



**CARLA CAROLYNNE RESUENO COELHO**

**CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Pogostemon Cablin*  
SOB INTENSIDADES LUMINOSAS E LEDs**

**LAVRAS – MG**

**2016**

**CARLA CAROLYNNE RESUENO COELHO**

**CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Pogostemon cablin* SOB INTENSIDADES  
LUMINOSAS E LEDs**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Cultivo e Manejo Sustentável em Plantas Medicinais, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci  
Orientadora

Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto  
Coorientador

**LAVRAS – MG  
2016**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Coelho, Carla Carolynne Resueno.

Crescimento *in vitro* de *Pogostemon cablin* sob intensidades  
luminosas e leds / Carla Carolynne Resueno Coelho. – Lavras :  
UFLA, 2016.

69 p. : il.

Dissertação(mestrado acadêmico)–Universidade Federal de  
Lavras, 2016.

Orientadora: Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

Bibliografia.

1. Patchouli. 2. LEDs. 3. Cultivo . I. Universidade Federal de  
Lavras. II. Título.

**CARLA CAROLYNNE RESUENO COELHO**

**CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Pogostemon cablin* SOB INTENSIDADES  
LUMINOSAS E LEDs**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Cultivo e Manejo Sustentável em Plantas Medicinais, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 20 de maio de 2016

Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto	UFLA
Prof. Dr. Ricardo Monteiro Corrêa	IFMG/BambuÍ
Dra. Fernanda Ventorim Pacheco	UFLA

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci  
Orientadora

**LAVRAS – MG**

**2016**

*Aos meus pais e irmão.*

*À minha amada avó Fortunata (in memoriam).*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, que todos os dias de minha vida me dá forças para nunca desistir.

A meus pais, Francisco e Socorro, ao meu irmão Francisco, meu infinito agradecimento. Sempre acreditaram em minha capacidade e me acharam a melhor de todas, mesmo não sendo. Isso só me fortaleceu e me fez tentar, não ser a melhor, mas a fazer o melhor de mim. Obrigada pelo amor incondicional!

A todos os meus familiares, avós, primos, tios, madrinhas e namorado. Não citarei nomes, para não me esquecer de ninguém. Mas há aquelas pessoas especiais, Vô Carlos, Vó Conceição, tia Marcia, tio André, Maila e Wellington, que diretamente me incentivaram.

Às minhas amigas de fé que sempre estiveram rezando por mim Jaomara, Lillian e Ariely e ao meu amigo, Pablo Wenderson, pelo apoio. Aos meus amigos que Deus colocou em minha vida e se fizeram minha família em Lavras, Sillas, Pedro, Jonas, Karen, Luiz, Daniela e Matheus. Às amigadas que o mestrado me proporcionou, tornando mais leve meu trabalho, Livia, Krisnanda, Simony, Bety, Fatinha, João e Marília.

Aos meus orientadores, prof. Suzan e Zé Eduardo, pela orientação que me foi passada. Aos técnicos do laboratório, Evaldo e Giulia, meus sinceros agradecimentos pelo apoio de vocês na condução do experimento. Aos meus colegas do laboratório pelos momentos divididos juntos.

A todos que, de certa forma, ajudaram-me direta ou indiretamente, meus sinceros agradecimentos, pois ninguém vence sozinho.

Com vocês, divido a alegria desta experiência!

*“E todos os nossos imprevistos  
já estavam previstos por Deus”*

(Autor desconhecido)

## RESUMO GERAL

*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth, popularmente conhecida como patchouli, é uma espécie aromática, que possui grande valor comercial, especialmente, na perfumaria pelo óleo essencial extraído de suas folhas. Todavia a propagação dessa espécie em condições de campo sofre grandes perdas em função das incidências de doenças e falta de conhecimento de fatores técnicos para seu cultivo. Assim a cultura de tecidos pode ser uma técnica que beneficie a cadeia produtiva dessa espécie. Porém, para sua aplicação na propagação de plantas, é necessário adequar fatores como o meio de cultivo, regime de luz, qualidade e intensidade de luz, dentre outros. Objetivou-se avaliar a influência da intensidade e qualidade luminosa no crescimento de plântulas de patchouli cultivadas *in vitro*, submetidas a diferentes intensidades e espectros de luz. Os explantes foram cultivados sob as intensidades luminosas 28, 51, 64, 76 e 113  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , com 4 repetições cada. Para qualidade luminosa, foram usados lâmpadas de LEDs, com 6 tratamentos, LEDs de cor branca, vermelha, azul, azul e vermelha (1:3), azul e vermelha azul (3:1) e vermelha e azul (1:1), com 4 repetições. Após 40 dias foram feitas as avaliações de crescimento e pigmentos fotossintéticos. Os resultados observados mostram que a intensidade e qualidade luminosa influenciaram o crescimento de *P. Cablin*. O tratamento com 76  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  obteve melhores resultados para número de folhas, comprimento de raiz, biomassa seca de raiz e biomassa seca total. Para os pigmentos fotossintéticos os maiores teores foram observados com 51  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Os LEDs nas combinações de espectros azul e vermelho (1:3) e branca obtiveram os melhores valores de crescimento. Faz-se necessário avaliar, ainda, a influência desses regimes luminosos, na composição química volátil de plântulas *in vitro* e aclimatizadas, para que possa ser estabelecido um método de micropropagação da espécie.

**Palavras-chave:** Patchouli. Qualidade Luminosa. Planta aromática.



## GENERAL ABSTRACT

*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth, commonly known as patchouli, is an aromatic species of great commercial value, especially for perfumeries, due to the essential oil extracted from its leaves. However, the propagation of this species under field conditions suffers losses due to the incidence of diseases and to the lack of knowledge of technical factors that affect its cultivation. Therefore, tissue culture is a technique that can benefit the production chain of this species. However, for its application on plant propagation, it is necessary to adapt factors such as cultivation medium, light regime, light quality and intensity, etc. With this work, we aimed at evaluating the influence of light quality and intensity over the growth of patchouli plantlets cultivated *in vitro*, submitted to different intensities and light spectrums. The explants were cultivated under the light intensities of 28, 51, 64, 76 and 113  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , with four replicates each. For light quality, we used LED lamps, with six treatments in the colors white, red, blue, blue and red (1:3), blue and red (3:1), and blue and red (1:1), with four replicates. After 40 days, growth and photosynthetic pigment analyses were performed. The results showed that light intensity and quality influenced the growth of *P. cablin*. The treatment with 76  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  obtained the best results for number of leaves, root length, root dry biomass and total dry biomass. For the photosynthetic pigments, the highest contents were verified with 51  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . The LEDs in the combinations of blue and red (1:3) and white spectrums obtained the best growth values. It is necessary to evaluate the influence of this light regime over volatile chemical composition of plantlets cultivated *in vitro* and acclimatized in order to establish a micropropagation method for this species.

**Keywords:** Patchouli. Light quality. Aromatic plant.

## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 - Hábito (A) e detalhe da morfologia foliar (B) de plantas de *Pogostemon cablin*. ..... 15
- Figura 2 - Principais estruturas dos compostos de *Pogostemon cablin*. ..... 18

### SEGUNDA PARTE - ARTIGO 1

- Figura 1 - Plântulas de *P. cablin* micropropagadas..... 45
- Figura 2 - Explantes de *P. cablin* utilizados nos experimentos de intensidade e qualidade luminosa. .... 46
- Figura 3 - Espectros de luz utilizados no experimento. .... 48
- Figura 4 - Plântulas de *Pogostemon cablin*, cultivadas *in vitro*, durante 40 dias, sob diferentes intensidades luminosas (28, 51, 64, 76 e 113  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). ..... 51
- Figura 5 - Crescimento de *Pogostemon cablin* cultivadas em meio MS, sob intensidades luminosas de 28, 51, 64, 76 e 113  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , durante 40 dias. .... 52
- Figura 6 - Crescimento de *Pogostemon cablin* cultivadas em meio MS, sob LEDs branca, azul, vermelha, azul e vermelha (1:1), azul e vermelha (3:1) e azul e vermelha (1:3), durante 40 dias. .... 57
- Figura 7 - Plântulas de *Pogostemon cablin*, cultivadas *in vitro* em meio MS, sob LEDs branca, azul, vermelha, azul e vermelha (1:1), azul e vermelha (3:1) e azul e vermelha (1:3), durante 40 dias. .... 58

## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE

- Tabela 1 - Pigmentos fotossintéticos de *Pogostemon cablin*, cultivadas *in vitro*, durante 40 dias, sob diferentes intensidades luminosas (28, 51, 64, 76 e 113  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). .....55
- Tabela 2 - Pigmentos fotossintéticos de *Pogostemon cablin*, cultivadas *in vitro*, durante 40 dias, sob LEDs branca, azul, vermelha, azul e vermelha (1:1), azul e vermelha (3:1) e azul e vermelha (1:3), durante 40 dias. .... 60

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	13
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
2.1 Aspectos gerais do <i>Pogostemon cablin</i> .....	15
2.2 Cultura de tecidos.....	19
2.3 Cultivo <i>in vitro</i> de patchouli.....	21
2.4 Influência da luz no cultivo <i>in vitro</i> .....	23
2.5 Uso de LED's no cultivo <i>in vitro</i> .....	25
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	29
<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGO</b> .....	39
<b>ARTIGO 1 - Crescimento <i>in vitro</i> de <i>Pogostemon cablin</i> sob intensidades luminosas e LEDs</b> .....	39
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	43
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	45
2.1 Obtenção do Material Vegetal e Condições Experimentais.....	45
2.2 Ensaio de Intensidade Luminosa.....	46
2.3 Ensaio de Qualidade Luminosa.....	47
2.4 Quantificação dos Pigmentos Fotossintéticos.....	49
2.5 Análise estatística.....	49
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	51
3.1 Efeito da Intensidade de Luz.....	51
3.2 Efeito da Qualidade de Luz.....	56
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	63
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	65

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth, popularmente conhecida como patchouli, é uma espécie aromática, pertencente à família Lamiaceae. Essa espécie possui grande valor comercial pelo óleo essencial extraído de suas folhas que é largamente utilizado pela indústria de cosmético, perfumaria e farmacêutica. Ele é considerado o 18º óleo essencial com maior importância comercial no mundo, com uma demanda mundial estimada em 2 mil t/ano (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009; TIME..., 2009).

A propagação convencional desta espécie é por estaquia apresentando alguns problemas que afetam a produção de biomassa e o rendimento do óleo essencial. O baixo rendimento do óleo essencial deve-se à suscetibilidade da planta a diversos tipos de vírus e ao nematoide *Meloydogine incógnita* (KUKREJA; MATHUR; ZAIM, 1990). Além disto, a propagação por estaquia é lenta e insuficiente para cultivo em larga escala. Assim, a propagação *in vitro* é uma alternativa viável, para obtenção de plantas livres de patógenos e, também, possibilita a propagação, em larga escala, em um período de tempo, relativamente, curto, por meio da técnica de micropropagação.

A micropropagação, sob condições adequadas de assepsia, nutrição e fatores ambientais, possibilita a propagação em larga escala de plantas de qualidade superior (CID, 2001; OLIVEIRA, 2000), como já realizado para propagar diversas espécies frutíferas, arbóreas, ornamentais, medicinais e aromáticas. No entanto, a técnica é influenciada por vários fatores como o genótipo, reguladores de crescimento, meio de cultivo, concentrações de sacarose, luz, temperatura, dentre outros (REIS et al., 2009).

A luz pode ser considerada um dos fatores de maior relevância no cultivo *in vitro*, pois regula a morfogênese vegetal e atua como fonte de energia

no metabolismo primário assim como no processo fotossintético. As respostas morfofisiológicas das plantas não dependem apenas da presença ou ausência da luz, mas também da variação da intensidade e qualidade luminosa (MARTINS, 2006).

Zhang et al. (2009) observaram em brotos de *Momordica grosvenori*, cultivados *in vitro* com 25, 50, 100, ou 200  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , que a intensidade de luz mais alta (200  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) promoveu um aumento na massa seca e fresca total das plântulas. Plantas de *Platycodon grandiflorum* cultivadas *in vitro* apresentaram maior área foliar e número de folhas sob LED de espectro azul, quando comparada à LED de espectro vermelho e lâmpadas fluorescentes (LIU et al., 2014). Assim a dependência das condições luminosas no cultivo *in vitro* variam entre as espécies.

Desta forma, o presente trabalho objetivou avaliar a influência da intensidade e qualidade luminosa com o uso de LED, no crescimento e produção de pigmentos fotossintéticos de plântulas de patchouli, a fim de verificar as condições luminosas mais propícias, para o cultivo *in vitro* da espécie, em razão de sua importância comercial e exigências de métodos de propagação alternativos.

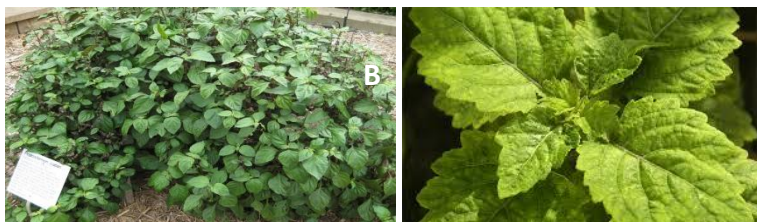
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos gerais do *Pogostemon cablin*

O *Pogostemon cablin* Benth, conhecido popularmente como patchouli, pertencente à família Lamiaceae, é uma planta aromática, cujo óleo essencial é considerado um dos melhores fixadores usados na indústria de perfumes (BETTONI et al., 2010). Nativa das Filipinas, a espécie cresce, espontaneamente, em muitos países do Sul da Ásia e é, atualmente, cultivada em escala comercial na Índia, Indonésia, Malásia, China, Cingapura, África Ocidental e Vietnã (MAHESWARI, et al., 1993; SWAMY et al., 2010).

O patchouli apresenta porte arbustivo, ereta, ramificada, que chega a atingir de 0,5 a 1,0 m de altura (FIGURA 1). Apresenta folhas ovais a alongadas, com aproximadamente 10x10 cm, serradas, pecíolo com 8 cm e ramos com nós e acumula óleo essencial nos tricomas glandulares (GUO et al., 2013). A inflorescência é terminal ou axilar, densa, com 2,4 a 14 cm de comprimento e apresenta flores pequenas e irregulares, bissexuais, brancas a roxas (JOY et al., 2001; MAHANTA; CHUTIA; SARMA, 2007). Desenvolve-se melhor, em ambientes sombreados, em temperaturas entre 24°C e 28°C, precipitação pluviométrica de 2.000 a 3.000 mm anuais e altitude de 0 a 1.200 m, sendo preferível entre 10 e 400 m, com umidade relativa do ar de 75% (JOY et al., 2001).

Figura 1 - Hábito (A) e detalhe da morfologia foliar (B) de plantas de *Pogostemon cablin*.



Fonte: Araujo (2008).

O patchouli pode ser propagado por meio de sementes ou por estaquia. Geralmente, a produção de mudas é realizada por estaquia, pois a produção de sementes é determinada pelas condições de cultivo, sendo rara em alguns ambientes (KUKREJA; MATHUR; ZAIM, 1990). O cultivo, no campo, do patchouli apresenta alguns problemas que afetam o rendimento do óleo essencial.

Entre alguns fatores que contribuem, para um baixo rendimento do óleo essencial, está a suscetibilidade da planta a diversos tipos de vírus e ao nematoide *Meloydogine incognita*. Entre os vírus que infectam o patchouli está o vírus do anel do pimentão (tobravírus), *tabacco necrosis necrovirus* (Necrovirus), *patchouli potexvirus*, *patchouli mosaic potyvirus*, *patchouli mottle virus* (PaMoV), *patchouli mild virus* (PaMMV), *patchouli mottle Rhabdovirus* (GAMA; CALDAS; KATAJIMA, 1980; KITAJIMA; COSTA, 1979; KUKREJA; MATHUR; ZAIM, 1990; MEISSNER FILHO et al., 2002; SUGIMURA et al., 2005).

Das folhas secas do *Pogostemon cablin* extrai-se, geralmente, por hidrodestilação o óleo essencial que é um dos 18 principais óleos essenciais de importância comercial no mundo, sendo largamente empregado na indústria de perfumes (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). Esse óleo essencial ocupa uma posição proeminente, nesta indústria, por ser um dos óleos essenciais naturais mais importantes, sendo utilizado para dar um caráter básico e duradouro a uma fragrância. Esta característica é a principal responsável pela grande valorização comercial deste óleo no mercado (KUKREJA; MATHUR; ZAIM, 1990). O óleo essencial, produzido por patchouli, consiste em um líquido viscoso âmbar, de coloração pálida a castanho escuro.

A demanda por óleo essencial de patchouli vem crescendo, em um ritmo acelerado, nos mercados nacionais e internacionais, em virtude de sua ampla utilização pela indústria de cosmético, perfumaria e farmacêutica (ZHAO et al.,



2005). A Indonésia e Índia são os maiores produtores de óleo de patchouli, no mundo, onde a Indonésia é responsável por 90% da produção mundial (BARATA; VILHA; CARVALHO, 2007; RAMYA; PALANIMUTHU; RACHNA, 2013).

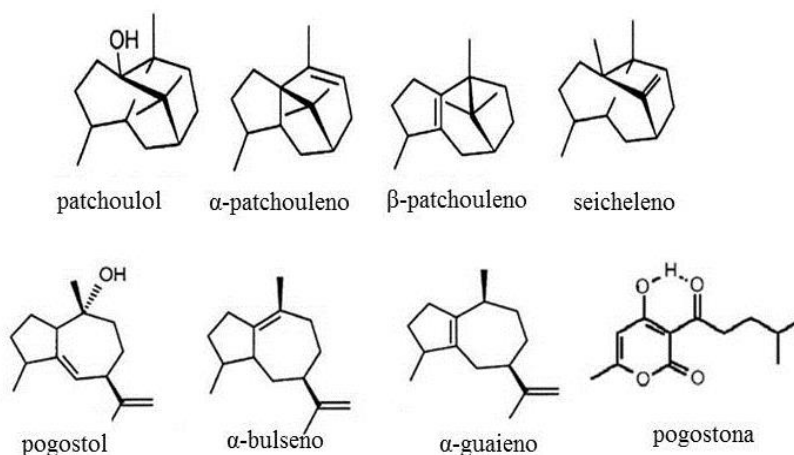
O óleo essencial do patchouli possui atividade inseticida, antibacteriana e antifúngica (CHAKRAPANI et al., 2013; KUMARA; ANURADHA, 2011). Algumas de suas outras atividades biológicas incluem antioxidante, analgésica, anti-inflamatória, antiplaquetário, antitrombótico, antimutagênica e atividades citotóxicas (CHAKRAPANI et al., 2013; LIU et al., 2009; PRIYA; SWATI; VILASRAO, 2014). Na aromaterapia, é usado para aliviar a depressão, diminuir o estresse, acalmar os nervos, controlar o apetite e para melhorar o interesse sexual.

Essas propriedades são atribuídas à constituição química do óleo essencial que se trata, principalmente, de terpenos. Dentre os terpenos, os sesquiterpenos são os mais encontrados e podem influenciar, sensivelmente, o odor nos óleos essenciais (CASTRO et al., 2004; SANGWAN; FAROOQI; SHABIH, 2001). Vários trabalhos têm demonstrado a presença de alguns sesquiterpenos, na composição dos óleos essenciais de *P. cablin*, os quais apresentam várias atividades farmacêuticas e biológicas (HSU et al., 2006). Estudos iniciais mostraram que o patchoulol inibe fortemente a multiplicação do vírus H1N1 (gripe espanhola ou suína tipo A) e o H2N2 (gripe asiática tipo A) (KIYOHARA et al., 2012; WU et al., 2011; WU; LIN, 2013).

Contudo a composição química, qualitativa e quantitativa do óleo de patchouli varia bastante. É encontrada, em diversos estudos, uma grande variedade de compostos, com registros de 65 monos e sesquiterpenos, sendo o patchoulol,  $\beta/\alpha$  patchouleno, pogostol,  $\alpha$  bulneseno,  $\alpha$  guaieno, seicheleno e pogostona (FIGURA 2) os mais descritos pela literatura (SINGH; SHARMA; RAMESH, 2002; WEI; SHIBAMOTO, 2007; ZHU et al., 2003). A ausência de

substituto sintético, para o patchoulol, constituinte majoritário do óleo essencial, reforça a sua posição de destaque na indústria de perfumes e óleos essenciais (HENDERSON et al., 1970; SANTOS et al., 2010).

Figura 2 - Principais estruturas dos compostos de *Pogostemon cablin*.



Fonte: Swamy e Sinniah (2015).

Em razão dessa grande variedade química observada nos óleos essenciais obtidos de plantas da família Lamiaceae verifica-se a existência de quimiotipos para diferentes espécies (VIEIRA; COSTA, 2006). Em estudo realizado por Hu et al. (2006), com 18 amostras do óleo essencial de *P. cablin*, coletados em diferentes regiões da China, foram observados dois quimiotipos, o tipo pogostona, tipo patchoulol e um tipo intermediário. Luo et al. (2003), também, observaram a existência dos dois quimiotipos de patchouli, tipo pogostona e tipo patchoulol, identificados por cromatografia gasosa. Dessa forma, os componentes patchoulol e pogostone podem auxiliar no controle de qualidade deste óleo, ajudando a distinguir substitutos ou adulterantes (HU et al., 2006).

## 2.2 Cultura de tecidos

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica com grandes aplicações na agricultura. Nessa técnica, pequenos fragmentos de tecido vivo, chamados explantes, são isolados de um organismo vegetal, desinfestados e cultivados, assepticamente, por períodos indefinidos em plantas idênticas à original, ou seja, realizam clonagem vegetal de modo a obter novo indivíduo, mantendo-se o genótipo idêntico àquele do ancestral comum (TORRES et al., 2001).

A regeneração de plantas, por meio da cultura de tecidos, baseia-se no princípio da totipotência, proposto pelo fisiologista Haberlandt, que, em 1902, enunciou que cada célula vegetal possuía o potencial genético para regenerar uma planta inteira (FLORES, 2006). O cultivo *in vitro* permite, ainda, aperfeiçoar a interação entre fatores abióticos (nutricionais, luminosos, temperatura, dentre outros) e bióticos (hormonais e genéticos), resultando em plantas saudáveis, vigorosas e geneticamente superiores, que podem ser multiplicadas massivamente (ALVES et al., 2012).

No Brasil, os trabalhos realizados sobre cultura de tecidos foram feitos, pioneiramente, no Instituto Biológico de São Paulo, na década de 50. Atualmente, existem dezenas de laboratórios utilizando metodologias diversificadas de manipulação de plantas *in vitro*, desenvolvendo trabalhos no campo da engenharia genética como, por exemplo, plantas de batata resistentes ao vírus PVY (TORRES; CALDAS; FERREIRA, 1998). Assim trata-se de uma técnica que propicia avanços nas diferentes áreas do conhecimento.

Em plantas medicinais, a cultura de tecidos apresenta vantagens como reprodutibilidade, possibilidade de produção em grande escala, direcionamento para a produção de substâncias de interesse, facilidade de isolamento de composto, pois o isolamento de compostos bioativos de plantas obtidas por extrativismo ou cultivo em campo representam obstáculo para os estudos farmacêuticos e industriais (NITZCHE et al., 2004). Assim o cultivo *in vitro*,

também, pode auxiliar na propagação clonal de diversos genótipos, permitindo a conservação do germoplasma e a otimização da produção de metabólitos secundários que tenham relevância do ponto de vista terapêutico e que, por algum tipo de impedimento, não são sintetizados (ARIKAT et al., 2004; BOTTA; SILVESTRINI; MONACHE, 2001; RAO; RAVISHANKAR, 2002).

No entanto, para a aplicação dessa técnica com plantas medicinais é necessário adequar alguns fatores como o meio de cultivo, regime de luz, qualidade e intensidade de luz e a ação dos reguladores de crescimento, fatores que maximizam a produção dos metabólicos (MARCHESE; FIGUEIRA, 2005).

Reis et al. (2009) avaliaram diferentes meios de cultura, para *Melissa officinalis* L. e observaram que os meios MS e MS/4 promoveram a formação de plântulas com maior teor de óleo essencial e, também, promoveram a alteração no componente majoritário do óleo. Machado et al. (2013) observaram em *Lavandula. angustifolia* cv. 'Provence blue', cultivadas em meio de cultura MS, com diferentes concentrações de citocinina 6-benzilaminopurina (BAP), que a concentração de 1,0 $\mu$ M foi a mais recomendada, para a manutenção da qualidade das brotações, na fase de multiplicação, com baixa taxa de hiperidricidade e não promoção da necrose apical nas brotações. Tais autores, também, constataram que a síntese dos compostos majoritários como o linalol e o acetato de linalila não é afetada por esse fitoregulador.

Plântulas de *Alocasia amazonica* regeneradas sob intensidades luminosas de 15 ou 30  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  mostraram um melhor crescimento e desenvolvimento do que as cultivadas sob intensidades de 60 e 90  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (JO et al., 2008). Foram observados, em acessos de *Chrysopogon zizanioides* (L.) (vetiver), cultivados *in vitro*, sob dois regimes de temperatura 18 e 25°C, que a melhor condição de cultivo *in vitro* foi com a temperatura 18°C (SANTOS et al., 2012).

Neste contexto, verifica-se que o cultivo *in vitro* de plantas medicinais é influenciado pelo meio nutritivo, tipos e condições fisiológicas dos explantes, genótipos, condições de cultivo e pelos fitoreguladores. Assim, é de fundamental importância trabalhos que verifiquem as diferentes respostas das plantas frente a esses fatores para uma melhor adequação do cultivo *in vitro*.

### 2.3 Cultivo *in vitro* de patchouli

A regeneração direta de brotos é uma via importante para propagação de vários tipos de plantas (GAHAN; GEORGE, 2008). Na família Lamiaceae, muitas espécies têm sido micropropagadas com este método, sendo os reguladores de crescimento utilizados com maior sucesso, a 6-benzilaminipurina (BAP) e a cinetina (6-furfurilaminopurina), isolados ou em combinação com as auxinas, ácido indol-3-acético (AIA) ou ácido naftalenoacético (ANA). O tipo de explante responsável pela melhor resposta para este propósito tem sido o segmento nodal, porém bons resultados, também, foram obtidos para o segmento foliar e hipocótilo (BOUHOUCHE; KSIKSI, 2007; CUENCA; AMO-MARCO, 2000; RANI et al., 2006; SKALA; WYSOKINSKA, 2004).

Arrignon-Blank, Santos e Blank (2011) observaram que a organogênese direta do patchouli pode ser promovida em meio MS acrescido de  $2,47 \text{ mg L}^{-1}$  de cinetina e  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de ANA, sendo as etapas de alongamento, individualização e enraizamento das brotações promovidas em meio MS básico. Explantes nodais de *P. cablin* foram submetidos à organogênese direta, cultivados em meio MS, utilizando várias concentrações de BAP e KN (0,25, 0,5 e  $1,0 \text{ mg / l}$ ), separadamente ou em combinações. Comparativamente, BAP mostrou o efeito mais pronunciado do que o KN em termos de indução de brotações, também, apresentou melhores respostas para comprimento médio de brotos (KUMARASWAMY; ANURADHA, 2010). Meristemas apicais cultivados em meio MS suplementado com  $2,0 \text{ mg BA}$  ou  $0,5-2,0 \text{ mg 2iP}$  ou  $0,5-2,0 \text{ mg}$

zeatina e 1,0 mg IAA/L exibiram bons resultados para proliferação múltipla de brotos (KUKREJA; MATHUR; ZAIM, 1990).

Swamy, Balasubramanya e Anuradha (2010) utilizaram segmentos apicais e nodais de patchouli, em meio MS, suplementado com 0,5 mg/L de BA e cinetina (KN), com diferentes fontes de carbono, sacarose, glicose, frutose e açúcar comercial (1, 2 e 3%) e suco de cana de açúcar (10, 20 e 30%). Foram observados que 20% caldo de cana e 2% açúcar comercial podem ser utilizados como um substituto de sacarose a 2%, geralmente, a fonte de carbono utilizada na maioria dos meios.

Santos et al. (2010) estudaram a multiplicação de três genótipos de *P. cablin*, o meio de cultura utilizado foi o MS suplementado com 0,7% de agar, 30 g L<sup>-1</sup> sacarose e com cinco concentrações de cinetina (0,0, 1,0, 2,0, 4,0, e 6,0mgL<sup>-1</sup>) e quatro concentrações de IAA (0,0, 0,5, 1,0, e 2,0mgL<sup>-1</sup>), A resposta morfo genética foi semelhante, para todos os genótipos estudados, os quais exibiram altas percentagens de regeneração direta de explantes foliares com baixas concentrações de cinetina (0,5-2,0mg/L<sup>1</sup>) e quando se utilizou IAA isoladamente ou em combinação.

Os óleos essenciais extraídos de plantas oriundas de cultivo *in vitro* e da planta mãe de *Pogostemon cablin* apresentaram perfis cromatográficos semelhantes. Conclui-se que a rápida estabilidade no teor de óleo essencial e a alta frequência de multiplicação de plantas é essencial, para garantir a eficácia do protocolo desenvolvido, para a produção *in vitro* dessa planta aromática, industrialmente, importante (PAUL et al., 2010).

A regeneração *in vitro* de patchouli, também, tem sido citada através da cultura de calos de explantes foliares e nodais, sendo o segmento foliar o que favorece maior produção de calos (KUMAR; CHAWALA, 2007; MISRA, 1996; RAJAN; SHAKILA, 1997; VIJAYALALITHA, 1998; XIAO; HE; XU, 2001).

Vijayalalitha (1998), usando explantes foliares de patchouli, obteve melhores índices de indução de calo com AIA nos níveis de 1,0–2,5 mg.L<sup>-1</sup> e cinetina de 4,0–5,5 mg.L<sup>-1</sup>. Resultados similares foram encontrados por Rajan e Shakila (1997). Entretanto Misra (1996) obteve melhor resposta utilizando 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA + 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Estes mesmos reguladores foram testados por Xiao, He e Xu (2001), que observaram melhor indução de calo empregando, além do explante foliar, o nodal em meio MS, suplementado com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 0,2 mg.L<sup>-1</sup> de ANA.

Assim, verifica-se que o fator, tipo e concentrações dos diferentes fitoreguladores apresentam muitos estudos com o patchouli. Porém estudos relacionados a fatores físicos como a intensidade e qualidade de luz no seu cultivo *in vitro* são incipientes.

#### **2.4 Influência da luz no cultivo *in vitro***

A luz é um fator ambiental de fundamental importância para as plantas, em virtude da ação direta ou indireta na regulação de seu crescimento e desenvolvimento. As respostas morfofisiológicas das plantas não dependem somente da presença, atenuação ou ausência da luz, mas também da variação na qualidade luminosa (MARTINS, 2006).

De acordo com Taiz e Zeiger (2009), a luz é um recurso crítico para as plantas que pode limitar seu crescimento. A radiação não é para as plantas somente uma fonte de energia (efeito fotoenergético), mas também um estímulo que governa o desenvolvimento (efeito fotodestrutivo). Todos esses efeitos ocorrem, por meio de absorção de luz, a qual é medida por fotorreceptores específicos (LARCHER, 2003).

A maioria dos processos biológicos dos vegetais é influenciada pela faixa de 400 – 700 nm, chamado de PAR. Esse intervalo do espectro é a

principal fonte de energia para a fotossíntese e promove a fotomorfogênese (LIN, 2000).

Nas salas de crescimento, são comumente utilizadas lâmpadas fluorescentes (BULA et al., 1991). Esse tipo de luz não é o ideal para o crescimento vegetal, pois essas lâmpadas possuem diferentes comprimentos de ondas (350 a 750 nm) e, geralmente, emitem luz branca de similaridade espectral entre as bandas. A irradiância fornecida, primariamente, na sala de crescimento, afeta o desenvolvimento das plantas, principalmente, por meio de alterações fotomorfogênicas (REZENDE et al., 2008).

A intensidade de luz tem grande importância no cultivo *in vitro* de plantas, tendo efeitos na realização da fotossíntese. Além disso, seu controle tem influência direta na formação de brotações, no crescimento e na multiplicação dos explantes, podendo afetar, diretamente, a formação de raízes (ALMEIDA; MUNDSTOCK, 2001). A iluminação adequada, também, pode influenciar na síntese de componentes que fazem parte do óleo essencial das plantas medicinais (GOMES et al., 2009), visto que influencia o desenvolvimento dos tricomas glandulares, estruturas onde ocorre a síntese e armazenamento de óleo essencial (SOUZA et al., 2008). Três fatores devem ser levados em consideração no que diz respeito à iluminação do ambiente de cultivo: a irradiância, o fotoperíodo e a qualidade da luz (HARTMANN et al., 2011).

Plântulas de *Aloysia triphylla* cultivadas *in vitro* com diferentes intensidades luminosas 13, 28, 47 e 69  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  acumularam maior biomassa da parte aérea e raízes com uma intensidade de 69  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (SILVA, 2013). Zhang et al. (2009) observaram, em brotos de *Momordica grosvenori* cultivados *in vitro* com 25, 50, 100 ou 200  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , que a intensidade de luz mais forte aumentou a massa seca e fresca total das plântulas. Plântulas de *Alocasia amazonica* regeneradas, sob intensidades luminosas de 15, 30, 60 e 90  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , mostraram melhor crescimento e desenvolvimento nas menores intensidades



15 e 30  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  do que aquelas cultivadas sob intensidades mais elevadas (JO et al., 2008).

Assim é possível compreender que a intensidade da luz tem influência no crescimento e desenvolvimento vegetal. Essa influência varia em função das variáveis analisadas como também entre as espécies. Desta forma, é importante estudos desse fator no cultivo *in vitro*, a fim de conhecer o seu envolvimento, em determinadas variáveis do desenvolvimento e promover ajustes na técnica, principalmente, quando se trata do seu uso em escala comercial.

### **2.5 Uso de LED's no cultivo *in vitro***

Na cultura de tecidos vegetais, a fonte de luz, geralmente, utilizada na sala de crescimento é a lâmpada fluorescente branca-fria (KIM et al., 2004), citada em 90% dos trabalhos científicos (KODYM; ZAPATA-ARIAS, 1999). Poucos estudos têm sido realizados buscando compreender o efeito da qualidade da luz no crescimento e desenvolvimento dos tecidos de espécies cultivados *in vitro*. Entretanto há demonstrações de que a qualidade da luz influencia a eficiência biológica dos fitorreguladores adicionados ao meio de cultura, bem como o balanço hormonal nos tecidos. Consequentemente, a qualidade da luz surge como uma ferramenta na manipulação da indução de balanços fisiológicos favoráveis a respostas específicas no crescimento das plantas (MORINI; MULEO, 2003).

Os Diodos Emissores de Luz (LEDs) têm alcançado larga aplicação comercial, tendo sido avaliados na micropropagação de plantas nos últimos anos. Sua aplicação tem sido impulsionada com o aquecimento global e com a preocupação ambiental, pois, cada vez mais, tem-se buscado o uso de equipamentos mais eficientes e menos poluentes (ROCHA et al., 2010). O LED tem o princípio de funcionamento diferente das lâmpadas incandescentes e fluorescentes em que o dispositivo semicondutor, com a passagem de corrente

elétrica, pelo processo denominado de eletroluminescência, emite luz visível (CARVALHO, 2007).

Além disso, seu destaque na micropropagação deve - se ao seu potencial para aplicação comercial e apresentar características ímpares em relação às fontes tradicionais, no processo de geração de luz com baixa produção de calor, por longos períodos, comprimento de onda específico, flexibilidade de cores e iluminação, redução do consumo elétrico e ausência de substâncias tóxicas tais como mercúrio e longo período de vida útil, podendo atingir até 100.000 horas (CARVALHO, 2007; NHUT et al., 2003; NHUT; NAM, 2010; YEH; CHUNG, 2009).

Comparando a vida útil das lâmpadas incandescentes de 1000 horas e lâmpadas fluorescentes 8000 horas, os LEDs têm uma vida, significativamente, maior de 100.000 h. Além de sua longa vida, os LEDs possibilitam a regulação de intensidade e qualidade da luz, bem como uma elevada eficiência de conversão fotoelétrica. Essas vantagens tornam os LEDs perfeitos, para o crescimento das plantas em ambiente controlado, como cultivo por cultura de tecido em sala e câmara de crescimento (YEH; CHUNG, 2009).

De acordo com Skin et al. (2008), os LEDs proporcionam alterações na fisiologia, como o incremento da quantidade de pigmentos fotossintéticos e no crescimento das plantas, aumentando a taxa de multiplicação dos explantes e comprimento das brotações. Alvarenga et al. (2015) observaram, em plântulas de *Achillea millefolium* L., cultivadas *in vitro* sob LED's de espectros azul, vermelho, branco, verde e lâmpadas fluorescentes branca fria, que as plântulas cultivadas, sob lâmpada LED com espectro azul, obtiveram maior número e comprimento de raízes e maiores acúmulos de matéria seca da parte aérea, raízes e total.

Daud, Faizal e Danny Geelen (2013) analisaram o impacto da qualidade da luz sobre a capacidade de enraizamento de *Jatropha curcas* L., tida como

uma planta multiso pelo seu alto valor nutricional e medicinal, cultivada *in vitro*. O LED vermelho foi o mais favorável, induzindo uma resposta de enraizamento de 65% do rebentos, que produziram, em média, 5,5 raízes por broto.

Heo et al. (2002) utilizaram tubos fluorescentes associados com diodo emissor de luz nas cores azul, vermelho e vermelho distante e determinaram características de crescimento em agerato (*Ageratum houstonianum* Mill.), cravo-de-defunto (*Tagetes erecta* L.) e sálvia (*Salvia splendens* F.). Concluíram que características qualitativas ou quantitativas do crescimento e morfogênese são influenciadas pela qualidade de luz. Os LEDs foram usados como luz suplementar na iluminação convencional de agerato, cravo-de-defunto e sálvia, provocando o aumento do crescimento e da morfogênese das plantas cultivadas *in vitro* com baixo consumo de energia.

Desta forma, os estudos relacionados com o uso de LED no cultivo *in vitro* tem proporcionado ajustes consideráveis nesta técnica de cultivo, visto que permite a seleção, por meio do uso de LEDs específicos, de características desejáveis para o sucesso da técnica, a qual varia entre as espécies. Adicionalmente, não foram verificados estudos usando LEDs para o cultivo *in vitro* do patchouli, o que torna o presente trabalho de grande relevância para a propagação *in vitro* dessa espécie.



## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. L.; MUNDSTOCK, C. M. O afilhamento da aveia afetado pela qualidade de luz em plantas sob competição. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 393-400, maio/jun. 2001.

ALVARENGA, I. C. A. et al. *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. **Plant Cell Tissue, Organ Culture**, Dordrecht, v. 122, n. 2, p. 299-308, Aug. 2015.

ALVES, C. et al. A cultura de tecidos na agricultura. In: JORNADA CIENTÍFICA 1., 2012, Bambuí. **Anais...** Bambuí: CEFET, 2012. p. 1-3.

ARAUJO, A. C. de. **Fracionamento do óleo essencial de patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] obtido por extração supercrítica**. 2008. 122 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

ARIKAT, N. A. et al. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticulosa* Mill.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 100, p. 193-202, 2004.

ARRIGONI-BLANK, M. de F.; SANTOS, A. V.; BLANK, A. F. Organogênese direta e aclimatização de plantas de patchouli. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 145-150, abr./jun. 2011.

BARATA, L. E. S.; VILHA, A. M.; CARVALHO, R. Q. Mercado de perfumaria e cosmética no Brasil. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 4., 2007, Campinas. **Anais...** Campinas, 2007. 1 CD-ROM.

BETTONI, M. M. et al. Propagação vegetativa de patchouli por estaquia. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 11, n. 5, p. 417-420, set./out. 2010.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BOTTA, B.; SILVESTRINI, A.; MONACHE, G. D. C. Cultura de tecidos vegetais: doze anos de experiência. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Ed.). **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001. p. 354-379.

BOUHOUCHE, N.; KSIKSI, T. An efficient *in vitro* plant regeneration system for the medicinal plant *Teucrium stocksianum* Boiss. **Plant Biotechnology**, Oxford, v. 1, n. 4, p. 179-184, Nov. 2007.

BULA, R. J. et al. Light-emitting diodes as a radiation source for plants. **Hort Science**, Wisconsin, v. 26, p. 203-205, 1991.

CARVALHO, H. **Diodos de luz de alto brilho e alta potência**. São Paulo: Directlight Indústria e Comércio de Produtos Eletrônicos, 2007. 2 p.

CASTRO, H. G. et al. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**. 2. ed. Viçosa, MG: Suprema, 2004. 113 p.

CHAKRAPANI, P. et al. Phytochemical, pharmacological importance of Patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth) an aromatic medicinal plant. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, Pnackkula, v. 21, n. 2, p. 7-15, July/Aug. 2013.

CID, L. P. B. A propagação *in vitro* de plantas: o que é isso? **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 19, p. 16-21, 2001.

CUENCA, S.; AMO-MARCO, J. B. *In vitro* propagation of two spanish endemic species of salvia through bud proliferation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 36, n. 3, p. 225-229, May/June 2000.

DAUD, N.; FAIZAL, A.; DANNY GEELLEN, D. Adventitious rooting of *Jatropha curcas* L. is stimulated by phloroglucinol and by red LED light. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 49, n. 2, p. 183-190, Apr. 2013.

FLORES, R. **Cultura de tecidos e produção de B-ecdisona em *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* (Amaranthaceae)**. 2006. 168 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

GAHAN, P. B.; GEORGE, E. F. Adventitious regeneration. In: GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. (Ed.). **Plant propagation by tissue culture**. 3<sup>rd</sup> ed. Dordrecht: Springer, 2008. p. 355-401.

GAMA, M. I. C. S.; CALDAS, L. S.; KATAJIMA, E. W. Obtenção de plantas sadias de patchuli (*Pogostemum patchuli*) por cultura de meristema. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 185-189, 1980.

GOMES, P. A. et al. Influência do sombreamento na produção de biomassa, óleo essencial e quantidade de tricomas glandulares em cidrão (*Lippia citriodora* Lam.). **Biotemas**, Florianópolis, v. 22, n. 4, p. 9-14, dez. 2009.

GUO, J. et al. Development and structure of internal glands and external glandular trichomes in *Pogostemon cablin*. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, Oct. 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371%2Fjournal.pone.0077862>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

HARTMANN, H. T. et al. **Hartman & Kester's plant propagation: principles and practices**. 8<sup>th</sup> ed. New Jersey: Prentice Hall, 2011. 928 p.

HENDERSON, W. et al. Chemical and morphological studies on sites of sesquiterpene accumulation in *Pogostemon cablin* (patchouli). **Phytochemistry**, New York, v. 9, p. 1219-1228, 1970.

HEO, J. W. et al. Growth responses of marigold and salvia bedding plants as affected by monochromic or mixture radiation provided by a light emitting diode (LED). **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 38, n. 3, p. 225-230, Nov. 2002.

HSU, H. C. et al.  $\alpha$ -Bulnesene, a novel PAF receptor antagonist isolated from *Pogostemon cablin*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 345, n. 3, p. 1033-1038, July 2006.

HU, L. F. et al. GC-MS fingerprint of *Pogostemon cablin* in China. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 42, n. 2, p. 200-206, Sept. 2006.

JO, E. A. et al. *In vitro* sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 96, p. 307-315, Dec. 2008.

JOY, P. P. et al. Aromatic plants. **Tropical Horticulture**, Calcutta, v. 2, p. 633-733, 2001.

KIM, S. J. et al. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of *Chrysanthemum* plantlets *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 101, n. 1/2, p. 143-151, May 2004.

KITAJIMA, E. W.; COSTA, A. S. Rhabdovirus-like particles in tissue of diferente planta species. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 4, p. 55-62, 1979.

KIYOHARA, H. et al. Patchouli alcohol: *in vitro* direct anti-influenza vírus sesquiterpene in *Pogostemon cablin* Benth. **Journal of Natural Medicines**, Tokyo, v. 66, n. 1, p. 55-61, Jan. 2012.

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F. J. Low-cost alternatives for the micropropagation of banana. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 66, n. 1, p. 67-71, July 2001.

KUKREJA, A. K.; MATHUR, A. K.; ZAIM, M. Mass production of virus-free patchouli plants [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] by *in vitro* culture. **Tropical Agriculture**, Kerala, v. 67, n. 2, p. 101-104, 1990.

KUMAR, V.; CHAWLA, H. S. Organogenic regeneration from different explants of patchouli (*Pogostemon cablin*). **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, New Delhi, v. 67, n. 2, p. 187-189, 2007.

KUMARA, S. M.; ANURADHA, M. Analysis of genetic variability in Patchouli cultivars (*Pogostemon cablin* Benth.) using RAPD Markers. **Research Journal of Biotechnology**, Oxford, v. 2, n. 6, p. 64-71, 2011.

KUMARASWAMY, M.; ANURADHA, M. Micropropagation of *Pogostemon cablin* Benth. through direct regeneration for production of true-to-type plants. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Bangladesch, v. 20, n. 1, p. 81-89, 2010.

LARCHER, W. **Physiological plant ecology**. Berlin: Springer Verlag, 2003. 513 p.

LIN, C. Photoreceptors and regulation of flowering time. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 123, n. 1, p. 39-50, May 2000.

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

LIU, X. R. et al. Study on antimicrobial activities of extracts from *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. **Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 24, p. 220-227, 2009.



LUO, J. P. et al. Two chemotypes of *Pogostemon cablin* and influence of region of cultivation and harvesting time on volatile oil composition. **Yao Xue Xue Bao**, Beijing, v. 38, n. 4, p. 307-310, 2003.

MACHADO, M. P. et al. Propagação *in vitro* e caracterização química do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* cultivada no Sul do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 2, p. 283-289, fev. 2013.

MAHANTA, J. J.; CHUTIA, M.; SARMA, T. C. Study on weed flora and their influence on patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) oil and patchoulol. **Journal of Plant Sciences**, Rohtak, v. 2, n. 1, p. 96-101, 2007.

MAHESWARI, M. L. et al. Patchouli: an Indian perspective. **Indian Performance**, New Delhi, v. 37, p. 9-11, 1993.

MARCHESE, J. A.; FIGUEIRA, G. M. O uso de tecnologia pré e pós-colheita e boas práticas agrícolas na produção de plantas medicinais e aromáticas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 7, n. 3, p. 86-96, 2005.

MARTINS, J. R. **Aspectos da germinação de sementes e influencia da luz no desenvolvimento, anatomia e composição química do óleo essencial em *Ocimum gratissimum* L.** 2006. 176 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

MEISSNER FILHO, P. E. et al. Patchouli virus X, a new potexvirus from *Pogostemon cablin*. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 141, p. 267-274, 2002.

MISRA, M. Regeneration of patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) plants from leaf and node callus, and evaluation after growth in the field. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 15, n. 12, p. 991-994, 1996.

MORINI, S.; MULEO, R. Effects of light quality on micropropagation of woody species. In: JAIN, S. M.; ISHI, K. (Ed.). **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2003. p. 3-35.

NHUT, D. T. et al. Efficiency of a novel culture system by using light-emitting diode (led) on *in vitro* and subsequent growth of micropropagated banana plantlets. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 616, p. 121-127, 2003.

NHUT, D. T.; NAM, N. B. Light-emitting diodes (LEDs): an artificial lighting source for biological studies. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE DEVELOPMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING IN VIETNAM, OF THE SERIES IFMBE, 3., 2010, Hanói. **Proceedings...** Hanói, 2010. p. 134-139.

NITZCHE, A. et al. Chemical and biological characterization of cinnamic and derivatives from cell cultures of lavender (*Lavandula officinalis*) induced by stress and jasmonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 10, p. 2915-2923, May 2004.

OLIVEIRA, M. M. Aplicações e avanços na área da biotecnologia vegetal. **Boletim de Biotecnologia**, Porto, n. 66, p. 22-27, 2000.

PAUL, A. et al. Rapid plant regeneration, analysis of genetic fidelity and essential aromatic oil content of micropropagated plants of Patchouli, *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. an industrially important aromatic plant. **Industrial Crops and Products**, London, v. 32, p. 366-374, 2010.

PRIYA, D.; SWATI, D.; VILASRAO, D. K. A Review on *Pogostemon* patchouli. **Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, New Delhi, v. 691, p. 41-47, 2014.

RAJAN, G. B.; SHAKILA, A. Propagation of *Pogostemon* patchouli Hook through tissue culture. In: NATIONAL SEMINAR BIOTECHNOLOGY OF SPICES MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS, 1997. **Proceedings...** 1997. p. 56-59.

RAMYA, H. G.; PALANIMUTHU, V.; SINGLA, R. An introduction to patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.): a medicinal and aromatic plant: it's importance to mankind. **Agricultural Engineering International: CIGR Journal**, Beijing, v. 15, n. 2, p. 243-251, 2013.

RANI, G. et al. Micropropagation of *Coleus blumei* from nodal segments and shoot tips. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 50, n. 4, p. 496-500, Dec. 2006.

RAO, S.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotecnology Advances**, New York, v. 20, n. 2, p. 101-153, May 2002.

- REIS, E. S. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* *in vitro* sob influência do meio de cultura. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 2, p. 331-335, jun. 2009.
- REZENDE, R. K. S. et al. Organogênese em capítulos florais e avaliação de características anatômicas da folha de *Gerbera jamesonii* Adlam. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 821-827, maio/jun. 2008.
- ROCHA, P. S. G. et al. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação *in vitro* de morangueiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 9, p. 1922-1928, 2010.
- SANGWAN, N. S.; FAROOQI, A. H. A.; SHABIH, F. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 34, n. 1, p. 3-21, 2001.
- SANTOS, A. V. et al. Mass multiplication of *Pogostemoncablin* (Blanco) Benth genotypes and increase of essential oil and patchouli yield. **Industrial Crops and Products**, London, v. 32, n. 3, p. 445-449, Nov. 2010.
- SANTOS, T. C. et al. Conservação *in vitro* de acessos de vetiver, *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty (Poaceae). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 6, p. 963-970, nov./dez. 2012.
- SILVA, G. M. da. **Micropropagação e produção de constituintes voláteis *in vitro* de *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton**. 2013. 114 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- SINGH, M.; SHARMA, S.; RAMESH, S. Herbage, oil yield, and oil quality of patchouli [*Pogostemoncablin* (Blanco) Benth.] influenced by irrigation, organic mulch and nitrogen application in semi-arid tropical climate. **Industrial Crops and Products**, London, v. 16, n. 2, p. 101-107, Sept. 2002.
- SKALA, E.; WYSOKINSKA, H. *In Vitro* regeneration of *Salvia nemorosa* L. from shoot tips and leaf explants. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Gaithersburg, v. 40, n. 6, p. 596-602, Nov./Dec. 2004.
- SKIN, H. S. et al. The effect of light quality on the growth and development of *in vitro* cultured Doritaenopsis plant. **Acta Physiologia & Plantarum**, Copenhagen, v. 30, n. 3, p. 339-343, May 2008.

SOUZA, J. R. P. et al. Desenvolvimento da espinheira-santa sob diferentes intensidades luminosas e níveis de poda. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 40-44, jan./mar. 2008.

SUGIMURA, Y. et al. Transgenic patchouli plants produced by Agrobacterium-mediated transformation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 82, n. 3, p. 251-257, Sept. 2005.

SWAMY, M. K.; BALASUBRAMANYA, S.; ANURADHA, M. *In vitro* multiplication of *Pogostemon cablin* Benth through direct regeneration. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 9, n. 14, p. 2069-2075, 2010.

SWAMY, M. K. et al. Effect of different carbon sources on *in vitro* morphogenetic response of patchouli (*Pogostemoncablin* BENTH.). **Journal of Phytology**, New York, v. 2, n. 8, p. 11-17, 2010.

SWAMY, M. K.; SINNIH, U. R. A comprehensive review on the phytochemical constituents and pharmacological activities of *Pogostemoncablin* Benth.: an aromatic medicinal plant of industrial importance. **Molecules**, Basel, v. 20, n. 5, p. 8521-8547, May 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2009. 719 p.

TIME is: technology innovation management & entrepreneurship information service. **Patchouli Agrotechnology**, New Delhi, June 2009. Disponível em: <<http://www.techno-preneur.net/technology/project-profiles/food/patchouli.html>>. Acesso em: 17 fev. 2016.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; FERREIRA, A. T. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1998. v. 2, 864 p.

TORRES, A. C. et al. **Meios e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas**: formulações de meio de cultura de tecidos de plantas. Brasília: EMBRAPA, 2001. 20 p. (Circular Técnica, 24).

VIEIRA, R. F.; COSTA, T. S. A. Caracterização química de metabólitos secundários em germoplasma vegetal. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. p. 343-376.

VIJAYALALITHA, S. J. Induction of callus as influenced by explants and growth regulators in culture media *in vitro* culture of patchouli (*Pogostemon patchouli* Pellet.). **Advances in Plant Sciences**, New York, v. 11, n. 2, p. 89-94, 1998.

WEI, A.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 5, p. 1737-1742, 2007.

WU, H. et al. Inhibitory effect and possible mechanism of action of patchouli alcohol against influenza A (H2N2) virus. **Molecules**, Basel, v. 3, n. 16 p. 6489-6501, Aug. 2011.

WU, H. C.; LIN, C. C. Red light-emitting diode light irradiation improves root and leaf formation in difficult-to-propagate *Protea cynaroides* L. plantlets *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v. 47, n. 10, p. 1490-1494, 2013.

XIAO, S.; HE, H.; XU, H. Study on the tissue culture and plantregeneration of *Pogostemon cablin*. **Zhong Yao Cai**, Beijing, v. 24, n. 6, p. 391-392, 2001.

YEH, N.; CHUNG, J. P. High-brightness LEDs: energy efficient lighting sources and their potential in door plant cultivation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Golden, v. 13, n. 8, p. 1-6, Oct. 2009.

ZHANG, M. et al. Growth and photosynthethetic capability of *Momordica grosvenori* plantlets grownphotoautotrophically in response to light intensity. **HortScience**, Alexandria, v. 44, n. 3, p. 757-763, June 2009.

ZHAO, Z. et al. Determination of Patchoulic Alcohol in Herba Pogostemonis by GC MS-MS. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 53, n. 7, p. 856-860, 2005.

ZHU, B. C. R. et al. Toxicity and repellency of patchouli oil and patchouli alcohol against formosan subterranean termites *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera: Rhinotermitidae). **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 13, p. 4585-4588, July 2003.



**SEGUNDA PARTE – ARTIGO**

**ARTIGO 1 - CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Pogostemon cablin* SOB  
INTENSIDADES LUMINOSAS E LEDs**

**Artigo formatado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003).**

## RESUMO

*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth (patchouli) é uma espécie aromática, que possui grande valor comercial em razão do óleo extraído de suas folhas. Pesquisas relacionadas ao cultivo *in vitro* de plantas medicinais e aromáticas têm demonstrado diferentes respostas quanto ao crescimento vegetativo em função da intensidade luminosa e do controle do espectro de luz no cultivo. Objetivou-se avaliar a influência da intensidade e qualidade luminosa no crescimento de plântulas de patchouli cultivadas *in vitro*. O experimento foi conduzido com diferentes intensidades luminosas 28, 51, 64, 76 e 113  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , com 4 repetições cada. Para qualidade luminosa, foram usadas lâmpadas de LEDs, com 6 tratamentos, LEDs de cor branca, vermelha, azul, azul e vermelha (1:3), azul e vermelha azul (3:1) e vermelha e azul (7:7), com 4 repetições. Os explantes foram de plântulas de patchouli micropropagadas *in vitro*, sendo utilizados segmentos nodais de 1 cm, cultivados em tubos de ensaio com 15 mL de meio básico MS. Após 40 dias, foram avaliados número de folhas, comprimento de raiz, biomassa seca das folhas, caule, raiz e total e pigmentos fotossintéticos. Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ), utilizando-se o software Sisvar®. O tratamento com intensidade de 76  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  obteve melhores resultados para os parâmetros avaliados de crescimento. Para os pigmentos fotossintéticos, os maiores teores foram observados com a intensidade de 51  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . A combinação de LEDs de espectro azul e vermelho (1:3) obteve os melhores valores para número de folhas, biomassa seca do caule, folhas e total. As plântulas sob LED branca apresentaram melhores respostas para pigmentos fotossintéticos. Faz-se necessário avaliar, ainda, a influência desses regimes luminosos na composição química volátil de plântulas *in vitro* e aclimatizadas para que possa ser estabelecido um método de micropropagação da espécie.

**Palavras - chave:** Patchouli. Qualidade Luminosa. Pigmentos fotossintéticos.



## ABSTRACT

*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth (patchouli) is an aromatic species that presents great commercial value due to the oil extracted from its leaves. Researches have showed different responses concerning vegetative growth in function of light intensity and control of the light spectrum during cultivation. We aimed at evaluating the influence of the light intensity and quality over the growth of patchouli plantlets cultivated *in vitro*. The experiment was conducted with different light intensities, 28, 51, 64, 76 and 113  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , with four replicates each. For light quality, we used LED, with six treatments, in the colors white, red, blue, blue and red (1:3), blue and red (3:1), and blue and red (7:7), with four replicates. The explants were of patchouli plantlets micro propagated *in vitro*, using nodal segments of 1 cm, cultivated in test tubes with 15 mL of basic MS medium. After 40 days, we evaluated the number of leaves, root length, dry leaf, stem and root and total biomass, and photosynthetic pigments. The data obtained were submitted to ANOVA by the Scott-Knott test ( $p < 0.05$ ), using the Sisvar<sup>®</sup> software. The treatment with intensity of 76  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  obtained the best results for the evaluated growth parameters. For the photosynthetic pigments, the highest contents were observed in the intensity of 51  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . The combination of blue and red (1:3) spectrum LEDs obtained the best values for number of leaves and stem, leaf and total dry biomass. The plantlets under white LED presented better responses for photosynthetic pigments. It is necessary to evaluate also the influence of light regimes in the volatile chemical composition of *in vitro* plantlets and acclimatized so it can be established a micropropagation method of the species.

**Keywords:** Patchouli. Light quality. Photosynthetic pigments.



## 1 INTRODUÇÃO

A fitoterapia tem ganhado relevância, principalmente, por serem comprovadas as propriedades medicinais que lhes eram atribuídas pelo conhecimento popular. Além disso, a necessidade de alternativas aos medicamentos sintéticos e, conseqüentemente, ao aumento na busca por produtos naturais, elevou a importância das plantas medicinais na agricultura. Dentre as plantas medicinais, as plantas aromáticas constituem - se como um grupo de destaque, em razão, principalmente, dos óleos essenciais encontrados nos seus diferentes órgãos (NUNES et al., 2006).

O *Pogostemon cablin* (patchouli) é uma espécie aromática cujo óleo essencial destaca-se por ser um dos 18 principais óleos essenciais de importância comercial no mundo, sendo amplamente empregado na indústria de perfumes (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). A demanda por óleo essencial de patchouli está aumentando, nos mercados nacionais e internacionais, em virtude de sua ampla utilização pelas indústrias de cosméticos, higiene oral, perfumarias e farmacêutica (HU et al., 2006; ZHAO et al., 2005).

O aumento na demanda pelo óleo essencial produzido pelo patchouli tem intensificado a aplicação de métodos biotecnológicos para obter plantas altamente produtivas sob condições controladas de crescimento, para adquirir genótipos homogêneos e livres de patógenos (AVATO et al., 2005). Visto que a propagação convencional desta espécie é por estaquia, apresenta problemas como a suscetibilidade da planta a diversos tipos de vírus e ao nematoide *Meloydogine incógnita* (KUKREJA; MATHUR; ZAIM, 1990), que comprometem o rendimento do óleo essencial do patchouli. Assim a propagação *in vitro* aparece como uma alternativa viável, para obtenção de plantas livres de patógenos, possibilitando propagação em larga escala em um período de tempo relativamente curto.

Pesquisas relacionadas ao cultivo *in vitro* de plantas medicinais e aromáticas têm demonstrado diferentes respostas quanto ao crescimento vegetativo em função da intensidade luminosa e do controle do espectro de luz durante o cultivo (ALVARENGA et al., 2015; SILVA, 2013). Entretanto as plantas têm diferentes respostas de crescimento quando expostas a diferentes condições de luminosidade em cultivo. No cultivo *in vitro* de *Agapanthus umbellatus*, maior número de folhas por brotação foi observado nas intensidades de  $70 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (FOGAÇA et al., 2007). *Momordica grosvenori* cultivada sob  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  apresentou maior produção de clorofilas e crescimento (ZHANG et al., 2009).

O uso de Diodos Emissores de Luz (LEDs) tem sido considerado uma alternativa para se verificar o efeito da qualidade de luz no crescimento e cultivo *in vitro*. A utilização de LEDs em cultura *in vitro* fornece respostas específicas de crescimento. Em plântulas de *Achillea millefolium*, cultivadas *in vitro*, LEDs com espectro azul proporcionaram maior acúmulo de matéria seca, número de raízes, porcentagem de enraizamento e sobrevivência (ALVARENGA et al., 2015). Para *Jatropha curcas* houve maior formação de raízes sob LEDs com espectro vermelho (DAUD; FAIZAL; DANNY GEELLEN, 2013).

Por apresentar interesse comercial, os estudos de cultivo *in vitro* com *P. cablin* são necessários, a fim de avaliar parâmetros que possam interferir no crescimento das plântulas. Assim o objetivo do trabalho foi avaliar o crescimento e produção de pigmentos fotossintéticos de plântulas de *P. cablin* sob diferentes intensidades e espectros de luz com o uso do LED no cultivo *in vitro*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção do Material Vegetal e Condições Experimentais

O experimento foi conduzido na Universidade Federal de Lavras (UFLA) – MG, no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura. O material vegetal utilizado como matriz foi obtido de plântulas de *Pogostemon cablin* já estabelecidas *in vitro* (FIGURA 1). Gemas axilares dessas plântulas foram inoculadas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP. Após a inoculação, os tubos foram mantidos, em sala de crescimento, com lâmpadas brancas frias fluorescentes e intensidade luminosa de  $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 de escuro e temperatura de  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  por 90 dias.

Figura 1 - Plântulas de *P. cablin* micropropagadas



## 2.2 Ensaio de Intensidade Luminosa

Para os experimentos de intensidade luminosa, foram utilizados segmentos nodais de 1 cm (FIGURA 2), oriundos de plântulas pré-estabelecidas, cultivadas em tubos de ensaio com 15 mL de meio básico MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Ao meio, acrescentaram-se 0,6% de ágar, 3% de sacarose e o pH foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ , os tubos, contendo o meio de cultura, foram autoclavados em temperatura de  $127^\circ\text{C}$ , por 15 min e 1,10 atm de pressão.

Figura 2 - Explantes de *P. cablin* utilizados nos experimentos de intensidade e qualidade luminosa.



O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 5 tratamentos, utilizando lâmpadas fluorescentes branca fria com 28, 51, 64, 76 e  $113 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , aferidas por meio do medidor PRO CHECK + PAR PHOTON FLUX SENSOR, MODELO QSO-S (DECAGON DEVICES – Pullman-Washington-USA). Os tubos foram mantidos, em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas de luz e de 8 de escuro, temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Foram utilizadas 5 repetições, sendo cada repetição com 4 tubos com uma plântula/tubo totalizando 20 plantas analisadas por tratamento. As avaliações do experimento foram realizadas, após 40 dias de cultivo *in vitro*, sendo avaliados o número de folhas, comprimento da maior raiz (cm), as biomassas secas dos caules, folhas e raízes e os teores de clorofilas a, b e total. As determinações de biomassa seca do caule (BSC), folha (BSF) e da raiz (BSR) foram realizadas por

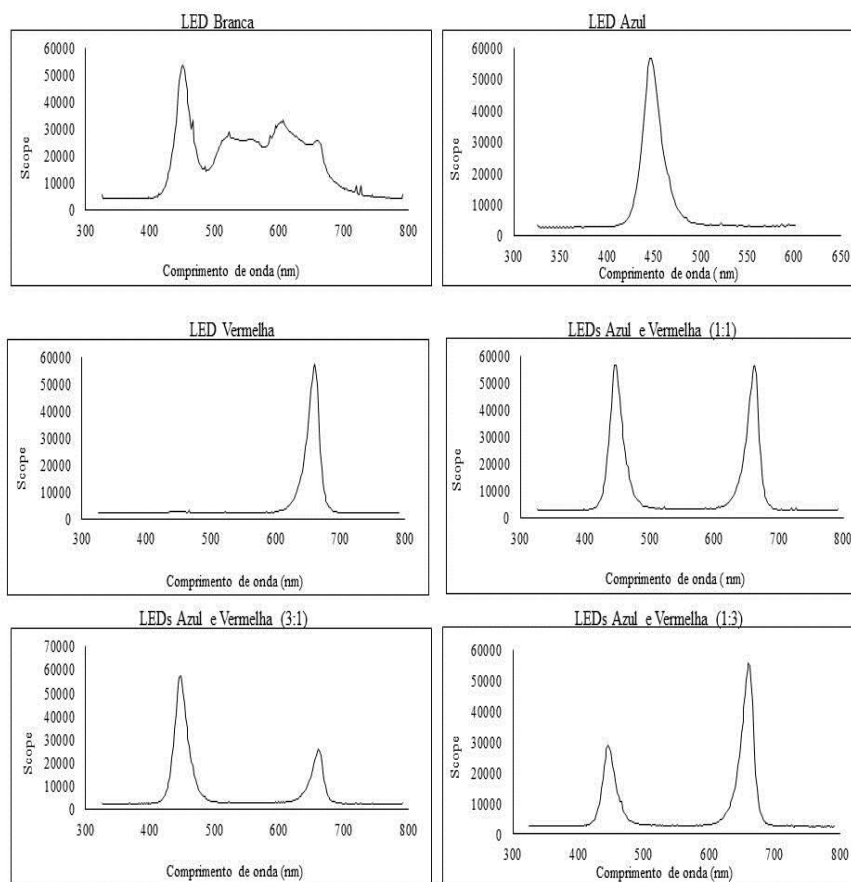
meio da secagem do material vegetal, em estufa de circulação forçada de ar a  $40 \pm 2$  °C, até peso constante, as quais foram expressas em miligramas (mg).

### **2.3 Ensaio de Qualidade Luminosa**

Para os experimentos de qualidade luminosa, foram utilizados segmentos nodais de 1 cm, oriundos de plântulas pré-estabelecidas, cultivados em tubos de ensaio com 15 mL de meio básico MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Ao meio, acrescentaram-se 0,6% de ágar, 3% de sacarose e o pH foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ , os tubos, contendo o meio de cultura, foram autoclavados em temperatura de  $127^\circ$  C, por 15 min e 1,10 atm de pressão. Posteriormente, foram inoculados segmentos nodais, os quais eram mantidos sob lâmpadas de LED (*Light Emission Diode*), com  $42 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , com espectros branco, vermelho, azul e combinações: vermelha e azul (1:1), vermelha e azul (3:1), vermelha e azul (1:3). As condições da sala de crescimento eram fotoperíodos de 16 horas de luz e de 8 de escuro, temperatura de  $25 \pm 2$  °C.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), sendo 6 tratamentos, com 4 repetições com 5 tubos por repetição/tubo, totalizando 20 plantas analisadas por tratamento. Após 40 dias, foram realizadas as avaliações de crescimento e quantificação de pigmentos fotossintéticos. Os espectros de luz foram aferidos com o espectrômetro portátil SPECTRA PEN Z850, (Qubit Systems-Kingston, Ontario-USA), sendo os perfis espectrais registrados para cada tratamento apresentado na Figura 3.

Figura 3 - Espectros de luz utilizados no experimento.



O crescimento foi avaliado pelo número de folhas, comprimento de parte aérea (cm), comprimento da maior raiz (cm), biomassas secas dos caules, folhas e raízes e total. As determinações de biomassa seca do caule (BSC), folha (BSF) e da raiz (BSR) foram realizadas por secagem em estufa de circulação forçada de ar a  $40 \pm 2$  °C, até peso constante, as quais foram expressas em miligramas (mg). Com esses dados, foi determinada a relação raiz/parte aérea (R/Pa), aplicando-se as fórmulas (BENINCASA, 1998):



$$\frac{R}{Pa} = \frac{BSR}{BSF + BSC}$$

#### **2.4 Quantificação dos Pigmentos Fotossintéticos**

Para determinação de pigmentos fotossintéticos, foram utilizadas folhas frescas, completamente expandidas, localizadas no terceiro nó, 40 dias após a inoculação. A extração foi realizada, conforme metodologia descrita por Arnon (1949), utilizando 0,20 g de matéria fresca homogeneizada em 20 mL de acetona 80%, seguida da leitura em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda 645, 663 e 470 nm, para clorofila *a*, *b* e carotenoides, respectivamente. A quantificação desses pigmentos fotossintéticos foi determinada conforme Lichtenthaler e Buschmann (2001). Também foi calculada a razão carotenoides que foi baseada no trabalho de Jo et al. (2008) e a clorofila total (clorofila *a* + *b*). Os resultados foram expressos em mg g<sup>-1</sup> matéria fresca.

#### **2.5 Análise estatística**

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Toda a análise foi realizada utilizando-se o software Sisvar® (FERREIRA, 2011).



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

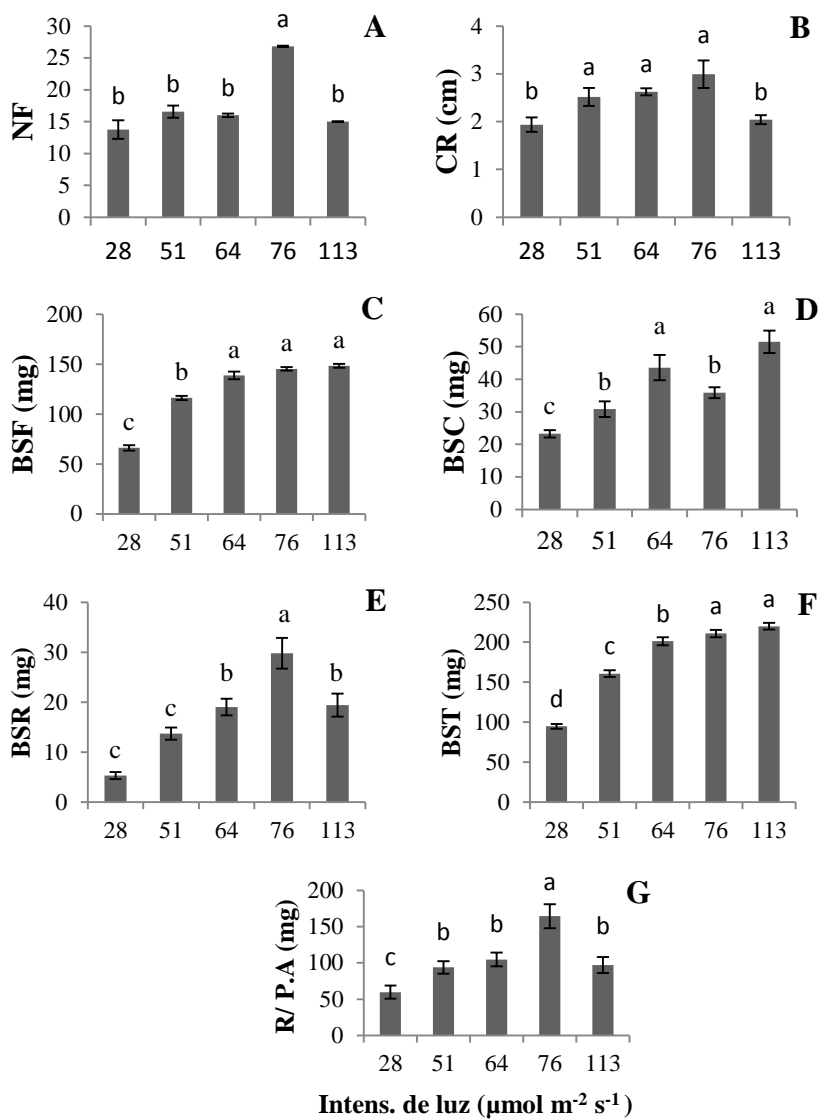
#### 3.1 Efeito da Intensidade de Luz

Na Figura 4 observa-se o aspecto morfológico das plântulas nos diferentes tratamentos. A intensidade de luz influenciou, significativamente, o crescimento *in vitro* de *P. cablin* (FIGURA 5). Foi possível verificar que a espécie apresentou maior crescimento quando cultivada sob intensidades de luz moderadas (51, 64, 76  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Todavia, para as plantas cultivadas sob 76  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , as variáveis número de folhas, biomassa seca de raiz, biomassa seca total e razão R/PA foram maiores (FIGURA 5 A, E, F e G).

Figura 4 - Plântulas de *Pogostemon cablin*, cultivadas *in vitro*, durante 40 dias, sob diferentes intensidades luminosas (28, 51, 64, 76 e 113  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).



Figura 5 - Crescimento de *Pogostemon cablin* cultivadas em meio MS, sob intensidades luminosas de 28, 51, 64, 76 e 113  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , durante 40 dias.



Legenda: **A**= número de folhas; **B** = comprimento da maior raiz; **C**= biomassa seca das folhas; **D**= biomassa seca do caule; **E**= biomassa seca da raiz; **F**= biomassa seca total; **G**= razão raiz/ parte aérea. Barras com a mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5%. Barras verticais indicam erro padrão.

O maior crescimento, em condições moderadas de luminosidades, corrobora com estudos de desenvolvimento da espécie no campo nos quais se afirma que esta se desenvolve melhor em ambientes sombreados (JOY et al., 2001). Além disso, o aumento da razão raiz/parte aérea, nas plântulas cultivadas sob  $76 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , indica que, nessas condições, a espécie apresenta maior investimento de fotoassimilados na raiz. Segundo Claussen (1996), a razão raiz/parte aérea mais elevada, em plantas de ambientes com intensidades de luz intermediárias e altas, indica que a biomassa distribui-se mais para as raízes que para os órgãos fotossintetizantes.

Tal fato propicia maior absorção de água e nutrientes, estratégia que garante à planta maior capacidade de suportar as maiores taxas de fotossíntese e transpiração em condições de aclimatização. Adicionalmente as plântulas cultivadas sob  $76 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  tiveram aumentos no número de folhas, comprimento radicular, biomassa seca de raiz, biomassa seca do caule e total que são parâmetros de crescimento considerados de suma importância, para o cultivo *in vitro*, pois permitem plântulas e mudas com melhor desenvolvimento *ex vitro* (CHANDRA et al., 2010).

Estudos realizados com *Castanea sativa* mostraram que, para essa espécie, o maior comprimento de raiz foi observado com intensidade de  $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (SÁEZ et al., 2015). Plântulas de *Aloysia tryphylla* cultivadas na intensidade luminosa de  $69 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  acumularam maior biomassa seca de raiz (SILVA, 2013). Foram observadas respostas diferentes em *Achillea millefolium*, apresentando melhor resposta para biomassa seca da raiz na intensidade de  $27 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (ALVARENGA et al., 2015).

Condições de baixas irradiâncias promovem a inibição do crescimento e da produtividade por afetar as trocas gasosas (ZAVALA; RAVETTA, 2001). No entanto, altas irradiâncias, também, têm efeitos prejudiciais sobre o aparelho fotossintético, principalmente, em plantas que se desenvolvem naturalmente em

ambientes sombreados (LICHTENTHALER et al., 2007). Assim, para *P. cablin*, o aumento da intensidade luminosa pode ter promovido alterações fisiológicas que promoveram redução no seu crescimento. Resultados diferentes já foram observados para outras espécies cultivadas *in vitro*.

Em plântulas de *Momordica grosvenori*, por exemplo, a intensidade de  $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  foi a mais adequada para o crescimento (ZHANG et al., 2009). Fogaça et al. (2007) observaram em brotos de *Agapanthus umbellatus* um maior número de folhas por brotação nas intensidades de  $70 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Alvarenga et al. (2015) relataram melhores respostas para crescimento em *Achillea millefolium* com intensidade de  $27 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Para *Capsicum chinense* Jacq. o maior crescimento foi observado nas plântulas cultivadas sob intensidade de  $28 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (BARRALES-LÓPEZ et al., 2015). Isto demonstra as diferentes respostas das plantas em relação à intensidade de luz mesmo quando cultivadas em ambientes controlados.

Quanto à produção de pigmentos fotossintéticos, também, verificou-se influência significativa dos ambientes de luz (TABELA 1). Os teores de clorofila a, b, total e carotenoide mostraram um aumento nas plantas cultivadas nas intensidades de luz intermediárias 51, 64 e  $76 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Vale destacar, também, que as plântulas cultivadas sob baixa intensidade de luz ( $28 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) tiveram um aumento de carotenoide e na razão carotenoide e clorofila total.

Tabela 1 - Pigmentos fotossintéticos de *Pogostemon cablin*, cultivadas *in vitro*, durante 40 dias, sob diferentes intensidades luminosas (28, 51, 64, 76 e 113  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )

Intensidades de luz ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	Clorofila (mg. g <sup>-1</sup> MF)			Carot.	Carot./ Clorof. total
	a	b	total		
28	0,57 <sup>c</sup>	0,28 <sup>c</sup>	0,85 <sup>d</sup>	0,35 <sup>a</sup>	0,41 <sup>a</sup>
51	1,22 <sup>a</sup>	0,61 <sup>a</sup>	1,84 <sup>a</sup>	0,43 <sup>a</sup>	0,23 <sup>b</sup>
64	0,89 <sup>b</sup>	0,57 <sup>a</sup>	1,46 <sup>b</sup>	0,37 <sup>a</sup>	0,25 <sup>b</sup>
76	0,86 <sup>b</sup>	0,42 <sup>b</sup>	1,28 <sup>c</sup>	0,23 <sup>b</sup>	0,18 <sup>c</sup>
113	0,69 <sup>c</sup>	0,60 <sup>a</sup>	1,29 <sup>c</sup>	0,23 <sup>b</sup>	0,18 <sup>c</sup>

\* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Scott- Knott a 5%. **Carot.**= carotenoides. **MF**= matéria fresca.

O aumento nos teores de clorofila b em ambientes com menores intensidades de luz é uma característica importante de adaptação da planta a ambientes sombreados, pelo fato desse pigmento captar fótons com maiores comprimentos de onda observados neste tipo de ambiente (TAIZ; ZEIGER, 2009). Além disso, o maior acúmulo de clorofila total nas intensidades de luz intermediária pode ter ocorrido em virtude do efeito compensatório da espécie à menor quantidade de irradiância disponível (ALMEIDA et al., 2004). Assim, o aumento nos teores de clorofila a e b, em ambientes de intensidades de luz intermediárias, pode ter proporcionado maiores taxas fotossintéticas, principalmente, quanto à captação de luz corroborando com o maior crescimento observado nessas condições. Resultados semelhantes foram observados para *Momordica grosvenori* que, quando cultivada sob 50  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , apresentou maior produção de clorofilas e crescimento (ZHANG et al., 2009).

Por ter seu desenvolvimento, em condições naturais, considerado mais satisfatório em ambientes semissombreado, as altas e baixas intensidades podem

promover a inibição da síntese ou degradação de clorofilas. Desta forma, promovem o aumento no conteúdo de carotenoides observado em condições de baixa intensidade de luz. Enquanto o aumento do acúmulo de carotenoides sob as intensidades intermediárias de luz confirma o melhor desenvolvimento do aparato fotossintético observado para a espécie nessas condições.

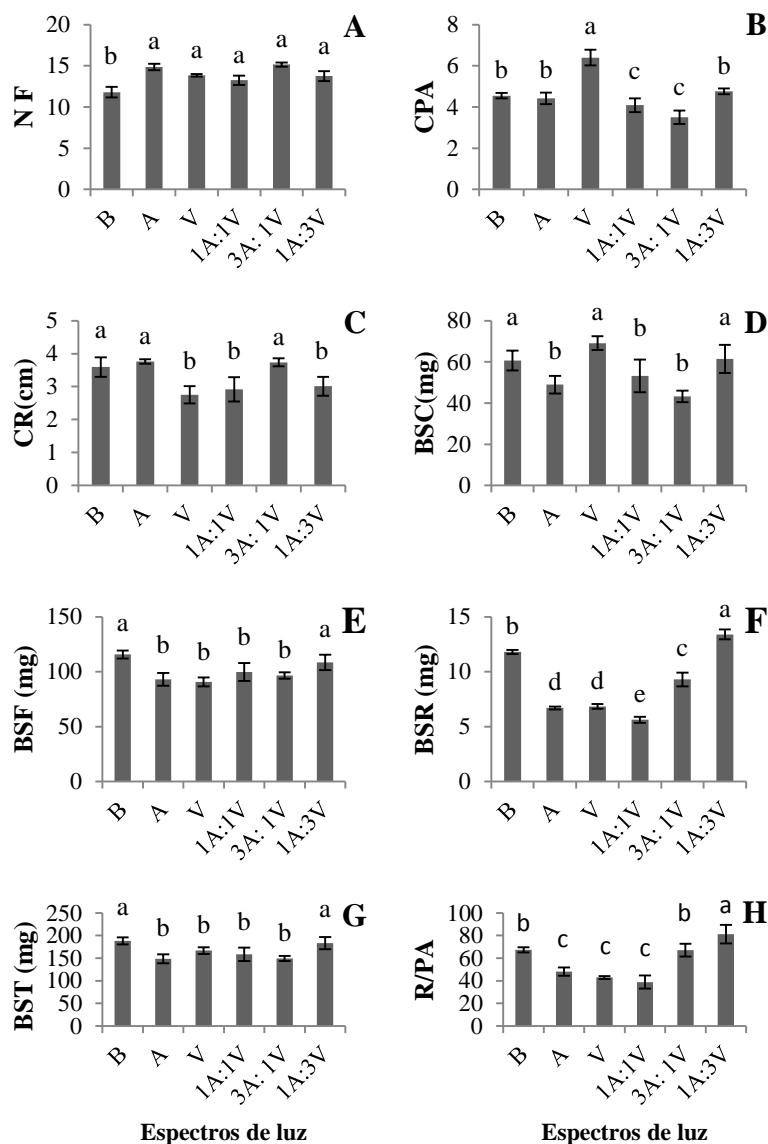
A razão entre carotenoides e clorofila total diminui com o aumento da intensidade de luz (TABELA 1). Jo et al. (2008) reportaram que houve aumento da razão entre carotenoides e clorofila com maior intensidade de luz, isto é, uma medida de proteção contra uma absorção excessiva de luz. Além disso, segundo Jeon et al. (2005) e Pandey, Kang e Yeo (2005), o carotenoide pode dissipar o excesso de energia e proteger a clorofila da foto - oxidação e reduzir a fotoinibição.

### **3.2 Efeito da Qualidade de Luz**

Os diferentes LEDs proporcionaram alterações no crescimento de *P. cablin in vitro*. As plantas cultivadas sob os LEDs de luz branca e na combinação 1A:3V apresentaram maiores comprimentos de raiz, biomassa seca de folha, biomassa seca de caule e biomassa seca total (FIGURA 6). Nas plantas cultivadas, sob luz monocromática vermelha, foi verificado maior comprimento da parte aérea (FIGURA 6B), enquanto as plantas cultivadas, sob LED na combinação 1A:3V, tiveram maior relação R/PA (FIGURA 6H), ocorrendo maior investimento em raiz. Na Figura 7 pode-se observar o aspecto geral da planta nos diferentes tratamentos.



Figura 6 - Crescimento de *Pogostemon cablin* cultivadas em meio MS, sob LEDs branca, azul, vermelha, azul e vermelha (1:1), azul e vermelha (3:1) e azul e vermelha (1:3), durante 40 dias.



Legenda: **A**= número de folhas; **B**= comprimento da parte aérea; **C**= comprimento de raiz; **D**= biomassa seca do caule; **E**= biomassa seca das folhas; **F**=biomassa seca da raiz; **G**= biomassa seca total; **H**= razão raiz/ parte aérea. Barras com a mesma letra não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5%. Barras verticais indicam erro padrão.

Figura 7 - Plântulas de *Pogostemon cablin*, cultivadas *in vitro* em meio MS, sob LEDs branca, azul, vermelha, azul e vermelha (1:1), azul e vermelha (3:1) e azul e vermelha (1:3), durante 40 dias.



A partir dos resultados obtidos, verifica-se que o crescimento *P. cablin* exige a presença de espectros de luz, na região do vermelho, indicando possível envolvimento do fitocromo nos processos relacionados a seu desenvolvimento. O fitocromo trata-se de um fotorreceptor que absorve luz mais fortemente na região do vermelho e vermelho-distante (MATHEWS, 2010). Além disso, em comprimentos de onda, na região do vermelho, esse fotorreceptor possibilita a realização de fotossíntese de forma mais eficiente (SUN; NISHIO; VOGELMANN, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2009). Tal envolvimento pode estar associado à maior produção de biomassa observada nos tratamentos que possuíam espectros de luz na região do vermelho. Visto que o LED branco possuía uma mistura de comprimentos de onda, incluindo o vermelho, sendo o seu espectro semelhante ao da luz solar, ele, também, propiciou maior crescimento relacionado à ação do fitocromo (FOLTA; CHILDERS, 2008).

Além disso, o maior investimento radicular, observado nas plantas cultivadas sob a combinação 1A:3V, também, está associado a respostas mediadas pelo fitocromo. Desta forma, o cultivo *in vitro*, nessas condições, pode promover parâmetros que beneficiam a planta no processo de aclimatização.

Observa-se que plantas com sistema radicular bem formado permitem uma aclimatização mais rápida e melhores taxas de sobrevivência em campo (CHANDRA et al., 2010; GRUSZECKI et al., 2010).

O maior comprimento da parte aérea observado nas plantas cultivadas sob o espectro monocromático vermelho, também, pode ser atribuído a um processo mediado pelo fitocromo. Este fotorreceptor atua ativando enzimas como, por exemplo, as associadas à síntese de auxinas que é um hormônio que proporciona esse crescimento. Desta forma, a produção deste hormônio é mantida em plantas cultivadas sob espectro de luz vermelho e degradada em plantas cultivadas sob luz azul (MARKS; SIMPSON, 1999). Kim et al. (2004), também, verificaram alongamento da parte aérea de crisântemos cultivados *in vitro*, sob luz na faixa do vermelho.

Para outras espécies, também, foram verificadas respostas diversas relacionadas ao cultivo *in vitro* com o uso de LEDs. Em plântulas de *Achillea millefolium*, foi observada melhor resposta para comprimento e biomassa seca de raiz em plântulas sob o espectro luminoso azul (ALVARENGA et al., 2015). Para *Jatropha curcas* e *Protea cynaroides*, houve maior formação de raízes sob LEDs com espectro vermelho (DAUD et al., 2013; WU; LIN, 2012) . Combinação de LEDs com espectro azul (30%) e vermelho (70%) induziram à maior biomassa seca de morango cultivado *in vitro* (NHUT et al., 2003). Em *Saccharum officinarum* foi observado melhor resultado, para biomassa seca total, quando se utilizou combinação de LEDs azul (30%) e vermelha (70%) (MALUTA et al., 2013). A partir desses estudos, verifica-se uma variação interespecífica no cultivo *in vitro* sob LEDs.

O conteúdo dos pigmentos fotossintéticos, em plântulas de *P. cablin*, variou em resposta aos diferentes LEDs (TABELA 2). A concentração de clorofila a, clorofila b e clorofila total foi maior em plântulas sob luz com espectro branco e 3A:1V. Esse resultado demonstra o envolvimento da luz azul,

na síntese de clorofila da espécie, pois por meio do espectro da luz LED branca, observado na Figura 3, nota-se uma banda larga, principalmente, na região do azul.

O aumento nos teores de clorofila observados, nos tratamentos com maior quantidade de luz, na região espectral azul, pode estar relacionado à influência desse comprimento de onda na biossíntese de clorofila e de outros pigmentos por meio da regulação genética (TSUNOYAMA et al., 2002). Segundo Larcher (2003), as alterações na biossíntese de clorofila pelas alterações na qualidade espectral podem proporcionar vantagens quanto ao crescimento dos vegetais.

Tabela 2 - Pigmentos fotossintéticos de *Pogostemon cablin*, cultivadas *in vitro*, durante 40 dias, sob LEDs branca, azul, vermelha, azul e vermelha (1:1), azul e vermelha (3:1) e azul e vermelha (1:3), durante 40 dias.

Fonte de luz (LED)	Clorofila (mg. g <sup>-1</sup> MF)			Carotenóides	Caroten./ Clorof. total
	a	b	total		
Branco	1.07 <sup>a</sup>	0.61 <sup>a</sup>	1.69 <sup>a</sup>	0.26 <sup>a</sup>	0.15 <sup>b</sup>
Vermelho	0.80 <sup>b</sup>	0.31 <sup>b</sup>	1.12 <sup>b</sup>	0.30 <sup>a</sup>	0.26 <sup>a</sup>
Azul	0.99 <sup>a</sup>	0.48 <sup>b</sup>	1.48 <sup>b</sup>	0.24 <sup>b</sup>	0.16 <sup>b</sup>
Azul: Verm (1:1)	0.68 <sup>b</sup>	0.25 <sup>b</sup>	0.94 <sup>b</sup>	0.14 <sup>b</sup>	0.14 <sup>b</sup>
Azul:Verm (1:3)	0.77 <sup>b</sup>	0.23 <sup>b</sup>	1.01 <sup>b</sup>	0.18 <sup>b</sup>	0.17 <sup>b</sup>
Azul:Verm (3:1)	1.00 <sup>a</sup>	0.55 <sup>a</sup>	1.55 <sup>a</sup>	0.23 <sup>b</sup>	0.14 <sup>b</sup>

\*Médias pelo Teste Scott-Knott a 5%. MF= matéria fresca.

Assim, esses resultados indicam que a espécie *P. cablin* se adapta, cromaticamente, no sentido de melhorar o seu desempenho fotossintético, embora não tenha sido observado aumento no crescimento, neste estudo, nos

tratamentos com maiores acúmulos de clorofila. Esses resultados podem estar associados a uma defesa da planta, para evitar prejuízos no aparato fotossintético, visto que a luz azul apresenta altas quantidades de energia o que poderia estar comprometendo a atividade dos fotossistemas e, conseqüentemente, do crescimento da planta.

Em *Withania somnifera*, foram observados maiores teores de pigmentos fotossintéticos em plântulas sob uma combinação de LEDs azul e vermelha, quando comparada a lâmpadas com espectro do vermelho e vermelho distante (LEE et al., 2007). Lin et al. (2011) encontraram maiores teores de clorofila e carotenoides em *Dendrobium officinale* cultivadas *in vitro*, quando utilizado LED's com espectro azul.

Vale salientar, também, que foi observada uma queda na produção de clorofila nas plantas cultivadas sob espectro de luz vermelho. Essa redução pode estar ligada ao fato de que sob espectro de luz vermelha ocorre um desequilíbrio de energia que interfere no funcionamento dos fotossistemas I e II e, conseqüentemente, na produção de clorofila nesses fotossistemas (TENNESSEN; SINGSAAS; SHARKEY, 1994).

O conteúdo de carotenoides e a razão carotenoides/clorofila total foram maiores em plântulas cultivadas sob a luz monocromática vermelha e branca (TABELA 2). Isso indica que essas condições podem ter propiciado estresse para a planta, visto que os carotenoides são pigmentos acessórios que absorvem melhor na faixa do azul e ultravioleta protegendo a planta nessas situações estressantes (OREN-SHAMIR et al., 2001). Vale salientar, também, que o aumento dos carotenoides, nas plantas cultivadas sob luz branca, pode ter propiciado melhor ajuste do aparato fotossintético e, conseqüentemente, maior atividade fotossintética, o que pode ter contribuído para o maior crescimento observado nessa condição.

Resultados contrários foram observados por Yia et al. (2014) em *Cordyceps militaris* que, quando cultivada sob LED vermelho, teve uma redução no conteúdo de carotenoides, quando comparado aos LEDs branco, azul e combinações de azul e vermelho. Assim, o patchouli, aparentemente, ajusta sua síntese de pigmentos e, conseqüentemente, sua atividade fotossintética em função da qualidade de luz. Em determinadas situações (luz vermelha), esse ajuste é feito como forma de proteção para garantir a sobrevivência da espécie e, em outros (luz branca), para propiciar maior crescimento. No entanto, por ser um estudo pioneiro com o cultivo *in vitro* de patchouli, sob diferentes espectros de luz, são necessários mais estudos morfofisiológicos para elucidar o efeito da qualidade de luz no seu desenvolvimento e fisiologia.

#### 4 CONCLUSÃO

A intensidade e a qualidade de luz são fatores determinantes para o cultivo *in vitro* de *Pogostemon cablin*. Esta planta possui maior crescimento na intensidade de luz de  $76 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Para os pigmentos fotossintéticos, os maiores teores são observados na intensidade de  $51 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Assim, a partir dos resultados obtidos, pode - se afirmar que baixas e altas intensidades de luz não são apropriadas, para o crescimento *in vitro* de *P. cablin*, visto que a espécie possui crescimento mais favorável em condições de luz intermediárias.

As plântulas sob LEDs de espectro branco, vermelho e combinações de azul e vermelho (1:3) proporcionam melhores respostas de crescimento, enquanto que os pigmentos fotossintéticos foram maiores nas plântulas cultivadas sob LED com espectro branco. Faz-se necessário avaliar, ainda, a influência desses regimes luminosos na composição química volátil de plântulas *in vitro* e aclimatizadas para que possa ser estabelecido um método de micropropagação da espécie. Isto não foi possível realizar neste estudo em razão da pouca disponibilidade de material vegetal disponível.





## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. P. et al. Crescimento inicial de plantas de *Cryptocariaas chersoniana* Mez. submetidas a níveis de radiação solar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 83-88, jan./fev. 2004.
- ALVARENGA, I. C. A. et al. *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. **Plant Cell Tissue, Organ Culture**, Dordrecht, v. 122, n. 2, p. 299-308, Aug. 2015.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 24, n. 1, p. 1-5, Jan. 1949.
- AVATO, P. et al. Glandular hairs and essential oils in micropropagated plants of *Salvia officinalis* L. **Plant Science**, Shannon, v. 169, n. 1, p. 29-36, July 2005.
- BARRALES-LÓPEZ, A. et al. Improved *in vitro* rooting and acclimatization of *Capsicum chinense* Jacq. plantlets. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 51, n. 3, p. 274-283, June 2015.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise decrescimento de plantas**. Jaboticabal: FUNEP, 1988. 42 p.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- CHANDRA, S. et al. Acclimatization of tissue cultures plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 32, n. 9, p. 1199-1205, 2010.
- CLAUSSEN, J. W. Acclimation abilities of three tropical rainforest seedlings to an increase in light intensity. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 80, p. 245-255, 1996.
- DAUD, N.; FAIZAL, A.; DANNY GEELLEN, D. Adventitious rooting of *Jatropha curcas* L. is stimulated by phloroglucinol and by red LED light. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 49, n. 2, p. 183-190, Apr. 2013.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR - Sistemas de Análises de Variância para Dados Balanceados**: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos. Lavras: UFLA, 2011. Software.

FOGAÇA, L. A. et al. Características morfofisiológicas de brotos micropropagados de agapantho sob diferentes intensidades luminosas e concentrações de sacarose. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 371-378, 2007.

FOLTA, K. M.; CHILDERS, K. S. Light as a growth regulator: controlling plant biology with narrow-bandwidth solid-state lighting systems. **HortScience**, Alexandria, v. 43, n. 7, p. 1957-1964, Dec. 2008.

GRUSZECKI, W. I. et al. Blue-light-controlled photoprotection in plants at the level of the photosynthetic antenna complex LHCII. **Journal of Plant Physiology**, New York, v. 167, n. 1, p. 69-73, 2010.

HU, L. F. et al. GC-MS fingerprint of *Pogostemon cablin* in China. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 42, n. 2, p. 200-206, Sept. 2006.

JEON, M. W. et al. Effect of photon flux density on the morphology, photosynthesis, and growth of a CAM orchid, *Doritaenopsis* during post-micropropagation acclimatization. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 45, n. 2, p. 139-147, Jan. 2005.

JO, E. A. et al. Effect of photoperiod and light intensity on *in vitro* propagation of *Alocasia amazônica*. **Plant Biotechnology Reports**, London, v. 2, p. 207-212, Dec. 2008.

JOY, P. P. et al. Aromatic plants. **Tropical Horticulture**, Calcutta, v. 2, p. 633-733, 2001.

KIM, S. J. et al. Effects of LEDs on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of *Chrysanthemum* plantlets *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 101, n. 1/2, p. 143-151, May 2004.

KUKREJA, A. K.; MATHUR, A. K.; ZAIM, M. Mass production of virus-free patchouli plants [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] by *in vitro* culture. **Tropical Agriculture**, Kerala, v. 67, n. 2, p. 101-104, 1990.

LARCHER, W. **Physiological plant ecology**. Berlin: Springer Verlag, 2003. 513 p.

LEE, S. H. et al. Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania Somnifera* (L.) Dunal. Plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 90, n. 2, p. 141-151, Aug. 2007.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In: WROLSTAD, R. E. et al. (Ed.). **Current protocols in food analytical chemistry**. Davis: J. Wiley, 2001. p. 1-8.

LICHTENTHALER, H. K. et al. Differences in pigment composition, photosynthetic rates and chlorophyll fluorescence images of sun and shade leaves of four tree species. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 45, n. 8, p. 577-588, 2007.

LIN, Y. et al. Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of *Dendrobiumofficinale in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 105, n. 3, p. 329-335, June 2011.

MALUTA, F. A. et al. Cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar exposta a diferentes fontes de luz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 9, p. 1303-1307, set. 2013.

MARKS, T. R.; SIMPSON, S. E. Effect os irradiance on shoot development *in vitro*. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 28, n. 2, p. 133-142, June 1999.

MATHEWS, S. Evolutionary studies illuminate the structural-functional model of plant phytochromes. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, n. 1, p. 4-16, Jan. 2010.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.

NHUT, D. T. et al. Efficiency of a novel culture system by using light-emitting diode (led) on *in vitro* and subsequent growth of micropropagated banana plantlets. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 616, p. 121-127, 2003.

NUNES, X. P. et al. Antimicrobial activity of the essential oil of *Sidacordifolia* L. Braz. **Journal of Pharmacognosy**, João Pessoa, v. 16, p. 642-644, Dec. 2006.

OREN-SHAMIR, M. et al. Coloured shade nets can improve the yield and quality of green decorative branches of *Pittosporum variegatum*. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 76, n. 3, p. 353-361, 2001.

PANDEY, D. M.; KANG, K. H.; YEO, U. D. Effects of excessive photon on the photosynthetic pigments and violaxanthin de-epoxidase activity in the xanthophylls cycle of spinach leaf. **Plant Science**, Shannon, v. 168, n. 1, p. 161-166, Jan. 2005.

SÁEZ, P. L. et al. Influence of *in vitro* growth conditions on the photo synthesis and survival of *Castanea sativa* plantlets during ex vitro transfer. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 75, n. 3, p. 625-639, Apr. 2015.

SILVA, G. M. da. **Micropropagação e produção de constituintes voláteis *in vitro* de *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton**. 2013. 114 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

SUN, J.; NISHIO, J. N.; VOGELMANN, T. C. Green light drives CO<sub>2</sub> fixation deep with in leaves. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 39, n. 10, p. 1020-1026, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2009. 719 p.

TENNESSEN, D. J.; SINGSAAS, E. L.; SHARKEY, T. D. Light-emitting diodes as a light source for photosynthesis research. **Photosynthesis Research, Dordrecht**, v. 39, n. 1, p. 85-92, 1994.

TSUNOYAMA, Y. et al. Blue light specific and differential expression of plastid sigma factor, Sig5 in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 516, n. 1, p. 225-228, 2002.

WU, H. C.; LIN, C. C. Red light-emitting diode light irradiation improves root and leaf formation in difficult-to-propagate *Protea cynaroides* L. plantlets *in vitro*. **HortScience**, Alexandria, v. 47, n. 10, p. 1490-1494, 2013.

YIA, Z. L et al. LED lights increase bioactive substances at low energy costs in culturing fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, n. 175, p. 139-143, 2014.

ZAVALA, J. A.; RAVETTA, D. A. Allocation of photoassimilates to biomass, resin and carbohydrates in *Grindelia chiloensis* as affected by light intensity. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 69, n. 2, p. 143-149, 2001.

ZHANG, M. et al. Growth and photosynthetic capability of *Momordica grosvenori* plantlets grown photoautotrophically in response to light intensity. **HortScience**, Alexandria, v. 44, n. 3, p. 757-763, June 2009.

ZHAO, Z. et al. Determination of Patchoulic Alcohol in Herba Pogostemonis by GC MS-MS. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 53, n. 7, p. 856-860, 2005.