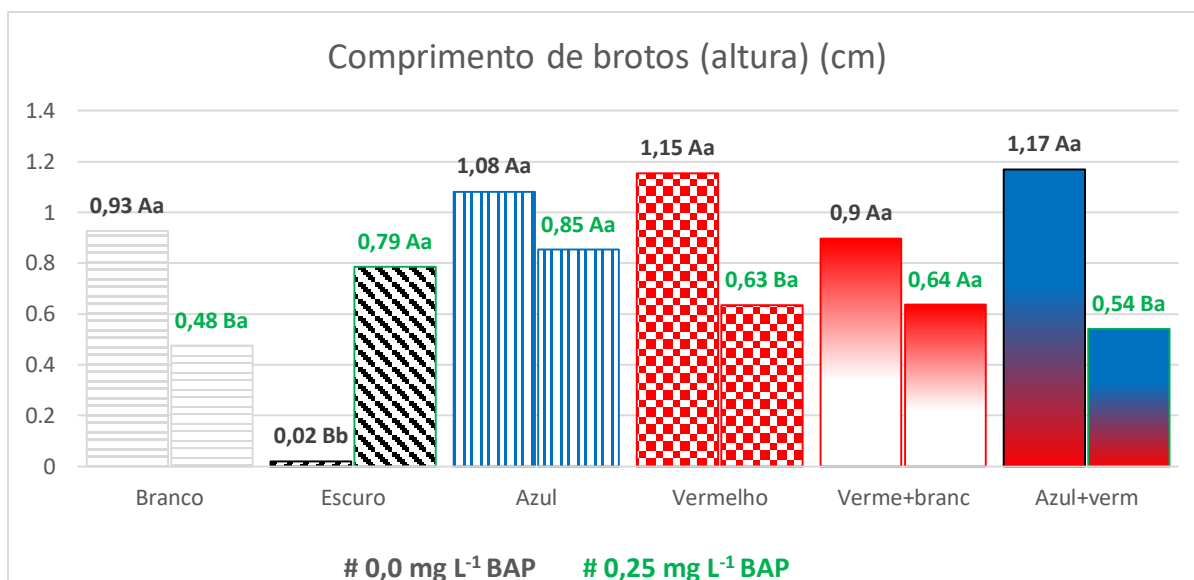
vegetais (Muleo e Morini, 2006). No entanto, os tratamentos sem BAP apresentaram desenvolvimento das raízes (Figura 13), o que é consistente com os resultados obtidos por Oliveira et al. (2010) e Iiyama e Cardoso (2021).

No caso do comprimento dos brotos (CB), o efeito do BAP, do comprimento de onda utilizado e da interação entre esses fatores foi significativo, conforme demonstrado na Tabela 2. As médias de comprimento dos brotos foram comparadas pelo teste Games-Howell. Os resultados do comprimento dos brotos (Figura 11) foram opostos aos resultados do número de brotos. O maior comprimento de brotos (1,17 cm) foi obtido com a combinação de luz LED azul + vermelho, sem a presença de BAP, enquanto na mesma fonte de luz, mas com adição de BAP (0,25 mg L<sup>-1</sup>), o comprimento foi de 0,54 cm. Isso indica que a citocinina BAP alterou o desenvolvimento normal dos brotos *in vitro*, aumentando a proliferação, mas diminuindo o tamanho dos novos brotos obtidos. Portanto, é mais vantajoso ter um maior número de brotos, independentemente do comprimento, para a melaleuca.

**Tabela 2.** Anova da interação de BAP e comprimento de onda do comprimento de brotos.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	P
BAP (A)	1	27,023	27,023	27,023**	< 0,0001
Comprimento de onda (B)	5	258,20	51,640	51,640**	< 0,0001
Interação (AXB)	5	336,71	67,342	67,342**	< 0,0001
Resíduo	105				
Total	116				
Coeficiente de variação (%)		75,738			
Média	0,8	Número de observações		120	

\*\* = significativi a 1% de probabilidade



**Figura 11:** Comprimento de brotos (CB) de *M. alternifolia*, no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda com e sem presença de BAP. Letras maiúsculas diferentes entre si demonstram diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade utilizando-se o teste Games-Howel, para o fator presença e ausência de BAP no meio de cultura. Letras minúsculas mostram as diferenças entre os espectros de luz.

No escuro, quando foi adicionado BAP, foram obtidos 5,8 brotos/segmento nodal e um comprimento de 0,79 cm. Por outro lado, o cultivo sem adição de BAP no escuro resultou em valores muito baixos, apenas 0,01 brotos/segmento nodal e 0,02 cm de comprimento, respectivamente. Esses resultados indicam que a presença do BAP no meio de cultura pode substituir, pelo menos parcialmente, a necessidade de luz para o desenvolvimento das plantas *in vitro* de melaleuca. No entanto, vários estudos mostraram que a aplicação de BAP pode atrasar a senescência em diferentes espécies de plantas. Por exemplo, SHI *et al.* (2015) descobriram que a aplicação de BAP atrasou a senescência em folhas de rosas cortadas, prolongando assim o tempo de vida das flores. Em culturas de tecidos vegetais, observou-se que a adição de BAP ao meio de cultura pode manter a viabilidade e o vigor dos explantes, atrasando assim a senescência dos tecidos (COCA *et al.*, 2015; HASSAN *et al.*, 2019). Resultados

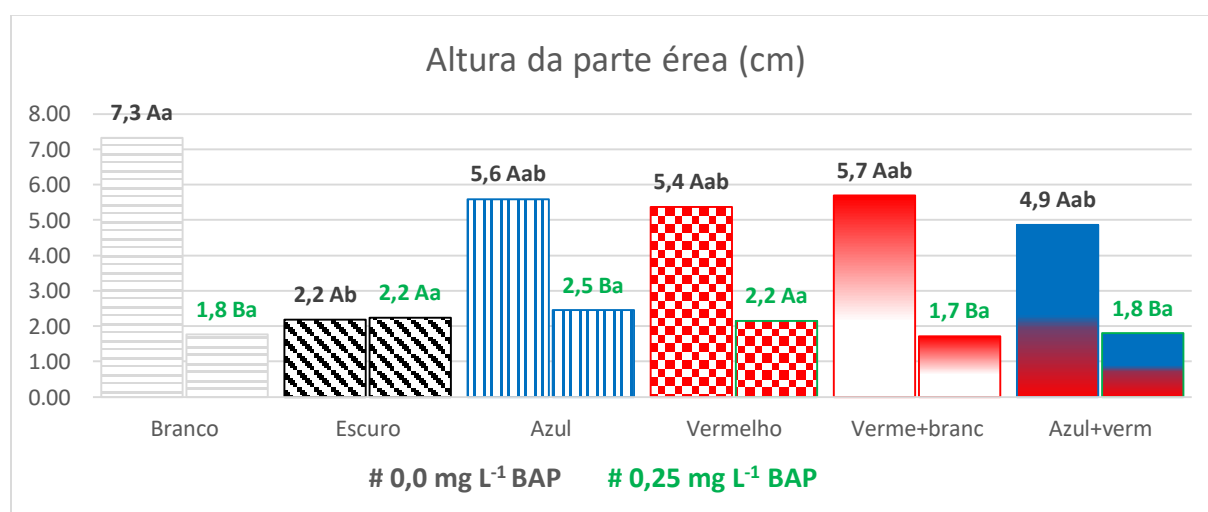
semelhantes foram encontrados por LIN et al. (2013), que relataram que as mudas de mirtilo não se desenvolvem no escuro devido à ausência de luz. Além disso, observou-se tanto em melaleuca quanto em mirtilo que o BAP promove a proliferação de brotações, com redução da expansão das folhas e encurtamento dos entrenós do caule, resultando em plantas com várias brotações axilares ou adventícias, mas pouco desenvolvidas.

Os resultados da altura da parte aérea das plantas (AA) foram analisados usando o teste Games-Howell, conforme apresentado na Tabela 3. A maior altura das plantas (7,3 cm) foi observada quando as plantas foram cultivadas sob luz branca, sem adição de BAP ao meio de cultura. Por outro lado, quando o BAP foi adicionado ao meio de cultura na mesma fonte de luz, foi observada uma das menores alturas das plantas (1,8 cm), conforme ilustrado na Figura 12.

**Tabela 3.** Anova da interação de BAP e comprimento de onda na altura da planta.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	P
BAP (A)	1	35,015	35,015	35,015**	< 0,0001
Comprimento de onda (B)	5	30,014	6,0028	6,0028**	< 0,0001
Interação (AXB)	5	66,220	13,244	13,244 **	< 0,0001
Resíduo	105				
Total	116				
Coeficiente de variação (%)		29,460			
Média	3,5	Número de observações		120	

\*\* = significativo a 1% de probabilidade



**Figura 12:** Altura da parte aérea (AA) das plantas de *M. alternifolia* foi avaliada ao

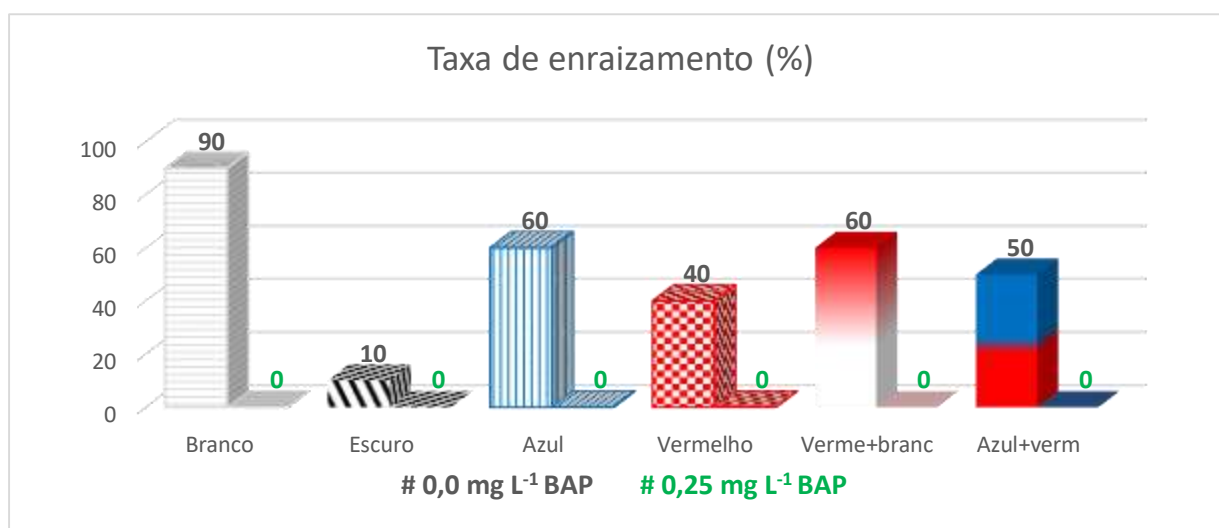
longo de um período de 30 dias, considerando a interação entre o comprimento de onda da luz e a presença ou ausência de BAP no meio de cultura. A análise estatística utilizando o teste Games-Howell foi realizada para comparar as médias, e letras maiúsculas diferentes entre si indicam diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade para o fator presença e ausência de BAP no meio de cultura. Por outro lado, letras minúsculas são utilizadas para mostrar as diferenças entre os espectros de luz.

Dados similares foram encontrados nos estudos de IYAMA; CARDOSO (2021) e Oliveira et al. (2010), nos quais eles relataram uma redução na altura da parte aérea de mudas de melaleuca, variando de 3,55 cm a 0,40 cm, quando o BAP foi adicionado ao meio de cultura. Além disso, CRUZ et al. (2021) também encontraram resultados semelhantes em mudas de mirtilheiro cultivadas em diferentes tipos de luz e reguladores de crescimento, sendo que o tratamento com luz branca apresentou uma altura de 2,18 cm.

Por outro lado, o cultivo no escuro não mostrou influência do BAP, uma vez que ambos os tratamentos apresentaram a mesma altura (2,2 cm). Resultados semelhantes foram observados em estudos com hipocótilos de *Arabidopsis thaliana* cultivados no escuro, nos quais não houve desenvolvimento (FOLTA, 2004). Nos demais espectros de luz, a altura ficou intermediária entre a luz branca e as condições de escuro, sem diferenças significativas entre eles para essa variável.

Os resultados da taxa de enraizamento (TE) não foram tratados com a ANOVA. A maior taxa de enraizamento (90 %) foi observada quando as plantas foram cultivadas luz branca, sem adição de BAP ao meio de cultura. Por outro lado, quando o BAP foi adicionado ao meio de cultura na mesma fonte de luz, não foi observada presença de raiz (0 %), conforme ilustrado na Figura 13.

As citocininas podem ter efeitos variáveis no enraizamento das plantas. Em geral, em altas concentrações, podem inibir o enraizamento (GASPAR *et al.*, 1998; OLMOS *et al.*, 1998; PÉREZ-TORNERO *et al.*, 2019). As taxas de enraizamento foram de 0% para os tratamentos que foram expostos ao BAP. Resultados semelhantes foram descritos por IYAMA e CARDOSO (2021), onde a adição de BAP no meio de cultura inibiu o enraizamento. Não entanto, é possível que algumas plantas, em condições específicas, sejam capazes de enraizar sem a adição de auxinas no meio de cultura. Isto pode ocorrer por fatores endógenos, reguladores presentes no explantes (DE KLERK; KRIEKEN 1999; GUROVICH, 2009; FERNÁNDEZ-GARCÍA, 2011; HARTMANN, 2011).



**Figura 13:** Taxa de enraizamento (%) (TE) das plantas de *M. alternifolia* foi avaliada ao longo de um período de 30 dias.

No caso de melaleuca, observou-se uma taxa de enraizamento de 10 a 90% em diferentes comprimentos de onda de luz, sendo 90% obtidos em luz branca (Figura 13). Por outro lado, o cultivo no escuro sem adição do BAP, resultou em apenas 10% de enraizamento devido ao deterioro dos tecidos vegetais, como pode ser observado na Figura 14. Vários estudos demonstraram que os tecidos vegetais em estado de senescência têm uma capacidade reduzida de formar raízes adventícias ou de



enraizar em comparação com os tecidos mais jovens. Isto pode dever-se a uma diminuição da actividade das células nos tecidos senescentes, bem como a alterações na expressão de genes relacionados com o enraizamento (PÉREZ-TORNERO, 2001; VALDÉS 2005; BUCHANAN-WOLLASTON, 2007).

Concentração BAP			
0,25 mg L <sup>-1</sup>	0,00 mg L <sup>-1</sup>	0,25 mg L <sup>-1</sup>	0,00 mg L <sup>-1</sup>
Espectro de luz LEDs			
Branco		Escuro	
Azul		Vermelho	
Vermelho + branco		Azul + vermelho	

**Figura 14:** Desenvolvimento *in vitro* de melaleuca em diferentes comprimentos de onda e 6-Benzylaminopurine (BAP). A. Luz cor Branco com e sem BAP. B. cor Escuro com e sem BAP. C. LEDs de cor Azul com e sem BAP. D. LEDs de cor Vermelho com e sem BAP. E. LEDs de cor Vermelho + Branco com e sem BAP. F. LEDs de cor Azul + Vermelho com e sem BAP.

Para os resultados de massa fresca (MF) e seca (MS), o efeito de BAP e do comprimento de onda foram significativos, mas não foi observada interação dos fatores (Tabelas 4 e 5). As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, sendo assim os maiores médias (0,18 g MF/planta e 0,015 g MS/planta) foram obtidas com uso da luz branca, na presença de BAP no meio de cultura. Sem a adição do BAP ao meio de cultura as maiores médias foram obtidas também na luz branca (0,08 e 0,01 g), não diferindo estatisticamente das luzes vermelha, vermelho+branca e vermelho+azul (Figura 10).

**Tabela 4.** Anova da interação de BAP e comprimento de onda de Massa fresca da parte aérea.

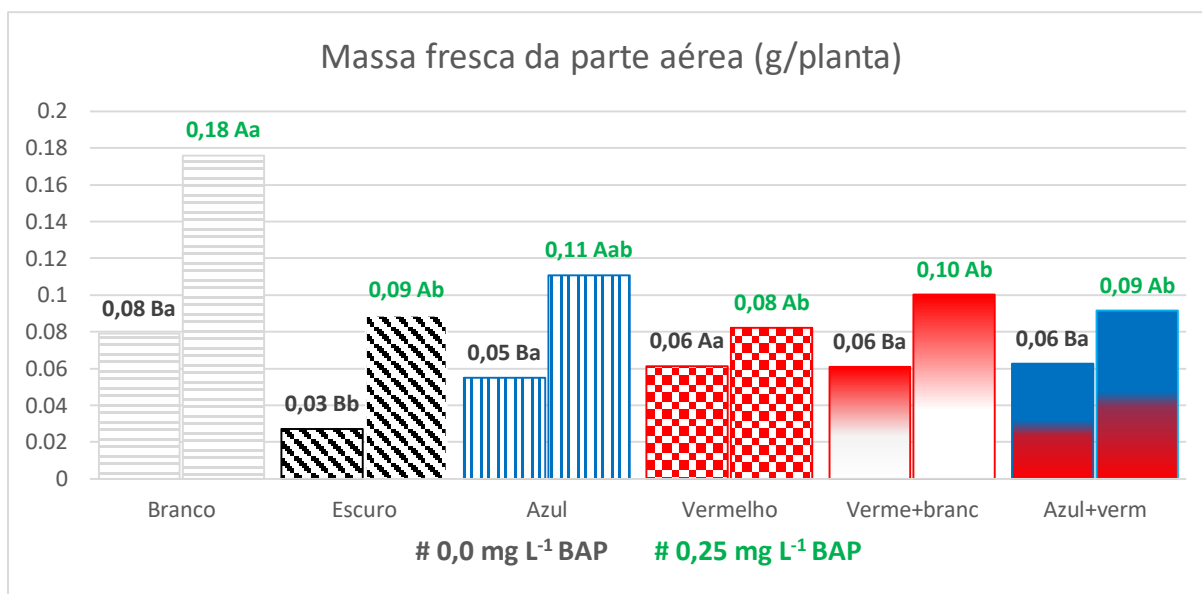
CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	P
BAP (A)	1	73,410	73,410	71,117**	< 0,0001
Comprimento de onda (B)	5	42,703	8,5406	8,2738**	< 0,0001
Interação (AXB)	5	10,340	2,0681	2,0035 NS	< 0,0001
Resíduo	108	111,48	1,0322		
Total	119	237,94			
Coeficiente de variação (%)		18,934			
Média	0,08	Número de observações		120	

\*\* =significativo a 1% de probabilidade

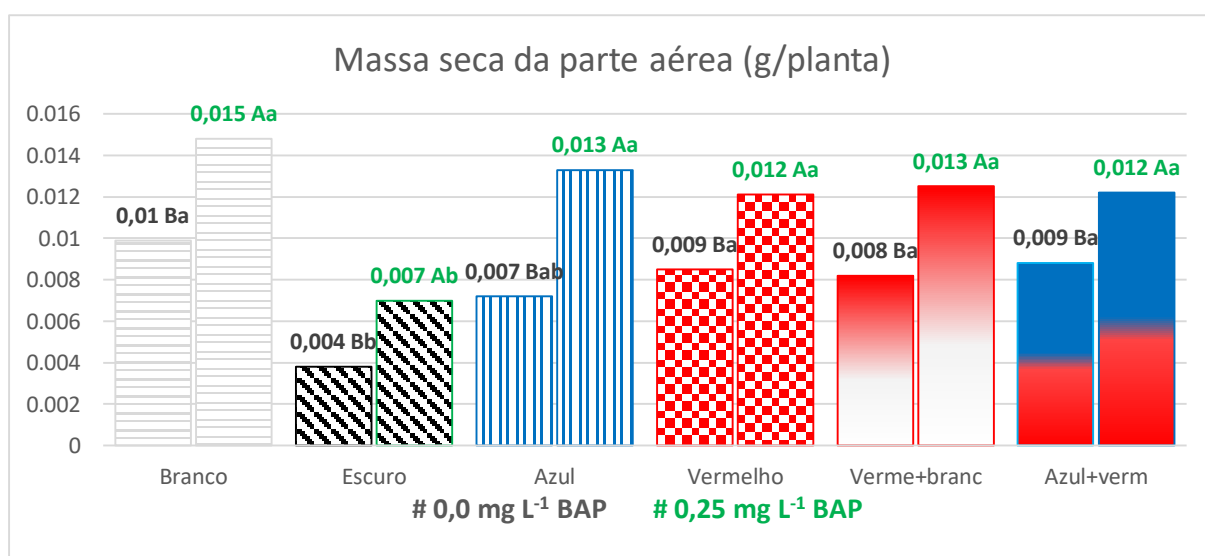
**Tabela 5.** Anova da interação de BAP e comprimento de onda em Massa seca da parte aérea.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	P
BAP (A)	1	1865005	1865005	56,559**	< 0,0001
Comprimento de onda (B)	5	1959109	391822	11,883**	< 0,0001
Interação (AXB)	5	87961	17592	0,5335 NS	< 0,0001
Resíduo	108	3561236	32974		
Total	119	7473311			
Coeficiente de variação (%)		9,0746			
Média	0,0099	Número de observações		120	

\*\* =significativo a 1% de probabilidade



**Figura 15:** Massa fresca da parte aérea de *M. alternifolia*, no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda com e sem presença de BAP. Letras maiúsculas diferentes entre si demonstram diferença significativa para o fator presença e ausência de BAP no meio de cultura. Letras minúsculas mostram as diferenças entre os espectros de luz.



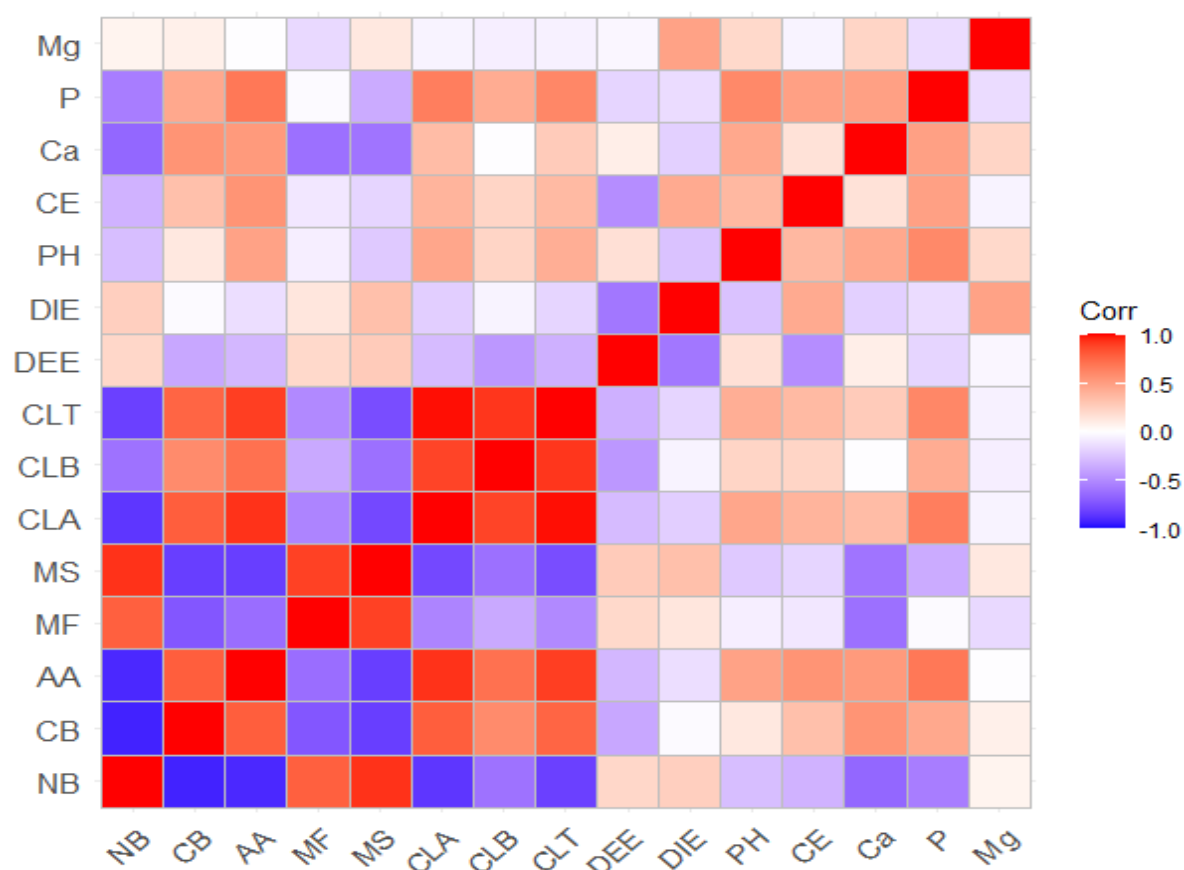
**Figura 16:** Massa seca da parte aérea de *M. alternifolia*, no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda com e sem presença de BAP. Letras maiúsculas

diferentes entre si demonstram diferença significativa para o fator presença e ausência de BAP no meio de cultura. Letras minúsculas mostram as diferenças entre os espectros de luz.

Vários autores, como BELLO-BELLO et al. (2016), GUPTA; JATOTHU (2013) e KIM et al. (2004), relatam a existência de correlação entre a massa fresca e seca (MF e MS) e o número de brotos por segmento nodal. Neste estudo, observou-se que as médias da massa seca (0,015 g) e fresca (0,18 g) apresentaram correlação positiva com o número de brotos (8,1 brotos por segmento nodal) (Figura 17). As maiores médias foram obtidas na condição de luz branca com presença de BAP. Resultados semelhantes foram encontrados por SARROPOULOU et al. (2022) em mudas de cereja, onde as variáveis de massa fresca (0,365 g) e seca (0,046 g) também mostraram correlação com o número de brotos (3,86) sob exposição à luz. Na mesma fonte de luz, mas sem adição de BAP ao meio de cultivo, as médias das variáveis de massa fresca (0,08 g), seca (0,01 g) e número de brotos (2,5 brotos por segmento nodal) também apresentaram correlação, embora com valores menores. Os tratamentos que incluíram a presença de BAP apresentaram maior massa fresca e seca, o que indica uma maior proliferação de brotos e absorção de nutrientes, resultando no desenvolvimento de novos tecidos ou biomassa (FORTINI, 2017). Por outro lado, nos tratamentos sem adição de BAP, observou-se um desenvolvimento inferior devido à baixa proliferação de brotos causada pela ausência do BAP. Dados semelhantes foram obtidos por SARROPOULOU et al. (2022) em mudas de cereja.

Nos demais espectros de luz, a massa fresca e seca apresentaram uma tendência similar ao espectro de luz branca, não diferindo entre si para essas variáveis.

No estudo, foi observado que o espectro de luz branca em combinação com a adição de BAP mostrou uma relação positiva com as variáveis de número de brotos, massa fresca e massa seca. No entanto, não foi encontrada uma relação significativa entre o comprimento dos brotos e a altura das plantas. Além disso, verificou-se que a presença de BAP teve um efeito inibitório sobre o desenvolvimento das raízes, o que está em consonância com os resultados obtidos por IYAMA; CARDOSO (2021) em melaleuca, utilizando concentrações de BAP de 0,55  $\mu\text{M}$ , 1,11  $\mu\text{M}$  e 2,22  $\mu\text{M}$ , assim como em diferentes espécies lenhosas (BENNETT et al., 1994).



**Figura 17:** Plost de correlação das variáveis desenvolvida de melaleuca, Mg, P, Ca, CE, PH, DIE, DEE, CLT, CLB, CLA, MS, MF, AA, CB e NB (Magnésio, fósforo, cálcio, Ph, Diâmetro de estômatos, Densidade de estômatos, Clorofila total, Clorofila b, Clorofila a, Massa seca, Massa fresca, Altura aérea, Comprimento de brotos, Numero de brotos).

Para os teores da clorofila a e total (CLA e CLT) os efeitos de BAP, do comprimento de onda utilizado e da interação dos fatores foram significativos. As médias foram comparadas pelo teste Duncan (Tabela 6 e 8) respectivamente. Para o teor de clorofila b (CLB) o efeito de BAP e da interação dos fatores foram significativos, mas não do comprimento de onda (Tabela 7). Sendo assim a maior teor de clorofila a, b e total (49,27; 23,8 e 73,08 mg L<sup>-1</sup>) foi obtida com a luz LEDs azul, sem presença de BAP, enquanto na mesma fonte de luz com adição de BAP ao meio de cultivo, foi reportada nos teores de clorofila a, b e total apenas (16,12; 12,14 e 28,26 mg L<sup>-1</sup>) (Figura 18, Figura 19 e Figura 20).

**Tabela 6.** Anova da interação de BAP e comprimento de onda no teor de clorofila a.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	P
BAP (A)	1	5240,6	5240,6	56,559*	< 0,0001
Comprimento de onda (B)	4	505,6	126,4	11,883*	< 0,0001
Interação (AXB)	4	123,2	30,8	0,5335*	< 0,0001
Resíduo	20	743,6	37,2		
Total	29				
Coeficiente de variação (%)		19,05			
Média	35,49	Número de observações		30	

\* =significativo a 5% de probabilidade

**Tabela 7.** Anova da interação de BAP e comprimento de onda no teor de clorofila b.

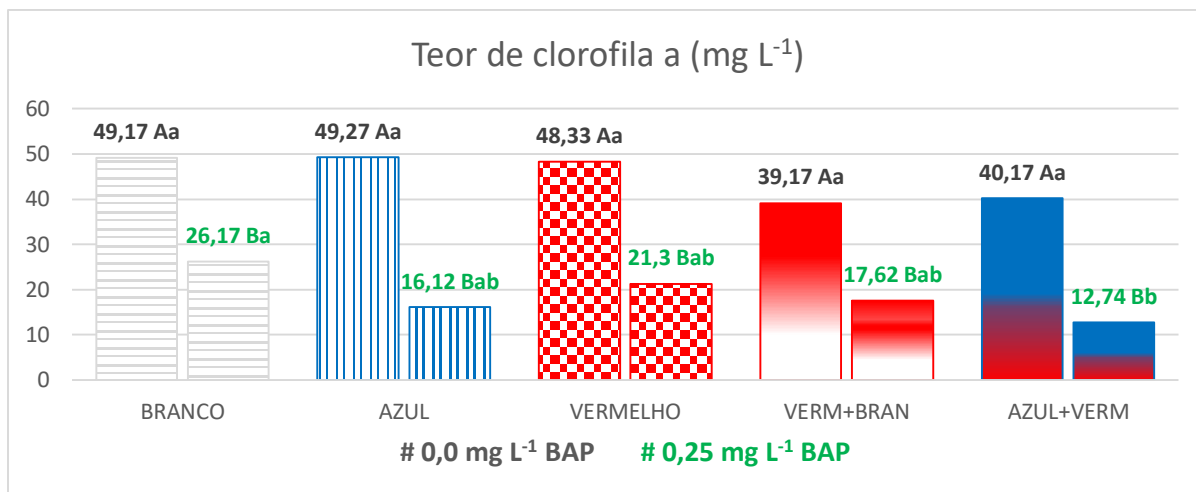
CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	P
BAP (A)	1	270,65	270,65	9,6197*	0,0056
Comprimento de onda (B)	4	140	35	1,244 NS	0,3244
Interação (AXB)	4	105,51	26,38	0,9375*	0,4625
Resíduo	20	562,71	28,14		
Total	29				
Coeficiente de variação (%)		30,51			
Média	17,74	Número de observações		30	

\* =significativo a 5% de probabilidade

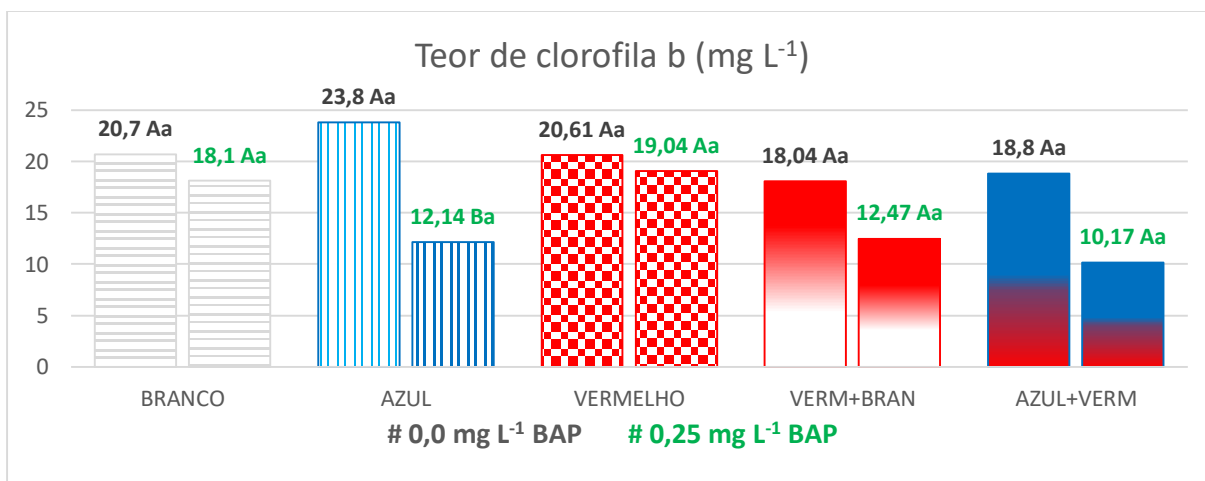
**Tabela 8.** Anova da interação de BAP e comprimento de onda no teor de clorofila total.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	P
BAP (A)	1	7893,171	7893,171	67,5526*	<0,001
Comprimento de onda (B)	4	1155,284	288,821	2,4718*	0,0776
Interação (AXB)	4	384,050	96,0126	0,8217*	0,5266
Resíduo	20	2336,896	116,8448		
Total	29				
Coeficiente de variação (%)		21,88			
Média	54,25	Número de observações		120	

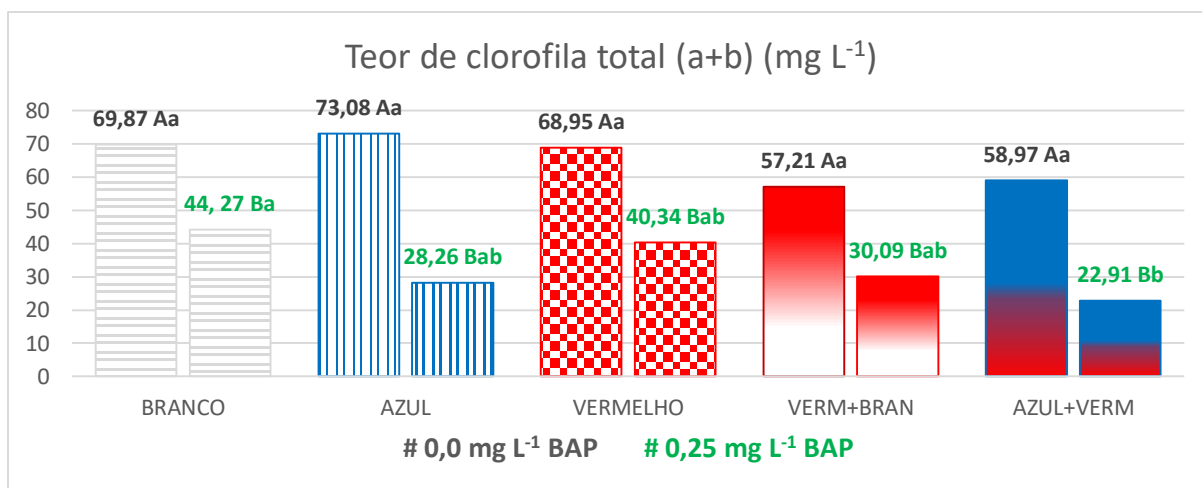
\* =significativo a 5% de probabilidade



**Figura 18:** Teor de clorofila A (CLA), no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda com e sem presença de BAP. Letras maiúsculas diferentes entre si demonstram diferença significativa para o fator presença e ausência de BAP no meio de cultura. Letras minúsculas mostram as diferenças entre os espectros de luz.



**Figura 19:** Teor de clorofila B (CLB), no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda com e sem presença de BAP. Letras maiúsculas diferentes entre si demonstram diferença significativa para o fator presença e ausência de BAP no meio de cultura. Letras minúsculas mostram as diferenças entre os espectros de luz.



**Figura 20:** Teor de clorofila Total (CLT), no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda com e sem presença de BAP. Letras maiúsculas diferentes entre si demonstram diferença significativa para o fator presença e ausência de BAP no meio de cultura. Letras minúsculas mostram as diferenças entre os espectros de luz.

De acordo com LOTFI *et al.* (2019), a luz LED azul desempenha um papel relevante na síntese de clorofila durante o desenvolvimento dos cloroplastos, na formação das clorofilas e na abertura dos estômatos (WU *et al.*, 2007). A clorofila apresenta absorção máxima na faixa de cor azul (HALL; RAO, 1980). Resultados semelhantes foram obtidos por MARÍN-MARTINEZ e IGLESIAS-ANDREU (2022), que relataram maiores teores de clorofila a (0,098 mg L<sup>-1</sup>), clorofila b (0,057 mg L<sup>-1</sup>) e clorofilas totais (0,155 mg L<sup>-1</sup>) em plantas expostas ao espectro de luz azul. Outros estudos também encontraram um aumento significativo nas concentrações de clorofila a, b e total em espécies como *Lactuca sativa* L., *Cucumis sativus* L., *Solanum lycopersicum* L. e *Capsicum annum* L. quando expostas à luz azul (LI; KUBOTA, 2009; Novičkovas *et al.*, 2012; SAMUOLIENE *et al.*, 2012; HERNÁNDEZ; KUBOTA, 2016). As clorofilas a, b e total são indicadores do bom desenvolvimento no cultivo (BOWYER, LEEGOOD, 1997), o que pode ser observado na Figura 16, onde essas



três variáveis (CLA, CLB e CLT) estão correlacionadas com a altura da parte aérea (AA).

Por outro lado, quando BAP foi adicionado ao meio de cultivo na mesma fonte de luz, foram observados teores baixos de clorofila a (16,12 mg L<sup>-1</sup>), clorofila b (12,14 mg L<sup>-1</sup>) e clorofilas totais (28,26 mg L<sup>-1</sup>). Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira *et al.* (2007), que relataram teores menores de clorofila a (128,44 µg/g), clorofila b (51,87 µg/g) e clorofilas totais (180,32 µg/g) com a adição de citocinina em comparação com as plantas sem a adição dessa substância, em que os valores para CLA foram de 131,134 µg/g, CLB de 51,35 µg/g e CLT de 182,48 µg/g.

Nos demais espectros de luz, CLA, CLB e CLT apresentaram uma tendência similar ao espectro de luz branca, não diferindo entre si para essas variáveis.

No estudo, observou-se que o espectro de luz Azul sem e com a adição de BAP tem relação com as variáveis de CLA, CLB e CLT. Sendo assim, sem adição de BAP apresentaram maiores teor de clorofila A, B e Total, por causa dos fotorreceptores das planta que absorvem a luz azul (CHRISTEI, 2007).

## **5.2 Efeito da interação entre BAP e comprimento de onda na densidade e diâmetro de estômatos (DEE; DIE) das folhas.**

Os resultados da densidade de estômatos das folhas do efeito da interação entre comprimento de onda e presença de BAP, estão ilustrado na Figura 22 e 23.

O efeito de BAP, do comprimento de onda utilizado e da interação dos fatores foram significativos. As médias foram desenvolva pelo teste Duncan na densidade e diâmetro de estômatos (Tabela 9 e 10) respectivamente. Sendo assim, a maior densidade dos estômatos (235 estômatos/mm<sup>2</sup>) foi obtida com a luz LEDs vermelho + branco, com presença de BAP, enquanto na mesma fonte de luz sem adição de BAP ao meio de cultivo, foi reportada na densidade de estômatos apenas (173,3

estômatos/mm<sup>2</sup>) (Figura 21). O maior diâmetro de estômatos (26,5 µm) foi obtida com a luz LEDs azul, com presença de BAP, enquanto na mesma fonte de luz sem adição de BAP ao meio de cultivo, foi reportada o diâmetro de estômatos apenas (18,4 µm) (Figura 23).

**Tabela 9.** Anova da interação de BAP e comprimento de onda em densidade de estômatos.

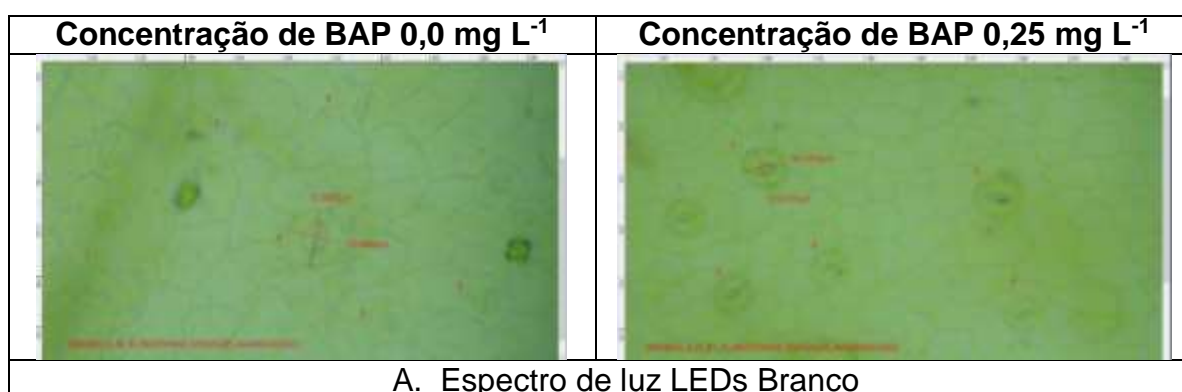
CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	P
BAP (A)	1	31,36	31,36	7,2667*	0,0084
Comprimento de onda (B)	4	579	144,75	33,5415*	<0,001
Interação (AXB)	4	102,24	25,56	5,9228*	<0,001
Resíduo	90	388,4	4,32		
Total	99				
Coeficiente de variação (%)		25,03			
Média	8		Número de observações	100	

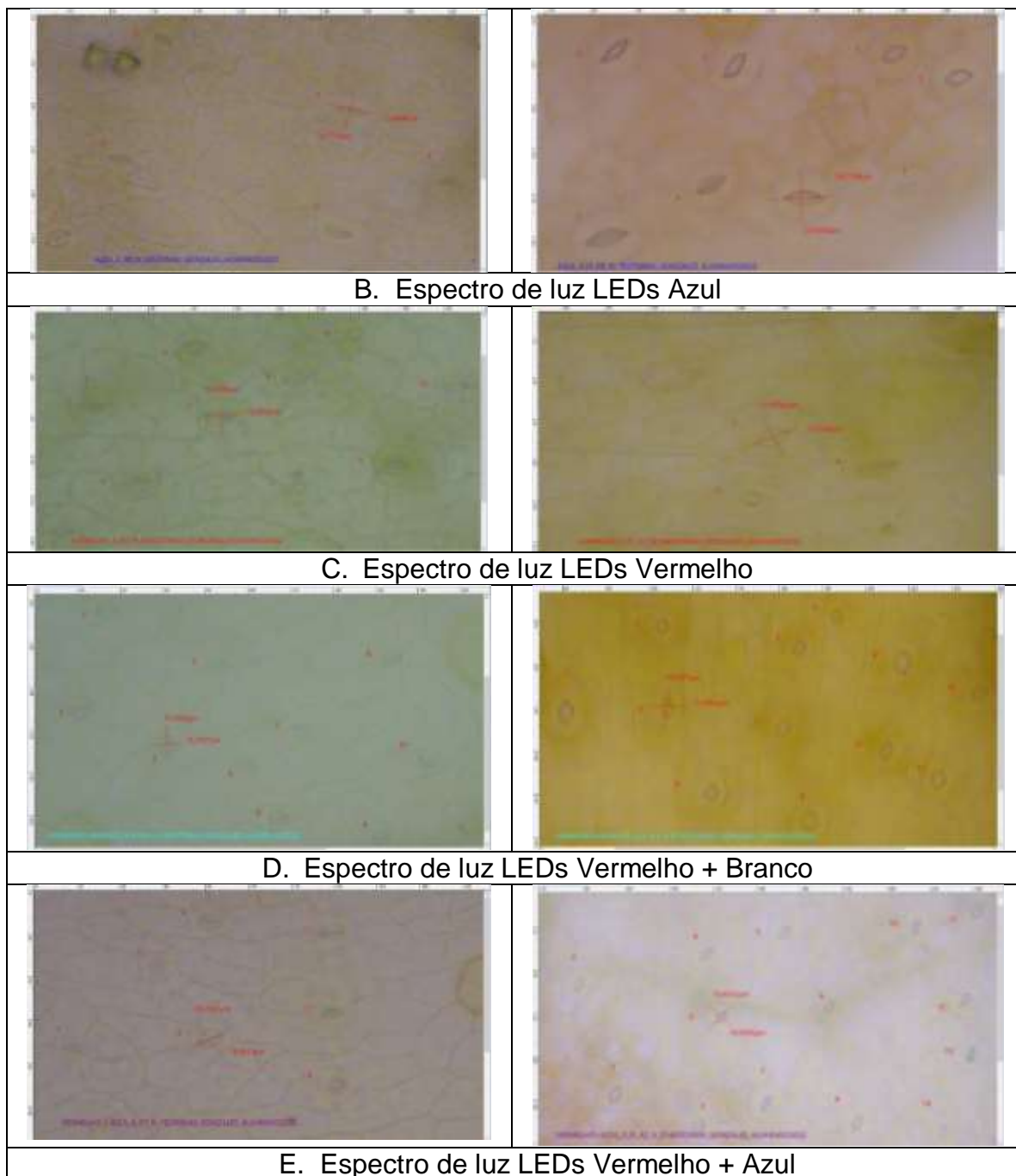
\* =significativo a 5% de probabilidade

**Tabela 10.** Anova da interação de BAP e comprimento de onda em diâmetro de estômatos.

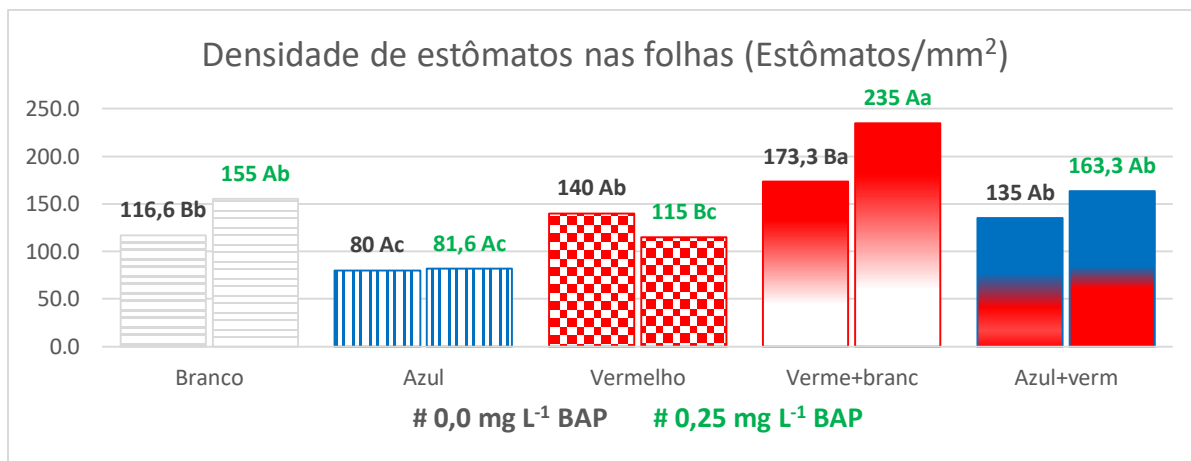
CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	P
BAP (A)	1	121,90	121,90	31,2894*	<0,001
Comprimento de onda (B)	4	551,32	137,83	35,3777*	<0,001
Interação (AXB)	4	461,28	115,32	29,5997*	<0,001
Resíduo	90	350,64	3,90		
Total	99				
Coeficiente de variação (%)		9,88			
Média	8		Número de observações	100	

\* =significativo a 5% de probabilidade

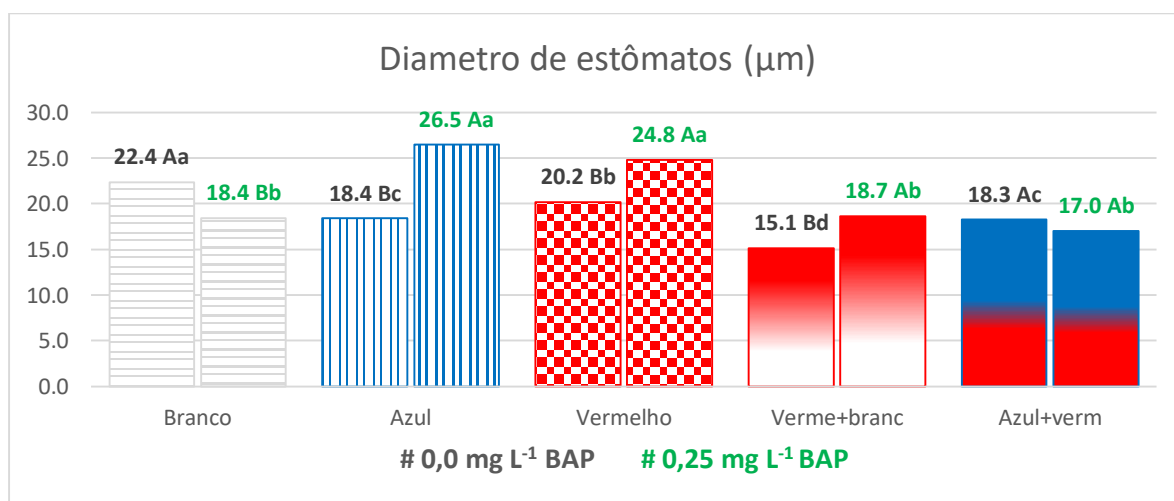




**Figura 21:** Efeito da interação entre comprimento de onda e presença de BAP na densidade e diâmetro de estômatos das folhas. A. módulo difusor de cor Branco com e sem BAP. B. cor Escuro com e sem BAP. C. LEDs de cor Azul com e sem BAP. D. LEDs de cor Vermelho com e sem BAP. E. LEDs de cor Vermelho + Branco. E. LEDs de cor Azul + Vermelho com e sem BAP.



**Figura 22:** Densidade de estômatos de *M. alternifolia*, no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda e presença de BAP. Letras maiúsculas diferentes entre si demonstram diferença significativa para o fator presença e ausência de BAP no meio de cultura. Letras minúsculas mostram as diferenças entre os espectros de luz.



**Figura 23:** Diâmetro de estômatos de *M. alternifolia*, no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda e presença de BAP. Letras maiúsculas diferentes entre si demonstram diferença significativa para o fator presença e ausência de BAP no meio de cultura. Letras minúsculas mostram as diferenças entre os espectros de luz.

Os estômatos são muito importante porque eles permitem trocar gases, quanto maior é a densidade, mais eficaz e rápido é o troca gasoso (TICHÁ *et al.*, 1999). Em relação aos dados descritos da densidade dos estômatos, para HE *et al.*, (2020) a maior média da densidade de estômatos (10,9 estômatos/mm<sup>2</sup>) foram com luz branca em *Camellia oleífera* diferindo com os resultados apresentados em melaleuca. Na fonte de luz Luz LEDs azul + vermelho com adição de BAP ao meio de cultivo, foram reportado maiores densidades de estômatos (163,3 estômatos/mm<sup>2</sup>). Resultados semelhantes foram obtidos por MIHOVILOVIĆ *et al.* (2020), das quais os autores reportaram maior densidade de estômatos (17,3 estômatos/mm<sup>2</sup>) com a adição de BAP no meio de cultura em *Amelanchier alnifolia*.

O cultivo no azul não demonstrou influência do BAP estatisticamente, sendo iguais densidades de estômatos (80 e 81,9 estômatos/mm<sup>2</sup>) sem e com BAP respectivamente. Resultados similares foram obtidos por CIOĆ; PAWLOWSKA, (2020), no qual esses autores reportaram que em *Gerbera*, a densidade de estômatos nas folhas foram apenas (22 estômatos/mm<sup>2</sup>) em comparação com outras tipos de luz LEDs Azul + vermelho (29,33 estômatos/mm<sup>2</sup>), vermelho (31,33 estômatos/mm<sup>2</sup>) e branco (30,44 estômatos/mm<sup>2</sup>). Nos demais espectros de luz, a altura foi intermediária entre a luz vermelha + branca e as condições de luz azul, não diferindo entre si para essa variável, não entanto, a densidade de estômatos exposto com a luz LEDs Vermelho foram oposto dos demais tratamentos, sendo que a maior densidade de estômatos foi para o meio de cultura sem BAP (140 estômatos/mm<sup>2</sup>) e a menor média foi para o meio de cultura sem BAP (115 estômatos/mm<sup>2</sup>).

Segundo CIOĆ; PAWLOWSKA, (2020) muitos autores como KIN *et al.* (2004); CAMARGO *et al.* (2011) relatam que a densidade e diâmetro de estômatos tem um alto efeito com a luz LEDs azul e isso pode-se visualizar com as variáveis da Figura

22 e 23. As médias da densidade de estômatos com luz LEDs azul foram menos numerosos ou menores (80 e 81,6 estômatos/mm<sup>2</sup>) e as médias da variável diâmetro dos estômatos foram uma das maiores com BAP (26,5 µm) e sem BAP (18,4 µm), resultados semelhantes obtiveram (CIO´C; PAWLOWSKA, 2020) no qual esses autores reportaram que com luz LEDs azul encontraram menor número de estômatos (22 estômatos/mm<sup>2</sup>) e estômatos com diâmetros maiores (29,5 µm).

As médias dos diâmetros dos estômatos das folhas foram desenvolvidas pelo teste Duncan (Figura 23). Os maiores diâmetros (26,5 µm e 24,8 µm) foram obtidos com a LED azul e vermelho, respectivamente, com presença de BAP. Resultados similares foram reportados pelos autores SHENG; VAN, (2017), utilizando luz LEDs azul e vermelha os diâmetros foram (274,60 µm e 325,10 µm), (143,55 µm e 130,06 µm), e (51,22 µm e 37,55 µm), em *Cordyline australis*, *Ficus benjamina* e *Sinningia speciosa* respectivamente. Além disso, CIO´C; PAWLOWSKA, (2020), reportaram que a adição de BAP ao meio de cultura, apresenta diâmetros maiores em µm. Em condições *in vitro*, os estômatos são circular e abertos (TICHÁ *et al.*, 1999), características semelhante foram observada nesta pesquisa (Figura 21). De acordo com KIN *et al.* (2004); GUPTA; JATOHU (2013) as plantas que apresentam maior crescimento quando expostas a diferentes espectros de luz LEDs, tendem a desenvolver um número menor de estômatos com diâmetros maiores. Esses resultados podem ser visualizados na variável de altura de planta (Figura 12), onde a maior média foi com luz branca (7,3), enquanto o número de estômatos (7) foi uma das menores médias, e os diâmetros apresentaram uma das médias mais altas de diâmetro de estômatos (22,4 µm) sem presença de BAP.

**5.3 Efeito da interação entre BAP e comprimento de onda no pH, absorção de nutrientes por meio da condutividade elétrica (CE), e dos macronutrientes Cálcio (Ca), Fósforo (P) e Magnésio (Mg) do meio de cultura.**

Os resultados da absorção de cálcio, fosforo e magnésio no efeito da interação entre comprimento de onda e presença de BAP ilustrado na Figura 24 a 28.

Os resultados de pH e absorção da condutividade elétrica no meio de cultura (Figura 24 e 25), as médias foi desenvolva pelo teste Duncan. O efeito de BAP, do comprimento de onda utilizado e da interação dos fatores foram significativos (Tabela 11 e 12), o pH mais estável (5,02; 4,96; 4,92) foi obtida com o escuro, LED vermelho e branco respectivamente sem presença de BAP, enquanto às mesma fonte de luz com adição de BAP ao meio de cultivo, foi reportado apenas (4,72; 4,22; 4,58). a maior absorção da condutividade elétrica (1,13 mS/cm) foi obtida com luz branco sem presença de BAP, enquanto às mesma fonte de luz com adição de BAP ao meio de cultivo, foi reportado apenas (0,26 mS/cm). A adição de BAP (0,25 mg L<sup>-1</sup>) apresenta uma redução do pH e a absorção baixo da condutividade elétrica.

**Tabela 11.** Anova da interação de BAP e comprimento de onda no pH do meio de cultura.

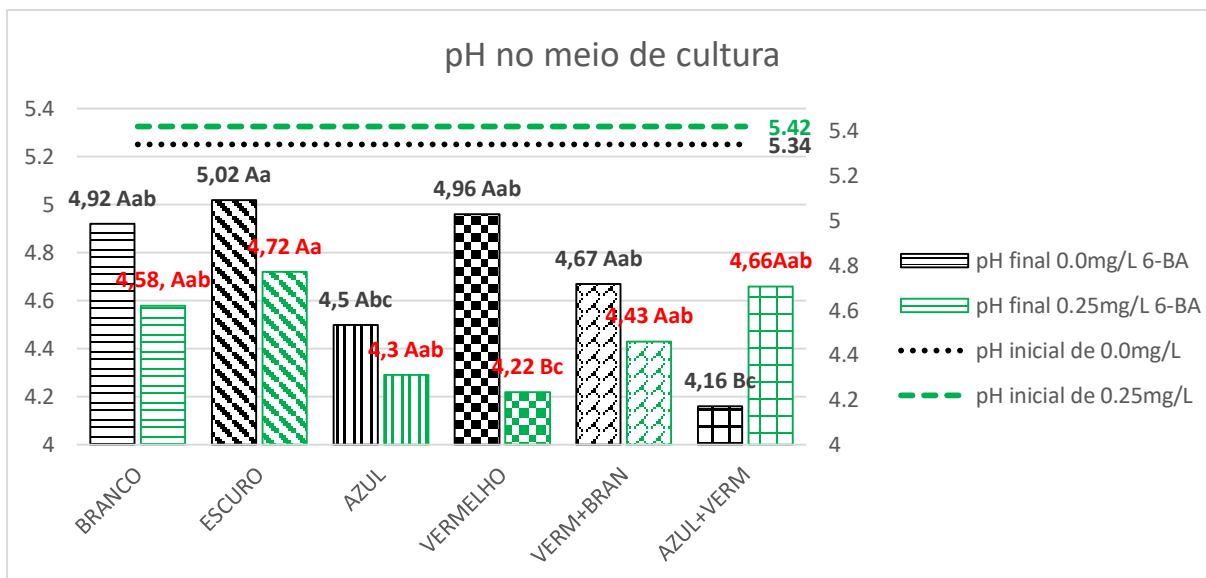
CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	P
BAP (A)	1	0,4312	0,4312	6,8743*	0,0149
Comprimento de onda (B)	5	1,0506	0,2101	3,3497*	0,0195
Interação (AXB)	5	1,2138	0,2428	3,87*	0,0103
Resíduo	24				
Total	35				
Coeficiente de variação (%)		5,45			
Média		5,6	Número de observações	36	

\* = significativo a 5% de probabilidade

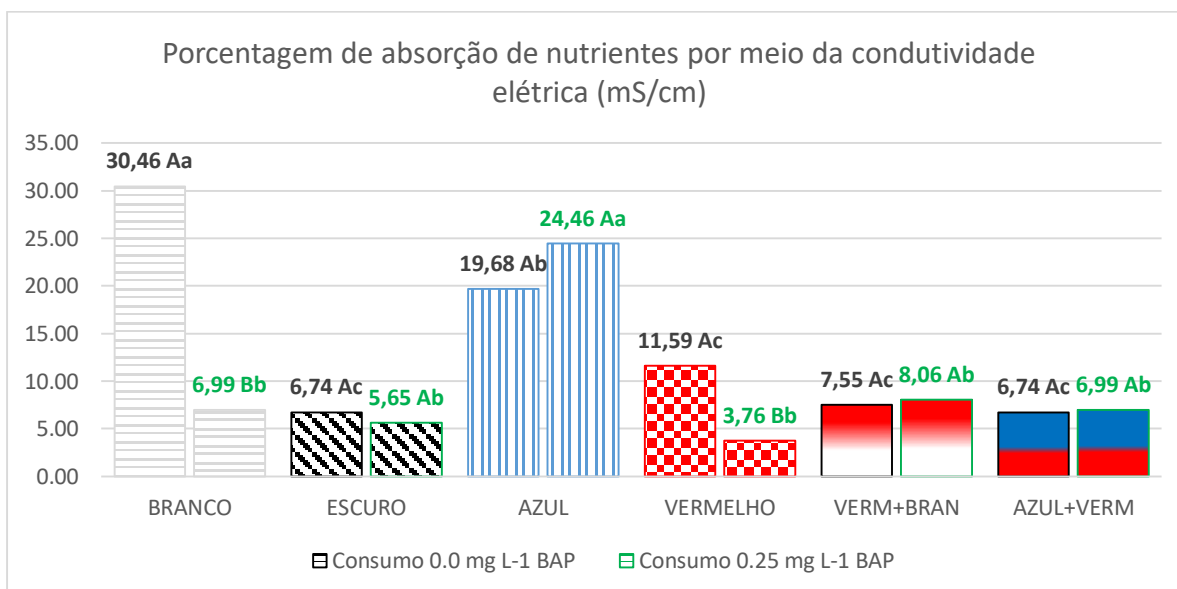
**Tabela 12.** Anova da interação de BAP e comprimento de onda na na absorção de nutrientes por médio de CE do meio de cultura.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	P
BAP (A)	1	0,2880	4	25,057*	0,000001
Comprimento de onda (B)	5	1,9168	5	33,352*	0,000001
Interação (AXB)	5	1,0394	3	18,084*	0,000001
Resíduo	24				
Total	35				
Coeficiente de variação (%)		24,58			
Média		0,4	Número de observações	36	

\*\* =significativo a 1% de probabilidade



**Figura 24:** pH do médio de cultura, no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda e com e sem presença de BAP. Letras maiúsculas diferentes entre si demonstram diferença significativa para o fator presença e ausência de BAP no meio de cultura. Letras minúsculas mostram as diferenças entre os espectros de luz.



**Figura 25:** Porcentagem de absorção de nutrientes por meio da condutividade elétrica (mS/cm) no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda e com e sem presença de BAP. Letras maiúsculas diferentes entre si demonstram diferença,



para o fator presença e ausência de BAP no meio de cultura. Letras minúsculas mostram as diferenças entre os espectros de luz.

De acordo com BEYL, (2011) e SHI *et al.* (2017), o pH geralmente é ajustado de 5,4 a 6, mas pode variar de acordo com o cultivo e o objetivo específico. O pH desempenha um papel crucial no desenvolvimento das mudas, como observado no caso da *Tectona grandis*, que desenvolve-se melhor em um pH pH 6 HONG; YIN, (2010); ZHOU *et al.* (2009). No caso de melaluca, o pH final após a autoclavagem variou entre 4,16 – 5,02 sem adição de BAP, e entre 4,22 – 4,96 com adição de BAP. Observou-se que as mudas apresentaram uma media mais elvada em condições de escuro sem adição de BAP, porém não se desenvolveram (Figura 24). Por outro lado, na luz branca sem adição de BAP, as mudas desenvolveu-se com um pH de 4,92, o que é considerado bastante tolerável para a melaleuca. Resultados semelhantes foram encontrados por MARTINS *et al.* (2011) em estudos com *Plantago almogravensis* e *Plantago algarbiensis*, que toleraram e se desenvolveram em diferentes variações de pH (4,50 – 5,75) no meio de cultura. No entanto, MARTINUSSEN *et al.* (2004) observaram que um pH de 4,5 aumenta a proliferação de brotos, o que difere das respostas observadas na Figura 11, onde o BAP tem efeito na produção ou proliferação de brotos.

De acordo com ARGENTEL, (2017), quando há um maior desenvolvimento, a porcentagem de absorção de nutrientes por meio da condutividade elétrica (mS/cm) aumenta. No caso da melaluca, a maior absorção de nutrientes ocorreu pela luz branca, sem adição de BAP, com uma absorção de 30,46% através da condutividade elétrica. Além disso, o desenvolvimento da parte aérea das mudas (7,3 cm) também foi melhor sob a luz branca, sem adição de BAP (Figura 14). PÉREZ-VAZQUEZ *et al.* (2021) reportaram que a absorção de nutrientes por meio da condutividade elétrica no

meio de cultura afeta o rendimento e desenvolvimento de pimentão morrón, demonstrando uma correlação entre a absorção através da condutividade elétrica e o desenvolvimento da massa fresca e seca da parte aérea. No entanto, na melaleuca, os resultados foram oposto em à correlação entre a absorção de nutrientes através da condutividade elétrica e a massa fresca e seca (Figura 17). Enquanto a mesma fonte de luz com adição de BAP a absorção foi menor, atingindo 6,99%.

No cultivo no escuro, a absorção de nutrientes por meio da condutividade elétrica não demonstrou diferença com BAP ou sem adição de BAP, sendo ambos os tratamentos estatisticamente iguais. Nos outros espectros de luz, a absorção foi menor em comparação da luz branca.

Os resultados da absorção cálcio, fosforo e magnésio (Figura 26 - 28) respectivamente, as médias foi desenvolva pelo teste Duncan. O efeito de BAP, do comprimento de onda utilizado e da interação dos fatores foram significativos (Tabela 13 á 15), os maiores consumos dos macronutrientes (264,67; 10 e 33,67 mg L<sup>-1</sup>) foram em luz LEDs vermelho + branco e vermelho sem presença de BAP, enquanto ás mesma fonte de luz LEDs com adição de BAP ao meio de cultivo, foi reportado apenas (152,33; 2; 30,33 mg L<sup>-1</sup>).

**Tabela 13.** Anova da interação de BAP e comprimento de onda na absorção de cálcio.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	P
BAP (A)	1	21121,78	21121,78	539,28*	<0,001
Comprimento de onda (B)	5	24793,67	4958,73	126,61*	<0,001
Interação (AXB)	5	40685,56	8137,11	207,76*	<0,001
Resíduo	24	940	39,17		
Total	35				
Coeficiente de variação (%)	3,77				
Média	164,5	Número de observações	30		

\* = significativo a 5% de probabilidade

**Tabela 14.** Anova da interação de BAP e comprimento de onda na absorção de fosforo.

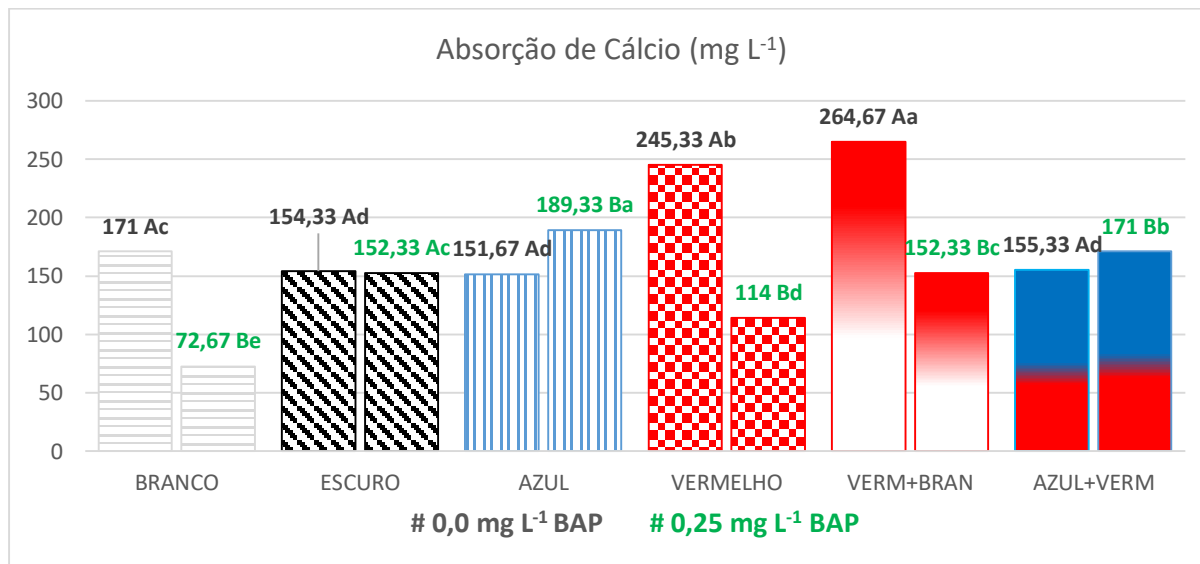
CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	P
BAP (A)	1	156,25	3	2.3790e+31*	< 0,0001
Comprimento de onda (B)	5	79,49	2	2.4205e+30*	< 0,0001
Interação (AXB)	5	96,77	4	2.9467e+30*	< 0,0001
Resíduo	24	0	5		
Total	35				
Coeficiente de variação (%)		9,0746			
Média	6,4	Número de observações		30	

\* =significativo a 5% de probabilidade

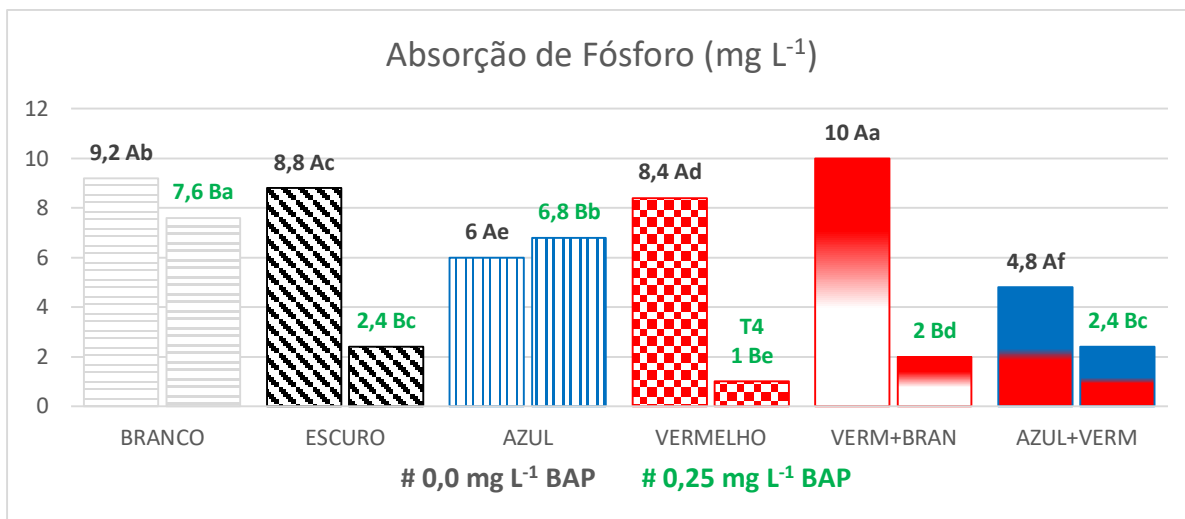
**Tabela 15.** Anova da interação de BAP e comprimento de onda na absorção de magnésio.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	P
BAP (A)	1	19,51	19,51	4,49*	0,0447
Comprimento de onda (B)	5	1535,53	307,11	70,64*	<0,001
Interação (AXB)	5	1098,87	219,77	50,56*	<0,001
Resíduo	24	104,33	4,35		
Total	35				
Coeficiente de variação (%)		9,82			
Média	23	Número de observações		30	

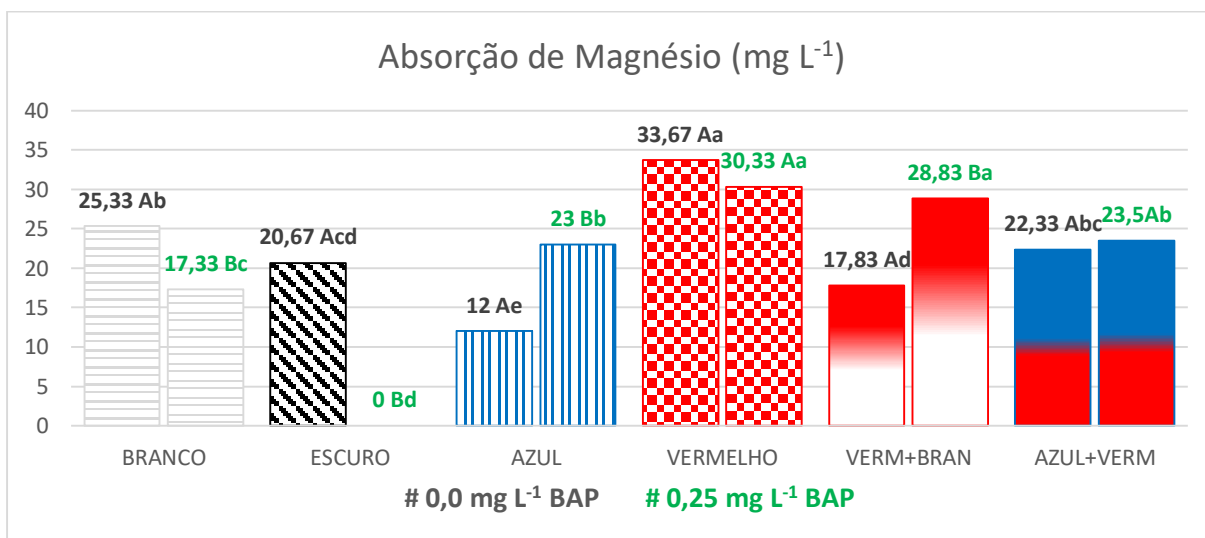
\* =significativo a 5% de probabilidade



**Figura 26:** Absorção de cálcio de melaleuca (mg L<sup>-1</sup>) em condições *in vitro*, no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda e com e sem presença de BAP. Letras maiúsculas diferentes entre si demonstram diferença, para o fator presença e ausência de BAP no meio de cultura. Letras minúsculas mostram as diferenças entre os espectros de luz.



**Figura 27:** Absorção de fósforo de melaleuca ( $\text{mg L}^{-1}$ ) em condições *in vitro*, no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda e com e sem presença de BAP. Letras maiúsculas diferentes entre si demonstram diferença, para o fator presença e ausência de BAP no meio de cultura. Letras minúsculas mostram as diferenças entre os espectros de luz.



**Figura 28:** Absorção de magnésio de melaleuca ( $\text{mg L}^{-1}$ ) em condições *in vitro*, no período de 30 dias, com interação entre comprimento de onda e com e sem presença de BAP. Letras maiúsculas diferentes entre si demonstram diferença, para o fator presença e ausência de BAP no meio de cultura. Letras minúsculas mostram as diferenças entre os espectros de luz.

Os resultados da absorção de cálcio (Figura 26) foram analisados utilizando o teste de Duncan para determinar as médias. A maior absorção de cálcio ( $264,67 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi obtida com a LEDs vermelha + branca, sem presença de BAP no meio de cultivo, com uma intensidade luminosa  $104,51 \mu\text{mol/m}^2 \text{ s}$ . Por outro lado, quando o meio de cultivo foi suplementado com BAP e as mudas foram expostas à mesma fonte de luz LEDs, foi observada uma absorção intermediária de cálcio ( $152,33 \text{ mg/L}$ ). Resultados semelhantes foram obtidos por GEROVAC *et al.* (2016), que também observaram uma maior absorção de cálcio em luz LEDs vermelha com uma intensidade luminosa de  $105 \mu\text{mol/m}^2 \text{ s}$ . Nos espectros de luz vermelha e branca, foi observada uma tendência semelhante de absorção, com maior absorção nos tratamentos sem presença de BAP.

Os resultados da absorção de fósforo (Figura 27), as médias foram analisados usando o teste Duncan. A maior absorção de fósforo ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi observada com a LED vermelha + branca, sem presença de BAP no meio de cultivo. Por outro lado, quando o meio de cultivo foi suplementado com BAP e as mudas foram expostas à mesma fonte de luz LEDs, foi registrada uma absorção menor de fósforo ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Nos demais espectros de luz apresentaram uma tendência semelhante ao espectro de luz vermelha + branca. No entanto, na luz LEDs azul, os resultados foram opostos aos demais espectros, sendo a maior absorção ( $6,8 \text{ mg L}^{-1}$ ) com presença de BAP, enquanto na mesma fonte de luz sem adição de BAP ao meio de cultivo resultou em uma absorção menor ( $6 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Os resultados da absorção de Magnésio (Figura 28), as médias para absorção de magnésio foi desenvolvida pelo teste Duncan. Observou-se que a maior absorção de magnésio ( $33,67 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi obtida com a luz LEDs vermelha, sem presença de BAP no meio de cultura. No entanto, quando a mesma fonte de luz com adição de BAP ao

meio de cultivo, foi reportado uma média ligeiramente mais baixa de absorção magnésio ( $30,33 \text{ mg L}^{-1}$ ). Isso indica que a presença de BAP teve um efeito moderado na absorção de magnésio pelas mudas de melaleuca.

Em alguns casos, observou-se que o BAP pode estimular a absorção de nutrientes pelas plantas. Por exemplo, estudos demonstraram que o BAP pode aumentar a absorção de nitrogênio e fósforo em determinadas espécies de plantas, o que, por sua vez, pode promover um crescimento mais vigoroso e uma melhor nutrição das plantas (HOSSAIN *et al.*, 2017; EL-TAYEB *et al.*, 2021). No caso de melaleuca aconteceu o contrário posto que, os explantes expostos com BAP a absorção de fósforo foram baixos em comparação com os explantes exposta sem presença de BAP.

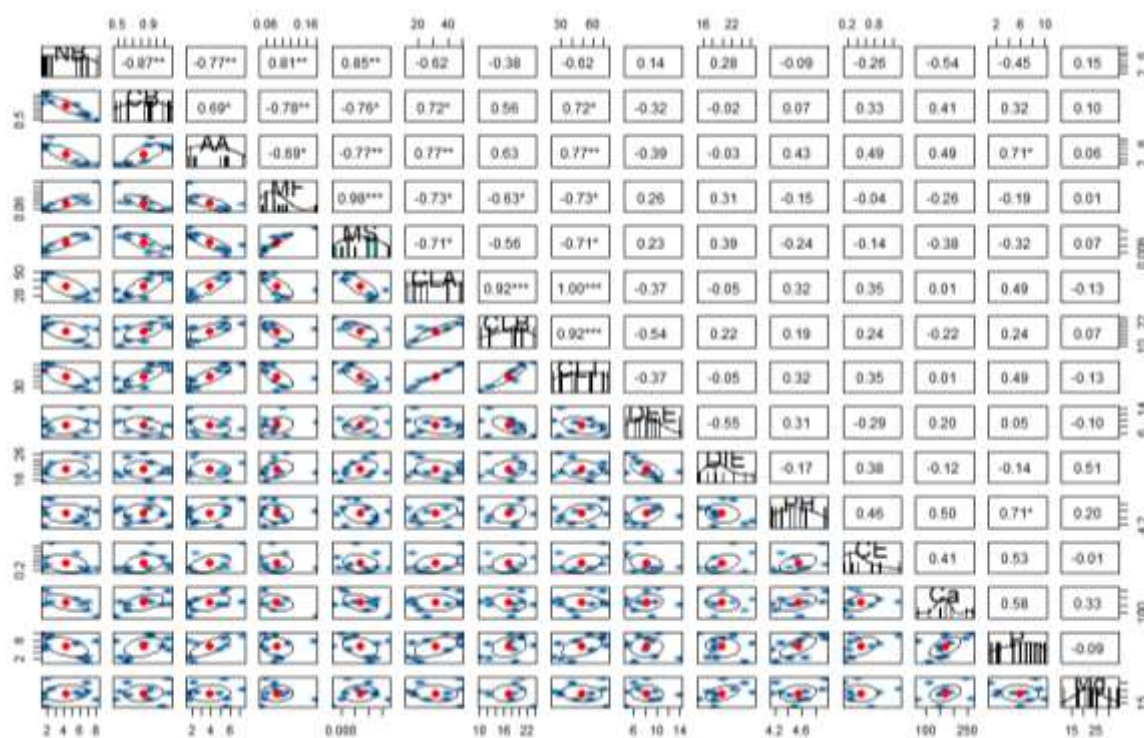
No entanto, os efeitos negativos do BAP na absorção de nutrientes, em altas concentrações de BAP podem inibir a absorção de certos nutrientes (BALESTRASSE *et al.*, 2011; GARCÍA-SÁNCHEZ *et al.*, 2021) como foram observados na absorção de fósforo em melaleuca. Além disso, o efeito das BAP na absorção de nutrientes pode depender de fatores como a espécie vegetal, a concentração e o tempo de exposição às BAP, bem como das condições ambientais.

De acordo com SCHOEFS (2002), a absorção de magnésio tem correlação com o teor de clorofila a e clorofila total. No entanto, no caso da melaleuca, essa correlação não foi observada, pode-se visualizar na Figura 17, 19 e 27. Os resultados mostraram que a luz vermelha, sem a adição de BAP, resultou em um dos valores mais altos de absorção de magnésio. Resultados semelhantes foram obtidos por SCHROETER-ZAKRZEWSKA; KLEIBER (2014), no qual esses autores reportaram que no espectro de luz LEDs vermelha a absorção de magnésio foram maiores ( $34,4 \text{ mg L}^{-1}$ ) em *Michaelmas daisy*. Nos espectros de luz branco e escuro tiveram o mesmo

comportamento de consumo, onde a maior absorção foi para os tratamentos que não tiveram presença de BAP, mas com presença de BAP em luz branca o resultado foi intermédio com luz vermelho e escuro.

Em relação aos espectros de luz LEDs azul, vermelha + branca e azul + vermelha, os resultados foram opostos aos dos demais espectros. A maior absorção de magnésio ( $28,83 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi observada no tratamento com luz LEDs vermelha + branca e presença de BAP, enquanto na mesma fonte de luz LEDs sem adição de BAP ao meio de cultivo, foi reportada uma média intermédia de absorção ( $17,83 \text{ mg L}^{-1}$ ) em comparação aos tratamentos com luz LEDs azul e azul + vermelha.

Para a Correlação e Análise de Componentes Principais foram modificados um dos fatores, onde o comprimento de onda do escuro foi retirado para avaliar as quinze variáveis do desenvolvimento de melaleuca, posto que no escuro melaleuca não desenvolveu, em fatorial  $2 \times 5$ . A correlação foi feita com Spearman ao nível de 5% de probabilidade a partir das médias (Figura 29).



\*\* =significativo a 1% de probabilidade





como entre MF e MS com valor absoluto de 0,98; assim como também CLA e CLB com valor absoluto de 0,92; CLB e CLT com valor absoluto de 0,92; obtendo em todas as correlações valores superiores a 0,69 em treze correlações positivas.

A análise de componentes principais (PCA) identificou a relação entre as quinze variáveis avaliadas em melaleuca. Esta análise revelou que o primeiro componente (PC1) explicou grande parte da variabilidade dos dados representando uma proporção de 50,29%, onde foi possível observar uma separação dos acessos pertencentes ao desenvolvimento de melaleuca, enquanto o segundo componente (PC2) contribuiu com 14,56% da explicação de variação dos dados (Figura 30).

As variáveis massa fresca (MF), massa seca (MS) y número de brotos (NB), estão altamente correlacionada com a presença de BAP no meio de cultura, intercaladp com o cultivo em LEDs branca e vermelha.

## **6 CONCLUSÕES**

Os resultados deste estudo mostraram uma forte interação entre a adição da citocinina 6-BAP ao meio de cultura e os comprimentos de onda fornecidos pelos LEDs utilizados no cultivo in vitro de melaleuca. O uso de 6-BAP teve efeitos significativos, aumentando o número de brotos/plantas, o que resultou em um aumento na massa fresca e seca, reduzindo a altura dos brotos, inibindo a taxa de enraizamento e diminuindo significativamente o teor de clorofila e a absorção de nutrientes, como o fósforo, das plantas in vitro. A luz branca pode ser utilizada como fonte de energia para o desenvolvimento das mudas.

## 7 LITERATURA CITADA

ANPSA – AUSTRALIAN NATIVE PLANTS SOCIETY. Melaleuca. Austrália, 2023. <https://anpsa.org.au/genera/melaleuca>

ARGENTEL L.M. Fonseca, I.R. GARATUZA, J.P. YAPEZ, E.G. GONZALEZ, J.A. Effect of salinity on calli of wheat varieties during *in vitro* culture, **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, v. 8, n. 3, p. 477 - 488, 2017.

BAKER, R.T. SMITH, H.G. On the australian melaleucas and their essential oils. **Journal and Proceedings of the Royal Society of New South Wales**, v. 27, p. 193 - 214, 1913.

BALESTRASSE, K.B. GALLEGRO, S.M. BENAVIDES, M.P. TOMARO, M.L. Response of antioxidant defense system in soybean nodules and roots subjected to boron stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 73, p. 20–26, 2011.

BANTIS, F. SMIRNAKOU, S. OUZOUNIS, T. KOUKOUNARAS, A. NTAGKAS, N. RADOGLU, K. Current status and achievements in the field of horticulture with the use of light-emitting diodes (LEDs). *Scientia horticultrae*. **Amsterdam**, v. 235, p. 437-451, 2018.

BEJAR, E. Tea tree Oil (*Melaleuca alternifolia* and *Melaleuca linariifolia*). *Botanical Adulterants Bulletin*, 2017.

BIAN, Z. CHENG, R. WANG, Y. YANG, Q. LU, C. Effect of green light on nitrate reduction and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L.) under short-term continuous light from red and blue light-emitting diodes. **Environmental and Experimental Botany**, v. 153, p. 63–71, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.010>

BAIRU, M.W. STIRK, W.A. DOLEZAL, K. STADEN, J.V. Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.90, n.1, p.15-23. 2007.

BAIRU, M.W. STIRK. W.A. STADEN, J.V. The role of topolins in micropropagation and somaclonal variation of banana cultivars “Williams” and “Grand Naine” (*Musa* spp. AAA). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, V.95, n.3, P.373-379. 2008.

BAIRU, M.W. JAIN, N. STIRK, W.A. DOLEZAL, K. STADEN, J.V. Solving the problem of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens* by changing the cytokinin types, calcium and boron concentrations in the medium. **South African Journal of Botany**, v.75, n.1, p.122-127. 2009.

BANTIS, F. SMIRNAKOU, S. OUZOUNIS, T. KOUKOUNARAS, A. NTAGKAS, N. RADOGLU, K. Current status and recent achievements in the field of horticulture with the use of light-emitting diodes (LEDs). *Scientia Horticultrae*, v.23, p.437–451. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.058>.

BARBOSA, J.C. JÚNIOR, W.M. Experimentação Agronômica e AgroEstat - Sistema Para Análises Estatísticas De Ensaio Agronômicos. Multipress, Jaboticabal, 2015.

BEYL, C. Getting started with tissue culture: Media preparation, sterile technique, and laboratory equipment, p. 11–26. In: R. Trigiano and D. Gray (eds.). *Plant tissue culture, development, and biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, FL. 2011.

BELLO-BELLO, J.J. MARTINEZ-ESTRADA, E. CAAMAL-VELAZQUEZ, J.H. MORALESRAMOS, V. Effect of LED light quality on *in vitro* shoot proliferation and growth of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). **Afr J Biotechnol**, v.15, p.272–277, 2016. <https://doi.org/10.5897/AJB2015.14662>

BENNETT, I.J. McCOMB, J.A. TONKIN, C.M. McDAVID, D.A.J. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. **Ann Bot**, v. 74, n. 1, p. 53–58, 1994.

BOWYER, J.R., LEEGOOD, R.C. Photosynthesis. In: DEY, P.M. HARBORNE, J.B. (eds): **Plant Biochemistry**. San Diego, Academic Press, p. 49 –110, 1997.

BUCHANAN-WOLLASTON, V. Senescence in Plants. **Encyclopedia of Life Sciences**, 2007.

BUDHIRAJA, S.S. CULLUM, M.E. SIOUTIS, S.S. EVANGELISTA, L. HABANOVA, S.T. Biological activity of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil component, terpinen-4-ol, in human myelocytic cell line HL-60. **Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics**, v. 22, n. 7, p. 447–453, 1999.

BUDIARTO, K. Spectral quality affects morphogenesis on Anthurium plantlet during *in vitro* culture. **Agrivita**, v.32, n.3, p.234, 2010. DOI: <http://doi.org/10.17503/agrivita.v32i3.20>

BROPHY, J.J. DORAN, J.C. Geographic Variation in Oil Characteristics in Melaleuca ericifolia. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, 2004.

BRUN, P. BERNABÈ, G. FILIPPINI, R. PIOVAN, A. *In vitro* Antimicrobial Activities of Commercially Available Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Essential Oils. **Current Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 108-116, 2019.

CALDEFIE-CHEZET, F. FUSILLIER, C. JARDE, T. LAROYE, H. DAMEZ, M. V et al. Potential anti-inflammatory effects of Melaleuca alternifolia essential oil on human peripheral blood leukocytes. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 364– 370, 2006.

CAMARGO, M.A.B. MARENCO, R.A. Density, size and distribution of stomata in 35 rainforest tree species in Central Amazonia. **Acta Amaz**, v. 41, p. 205–212, 2011.

CARSON, C.F. HAMMER, K.A. RILEY, T.V. Melaleuca alternifolia (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 19, n. 1, p. 50-62, 2006.

CASSELLS, A.C. CURY, R.F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.64, p.145-157. 2001.

CHEEL, E. Notes on melaleuca, with descriptions of two new species and a new variety. **Journal and Proceedings of the Royal Society of New South Wales** v. 58, p. 189–197, 1924.

<https://www.biodiversitylibrary.org/item/174132#page/227/mode/1up>

CHEN, B. et al. Mejora de la técnica de cultivo tisular para *Melaleuca alternifolia*. **J. Por. Res**, v. 27, p. 1265–1269, 2006.

CHRISTIE, J. M. Phototropin blue-light receptors. **Annual review of plant biology**, v. 58, p. 21–45, 2007.

CID, L.P.B. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, p. 17–21, 2001.

CIO´C, M. PAWLOWSKA, B. Leaf Response to Different Light Spectrum Compositions during Micropropagation of *Gerbera* Axillary Shoots. **Agronomy**, v. 10, p. 1-15, 2020.

COCA, M. ET AL. Cytokinin-induced delay of leaf senescence in *Solanum tuberosum* and *Arabidopsis thaliana* is accompanied by a decrease in transcript levels of senescence-associated genes. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 23, p.7347–7357, 2015.

COLTON, R. T. MUSTAGH, G. H. Cultivation of Tea Tree. In: SOUTHWELL, I.; LOWE, R. Tea Tree: The genus *melaleuca*. **Amsterdam: Harwood academic publishers**, p. 63-80. 2005.

COMIN, V.M. LOPES, L.Q. QUATRIN, P.M. DE SOUZA, M.E. BONEZ, P.C. PINTOS, F.G. RAFFIN, R.P. VAUCHER, R.A. MARTINEZ, D.S. SANTOS, R.C. Influence of *Melaleuca alternifolia* oil nanoparticles on aspects of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **Microbial Pathogenesis**, v. 25, n. 93, p. 120-125, 2016.

COSTA, L.C.B. PINTO, J.E.B.P. BERTOLUCCI, S.K.V. Comprimento da estaca e tipo de substrato na propagação vegetativa de atoveran. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 37, n. 4, p. 1157-1160, 2007.

COSTA, A.G. STORCK, R.C. ZUFFELLATO-RIBAS, K.C. MOGOR, A.F. Diferentes concentrações de ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de melaleuca. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 1, 2007.

CRAIG, D.S. RUNKLE, E. S. An intermediate phytochrome photoequilibria from nightinterruption lighting optimally promotes flowering of several long-day plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 121, p. 132–138, 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.04.004>

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. **New York: Columbia University Press**, p. 1260, 1981.

CRUZ, J.G. Qualidade de luz na micropropagação de mirtilheiro Woodard, 2017. 64. Dissertação (Mestrado) Programa de PósGraduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

CRUZ, J.G. PASA, M.daS. DIAS, C.S. LOY, F. COPATTI, A.S. SOMMER, L.R. DEUNER, S. MELLO-FARIAS, P.C. Light quality on *in vitro* multiplication and rooting of 'Woodard' blueberry. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i2.12790.

D'AGOSTINO, I.B. KEIBER, J.J. Molecular mechanisms of cytojinin action. **Current Opinion in Plant Biology**, v.2, n.5, p. 359–364, 1999.

DA SILVA, C. J. Morfoanatomia foliar e composição química dos óleos essenciais de sete espécies de Melaleuca L. (Myrtaceae), 2007.

DAVIES, P.J. The plant hormones: Their Nature, Occurence and Funtion, In: DAVIS, Ed., Plant Hormones: Physiology, biochemistry and biology. **Academic Publishers, Drodrecht**. pp. 1–12. 1995.

DEANS, S.G. WATERMAN, P.G. Biological activity of volatile oils. In: HAY, R.K.M. WATERMAN, P.G. Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production. **Essex: Longman Group**, p. 97–109, 1993.

DE KLERK, G.J. VAN DER KRIEKEN, W.M. De novo shoot formation in seedlings: a tool in plant biotechnology. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 35, n. 5, p. 457–464, 1999.

DOGAN, M. Effect of pre-treatment of zeatin on multiple shoot regeneration from leaf explants of aquatic plant *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. **Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences**, v.4, p.161–165, 2019. DOI: <https://doi.org/10.35229/jaes.557425>

DOGAN, M. The effectiveness of light emitting diodes on shoot regeneration *in vitro* from shoot tip tissues of *Limnophila aromatica* (Lamk.) Merr. and *Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. ex Roxb) Koehne, **Biotechnic & Histochemistry**, v. 94, p. 225 – 232, 2019. DOI: 10.1080/10520295.2019.1670359

EL-TAYEB, M. A. EL-ENANY, A.E. AHMED, N.A. ABDEEN, A.M. AL-AMRI, S.M. Benzylaminopurine and salicylic acid mitigates drought stress in wheat plants by regulating physiological and biochemical processes. **Plants**, v. 10, n. 1, p. 97, 2021.

ERIG, A.C. SCHUCH, M.W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural, 2005.

ESTRADA, E.M. CAAMAL, H. BELLO-BELLO, J.J. MORALES-RAMOS, V. Light emitting diodes improve *in vitro* shoot multiplication and growth of *Anthurium andreanum* lind. **Propagation of Ornamental Plants**, v.16, n.1, p.3-8, 2016.

FELIPE, L.O. SILVA JUNIOR, W.F.S. ARAÚJO, K.C. FABRINO, D.L. Lactoferrin, chitosan and *Melaleuca alternifolia*-natural products that show promise in candidiasis treatment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 212-219, 2018.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, N. PIQUERAS, A. De novo shoot organogenesis: from art to science. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 47, n. 3, p. 270–278. 2011.

FOLTA, K.M. Green Light Stimulates Early Stem Elongation, Antagonizing Light-Mediated Growth Inhibition. **Plant Physiology**, v. 135, n. 3, p. 1407 – 1416, 2004.

FORTINI, E.O. Potencial Fotoautotrófico *in vitro* e influência do espectro de luz e da radiação UV-B sobre o desenvolvimento de vitroplantas de *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae) 2017. 60 Dissertação (Mestrado em Botânica) Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-graduação em Botânica, Universidade Federal de Viçosa, MG, 2017.

FREITAS, E.O. Embriogênese somática e análises morfoanatômicas e por citometria de fluxo em açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) 2014. 73. Dissertação (Mestrado em ciência florestal) Departamento de Engenharia Florestal, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

FROTA, J.M. MEDEIROS DE ARAÚJO, M. LANCERDA, M.J. Fatores Inerentes À Micropropagação, **EMBRAPA**, 2006.

GARCÍA-SÁNCHEZ, F. MALDONADO-GONZÁLEZ, M.M. TOMÁS-PEJO, E. LÓPEZ-LÓPEZ, A. MARTÍN-MARTÍNEZ, J.A. Role of hormones and signaling molecules in plant metabolism under abiotic stress. In: Hakeem, K. R., Akhtar, M. S., Abdullah, S., eds. *Plant Signaling Molecules: Role and Regulation under Stressful Environments*. Springer, Cham, p. 349–370, 2021.

GASPAR, T. FRANCK, T. BISBIS, B. KEVERS, C. JOUVE, L. HAUSMAN, J.F. DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant growth regulation**, v. 37, p. 263 – 285, 2002.

GASPAR, T. KEVERS, C. PENEL, C. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 21, n. 1, p. 1–10, 1985.

GBIF Secretariat. *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel. In GBIF Backbone Taxonomy. 2022 DOI: <https://doi.org/10.15468/39omei>

GEROVAC, J.R. CRAVER, J.K. BOLDT, J.K. LOPEZ, R.G. Light Intensity and Quality from Sole-source Light-emitting Diodes Impact Growth, Morphology, and Nutrient Content of Brassica Microgreens, **HortScience**, v. 51, n. 5, p. 497 - 503, 2016. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.51.5.497>

GIORDANI, C. MOLINARI, A. TOCCACIELI, L. CALCABRINI, A. STRINGARO, A. CHISTOLINI, P. ARANCIA, G. DIOCIAIUTI, M. Interaction of Tea Tree Oil with Model and anes. **Journal of Medical Chemistry**, v. 69, p. 4581–4588, 2006.

GOMES, P.A. ÓLEO ESSENCIAL DA ERVA-BALEEIRA (*Cordia verbenacea* L.) DE ÁREAS NATIVAS. 2010. 69 F. Dissertação (Mestrado em produção vegetal) – Centro de Ciências e tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytcazes, Rio de Janeiro, 2010.

GUROVICH, L.A. SÁEZ, P.L. ACEVEDO, A.M. Adventitious rooting of microshoots derived from 8-week-old seedlings of *Eucalyptus globulus* Labill. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 9, n. 2, p. 95–98, 2009.

GRATTAPAGLIA, D. MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S. BUSO, J.A. (Ed.). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: **EMBRAPA/CBAB**, v.1, p. 183-260, 1998.

GUPTA, S. D. JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. **Plant biotechnology reports**, v.7, n. 3, p. 211-220, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11816-013-0277-0>

HALL, D.O. RAO, K.K. Coleção Temas de Biologia: Fotossíntese. Editora Pedagógica e Universitária Ltda, São Paulo. 89p, 1980.

HASSAN, F. A. ET AL. In vitro aging and its impact on micropropagation of potato *Solanum tuberosum* L. through node culture. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 6, 2019.

HARTMANN, H.T. KESTER, D.E. DAVIES, F.T. GENEVE, R.L. Plant Propagation: Principles and Practices. **Pearson Education**, 2011.

HARTMAN, J.M. Factors influencing establishment success of *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. **Blake in Everglades National Park**, p. 217–226, 1999.

HE, C. ZENG, Y. FU, Y. WU, J. LIANG. Q. Light quality affects the proliferation of *in vitro* cultured plantlets of *Camellia oleifera* Huajin. **PerrJ Plant Biology**, 2020. DOI 10.7717/peerj.10016

HERNÁNDEZ, R. KUBOTA, C. Physiological responses of cucumber seedlings under different blue and red photon flux ratios using LEDs. **Environmental and Experimental Botany**, v. 121, p. 66–74, 2016.

HILL, A. DE LEON, D. DERVIEUX, C. *Quillt: 'pkgdown' Template for the R Markdown Ecosystem*. <https://github.com/rstudio/quillt>, <https://pkgs.rstudio.com/quillt>. 2022

HOENECKE, M. BULA, R. TIBBITTS, T. Importance of 'Blue' Photon Levels for Lettuce Seedlings Grown under Red-light-emitting Diodes. **HortScience**, v.27, p.427-430, 1992.

HONG, S. YIN, M. The optimization for high-frequency proliferation of adventitious buds of *Emmenopterys henryi* Oliv. J. **Nuclear Agr. Sci.** v. 24, p. 532–536. 2010.

HOSSAIN, M.M. HASANUZZAMAN, M. FUJITA, M. Up-regulation of antioxidant and glyoxalase systems by exogenous glycine betaine and proline in mung bean confer tolerance to cadmium stress. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 23, n.1, p 171–183, 2017.

HU, C. Y. WANG, P.J. Meristem, shoot tip and bud cultures. In: EVANS, D.A. et al. **Handbook of plant cell culture, techniques for propagation and breedings**. New York: Mac-Millan, v. 1, p. 117-227, 1984.

IYAMA, C.M. CARDOSO, J.C. Micropropagation of *Melaleuca alternifolia* by shoot proliferation from apical segments. **Trees**, v. 35, p. 1497 – 1509. 2021. <https://doi.org/10.1007/s00468-021-02131-w>

INTERNATIONAL STANDARDS ORGANISATION. Oil of Melaleuca, terpinen-4-ol type (Tea Tree Oil). **International Standard ISO 4730:1996(E)**. Geneva, p. 8, 1996.

JARMYN, R.J. Vielseitig aber eigensinnig. Teebaumöl in Kosmetika und örpferpflegeprodukten. **Parfümerie und Kosmetik**, v. 79, p. 22-6, 1998.

JOHNS, M.R. JOHNS, J.E. RUDOLPH, V. Steam distillation of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 58, p. 49-53, 1992.

LEACH, D.N. WYLLIE, S.G. HALL, J.G. KYRATZIS, I. Enantiomeric composition of the principal components of the oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 627-32, 1993.

KIM, S.J. HAHN, E.J. HEO, J.W. PAEK, K.Y. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of *Chrysanthemum* plantlets *in vitro*. **Sci Hortic**, v. 101, n. 1, p. 143 – 151, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2003.10.003>

KONG, Q. ZHANG, L. NA, P. QI, J. YU, X. LU, J. REN, X. Antifungal mechanisms of  $\alpha$ -terpineol and terpene-4-alcohol as the critical components of *Melaleuca alternifolia* oil in the inhibition of rot disease caused by *Aspergillus ochraceus* in postharvest grapes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 4, p.1161-1174, 2019.

KOZAI, T. ZHANG, G. Some Aspects of the Light Environment. In: Kozai T. Fujiwara K. Runkle E. (eds) LED Lighting for Urban Agriculture. **Springer**. p. 49-55. 2016.

LAHKAR, S.; KUMAR DAS, M.; BORA, S. An Overview on Tea Tree (*Melaleuca Alternifolia*) Oil. **International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research (eIJPPR)**, v. 3, n. 3, p. 250–253, 2013.

LI, H. XU, Z. TANG, C. Effect of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 103, n.2, p.155-163, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9763-z>

LI, W.R. LI, H.L. SHI, Q.S. SUN, T.L. XIE, X.B. SONG, B. HUANG, X.M. The dynamics and mechanism of the antimicrobial activity of tea tree oil against bacteria and fungi. **Applied Microbial and Cell Physiology**, v. 100, n. 20, p. 8865- 8875, 2016.

LI, Q. KUBOTA, C. Effects of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce. **Environmental and Experimental Botany**, p. 67: 59–64, 2009. LICHTENTHALER, H.K. Methods in enzymology, v. 148, p. 350, 1987.



LICHTENTHALER, H.K. Wellburn, A.R. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, v. 603, p. 591-592, 1984.

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, Amsterdam**, v.150, p.86-91, 2013.

LIU, X. ZU, Y. FU, Y. YAO, L. GU, C. WANG, W. EFFERTH, T. Antimicrobial activity and cytotoxicity towards cancer cells of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **European Food Research and Technology**, v. 229, p. 247-253, 2009.

LORENZI, H. MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, p. 512, 2002.

LORENZI, H. SOUZA, H.M. TORRES, M.A.V. BACHER, L.B. Árvores exóticas no Brasil: madeiras ornamentais e aromáticas. **Nova Odessa, SP: Plantarum**, p.173, 2003.

LORI, A. GRAZIOLI, D. GENTILE, E. MARANO, G. SALVATORE, G. Acaricidal properties of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree oil) against nymphs of *Ixodes ricinus*. **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 1-2, p. 173–176, 2005.

LOTFI, M. MARS, M. WERBROUCK, S. Optimizing pear micropropagation and rooting with light emitting diodes and trans-cinnamic acid. **Plant Growth Regulation**, v. 88, n. 2, p. 173-180, 2019.

MAIDEN, J.H. BETCHE, E. Notes from the botanic gardens, Sydney n° 10. **Journal and Proceedings of the Royal Society of New South Wales**, v. 29, p. 734-750, 1905. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/30005#page/798/mode/1up>

MARÍN-MARTINEZ, L.A. IGLESIAS-ANDREU, L.G. Effect of LED lights on the *in vitro* growth of *Pinus pseudostrobus* Lindl., plant. **Journal of Forest Science**, v. 68, n. 8, p. 311–317, 2022. DOI: <https://doi.org/10.17221/43/2022-JFS>

MARTINHO, Z. F. RODRIGUES, S. A. *Melaleuca alternifolia* Cheel: avaliação preliminar no Litoral Norte de Santa Catarina Agropec. **Catarin**, 2009.

MARTINS, N. GONCALVES, S. PALMA, T. ROMANO. A. The influence of low pH on *in vitro* growth and biochemical parameters of *Plantago almogravensis* and *P. algarbiensis*. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** v. 107, p. 113–121, 2011.

MARTINUSSEN, I. NILSEN, G. SVENSON, L. JUNTILLA, O. RAPP, K. *In vitro* propagation of cloudberry (*Rubus chamaemorus*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 78, p. 43-49, 2004. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000020392.85854.28>

MEISEL, L.A. URBINA, D.C. PINTO, M.E. Fotorreceptores y respuestas de plantas a señales luminicas. *Fisiologia Vegetal*. Squeo, F.A y Cardemil, L. (eds). p. 1-10, 2011.

MIHOVILOVIĆ, A.B. JERČIĆ, I.H. PREBEG, T. TOMAZ, I. PAVIČIĆ, A. BARIĆ, M. KEREŠA, S. Light Source and Cytokinin Type Affect Multiplication Rate, Chlorophyll Content and Stomata Formation of *Amelanchier alnifolia* Shoots *in vitro*. **Journal of Central European Agriculture**, v. 21, n. 4, p. 826-838, 2020.

MORROW, R.C. LED lighting in horticulture. **HortScience, Stanfor**, v. 43, n. 7, p. 1947-1950, 2008.

MORSOLETO, F.M. NAKAGAWA, I.T. SANTOS, W.S. MORSOLETO, M. J. MORGADO, F.M. MATOS, A.P. Administration of essential oil of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) in experimental muscle injury by phonoforesis. **Microscopy and Microanalysis**. v. 5, p. 7980. 2015.

MULEO, R. MORINI, S. Light quality regulates shoot cluster growth and development of MM106 apple genotype *in vitro* culture. **Scientia Horticulturae**, v.108, p.364-370, 2006.

MUNEER, S. KIM, E.J. PARK, J.S. LEE. J.H. 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**, v.15, n.3, p.4657-4670, 2014. [10.3390/ijms15034657](https://doi.org/10.3390/ijms15034657)

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. "PubChem Compound Summary for CID 62389, 6-Benzylaminopurine" *PubChem*, 11 December, 2022. Accessed. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6-Benzylaminopurine>.

NISHIO, J.N. Why are higher plants green? Evolution of the higher plant photosynthetic pigment complement. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, n. 6, p. 539-548, 2000.

NOUMI, E. MERGHNI, A. ALRESHIDI, M.M. HADDAD, O. AKMADAR, G. DE MARTINO, L. MASTOURI, M. CEYLAN, O. SNOUSSI, M. AL-SIENI, A. DE FEO, V. *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: Models for Evaluating Anti-Quorum Sensing Activity of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil and Its Main Component Terpinen-4-ol. **Molecules**, v. 23, p. 2672-2688, 2018.

NGUYEN, CHI D. VU, D. HOU, H. PEARSON, B. Led light increases leaf area and root length of *Humulus lupulus* (var. Tettnanger) *in vitro*. Ifas Extension, University of Florida, 2020.

NHUT, D.T. TAKAMURA, T. WATANABE, H. TANAKA, M. Efficiency of a novel culture system by using light-emitting diode (LED) on *in vitro* and subsequent growth of micropropagated banana plantlets. In I International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants, **Acta Hort** v. 616 p.121-127. 2001.

NHUT, D.T. TAKAMURA, T. WATANABE, H. OKAMOTO, K. TANAKA, M. Responses of strawberry plantlets cultured *in vitro* under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.73 p.43-52, 2003.

NOVIČKOVAS, A. BRAZAITYTE, A. DUCHOVSKIS, P. JANKAUSKIENE, J. SAMUOLIENE, G. VIRSILE, A. SIRTAUTAS, R. BLIZNIKAS, Z. ZUKAUSKAS, A. Solid-state lamps (LEDs) for the shortwavelength supplementary lighting

in greenhouses: Experimental results with cucumber. **Acta Horticulturae**. v. 927, p. 723–730, 2012.

OLIVA, A. COSTANTINI, S. ANGELIS, M. GARZOLI, S. BOZOVIC, M. MASCELLINO, M.T. VULLO, V. RAGNO, R. High Potency of Melaleuca alternifolia Essential Oil against MultiDrug Resistant Gram-Negative Bacteria and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. **Molecules**, v. 23, p. 2584-2498, 2018.

OLIVEIRA, L.D. PAIVA, R. SANTANA, J.D. NOGUEIRA, R.C. SOARES, F.P. SILVA, L.C. Efeito de citocininas na senescência e abscisão foliar durante o cultivo *in vitro* de Annona glabra L. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.29, n.1, p.25-30, 2007.

OLIVEIRA, Y. DA-SILVA, A.L.L. PINTO, F. BIASI, L.A. Effect of cutting length in rooting of tea tree, **Scientia Agraria, Curitiba**, v.9, n.3, p.415–418, 2008.

OLIVEIRA, Y. PINTO, F. DA SILVA, A.L.L. GUEDES, I. BIASI, L.A. QUOIRIN, M. An efficient protocol for micropropagation of Melaleuca alternifolia Cheel. **In vitro Cell Dev Biol Plant**, v. 46, n. 2, p. 192 – 197, 2010. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9287-6>

OLMOS, E. GARCÍA-MARTÍNEZ, J.L. HELLÍN, E. Phenylurea cytokinins and senescence of carnation leaves. **Journal of Plant Physiology**, v. 153, n. 1–2, p.100–104, 1998.

PAUCEK, I. PENNISI, G. PISTILLO, A. APPOLLONI, E. CREPALDI, A. CALEGARI, B. SPINELLI, F. CELLINI, A. GABARRELL, X. ORSINI, F. GIANQUINTO, G. 2020. Supplementary LED interlighting improves yield and precocity of greenhouse tomatoes in the Mediterranean. **Agronomy**, v.10, n. 7, p. 1002, 2020. <https://doi.org/10.3390/agronomy10071002>

PAZYAR, N. YAGHOobi, R. BAGHERANI, N. KAZEROUNI, A. A review of applications of tea tree oil in dermatology. **International Journal of Dermatology**, v. 52, n. 7, p. 784-90, 2013.

PEREZ-VAZQUEZ, E.L. GUACÍN-DELGADO, J.M. RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, S.C. SARIÑANA-NAVARRETE, M.A. SINFUENTES, G.Z. ZUÑIGA-VALENZUELA, E. Conductividad eléctrica de la solución nutritiva efecto en el rendimiento y la calidad nutracéutica de pimiento morrón. **Rev. Mex. Cienc. Agríc**, Texcoco , v. 11, n. 7, p. 1669-1675, 2021. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i7.2409>

PÉREZ-TORNERO, O. ALLEVA, K. MIERSCH, O. GRECH-BARAN, M. RUEDELL, C.M. CARVALHO, D.D. BOLLER, T. Role of cytokinins in root growth responses to environmental stimuli. **Plants**, v. 8, n. 10, p. 377, 2019.

PÉREZ-TORNERO, O. EGEA-CORTINES, M. MORENO, V. Changes in peroxidase activity and isozyme pattern during adventitious rooting in mung bean hypocotyls. **Plant Growth Regulation**, v. 34, n. 1, p. 45-51, 2001.

PIEKARZ, T. MERTAS, A. WIATRAC, K. RÓJ, R. KOWNACKI, P. SMIESZEKWILCZEWSKA, J. KOPCZYN'SKA, E. WRZOL, M. CISOWSKA, M. SZLISZKA, E. CZUBA, Z.P. NIEDZIELSKA, I. MORAWIEC, T. The Influence of Toothpaste Containing Australian *Melaleuca alternifolia* Oil and Ethanollic Extract of Polish Propolis on Oral Hygiene and Microbiome in Patients Requiring Conservative Procedures. **Molecules**, v. 22, n. 1957, p. 2-18, 2017.

POUDEL, P.R. KATAOKA, I. MOCHIOKA, R. Effect of red-and blue-light-emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 92 p. 147-153, 2008.

PROENÇA, C.E.B. AMORIM, B.S. ANTONICELLI, M.C. BÜNGER, M. BURTON, G.P. CALDAS, D.K.D. COSTA, I.R. FARIA, J.E.Q. FERNANDES, T. GAEM, P.H. GIARETTA, A. LIMA, D.F. LOURENÇO, A.R.L. LUCAS, E.J. MAZINE, F.F. MEIRELES, L.D. OLIVEIRA, M.I.U. PIZZARDO, R.C. ROSA, P.O. SANTANA, K.C. SANTOS, L.L.D. SANTOS, M.F. SOUZA, M.C. SOUZA, M.A.D. STADNIK, A. STAGGEMEIER, V.G. TULER, A.C. VALDEMARIN, K.S. VASCONCELOS, T.N.C. VIEIRA, F.C.S. WALTER, B.M.T. Sobral, M. *Myrtaceae in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro*, 2022 Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB614966>.

RAMADAN, M.A. SHAWKEY, A.E. RABEH, M.A. ABDELLATIF, A.O. Expression of P53, BAX, and BCL-2 in human malignant melanoma and squamous cell carcinoma cells after tea tree oil treatment *in vitro*. **Cytotechnology**, v. 71, n. 1, p. 461- 473, 2019.

RAYACHHETRY, M.B. VAN, T.K. CENTER, T.D. Regeneration potential of the canopy-held seeds of *Melaleuca quinquenervia* in south Florida. **International Journal of Plant Science, Chicago**, v. 159, n. 4, p. 648–654, 1998.

REASE, J. Y E. BURST. Increased yield and suppression of shoot growth and nute populations of d anjou pear trees with nitrogen and paclobutrazol. **HortScience**, v.18, n.2, p.212-214. 1983. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.18.2.212>

REYNEL, C. PENNINGTON, R. PENNINGTON, T. FLORES, C. DAZA, A. (2003). Árboles útiles de la Amazonía Peruana. p. 50, 2003.

RIEDL, R. W. Practical methods for using tea tree oil. *Agro-Food Industry/Hi Tech. Ballina*, p. 34-36, 1997.

ROCHA, P.S.G. OLIVEIRA, R.P. SCIVITTARO, W.B. SANTOS, U.L. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. **Ciência Rural**, v.40, n. 09, p.1922- 1928, 2010.

SAMUOLIENĖ, G. SIRTAUTAS, R. BRAZAITYTĖ, A. DUCHOVSKIS, P. LED lighting and seasonality effects antioxidant properties of baby leaf lettuce. **Food Chemistry**, v.134, p. 1494–1499, 2012.

SARROPOULOU. V. SPERDOULI, I. ADAMAKIS, L.D. GRIGORIADOU, K. The use of different LEDs wavelength and light intensities on *in vitro* proliferation of cherry rootstock: influence on photosynthetic pigments, photosystem II photochemistry and

leaf anatomy. **Research square**, v. 1, p – 22, 2022. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1789324/v1>

SCHOEFS B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 361-371, 2002.

SCHROETER-ZAKRZEWSKA, A. KLEIBER, T. The effect of light colour and type of lamps on rooting and nutrient status in cuttings of michaelmas Daisy. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 20, n. 6, p. 1426-1434, 2014.

SENGER, H. The effect of blue light on plants and microorganisms. **Photochemistry and Photobiology**, v. 35, n. 6, p. 911-920, 1982.

SHI, M. YANG, L. YAN, G. DU, G. Effects of benzyladenine on senescence of cut rose flowers. **HortScience**, v. 50, n. 9, p. 1382–1385, 2015.

SHI, X. YANG, L. YAN, G. DU, G. Medium pH between 5.5 and 7.5 has Minimal Effects on Tissue Culture of Apple. **HortScience**, v. 52, n.3, p. 478-478, 2017.

SILVA, S.R.S. DEMUNER, A.J. BARBOSA, L.C. de A. CASALI, V.W.D. NASCIMENTO, E.A. PINHEIRO, A.L. Efeitos do estresse hídrico sobre características de crescimento e a produção de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Acta Scientiarum, Maringá**, v. 24, n. 5, p. 1363-1368, 2002.

STANDARDS AUSTRALIA. Oil of *Melaleuca*, terpinen-4-ol type (Tea Tree Oil). **Australian Standard**, 1997.

SOUZA, C.F. BALDISSERA, M.D. DESCOB, S. ZEPPEFELD, C. ESLAVAMOCHA, P.R. GLORIA, E.M. ZANETTE, R.A. BALDISSEROTTO, B. SILVA, A.S. *Melaleuca alternifolia* essential oil abrogates hepatic oxidative damage in silver cat fish (*Rhamdia quelen*) fed with na aflatoxin-contaminated diet. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 221, p. 10-20, 2019.

TAIZ, L.E. ZEIGER, E. MOLLER, I.M. MURPHY, A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**, Artmed, 6a ed. Porto Alegre, 2017.

TICHÁ, I. RADOCHOVÁ, B. KADLEČEK, P. Stomatal morphology during acclimatization of tobacco plantlets to ex vitro conditions. **Biol. Plant**, v. 42, p. 469–474, 1999.

TADEU, R.O. Influência dos subcultivos e da qualidade da luz na morfogênese *in vitro* em *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) 2017. Dissertação (Mestrado em Produção vegetal). Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2017.

TERMIGNONI, R. R. Cultura de tecidos vegetais. **Porto Alegre: Editora UFRGS**, 2005.

TEIXEIRA, J.A. Is BA (6-Benzyladenine) BAP (6-Benzylaminopurine)? **The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology**. v.6, n. 1, p. 121-124. 2012.

TONG, M.M. ALTMAN, P.M. BARNETSON, R.S. Tea tree oil in the treatment of *Tinea pedis*. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 33, p. 145–149, 1992.

UCKER, C.D.L. Óleo Essencial de Sementes e Folhas de *Syzygium cumini* e Óleo desodorizado de *Melaleuca alternifolia*: Potencial Antimicrobiano e Antioxidante. 2016. 167 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

VALDÉS, A.E. REINOSO, H. GÓMEZ-CADENAS, A. MERINO, F. Senescence and rooting of leaf explants in *Nicotiana plumbaginifolia*. **Plant Science**, v. 168, n. 3, p. 677–682, 2005.

WATSON, L. DALLWITZ, M.J. 1992 - The Families of Flowering Plants: Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval. v. 19. 1992. <http://biodiversity.uno.edu/delta/>

WHITELAM, G. HALLIDAY, K. Light and plant development. **Blackwell: Oxford, UK**, 2007.

WILSON, P.G. O'BRIEN, M.M. GADEK, P.A. QUINN, C.J. Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups. **American Journal of Botany**, v. 88, p. 2013-2025, 2001.

WOODALL, S.L. Seed dispersal in *Melaleuca quinquenervia*. **Florida Scientist, Orlando**, v. 45, n. 2, p. 81-93, 1982.

WU, M.C. HOU, C.Y. JIANG, C.M. WANG, Y.T. WANG, C.Y. CHEN, H.H. CHANG, H.M. A novel approach of LED light radiation improves the antioxidant activity of pea seedlings. **Food Chemistry**, v. 101 n.4, p. 1753-1758, 2007.

XAVIER, A.; WENDLIG, I.; SILVA, R. L. da. Biologia da propagação clonal. In: XAVIER, A.; WENDLIG, I.; SILVA, R. L. da. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas**. Viçosa: MG: Ed. UFV, 2009, p. 24-58.

YU, D. WANG, J. SHAO, X. XU, F. WANG, H. Antifungal modes of action of tea tree oil and its two characteristic components against *Botrytis cinerea*. **Journal Applied Microbiology**, v. 119, n. 5, p. 1253-1262, 2015.

ZHANG, X. GUO, Y. GUO, L. JIANG, H. JI, Q. *In vitro* Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1-8, 2018.

ZHENG, L. VAN, L.M-C. Long-Term Effects of Red- and Blue-Light Emitting Diodes on Leaf Anatomy and Photosynthetic Efficiency of Three Ornamental Pot Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 917, p 1-12, 2017.

ZHOU, Z. XU, D. LING, K. HUANG, L. QIU. Z.H. Effects of calcium ions and pH values on the growth and nutrient uptake of teak (*Tectona grandis*) tube seedlings. J. Cent. South Univ. **Forestry Technol** v. 29, p. 1–5, 2009.