

Fonte de luz e concentração de sacarose no cultivo *in vitro* da cana-de-açúcar (RB 867515)

Light source and sucrose concentration on *in vitro* culture of sugarcane (RB 867515)

Lais Tomaz Ferreira¹, Marina Medeiros de Araújo Silva^{2*}, Carla Renata de Macêdo¹, Lilia Willadino¹

RESUMO

O cultivo *in vitro* é uma importante ferramenta para a propagação da cana-de-açúcar, e diferentes fatores podem interferir na exequibilidade desta técnica, tais como a composição do meio de cultura e o microambiente ao qual as plantas são expostas. O presente estudo teve como objetivo avaliar as respostas de plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* sob duas diferentes fontes de iluminação associadas ou não à redução da concentração de sacarose no meio de cultura. Para tanto, plantas da variedade RB 867515 foram cultivadas, durante as etapas de multiplicação e enraizamento, em meio MS acrescido de 1,5 ou 3% de sacarose e expostas a iluminação convencional por lâmpadas fluorescentes brancas ou sob LEDs brancos. Respostas quanto ao crescimento variaram entre os tratamentos, contudo, o uso de 3% de sacarose, independentemente da fonte de luz, favoreceu o desenvolvimento radicular. Maior número de brotações por explante e menor densidade estomática da superfície foliar adaxial foi obtida com 1,5% de sacarose e uso de LED. Esta fonte de luz também propiciou maior biossíntese de pigmentos fotossintéticos nas folhas, independentemente da concentração de sacarose utilizada. Deste modo, o uso de LEDs brancos se mostrou satisfatório, principalmente quando associado à redução da sacarose no meio de cultura, sendo recomendado para a micropropagação da variedade estudada, uma vez que promove maior formação de brotações e o desenvolvimento satisfatório das plantas, além de permitir que os custos de produção sejam reduzidos.

Palavras-chave: Carboidrato, LED, qualidade da luz, micropropagação, *Saccharum* spp.

ABSTRACT

In vitro culture is an important tool for the propagation of sugarcane, and different factors may affect the feasibility of this technique, such as the composition of the culture medium and the microenvironment to which the plants are exposed. This study aimed to evaluate the responses of sugarcane grown *in vitro* under two different light sources associated or not with the reduction of the sucrose concentration in the culture medium. Therefore, plants of the variety RB 867515 were grown during the multiplication and rooting steps in MS medium supplemented with 1.5 or 3% sucrose and exposed to conventional white fluorescent lamps or under white LEDs. Growth responses ranged between the treatments; however, the use of 3% sucrose, regardless of the light source, favored root development. Highest number of shoots per explant and low stomatal density on adaxial leaf surface was obtained with 1.5% sucrose and the use of LED. This light source also favored the biosynthesis of photosynthetic pigments in leaves, regardless of the sucrose concentration used. Thus, the use of white LEDs were satisfactory, particularly when associated with the reduction of sucrose in the culture medium, being recommended for micropropagation of the variety studied, since it promotes higher shoot formation and satisfactory development of plants, besides minimizing the production cost.

Keywords: Carbohydrate, LED, light quality, micropropagation, *Saccharum* spp.

INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) ocupa posição de destaque no setor econômico e é uma das principais culturas agrícolas do Brasil, país considerado como o maior produtor mundial (Conab, 2015). A propagação de plantas das diferentes variedades desta espécie tem sido obtida rotineiramente através das técnicas de propagação *in vitro* (Kaur e Sandhu, 2015). Convencionalmente os recipientes onde são cultivadas as plantas *in vitro* têm como característica a alta umidade relativa, reduzidas

trocias gasosas e fluxo de fótons, além de meio de cultura com elevada concentração de carboidratos; sendo assim, as plantas neste sistema exibem metabolismo heterotrófico ou mixotrófico (Kozai, 2010) e podem apresentar desordens anatômicas e metabólicas que acarretam em baixas taxas de sobrevivência durante a aclimatização (Hazarika, 2006).

Diante disso, diferentes estratégias vêm sendo utilizadas, tais como o aumento da intensidade luminosa nas salas de crescimento, o ajuste do teor de açúcares no meio de cultura e o emprego de sistemas de ventilação dos

Recebido em 26 de Abril de 2016 e aprovado em 18 de Outubro de 2016

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE, Recife, PE, Brasil

²Instituto Nacional do Semiárido/Insa/MCTI, Campina Grande, PB, Brasil

*Autor para correspondência: marinamedeirosas@yahoo.com.br

recipientes (Pospíšilova et al., 2007; Saéz et al., 2012; Silva et al., 2014), visando criar um ambiente mais favorável para o desenvolvimento das plantas *in vitro*. A concentração da fonte de carbono adicionada ao meio de cultura pode influenciar significativamente o desempenho do cultivo, devido aos seus efeitos sobre o aporte de energia para o explante e a manutenção do potencial osmótico do meio (Ribeiro et al., 2015). A presença de sacarose no meio de cultura é indispensável para a multiplicação da cana-de-açúcar, contudo, a concentração empregada pode ser ajustada de acordo com a fonte de luz à qual as plantas estão expostas (Rocha, Oliveira e Scivittaro, 2013).

A quantidade e qualidade da luz estão diretamente relacionadas ao crescimento e desenvolvimento das plantas. Nesse sentido, o uso de diodos emissores de luz (LED) em substituição às lâmpadas fluorescentes vem ganhando destaque no cultivo *in vitro* de plantas de distintas espécies, como orquídea (Mengxi et al., 2011), crisântemo (Kim et al., 2004) e banana (Vieira et al., 2015; Wilken et al., 2014). Os LEDs permitem, dentre outras vantagens, o controle do espectro de luz emitido, além de possuírem baixo consumo de energia e maior durabilidade (Gupta e Jatothu, 2013). Lâmpadas fluorescentes ainda são largamente utilizadas na micropropagação da cana-de-açúcar, embora alguns estudos com LEDs, especialmente com espectro vermelho e azul, isoladamente ou em combinação, já venham sendo realizados (Maluta et al., 2013; Rocha, Oliveira e Scivittaro, 2013; Silva et al., 2014). Assim, o objetivo desta pesquisa foi investigar a associação do uso de LEDs brancos e lâmpadas fluorescentes com a redução da sacarose no meio de cultura durante o cultivo *in vitro* da cana-de-açúcar.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de cultivo

Plantas *in vitro* de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp., variedade RB 867515), fornecidas pela Usina Santa Teresa (Goiana, PE), foram cultivadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962) líquido, acrescido de 1,5 ou 3% de sacarose e 0,88 μM de 6-benzilaminopurina (BAP), com pH ajustado para 5,8. Aos 15 dias de cultivo, as plantas foram subcultivadas

para o mesmo meio e, após mais 15 dias, transferidas para meio de enraizamento, composto por sais e vitaminas de MS acrescido de 1,5 ou 3% de sacarose e 0,54 μM de ácido α -naftalenoacético (ANA), onde permaneceram por 30 dias, totalizando 60 dias em cultivo *in vitro*. Durante todo este período as plantas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e sob duas diferentes fontes de iluminação: lâmpadas fluorescentes brancas (FL - 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e LEDs brancos - RGB (LB - 77 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). O espectro de luz emitido pelas diferentes fontes de luz foi obtido utilizando o espectrógrafo Ocean Optics modelo USB2000 (Figura 1).

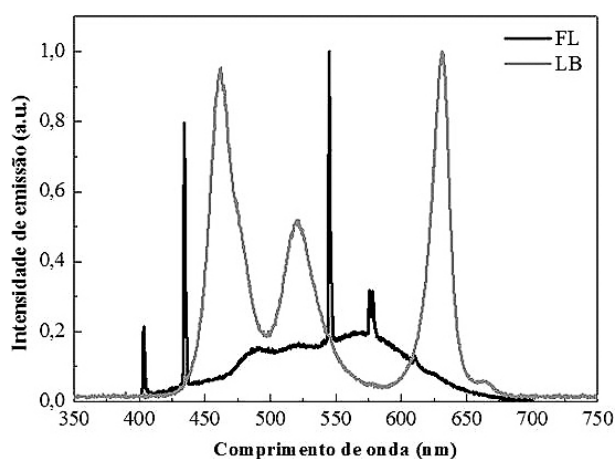


Figura 1 – Distribuição da energia espectral em lâmpadas fluorescentes (FL) e LEDs brancos - RGB (LB).

Parâmetros de crescimento

A cada subcultivo foi contabilizado o número de perfilhos e após 30 dias de enraizamento *in vitro* foram medidas a altura da parte aérea, o comprimento da raiz, a massa da matéria fresca e seca da parte aérea e radicular, o número de folhas e o total de brotações formadas por explante.

Densidade estomática

Foi utilizada a técnica de impressão epidérmica (Segatto, Bisognin e Benedetti, 2004), empregando éster de cianoacrilato (adesivo instantâneo universal) para a contagem do número de estômatos por mm^2 na superfície foliar adaxial e abaxial. Foram analisados, em microscópio (Olympus CH30), 15 campos obtidos da região mediana da segunda folha das plantas.

Taxa de perda de água (TPA)

A TPA foi determinada utilizando a metodologia e a equação proposta por Dami e Hughes (1995): $TPA (\%) = [(MF_0 - MS) - (MF_t - M_s)] \times 100 / (MF_0 - MS)$, onde MF_0 corresponde a massa fresca no tempo 0, MF_t a massa fresca aferida a cada 15 minutos até o tempo total de 75 minutos, e MS a massa seca.

Teor de pigmentos fotossintéticos

Amostras de 0,1 g de folhas foram maceradas em acetona 80% e, após a filtragem e a centrifugação do extrato, a leitura foi feita em espectrofotômetro UV-visível, por meio dos comprimentos de onda de 663, 645 e 470 nm, para clorofilas (Chl *a* e Chl *b*) e carotenoides (Car), respectivamente. Os valores foram calculados através da aplicação das equações relatadas por Lichtenthaler (1987).

Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 (2 sistemas de iluminação x 2 concentrações de sacarose), utilizando 30 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por uma planta individualizada em tubo de ensaio. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando o programa SISVAR versão 5.3 (Ferreira, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Plantas cultivadas sob FL associadas ao uso de 3% de sacarose apresentaram maior altura, massa fresca e seca da parte aérea quando comparado ao uso de 1,5%, sendo o mesmo resultado observado para número de folhas (Tabela 1). Entretanto, para as plantas expostas ao LED, as maiores médias de altura e massa fresca da parte aérea foram observadas com o uso de 1,5% de sacarose. Diferentemente, para a variedade RB 872552 de cana-de-açúcar, o comprimento das brotações foi menor com a redução da concentração de sacarose em todas as fontes de luz estudadas (Rocha, Oliveira e Scivittaro, 2013).

As plantas expostas ao LED também apresentaram médias superiores para altura de parte aérea e número de folhas quando comparadas às plantas cultivadas sob FL com a mesma concentração de sacarose (Tabela 1), demonstrando o efeito positivo do espectro emitido pelo LED, o qual permitiu um bom desenvolvimento das plantas mesmo com a redução da disponibilidade de carboidrato no meio de cultura. Portanto, pode-se inferir que a qualidade do espectro de luz também contribui para as diferentes respostas de crescimento observadas nas plantas cultivadas *in vitro*. Resultados positivos com o uso de LED branco também foram obtidos por Wilken et al. (2014), que constataram um crescimento mais vigoroso de *Musa* spp. em comparação ao uso de FL.

Tabela 1 – Parâmetros de crescimento, número de brotações por explante e densidade estomática em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp., variedade RB 867515) cultivadas *in vitro* durante 60 dias, com duas concentrações de sacarose (1,5 e 3%) e dois sistemas de iluminação (FL e LB).

Variáveis	FL		LB	
	1,5%	3%	1,5%	3%
Altura da parte aérea (cm)	7,5 bB	7,9 aA	10,17 aA	7,7 bA
Comprimento da raiz (cm)	1,6 bA	2,8 aA	1,9 bA	2,5 aA
Massa fresca da parte aérea (g)	0,15 bA	0,21 aA	0,19 aA	0,13 bB
Massa fresca da raiz (g)	0,011 bA	0,030 aA	0,015 bA	0,033 aA
Massa seca da parte aérea (g)	0,017 bA	0,032 aA	0,022 aA	0,020 aB
Massa seca da raiz (g)	0,0020 bA	0,0035 aA	0,0010 bA	0,0049 aA
Nº de folhas	4,0 bB	6,0 aA	5,0 aA	5,0 aA
Nº de brotações/explante	12,6 aB	9,7 bB	20,8 aA	17,0 bA
Nº de estômatos/mm ² - Adaxial	150,6 aA	130,3 bA	124,0 aB	129,0 aA
Nº de estômatos/mm ² - Abaxial	205,0 aA	189,0 aA	178,0 aA	167,3 aA

Médias seguidas de letras iguais, minúsculas para concentração de sacarose e maiúsculas para sistema de iluminação, não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A redução de sacarose em 50% da concentração usual no meio de cultura influenciou negativamente no desenvolvimento radicular após 60 dias de cultivo *in vitro*, apresentando médias de comprimento da raiz e de massa fresca e seca da raiz inferiores aos tratamentos com maior concentração de sacarose, independentemente da fonte de luz utilizada (Tabela 1). De fato, o processo de rizogênese *in vitro* requer energia disponível no explante, sendo esta fornecida por uma fonte exógena de carboidratos (em sistemas heterotróficos ou mixotróficos) (George, 1996). A sacarose contribui para o crescimento das raízes, pois atua na expansão e proliferação celular (Wang e Ruan, 2013). Melhores respostas quanto ao enraizamento de cana-de-açúcar (RB 872552) foram obtidas com concentrações usuais (3%) de sacarose (Rocha, Oliveira e Scivittaro, 2013).

O número total de brotações formadas por explante, ao final dos 60 dias de cultivo *in vitro*, foi maior nos tratamentos expostos ao LED branco, especialmente quando utilizado 1,5% de sacarose (Tabela 1). A luz é um sinal que é recebido por fotorreceptores, os quais regulam a diferenciação e o crescimento das plantas (Li, Tang e Xu, 2013). A qualidade da luz emitida pelos LEDs tem promovido melhorias significativas na morfogênese e diferenciação em diferentes espécies cultivadas *in vitro* (Gupta e Jatothu, 2013). No entanto, os efeitos e mecanismos associados com a qualidade da luz podem ser peculiares às espécies ou cultivares (Li, Tang e Xu, 2013), e essa especificidade parece estar relacionada as distintas respostas encontradas quanto a formação de brotações em variedades de cana-de-açúcar expostas a diferentes espectros de luz. Na variedade CTC-07, Maluta et al. (2014) obtiveram melhores médias com o uso de lâmpadas fluorescentes, enquanto Silva et al. (2014) constataram que LEDs com proporções de luz azul e vermelha propiciaram maior perfilhamento na variedade RB 92579. Já para a RB 872552, Rocha, Oliveira e Scivittaro (2013) encontraram interação significativa entre fonte de luz e quantidade de sacarose, inferindo que a concentração ótima desse carboidrato deve ser ajustada de acordo com o espectro de luz utilizado, sendo, nesse caso, recomendado para a obtenção de

um maior número de brotações o uso de 3% de sacarose quando da exposição aos LEDs vermelhos, lâmpadas Growlux e fluorescentes brancas.

Maior densidade estomática na superfície foliar adaxial foi observada com o uso de FL e 1,5% de sacarose em relação ao tratamento com 3% e ao LED associado a 1,5% de sacarose (Tabela 1). A qualidade e quantidade de luz interferem na formação e atividade estomática (Kim et al., 2004) e, comumente, o aumento na formação de estômatos nas plantas está relacionado ao uso de LEDs (Liu et al., 2014; Vieira et al., 2015). No entanto, neste trabalho, uma maior densidade estomática foi observada na superfície foliar adaxial de plantas cultivadas sob FL, assim como verificado por Ma et al. (2015), no cultivo *in vitro* de *Solanum tuberosum* sob diferentes espectros de luz.

Plantas provenientes do cultivo *in vitro* apresentam baixa capacidade de controle da perda de água por transpiração, devido ao limitado ou reduzido funcionamento estomático e a má formação da camada de ceras cuticulares nas folhas (Hazarika, 2006). A fim de prevenir o estresse hídrico e reduzir as perdas durante a fase de aclimatização, estratégias como a adição de agentes osmóticos ao meio de cultura, o aumento do nível de irradiância e o uso de ventilação têm sido utilizadas (Saéz et al., 2012; Silva et al., 2015).

No presente estudo, as plantas cultivadas sob maior irradiância (LB) não diferiram estatisticamente daquelas mantidas sob FL em relação à taxa de perda de água (Figura 2), mesmo tendo apresentado uma menor densidade estomática (Tabela 1). Tal fato pode estar relacionado ao espectro do LED branco, o qual emite fótons de comprimento de onda na região do azul (Figura 1), sendo a abertura dos estômatos controlada por fotorreceptores deste espectro de luz (Darko et al., 2014). Portanto, a perda de água em plantas do tratamento LB pode ser associada com a abertura estomática devido à presença da luz azul. Tal evento também foi observado por Schimdt et al. (2015), no cultivo *in vitro* de *Carica papaya*.

Teores de pigmentos fotossintéticos foram maiores nas plantas cultivadas sob LED branco, independentemente da concentração de sacarose. O conteúdo de clorofila (*a*, *b* e total) nas folhas de *Musa acuminata* variaram em resposta as diferentes fontes

de luz estudadas, apresentando valores mais altos com a exposição ao LED branco e LED branco/vermelho distante em comparação a FL (Vieira et al., 2015). No cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar (RB 92579) também foram observados maiores teores de Chl (*a* e total) com o uso de LED branco em relação ao de proporções de LED azul/vermelho (Silva et al., 2014).

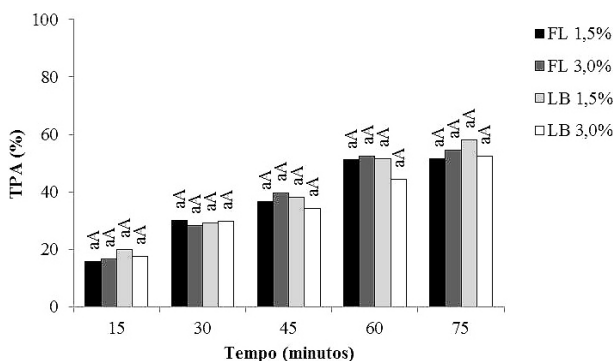


Figura 2 – Taxa da perda de água em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp., variedade RB 867515) cultivadas *in vitro* durante 60 dias, com duas concentrações de sacarose (1,5 e 3%) e dois sistemas de iluminação (FL e LB). Médias seguidas de letras iguais, minúsculas para concentração de sacarose e maiúsculas para sistema de iluminação, não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A qualidade da luz influencia na composição dos pigmentos, os quais desempenham papel importante no funcionamento do aparato fotossintético (Darko et al., 2014). A luz azul está envolvida na biossíntese de clorofila, abertura estomática e no desenvolvimento dos cloroplastos (Vieira et al., 2015); e a presença deste espectro no LED branco - RGB (Figura 1) pode ter contribuído para os maiores teores de clorofila encontrados neste tratamento.

Quanto ao conteúdo de carotenoides, maiores médias foram observadas em plantas cultivadas sob LEDs brancos. Este fato pode conferir vantagens às plantas durante a fase de aclimatização, uma vez que este pigmento acessório também atua na fotoproteção das moléculas de clorofila, dissipando o excesso de energia luminosa (Ramel, Mialoundama e Havaux, 2013). Em plantas expostas à lâmpada fluorescente, o teor de carotenoides foi maior quando utilizado 3% de sacarose

(Figura 3). Este resultado foi corroborado por Legha et al. (2012), que verificaram que a produção de carotenoides em culturas de calo de *Calendula officinalis* aumentou progressivamente com a concentração de sacarose no meio, e que essa acumulação é resultante do aumento das atividades metabólicas.

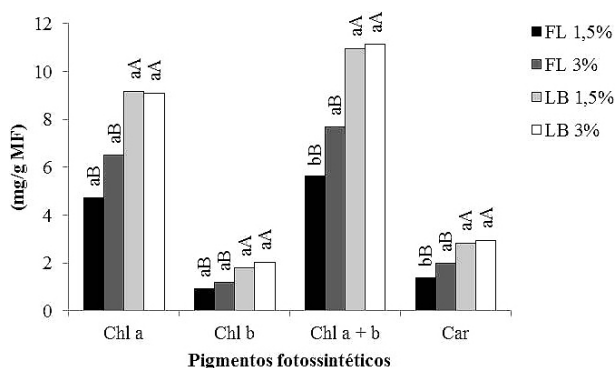


Figura 3 – Teor de pigmentos fotossintéticos em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp., variedade RB 867515) cultivadas *in vitro* durante 60 dias, com duas concentrações de sacarose (1,5 e 3%) e dois sistemas de iluminação (FL e LB). Médias seguidas de letras iguais, minúsculas para concentração de sacarose e maiúsculas para sistema de iluminação, não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

CONCLUSÕES

Considerando o conjunto de respostas exibidas pelas plantas, é possível evidenciar o elevado potencial de uso dos LEDs brancos para o cultivo *in vitro* da cana-de-açúcar (RB 867515), especialmente para a fase de multiplicação, uma vez que promove o desenvolvimento de um maior número de brotações por explante, mesmo com redução da concentração de sacarose em 50%. Esta fonte de luz também propiciou maior teor de clorofilas e carotenoides. Por sua vez, a concentração usual de sacarose (3%) na fase de enraizamento, resultou em melhor desenvolvimento do sistema radicular, tanto sob LED quanto sob lâmpadas fluorescentes. Em razão dos resultados obtidos neste trabalho, além da redução no consumo de energia e de emissão de calor, torna-se relevante a utilização de lâmpadas LEDs na micropropagação de cana-de-açúcar.

AGRADECIMENTO

A Usina Santa Tereza (Goiana, PE) por ter cedido as plantas de cana-de-açúcar utilizadas na condução dos experimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar - safra 2015/2016**. Brasília: Conab, 2015. 18p.
- DAMI, I.; HUGHES, H. Leaf anatomy and water loss of *in vitro* PEG-treated 'Valiant' grape. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 42(2):179-184, 1995.
- DARKO, E. et al. Photosynthesis under artificial light: The shift in primary and secondary metabolism. **Philosophical and Transactions of the Royal Society B**. 369(1640):1-7, 2014.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**. 35(6):1039-1042, 2011.
- GEORGE, E. F. **Plant Propagation by Tissue Culture**. Part 2: In Practice. Edington: Exegetics, 1996. 1361p.
- GUPTA, S. D.; JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. **Plant Biotechnology Reports**. 7(3):211-220, 2013.
- HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**. 108(2):105-120, 2006.
- KAUR, A.; SANDHU, J. S. High throughput *in vitro* micropropagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) from spindle leaf roll segments: Cost analysis for agri-business industry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 120(1):339-350, 2015.
- KIM, S. J. et al. Effects of LED on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets *in vitro*. **Scientia Horticulturae**. 101(2):143-151, 2004.
- KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation - Environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**. 10(4):188-204, 2010.
- LEGHA, M. R. et al. Induction of carotenoid pigments in callus cultures of *Calendula officinalis* L. in response to nitrogen and sucrose levels. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**. 48(1):99-106, 2012.
- LI, H. M.; TANG, C.; XU, Z. The effects of different light quantities on rapeseed (*Brassica napus* L.) plantlet growth and morphogenesis *in vitro*. **Scientia Horticulturae**. 150:117-124, 2013.
- LICHTENTHALER, H. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**. 148:350-382, 1987.
- LIU, M. et al. Evaluation of leaf morphology, structure and biochemical substance of balloon flower (*Platycodon grandifolium* (Jacq.) A. DC.) plantlets *in vitro* under different light spectra. **Scientia Horticulturae**. 174:112-118, 2014.
- MA, X. et al. Effects of green and red lights on the growth and morphogenesis of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets *in vitro*. **Scientia Horticulturae**. 190:104-109, 2015.
- MALUTA, F. A. et al. Cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar exposta a diferentes fontes de luz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 48(9):1303-1307, 2013.
- MENGXI, L. et al. Effects of different spectral lights on *Oncidium* PLBs induction, proliferation, and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 106:1-10, 2015.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. 15(3):473-497, 1962.
- POSPÍŠILOVA, J. et al. Acclimation of plantlets to *ex vitro* conditions: Effects of air humidity, irradiance, CO₂ concentration and abscisic acid. **Acta Horticulturae**. 748:29-38, 2007.
- RAMEL, F.; MIALOUNDAMA, A. S.; HAVAUX, M. Nonenzymic carotenoid oxidation and photooxidative stress signalling in plants. **Journal of Experimental Botany**. 64(3):799-805, 2013.
- RIBEIRO, M. F. et al. A. Fontes de carbono na multiplicação *in vitro* de porta-enxertos de marmeleiro 'MC' e 'Adams'. **Plant Cell Culture & Micropropagation**. 11(2):54-61, 2015.
- ROCHA, P. S. G.; OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B. Sugarcane micropropagation using light emitting diodes and adjustment in growth-medium sucrose concentration. **Ciência Rural**. 43(7):1168-1173, 2013.

- SAÉZ, P. L. et al. Increased light intensity during *in vitro* culture improves water loss control and photosynthetic performance of *Castanea sativa* grown in ventilated vessels. **Scientia Horticulturae**. 138:7-16, 2012.
- SCHMILDT, O. et al. Photosynthetic capacity, growth and water relations in 'Golden' papaya cultivated *in vitro* with modifications in light quality, sucrose concentration and ventilation. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**. 27(1):7-18, 2015.
- SEGATTO, F. B.; BISOGNIN, D. A.; BENEDETTI, M. Técnica para o estudo da anatomia da epiderme foliar de batata. **Ciência Rural**. 34(5):1597-1601, 2004.
- SILVA, M. M. A. et al. Effect of blue/red LED light combination on growth and morphogenesis of *Saccharum officinarum* plantlets *in vitro*. **Progress in Biomedical Optics and Imaging**. Bellingham, 8947:89471X, 2014.
- SILVA, M. M. A. et al. Response of *Ricinus communis* L. to *in vitro* water stress induced by polyethylene glycol. **Plant Growth Regulation**. 78(2):195-204, 2015.
- VIEIRA, L. N. et al. Light-emitting diodes (LED) increase the stomata formation and chlorophyll content in *Musa acuminata* (AAA) 'Nanicão Corupá' *in vitro* plantlets. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**. 27(2):91-98, 2015.
- WANG, L.; RUAN, Y. L. Regulation of cell division and expansion by sugar and auxin signaling. **Frontiers in Plant Science**. 30(4):1-9, 2013.
- WILKEN, D. et al. Effect of immersion systems, lighting, and TIS designs on biomass increase in micropropagating banana (*Musa* spp. cv. 'Grande naine' AAA). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**. 50(5):582-589, 2014.