



LUIZ EDUARDO SANTOS LAZZARINI

**LIGHT, NATURAL VENTILATION SYSTEM AND GROWTH
REGULATORS IN MICROPROPAGATION AND VOLATILE
CHEMICAL ANALYSIS OF *Lippia gracilis* Schauer
(VERBENACEAE)**

**LAVRAS-MG
2017**

LUIZ EDUARDO SANTOS LAZZARINI

**LIGHT, NATURAL VENTILATION SYSTEM AND GROWTH REGULATORS IN
MICROPROPAGATION AND VOLATILE CHEMICAL ANALYSIS OF *Lippia
gracilis* Schauer (VERBENACEAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Orientador

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Coorientador(a)

**LAVRAS-MG
2017**

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

Lazzarini, Luiz Eduardo Santos.

Light, natural ventilation system and growth regulators in
micropropagation and volatile chemical analysis of *Lippia gracilis*
Schauer (Verbenaceae) / Luiz Eduardo Santos Lazzarini. - 2017.
128 p.

Orientador(a): José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Coorientador(a): Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Cultivo *in vitro*. 2. Fração volátil. 3. Planta medicinal. I.
Pinto, José Eduardo Brasil Pereira. II. Bertolucci, Suzan Kelly
Vilela. III. Título.

LUIZ EDUARDO SANTOS LAZZARINI

**LIGHT, NATURAL VENTILATION SYSTEM AND GROWTH REGULATORS IN
MICROPROPAGATION AND VOLATILE CHEMICAL ANALYSIS OF *Lippia
gracilis* Schauer (VERBENACEAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 27 de outubro de 2017.

Dra. Priscila Pereira Botrel	IFSULDEMINAS
Dr. Gilvano Ebling Brondani	UFLA
Dra. Leila Aparecida Salles Pio	UFLA
Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci	UFLA

Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Orientador

**LAVRAS-MG
2017**

AGRADECIMENTOS

Aos meus maravilhosos pais pela dedicação e amor incondicional, mesmo nos momentos de dificuldades sempre compreensivos e amorosos. Se sou quem eu sou hoje e se cheguei até aqui, foi graças a vocês.

Ao meu orientador professor Dr. José Eduardo, pela orientação, paciência dedicação e cuidado com os seus “filhos”. Com certeza os ensinamentos vão além do saber científico. Agradeço aos bons conselhos e amizade durante todo o percurso.

A amiga Sâmia, que foi a primeira a me receber na UFLA, e com toda a sua bondade e atenção, já me fez sentir inserido no grupo. Sempre disposta a ajudar no que for preciso.

As minhas maravilhosas meninas do Pará. Eu não sei se conseguiria chegar até o fim se não tivesse vocês comigo. Muito mais importante do que o título de doutor, é a amizade de vocês, que será para a vida. Carol, Ana Paula, Fernanda, Tainá e Diene, vocês não tem noção de como são importantes e especiais na minha vida. Amo vocês.

As amigas de todas as horas, Thaina e Livia, que tornaram os momentos muito mais felizes, com o sorriso solto, as conversas fiadas e a alegria contagiante. Maravilhosas que quero para sempre.

Aos alunos de iniciação científica Jaqueline e Alexsandro, pela ajuda nos experimentos. Vocês fazem parte disso tudo.

Ao Evaldo, pelo socorro e por sempre está presente nas atividades do laboratório.

A Marli pela paciência e disponibilidade em nos ajudar e sanar as nossas duvidas junto ao programa.

A todas as pessoas que passaram pela minha vida nesses 3 anos, afinal nada acontece por acaso, e se nossos caminhos se cruzaram, algum motivo tinha.

A Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Agricultura (DAG) pela oportunidade concedida para a realização do doutorado

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos

A Abant Izzet Baysal Universitesi (AIBU) e aos professores Dr. Ekrem Gurel e Dr. Buhara Yucesan pelo valioso conhecimento adquirido no período sanduiche em Bolu, Turquia. Foram momentos inesquecíveis de muito aprendizado e conhecimento.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

MUITO OBRIGADO.

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes.” (Cora Coralina)

RESUMO

A *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae), popularmente conhecida como alecrim de tabuleiro é utilizada na medicina popular para tratar resfriados, tosse, sinusite, bronquite, dor de cabeça e externamente afecções da pele, queimaduras, feridas e úlceras. Objetivou-se estabelecer a espécie *in vitro* e avaliar a influência da intensidade e qualidade de luz, sistemas de ventilação natural e reguladores de crescimento, no crescimento e na composição química da fração volátil da *L. gracilis*. Para o estabelecimento *in vitro* foram avaliados fonte (apical e nodal), origem (campo e casa de vegetação) e meio de cultivo (MS e MS/2). No experimento de posição, os explantes foram inoculados na horizontal e vertical. Para os experimentos de concentração de sacarose quatro concentrações foram avaliadas: 60, 30, 15 e 7,5 g L⁻¹ de sacarose. Similarmente o experimento de concentração de sais consistiram de quatro concentrações de sais (2MS, MS, ½ MS e ¼ MS). Recomenda-se utilizar segmentos nodais e apicais provenientes de casa de vegetação para o estabelecimento *in vitro* da espécie. A taxa de multiplicação e número de brotações foi incrementada com a inoculação de explantes na posição horizontal. Deve-se utilizar 30 g L⁻¹ de sacarose e ½ MS. No experimento de intensidade e qualidade de luz, segmentos apicais e nodais foram cultivados por 30 dias sob as intensidades de 26, 51, 69, 94 e 130 μmol m⁻² s⁻¹ obtidas com lâmpadas fluorescentes brancas frias e sob *light emitting diodes* (LEDs) azul; vermelho; 1 azul : 2,5 vermelho; 2,5 azul : 1 vermelho e Branca. Para o cultivo *in vitro* de *L. gracilis*, recomenda-se o uso de LED vermelho e altas intensidades luminosas. Nos sistemas de ventilação natural (SVN), cultivaram-se segmentos nodais com folha e sem folha por 35 dias sob sistema sem membrana (SM) e sistema de ventilação natural com uma (SVN1), duas (SVN2) e quatro membranas porosas (SVN4). Recomenda-se utilizar explantes com um par de folhas e quatro membranas porosas. Nos experimentos de reguladores de crescimento foram testadas 5 concentrações de BAP: 0,0; 0,5; 0,75 ; 1,00 e 1,25 mg L⁻¹ e 3 concentrações de ANA: 0,0; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹, em esquema fatorial e um segundo experimento com: 0,0 BAP + 0,0 TDZ; 0,25 BAP + 0,25 TDZ; 0,3 BAP + 0,2 TDZ; 0,2 BAP + 0,3 TDZ; 0,1 BAP + 0,4 TDZ; 0,4 BAP + 0,1 TDZ mg L⁻¹. A combinação entre os reguladores estimulou o maior número de brotações e reduziu significativamente os níveis de carvacrol.

Palavras – chave: Cultivo *in vitro*. Fração volátil. Alecrim de tabuleiro. Luminosidade. Trocas gasosas. Hormônios.

ABSTRACT

Lippia gracilis Schauer (Verbenaceae), popularly known as “alecrim de tabuleiro” is used in folk medicine to treat colds, coughs, sinusitis, bronchitis, headache and externally skin conditions, burns, wounds, and ulcers. The objective of this study was to establish the species *in vitro* and to evaluate the influence of light intensity and quality, natural ventilation systems and the use of growth regulators on the growth and on the chemical composition of the volatile fraction of *L. gracilis*. For *in vitro* establishment, the explant source (apical and nodal), origin (field and greenhouse), and culture medium (MS and MS/2) were evaluated. In the position experiment, the explants were horizontally and vertically inoculated. For the sucrose concentration experiments four concentrations were evaluated: 60, 30, 15 and 7.5 g L⁻¹ of sucrose. Similarly, the salt concentration of culture medium experiment consisted of four salt concentrations (2MS, MS, ½ MS and ¼ MS). It is recommended to use nodal and apical segments from greenhouse for *in vitro* establishment of the species. The rate of multiplication and number of shoots was increased with the inoculation of explants in the horizontal position. It is recommended to use 30 g.L⁻¹ of sucrose and ½ MS salt concentration. In the experimente of light intensity and quality, apical and nodal segments were cultivated for 30 days under the intensities of 26, 51, 69, 94 and 130 µmol m⁻² s⁻¹ obtained with cold white fluorescent lamps and under light emitting diodes (LEDs) blue; red; 1 blue: 2.5 red; 2.5 blue: 1 red, and white. For *in vitro* cultivation of *L. gracilis*, it is recommended to use red LEDs and high luminous intensities. In the natural ventilation systems experiment (SVN), nodal segments were cultivated with and without leaves for 35 days under a membraneless system (SM) and natural ventilation system with one (SVN1), two (SVN2), and four porous membranes (SVN4). It is recommended to use explants with one pair of leaves and four porous membranes. In the growth regulator experiment, 5 concentrations of BAP: 0.0; 0.5; 0.75; 1.00 and 1.25 mg L⁻¹, and 3 ANA concentrations: 0.0; 0.5 and 1.0 mg L⁻¹, in a factorial design were tested, and a second experiment with: 0.0 BAP + 0.0 TDZ; 0.25 BAP + 0.25 TDZ; 0.3 BAP + 0.2 TDZ; 0.2 BAP + 0.3 TDZ; 0.1 BAP + 0.4 TDZ; 0.4 BAP + 0.1 TDZ mg L⁻¹. The combination between regulators stimulated the highest number of shoots and also significantly reduced carvacrol levels.

Keywords: *In vitro* culture. Volatile fraction. Alecrim de tabuleiro. Luminosity. Gas exchange. Hormones.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL	11
1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Plantas medicinais	12
2.2	Gênero <i>Lippia</i>	13
2.3	Espécie <i>Lippia gracilis</i>	14
2.4	Química volátil da espécie e análise por headspace – CG/EM	15
2.5	Fontes de radiação para plantas	17
2.6	Sistemas de ventilação natural	18
2.7	Reguladores de crescimento	20
	REFERÊNCIAS	21
	CAPÍTULO 2 A POSIÇÃO DO EXPLANTE E CONCENTRAÇÃO DE SAIS E SACAROSE AFETAM O CULTIVO <i>in vitro</i> DE <i>Lippia gracilis</i> Schauer	26
1	INTRODUÇÃO	28
2	MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1	Estabelecimento <i>in vitro</i>	30
2.2	Posição do explante	31
2.3	Concentrações de sacarose	31
2.4	Concentrações de sais	32
2.5	Análise estatística	32
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
3.1	Estabelecimento <i>in vitro</i>	32
3.2	Posição do explante	35
3.3	Concentrações de sacarose	37
3.4	Concentrações de sais	40
4	CONCLUSÕES	43
	REFERÊNCIAS	45
	CHAPTER 3 QUALITY AND INTENSITY OF LIGHT AFFECTS PLANT GROWTH AND VOLATILE COMPOUNDS OF <i>Lippia gracilis</i> Schauer <i>in vitro</i> *	49
1	INTRODUCTION	50
2	MATERIAL AND METHODS	51
2.1	Establishment of plant material	51
2.2	Light intensity	51
2.3	Light quality	52
2.4	Chemical analysis by headspace GC/MS	52
2.5	Statistical analysis	53
3	RESULTS AND DISCUSSION	53
3.1	Light intensity	53
3.2	Light quality	61

3.3	Principal Components Analyses (PCA).....	68
4	CONCLUSIONS.....	71
	ACKNOWLEDGEMENT.....	71
	REFERENCES.....	72
	CAPÍTULO 4 SISTEMAS DE VENTILACAO NATURAL AFETAM O CRESCIMENTO E ANÁLISE DA FRAÇÃO VOLÁTIL DE <i>Lippia gracilis</i> CULTIVADAS <i>in vitro</i>	79
1	INTRODUÇÃO.....	81
2	MATERIAIS E METODOS.....	82
2.1	Estabelecimento <i>in vitro</i> do material vegetal.....	82
2.2	Sistemas alternativos de membranas.....	83
2.3	Análise estatística.....	84
2.4	Análise química por headspace CG/EM.....	84
3	RESULTADOS E DISCUSSAO.....	85
3.1	Parâmetros de crescimento <i>in vitro</i>	85
3.2	Área foliar.....	89
3.3	Pigmentos fotossintéticos.....	91
3.4	Análises químicas por <i>headspace</i> – CG/EM.....	93
3.5	Análise dos componentes principais (PCA).....	95
4	CONCLUSÕES.....	97
	REFERÊNCIAS.....	98
	CAPÍTULO 5 REGULADORES DE CRESCIMENTO NA MICROPROPAGAÇÃO E FRAÇÃO VOLÁTIL DE <i>Lippia gracilis</i> Schauer UTILIZANDO ANÁLISE DE SUPERFICIE DE RESPOSTA	102
1	INTRODUÇÃO.....	104
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	106
2.1	Estabelecimento <i>in vitro</i> do material vegetal.....	106
2.2	Crescimento do explante com BAP X ANA.....	106
2.3	Crescimento do explante com BAP x TDZ.....	107
2.4	Análise química por <i>headspace</i> -CG/EM.....	107
2.5	Análise estatística.....	108
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	109
3.1	Crescimento do explante com BAP x ANA.....	109
3.2	Definição de fatores prioritários pela análise de Pareto.....	114
3.3	Análise química da fração volátil.....	116
3.5	Análise química da fração volátil.....	122
4	CONCLUSÕES.....	124
	REFERÊNCIAS.....	125

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

As tecnologias agrícolas, em seu sentido mais amplo, tem sido as responsáveis por apoiar o crescimento populacional e suas complexidades no decorrer do tempo. Alguns dos maiores avanços na produtividade das culturas agrícolas envolvem a integração de novas práticas agrícolas com o melhoramento genético (BENNETT et al., 2013).

Existem varias aplicações da biotecnologia visando à melhoria no desempenho das culturas, incluindo a seleção assistida por marcadores, a propagação *in vitro* de plantas e o resgate de embriões por meio da micropropagação, entre outras (MCCALLUM et al., 2000)

A totipotência permite que células vegetais sejam prontamente utilizadas para a propagação *in vitro* ou desenvolvimento de cultura de células. Os trabalhos com cultura de células vegetais dataram do início do século vinte, onde a partir daí, foram estabelecidas várias técnicas e metodologias utilizadas no processo, por meio do conhecimento adquirido com o passar dos anos (DAVIES; DEROLE, 2014).

A micropropagação é uma técnica da cultura de tecidos em que pequenos fragmentos do tecido vegetal, denominados explantes, são cultivados em meio nutritivo em condições assépticas, e possibilita o rápido aumento no número de indivíduos e a possibilidade de conservação de germoplasma, garantindo assim a manutenção da biodiversidade (DOS SANTOS et al., 2015). Vários fatores podem afetar o potencial de regeneração das espécies e, portanto há necessidade de definir o tipo de meio de cultivo a ser utilizado, a adição ou não de reguladores de crescimento, o tipo de explante, entre outros, já que seus efeitos são bastante distintos em função da espécie estudada, e são indispensáveis para estabelecer um protocolo de micropropagação (DE ASSIS et al., 2012).

A micropropagação permite a multiplicação em massa, a conservação das espécies, bem como a produção de plantas livres de microorganismos (SILVA et al., 2017). Durante o cultivo *in vitro* as plantas são submetidas a condições específicas no microambiente em que estão sendo cultivadas, que podem limitar o desenvolvimento dos tecidos. Por exemplo, os componentes do meio de cultura em que estão inseridas, a adição exógena de reguladores de crescimento, a umidade dentro do recipiente de cultivo, e a luz ineficiente que recebem das câmaras de crescimento (US-CAMAS et al., 2014). Essa tecnologia está avançando em aplicações para propagação clonal de culturas medicinais, hortícolas, agrônômicas e florestais.

A capacidade de regenerar a planta inteira a partir de células, tecidos ou órgãos somáticos cultivados vem sendo estudada por muitos grupos de pesquisa. No entanto, o problema de como as culturas se diferenciam em uma planta inteira e suas variações fisiológicas e anatômicas nas plantas regeneradas envolvem a otimização de protocolos para uma espécie. Existem diferenças nos potenciais de organogênese e respostas morfofisiológicas em famílias de plantas, gêneros, espécies e, até mesmo, genótipos de uma mesma espécie (ISAH, 2015). Portanto objetivou-se estabelecer a espécie *in vitro* e avaliar a influência da intensidade e qualidade de luz, sistemas de ventilação natural e reguladores de crescimento, no crescimento e na composição química da fração volátil da *L. gracilis*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas medicinais

Há relatos da utilização de plantas medicinais pelos homens desde os primórdios da humanidade, antes mesmo do surgimento da escrita, as populações já utilizavam as ervas para fins medicinais. Nos dias atuais as plantas medicinais continuam sendo utilizadas pelo homem em tratamentos alternativos de diversas enfermidades, por ser um recurso mais acessível em relação aos medicamentos alelopáticos (CARNEIRO et al., 2014). Porém, a continuidade da utilização desses recursos vem sendo ameaçada por fatores externos às práticas sociais das comunidades, como por exemplo, a maior facilidade de acesso aos serviços da medicina moderna e o êxodo rural que leva a perda do caráter utilitário do conhecimento popular acumulado há varias gerações, podendo levar ao desaparecimento desses conhecimentos, além da degradação ambiental a que esse material genético esta sujeito (PINTO et al., 2006).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), planta medicinal é toda planta, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos (BRASIL, 2010). O Brasil possui a maior diversidade genética do mundo, com cerca de 55 mil espécies catalogadas e possui uma ampla tradição no uso de espécies medicinais associadas ao conhecimento popular transmitido pelas gerações. Apesar dessa riqueza em diversidade de espécies da flora brasileira, o número de informações sobre plantas medicinais cresce pouco anualmente (CARNEIRO et al., 2014). Somente em 2006 houve a regulamentação do uso de plantas medicinais no Brasil, através do decreto da presidência da republica n° 5813, de 22 de junho, com a criação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Nesse mesmo ano, já havia sido criada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, pela Portaria do Ministério da Saúde GM/MS n° 971, visando a integração de sistemas

médicos complexos e recursos terapêuticos aos sistemas oficiais de saúde (DE FIGUEREDO et al., 2014).

As plantas produzem um vasto número de compostos químicos e moléculas que são potencialmente biodinâmicas. Entre essas substâncias, algumas são usadas no crescimento, reprodução, desenvolvimento e manutenção dos vegetais, como por exemplo, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios. Já outras substâncias apresentam finalidades distintas como atrair polinizadores e proteção contra herbívoros e patógenos, que também podem ser utilizadas com fins terapêuticos (DE PAIVA et al., 2016). Ocorrem variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas desses compostos nas plantas, que podem variar sazonal ou diariamente, intra ou interplanta ou ainda de maneira intraespecífica. Apesar de existir um controle genético, a expressão desses constituintes pode sofrer modificações provocadas por interações de processos bioquímicos, fisiológicos, evolutivos e ecológicos. Essas variações também podem ocorrer em função do desenvolvimento foliar e/ou surgimento de novos órgãos que podem levar a uma diluição desses constituintes na planta (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Pesquisas com plantas medicinais nativas e não domesticadas e que são potencialmente úteis aos homens, são extremamente importantes e necessárias para gerar informações e ampliar o conhecimento sobre a utilização dessas espécies. Estas podem servir como subsídio para a indústria farmacêutica. Além de possibilitar a geração de empregos e renda para agricultores (DE SOUZA et al., 2012).

2.2 Gênero *Lippia*

O gênero *Lippia* (Verbanaceae) inclui aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores. Essas espécies estão distribuídas principalmente em países da América do sul e central, e em territórios tropicais da África (TERBLANCHE; KORNELIUS, 1996). Muitas dessas espécies são tradicionalmente utilizadas como remédios gastrointestinais e respiratórios (MORTON, 1981). Algumas espécies de *Lippia* têm mostrado ação antimalárica (GASQUET et al., 1993), antiviral (ABAD et al., 1995) e atividades citostáticas (LOPEZ et al., 1979). Além disso, as folhas da maioria dessas espécies são utilizadas como tempero em preparações alimentares (MORTON, 1981). Em muitos casos, as partes usadas são as folhas ou partes aéreas, e flores, que comumente são preparadas por infusão ou decocção e, administradas oralmente (PASCUAL et al., 2001).

Existem poucos trabalhos publicados sobre a composição química e aspectos farmacológicos com essas espécies, apesar de haver muitas referências sobre o uso tradicional

dessas plantas, muitas vezes com ações contraditórias, devido a falta de informações sobre seus efeitos (PASCUAL et al., 2001). Em geral apresentam perfil consistente na composição química, atividades farmacológicas e são de uso popular, sendo mais comumente usadas para o tratamento de desordens respiratórias, resfriados, gripes, tosse, asma e bronquite (TREVISAN et al., 2016).

2.3 Espécie *Lippia gracilis*

A *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae), popularmente conhecida como alecrim do sertão, alecrim da chapada ou alecrim de tabuleiro (FIGURA 1), é uma planta típica da vegetação do semiárido nordestino, caracterizada por ser um pequeno arbusto caducifólio, ramificado, com caule quebradiço, de até 2 m de altura. Possui folhas aromáticas com pouco mais de 1 cm, picantes e com nervação bem aparente. Suas flores são pequenas, esbranquiçadas e se apresentam na forma de espigas de eixo curto. Os frutos são extremamente pequenos do tipo aquênio e suas sementes raramente germinam. A propagação, portanto é realizada via estaquia de ramos mais finos (LORENZI; MATOS, 2002).

É uma espécie endêmica do nordeste brasileiro, comumente encontrada nos estados da Bahia, Sergipe e Piauí, e é utilizada na medicina popular em comunidades tradicionais que habitam o semi-árido para tratar resfriados, tosses, sinusite, bronquite e dor de cabeça, e também é utilizada externamente para tratar doenças de pele, queimaduras, feridas e úlceras (DOS SANTOS et al., 2016)

Figura 1- Hábito da planta de *Lippia gracilis* Schauer em estágio de floração



Fonte: Do autor (2017).

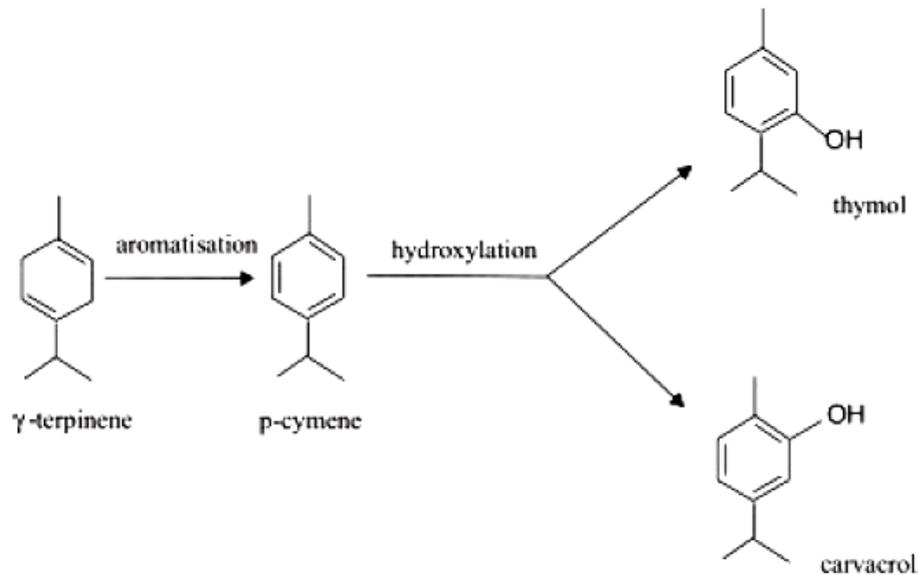
Devido a diversidade química nos óleos essenciais, os estudos sobre esse gênero e espécie confirmam o enorme potencial de aplicação medicinal, porém as concentrações dos constituintes químicos podem variar dependendo de vários fatores externos, dificultando assim o seu uso seguro e comercialização (SOARES; TAVARES-DIAS, 2013). Devido aos estudos relacionados a atividade farmacológica da *L. gracilis*, ela tem surgido como uma das mais importantes plantas medicinais do gênero, devido as suas diversas atividades medicinais (DOS SANTOS et al., 2016).

2.4 Química volátil da espécie e análise por headspace – CG/EM

Algumas espécies do gênero *Lippia* são caracterizadas pela presença de óleos essenciais, com atividade antimicrobiana, devido aos monoterpenos fenólicos timol e carvacrol e entre essas espécies destaca-se a *Lippia gracilis* devido aos altos teores desses monoterpenos (DE MATOS et al., 1999). Do ponto de vista da composição química são constituídos majoritariamente pelos monoterpenos fenólicos timol e carvacrol (DOS SANTOS et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2008; DE OLIVEIRA CRUZ et al., 2013).

Timol e carvacrol são constituintes químicos naturais da família Lamiaceae pioneiros em aplicações industriais, em especial na indústria de alimentos como conservantes microbiológicos, antioxidante e anti-aflatoxina (SHIMODA et al., 2006; TRIVELLINI et al., 2016). Timol ocorre também em plantas do gênero *Thymus*, *Carum*, *Baccharis*, *Centipeda*, *Inula*, *Arnica* (NAGLE et al., 2013), e carvacrol, em plantas dos gêneros *Origanum*, *Thymbra*, *Cordiothymus*, *Thymus*, *Satureja* e *Lippia* (SUGANTHI; MANPAL, 2013). Existem evidências da ação biológica e farmacológica desses compostos fenólicos como antibactericida, fungicida e acaricida (PESSOA et al., 2005; DOS SANTOS et al., 2016). Há relatos do seu uso como princípio ativo no uso de formulações antissépticas para o tratamento de infecções na boca, garganta e pele (LAMBERT et al., 2001). Outros compostos de natureza terpênica são encontrados no óleo essencial de *L. gracilis* S. como: *p*-cimeno, e γ -terpineno (CRUZ et al., 2013; DOS SANTOS, 2016). Segundo Poulou e Croteau (1978) a biossíntese de timol e carvacrol têm início na aromatização do *p*-cimeno a partir do γ -terpineno, que em seguida através de uma orto ou meta hidroxilação é, então, convertido a carvacrol ou timol, respectivamente (FIGURA 2).

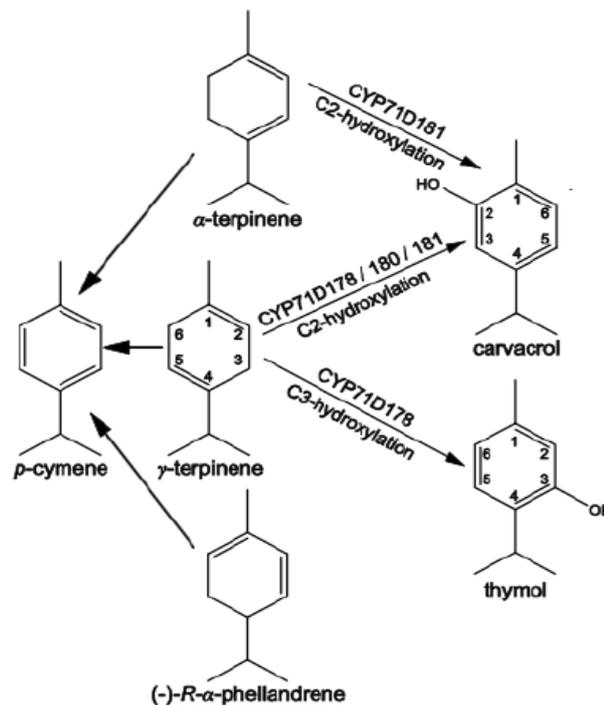
Figura 2- Rota Biosintética de timol e carvacrol por aromatização



Fonte: Adaptado de Rowshan et al. (2013).

Outra rota biosintética foi proposta por Crocoll (2011) que sugeriu que a formação do carvacrol, se dá através da reação de hidroxilação em C2 do α - terpineno ou γ -terpineno e a conversão do timol é realizada a partir da hidroxilação em C3 do γ -terpineno, e a formação do *p*-cimeno se dá através do α - terpineno, γ -terpineno e (-)-R- α -felandreno (FIGURA 3).

Figura 3-Rota biosintética de timol e carvacrol por hidroxilação



Fonte: Crocoll (2011).

Segundo dos Santos et al. (2016) embora a biossíntese desses compostos seja determinada por fatores genéticos, ela é intensamente afetada por fatores como a época de colheita, idade da planta, estágio de desenvolvimento, clima (temperatura, intensidade de luz, sazonalidade, etc) e características do solo. Por esse motivo, é importante analisar e medir a variação fenotípica determinada, tanto por fatores genéticos, quanto por fatores edafoclimáticos, uma vez que essa informação é essencial para o cultivo de *Lippia gracilis*.

A cromatografia gasosa (CG) pode ser utilizada para separar uma mistura complexa de gases ou substâncias volatilizáveis e se baseia na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa) (COLLINS et al., 2006). A cromatografia gasosa opera na faixa de massa molecular a partir de 2 (hidrogênio molecular) até cerca de 1500 unidades de massa (MARRIOT et al., 2001). Fração volátil é uma mistura de voláteis em uma matriz vegetal que pode ser amostrada em decorrência da sua capacidade em vaporizar espontaneamente ou em condições adequadas ou ainda através de técnicas apropriadas, que produzem amostras de diferentes composições, sendo representativas dos voláteis que caracterizam a espécie em estudo (BICCHI et al., 2008).

Headspace é um dos mais populares métodos de preparo de amostra para análise da fração volátil em matrizes vegetais e mais apropriada para análises de compostos muito voláteis (SANZ et al., 2001). A técnica empregada é usualmente classificada de acordo com o princípio do preparo da amostra, sendo que nesse trabalho será empregada a técnica do *headspace* estático. Nessa técnica a fase de vapor onde estão os compostos voláteis, é coletada com uma seringa após ocorrer o equilíbrio da fase gasosa com a fase sólida ou líquida da amostra e logo em seguida é injetada no cromatógrafo. Desta forma, as perdas dos voláteis são minimizadas pela redução do manuseio da amostra (FRANCO; JANZANTTI, 2003; THOMAZINI; FRANCO, 2000).

2.5 Fontes de radiação para plantas

As plantas utilizam a luz como fonte de energia no processo de fotossíntese e respondem a essa energia luminosa de acordo com a sua intensidade, comprimento de onda e direção em que estão sendo emitidas. Plantas percebem a luz através de fotorreceptores, como os fitocromos e criptocromos, e respondem a esses receptores gerando uma série de eventos fisiológicos específicos (MUNEER et al., 2014). Segundo Dong et al. (2014) e Samuolienė et al. (2013) um dos desafios da cultura de tecidos é fornecer de maneira controlada intensidades de luz em quantidade e qualidade suficientes para o desenvolvimento das plantas.

Para as plantas autotróficas, a faixa de energia radiante, definida como radiação fotossinteticamente ativa, esta entre 400 e 700 nm, e é o maior fator ambiental que controla o seu crescimento e desenvolvimento. O espectro da fonte de radiação deve atender as exigências da planta para a fotossíntese e o desenvolvimento fotomorfogênico (BULA et al., 1991). A importância da luz para o desenvolvimento das plantas está estabelecido atualmente. Sabe-se que a intensidade da luz, comprimento de onda (qualidade da luz) e o fotoperíodo regulam o crescimento, diferenciação, morfogênese de células das plantas na cultura de tecidos (SILVA et al., 2014).

As fontes de radiação mais comumente utilizadas em ambientes controlados de crescimento de plantas são as lâmpadas fluorescentes, iodetos metálicos, sódio em alta pressão, e lâmpadas incandescentes. Essas lâmpadas comercialmente disponíveis foram desenvolvidas para aplicações em iluminação de ambientes humanos. Uma vez que os fotorreceptores de plantas diferem dos seres humanos, as fontes de luz utilizadas atualmente nas instalações de cultivo de plantas apresentam várias limitações e, conseqüentemente, não são uma fonte de radiação ideal para as plantas (BULA et al., 1991). Porém lâmpadas fluorescentes emitem um amplo espectro luminoso que varia de 350 a 750 nm, incluindo comprimentos de onda desnecessários e que são de baixa qualidade para promover o crescimento vegetal (RAMIREZ-MOSQUEDA et al., 2016).

Fontes de radiação com maior eficiência elétrica e capaz de gerar uma maior eficiência fotossintética seria um benefício significativo em termos de pesquisa e aplicações em produção de culturas comerciais. Sistemas de irradiação baseados em diodos de emissão de luz, ou seja, lâmpadas LED, tem sido descrito e utilizado com esse propósito em ambientes de crescimento controlado em virtude dos benefícios que podem trazer para as plantas (IGNATIUS et al., 1991).

As vantagens das lâmpadas LED, incluem tamanho reduzido, comprimento de onda específico, intensidade e qualidade de luz ajustáveis, bem como alta eficiência de conversão fotoelétrica. Tais vantagens tornam as lâmpadas LEDs perfeitas para suportar o crescimento de plantas em ambientes controlados (YEH; CHUNG, 2009).

2.6 Sistemas de ventilação natural

A micropropagação convencional é realizada na presença de alta umidade. Além disso, o conteúdo interno de gás carbônico (CO₂) e a troca de gases da planta com o ambiente externo são reduzidos. As folhas das plantas cultivadas nesta condição apresentam

anormalidades, que ocorrem devido a não completa ativação do aparato fotossintético (POSPÍŠILOVÁ et al., 1999; HAZARIKA, 2006). Para reduzir este problema, pesquisas têm buscado a rusticificação de plântulas cultivadas *in vitro* através da implementação de sistemas mixotróficos de cultivo. Como as membranas comerciais para esse tipo de cultivo são caras, e podem limitar a sua utilização, Saldanha et al. (2012) manufaturaram uma membrana alternativa de baixo custo que possibilita trocas gasosas.

Segundo Vasconcelos et al. (2012) uma das anormalidades relatadas na micropropagação é a hiperidricidade, definida como uma desordem fisiológica, bioquímica e morfológica causada pelo acúmulo anormal de água no interior das células e tecidos. As plantas afetadas por essa desordem ficam inchadas, com coloração verde clara, folhas translúcidas, aparência vítrea e hipolignificadas. Ivanova e Staden (2010) utilizaram ventilação natural para reduzir a hiperidricidade em *Aloe polyphylla* cultivada *in vitro*. Verificaram ainda que trocas gasosas entre a atmosfera *in vitro* e o ambiente exterior é um pré-requisito para controlar esta desordem. Em recipientes fechados, a hiperidricidade afetou 84% dos brotos formados. A troca gasosa foi possibilitada pelo uso de tampas modificadas com um buraco coberto com poliéster ou malha de algodão. Nas culturas ventiladas, a hiperidricidade foi completamente eliminada.

Gonçalves et al. (2008) testaram o efeito de diferentes materiais de vedação e troca gasosa no cultivo *in vitro* de *Herreria salsaparrilha*. Os frascos foram vedados com tampa de polipropileno rígida, polipropileno rígida com um filtro, ou uma ou duas camadas de filme. O material de vedação induziu a perda de água nos recipientes e a concentração de oxigênio foi significativamente maior. Sáez et al. (2012) cultivaram microbrotos de *Castanea sativa* em recipientes ventilados e não ventilados, utilizando duas intensidades de luz: 50 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O uso da ventilação e o aumento da intensidade melhoraram a performance de microbrotos em relação ao cultivo convencional de *C. sativa*.

Além de afetar o crescimento de plântulas, a ventilação pode afetar o metabolismo secundário. Kiferle et al. (2014) cultivaram brotos de *Ocimum basilicum* sob cinco sistemas de cultivo com diferentes taxas de ventilação e verificaram seu efeito na fotossíntese, respiração no escuro, emissão de etileno e ácido rosmarínico. Esses autores confirmaram a relação próxima entre o ambiente de cultivo *in vitro* (recipiente, meio de cultura, trocas gasosas, etc) e o metabolismo da plântula, concluindo que ao modificar o ambiente de forma adequada pode levar a um aumento na produção de metabólitos secundários. *Plectranthus amboinicus* apresentou maior acúmulo de matéria seca quando cultivada em sistemas de

ventilação natural com uma e duas membranas, e maior acúmulo de carvacrol sob o sistema de cultivo com quatro membranas (SILVA et al., 2017).

2.7 Reguladores de crescimento

Reguladores de crescimento podem ser definidos como substâncias químicas sintéticas que atuam sobre o metabolismo vegetal provocando respostas fisiológicas nas plantas, com ação similar aos hormônios vegetais (LAMAS, 2001). Essas substâncias podem ser utilizadas na agricultura, pois apresentam grande potencial no aumento da produtividade e facilitação do manejo cultural, porém ainda não é uma prática muito utilizada pelos agricultores (VIEIRA, 2001). A maioria deles atuam como sinalizadores químicos agindo na regulação do crescimento e desenvolvimento de plantas, e geralmente ligam-se a receptores na planta, desencadeando uma série de mudanças celulares, as quais podem afetar a iniciação ou modificação do desenvolvimento de órgãos ou tecidos (RODRIGUES et al., 2003).

O primeiro hormônio vegetal descoberto foi a auxina, e ela possui uma importante participação na regulação do crescimento celular atuando diretamente na plasticidade da parede celular (TAIZ; ZEIGER, 2017 ; VIEIRA, 2001). Para que ocorra crescimento radicular são necessários baixas concentrações de auxina. Em contrapartida, altas concentrações agem como inibidoras do crescimento de raízes. As auxinas também participam de maneira efetiva em processos fisiológicos como a regulação da dominância apical, abscisão foliar, inibição de raízes laterais, formação de botões florais e desenvolvimento de frutos. O efeito das auxinas é frequentemente influenciado por sua proporção com as citocininas (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Outra classe de hormônios que atuam em processos de regulação nas plantas, como a morfogênese, maturação de cloroplastos e senescência, são as citocininas (TAIZ; ZEIGER, 2017), que também apresentam uma grande capacidade de promover divisão celular, agindo diretamente no processo de alongamento e diferenciação celular, principalmente quando estão associadas as auxinas (VIEIRA, 2001). As citocininas atuam também influenciando a taxa de síntese de proteínas e nos tipos de proteínas que serão produzidas pelas células (SEVERINO et al., 2003).

Rademacher (2000) relata que o objetivo da aplicação de reguladores de crescimento é reduzir o desenvolvimento longitudinal indesejável da parte aérea das plantas, porém sem prejudicar a produtividade. Em contrapartida, os efeitos produzidos por essas substâncias têm apresentado resultados inconsistentes, onde promove o aumento de produtividade em algumas situações e em outras, reduzem a produtividade (FELIX ALVAREZ et al., 2007).

REFERÊNCIAS

- ABAD, M. J. et al. Antiviral activity of some medicinal plants. **Methods and Findings**. Barcelona: v. 17, n. Suppl A, p. 108, 1995.
- BENNETT, Alan B. et al. Agricultural Biotechnology: Economics, Environment, Ethics, and the Future. **Annual Review Of Environment And Resources**, [s.l.], v. 38, n. 1, p.249-279, 17 out. 2013. Annual Reviews
- BICCHI, Carlo et al. *Headspace* sampling of the volatile fraction of vegetable matrices. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1184, n. 1-2, p.220-233, mar. 2008.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Agencia Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução – RDC nº 10, de 09 de março, Brasília, 2010.
- BULA, R. J. et al. Light-emitting diodes as a radiation source for plants. **HortScience**, Virginia, v. 26, n. 2, p. 203-205, 1991
- CARNEIRO, Fernanda Melo et al. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: Sociedade, Saberes e Práticas Educacionais**, Iporá, v. 3, n. 2, p. 44-75, Dez. 2014.
- COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S. Fundamentos de cromatografia. In: **Fundamentos de cromatografia**. Campinas, Unicamp, 2006.
- CROCOLL, Christoph. **Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme**. 2011. Tese de Doutorado. Jena, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Diss., 2011.
- DAVIES, Kevin M; DEROLE, Simon C. Prospects for the use of plant cell cultures in food biotechnology. **Current Opinion In Biotechnology**, London, v. 26, p.133-140, abr. 2014.
- DAVIS, N. Controlled-environment agriculture-Past, present and future. **Food technology**, Chicago, 1985.
- DE MATOS, Francisco José et al. Medicinal Plants of Northeast Brazil Containing Thymol and Carvacrol-*Lippia sidoides* Cham. and *L. gracillis* HBK (Verbenaceae). **Journal of Essential Oil Research**, [s.l.], v. 11, n. 6, p. 666-668, 1999.
- DE ASSIS, Kerlley Cristina et al. *In vitro* cultivation of *Anacardium othonianum* Rizz.: Effects of growth regulator, explant orientation and lighting. **African Journal of Biotechnology**, Nairob, v. 11, n. 7, p. 1559-1566, Jan. 2012.
- DE FIGUEREDO, Climério Avelino; GURGE, Idê Gomes Dantas; JUNIOR, Garibaldi Dantas Gurgel. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis-Revista de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 381-400, Abr. 2014.

DE OLIVEIRA CRUZ, Elizangela Mércia et al. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus*. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 195, n. 1, p. 198-202, Jul. 2013.

DE PAIVA, Selma Ribeiro et al. O Uso de Plantas Medicinais Pode Trazer Riscos à Saúde Humana?. **Interagir: pensando a extensão**, Rio de Janeiro, n. 11, p. 121, Jul. 2016.

DE SOUZA, A. V. et al. Efeito da adubação mineral e do estresse hídrico no rendimento de óleo essencial de alecrim do mato. In: **Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE). Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, n. 2, p. S5979-S5984, jul. 2012.

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

DOS SANTOS, Clesivan Pereira et al. Harvest time and geographical origin affect the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Industrial Crops and Products**, London, v. 79, p. 205-210, Jan. 2016.

DOS SANTOS, Maurício Reginaldo Alves; DA SILVA CHAGAS, Sâmela Emanuela; GUIMARÃES, Milene de Castro Melo. Estabelecimento de protocolo para descontaminação de explantes foliares de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.). **Saber Científico**, Porto Velho, v. 4, n. 2, p. 15-23, Jul. 2015.

FÉLIX ALVAREZ, Rita de Cássia et al. Influência do etil-trinexapac no acúmulo, na distribuição de nitrogênio (15N) e na massa de grãos de arroz de terras altas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 31, n. 6, 2007.

FRANCO, M. R. B.; JANZANTTI, N. S. Avanços na metodologia instrumental da pesquisa do sabor. **FRANCO, MRB Aroma e sabor de alimentos: temas atuais. São Paulo: Livraria Varela**, p. 17-28, 2003.

GASQUET, M. et al. Evaluation *in vitro* and *in vivo* of a traditional antimalarial, "Malarial 5". **FITOTERAPIA**, Milano, v. 64, p. 423-423, Feb. 1993.

GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374, Abr. 2007.

GONÇALVES, L. A. et al. *In vitro* propagation of *Herreria salsaparrilha* Martius (Herreriaceae) as affected by different sealing materials and gaseous exchanges. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v. 92, p. 243-250, Dez. 2008

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 105-120, Apr. 2006.

IGNATIUS, Ronald W. et al. **Method and apparatus for irradiation of plants using optoelectronic devices**. U.S. Patent n. 5,012,609, 7 mai. 1991.

ISAH, Tasiu. Adjustments to *in vitro* culture conditions and associated anomalies in plants. **Acta Biologica Cracoviensia s. Botanica**, Cracow. v. 57, n. 2, p. 9-28, Dec. 2015.

IVANOVA, M.; STADEN, J. V. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schonland ex Pillans. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 60, n. 2, p. 143-150, Mar. 2010.

KIFERLE, C. et al. *In vitro* culture of sweet basil: gas exchanges, growth, and rosmarinic acid production. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 58, n. 4, p. 601-610, Dec. 2014.

LAMAS, F.M. Reguladores de Crescimento. In: Embrapa Agropecuária Oeste. Algodão: tecnologia de produção. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Embrapa Algodão. **Boletim técnico**. 296p. 2001.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of applied microbiology**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 453-462, Sep. 2001.

LOPEZ, Abraham AM; ROJAS, Hernandez NM; JIMENEZ, Misas CA. Plant extracts with cytostatic properties growing in Cuba. I. **Revista cubana de medicina tropical**, Havana, v. 31, n. 2, p. 97-104, May. 1979.

LORENZI, Harri; MATOS, Francisco J.; FRANCISCO, J. Matos. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2002.

MARRIOTT, Philip J.; SHELLIE, Robert; CORNWELL, Charles. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. **Journal of Chromatography A**, New York, v. 936, n. 1, p. 1-22, Nov. 2001.

MCCALLUM, Claire M. et al. Targeting induced locallesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. **Plant physiology**, Lancaster, v. 123, n. 2, p. 439-442, Jun. 2000.

MORTON, Julia Frances et al. **Atlas of medicinal plants of Middle America: Bahamas to Yucatan**. Charles C. Thomas, 1981.

MUNEER, Sowbiya et al. Influence of green, red and blue light emitting diodes on multiprotein complex proteins and photosynthetic activity under different light intensities in lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.). **International journal of molecular sciences**, Basel, v. 15, n. 3, p. 4657-4670, Mar. 2014.

NAGLE, P. S. et al. Thymol: Synthesis, reactions & its spectrum of pharmacological and chemical applications. **Indo American Journal of Pharm Research**, Nova Deli, v. 3, p. 7549-7561, Sep. 2013.

OLIVEIRA, Olienaide Ribeiro de et al. Efeito de óleos essenciais de plantas do gênero *Lippia* sobre fungos contaminantes encontrados na micropropagação de plantas. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 39, n. 1, Mar. 2008.

PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of ethnopharmacology**, Limerick, v. 76, n. 3, p. 201-214, Aug. 2001.

PINTO, Erika de Paula Pedro; AMOROZO, Maria Christina de Mello; FURLAN, Antonio. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica-Itacaré, BA, Brasil. **Acta botanica brasílica**, São Paulo, p. 751-762, Mar. 2006.

POSPÓŠILOVÁ, J. et al. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 42, n. 4, p. 481-497, Dec. 1999.

POULOSE, A. J.; CROTEAU, Rodney. Biosynthesis of aromatic monoterpenes: conversion of γ -terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 187, n. 2, p. 307-314, Apr. 1978.

RADEMACHER, W. Growth retardants: effects on gibberellins biosynthesis and other metabolic pathways. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 51, n. 1, p. 501-531, Jun. 2000

RAMÍREZ-MOSQUEDA, Marco A.; IGLESIAS-ANDREU, Lourdes G.; BAUTISTA-AGUILAR, José R. The Effect of Light Quality on Growth and Development of *In vitro* Plantlet of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Sugar Tech**, Jankipuram p. 1-6, Jun. 2016.

RODRIGUES, Osmar et al. **Redutores de crescimento**. Embrapa Trigo, 2003.

ROWSHAN, Vahid; BAHMANZADEGAN, Atefeh; SAHARKHIZ, Mohammad Jamal. Influence of storage conditions on the essential oil composition of *Thymus daenensis* Celak. **Industrial crops and products**, London, v. 49, p. 97-101, Aug. 2013.

SÁEZ, P. L. et al. Increased light intensity during *in vitro* culture improves water loss control and photosynthetic performance of *Castanea sativa* grown in ventilated vessels. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 138, p. 7-16, May 2012.

SALDANHA, C. W. et al. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v. 110, n. 3, p. 413-422, Sept. 2012.

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

SANZ, Cristina et al. Optimizing headspace temperature and time sampling for identification of volatile compounds in ground roasted Arabica coffee. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 49, n. 3, p. 1364-1369, Feb. 2001.

SEVERINO, L.S; de LIMA, C.L.D.; FARIAS, V. A.; et.al. Aplicação de regulador de crescimento em sementes de algodão, amendoim, gergelim e mamona. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**. EMBRAPA, 2003.

SHIMODA, Kei et al. Biotransformation of thymol, carvacrol, and eugenol by cultured cells of *Eucalyptus perriniana*. **Phytochemistry**, New York, v. 67, n. 20, p. 2256-2261, Oct. 2006.

SILVA, Marina MA et al. Effect of blue/red LED light combination on growth and morphogenesis of *Saccharum officinarum* plantlets *in vitro*. In: **SPIE BiOS, International Society for Optics and Photonics**, San Francisco, p. 89471X, Mar. 2014.

SILVA, Sâmia Torres et al. Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, London v. 129, n. 3, p. 501-510, Jun. 2017.

SOARES, Bruna Viana; TAVARES-DIAS, Marcos. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, Macapá, v. 3, n. 1, p. 109-123, 2013.

SUGANTHI, R. Umayya; MANPAL, S. Biological and pharmacological of actions carvacrol and its effects on poultry: An updated review. **World J Pharm Pharm Sci**, Gujarat, v. 2, p. 3581-95, Sep. 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal 6ªed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2017.**

TERBLANCHÉ, F. C.; KORNELIUS, G. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae)—a literature review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, n. 5, p. 471-485, 1996.

THOMAZINI, M.; FRANCO, M. R. B. Metodologia para análise dos constituintes voláteis do sabor. **Bol. SBCTA**, Campinas, v. 34, n. 1, p. 52-59, 2000.

TREVISAN, Maria TS et al. Composition of essential oils and ethanol extracts of the leaves of *Lippia* species: Identification, quantitation and antioxidant capacity. **Records of Natural Products**, Istanbul, v. 10, n. 4, p. 485, Jul. 2016.

TRIVELLINI, Alice et al. Lamiaceae phenols as multifaceted compounds: bioactivity, industrial prospects and role of “positive-stress”. **Industrial Crops and Products**, London, v. 83, p. 241-254, May 2016.

US-CAMAS, Rosa et al. *In vitro* culture: an epigenetic challenge for plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, London, v. 118, n. 2, p. 187-201, Aug. 2014

VASCONCELOS, A. G. V. et al. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 5, p. 837-844, maio 2012.

VIEIRA, Elvis Lima. Ação de bioestimulante na germinação de sementes, vigor de plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e arroz (*Oryza sativa* L.). **Piracicaba: USP/ESALQ**, 2001.

YEH, Naichia; CHUNG, Jen-Ping. High-brightness LEDs—Energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Golden, v. 13, n. 8, p. 2175-2180, Oct. 2009.

CAPÍTULO 2 A POSIÇÃO DO EXPLANTE E CONCENTRAÇÃO DE SAIS E SACAROSE AFETAM O CULTIVO *in vitro* DE *Lippia gracilis* Schauerr

RESUMO

Objetivou-se avaliar o tipo do explante e o meio de cultivo mais adequados para o estabelecimento e cultivo *in vitro* de *Lippia gracilis* e a influência da posição do explante. Para o experimento de estabelecimento os tratamentos foram: dois tipos de explantes (apical e nodal) retirados de dois ambientes de cultivo (Campo e casa de vegetação) e inoculados em dois tipos de meio (MS e MS/2). A metade da concentração de sais e o cultivo em ambiente protegido reduziram os índices de contaminação, oxidação e necrose no estabelecimento *in vitro* de *Lippia gracilis*. No experimento de posição do explante o tratamento consistiu na posição com que os explantes foram inoculados, horizontal e vertical. Explantes inoculados horizontalmente aumentaram a taxa de multiplicação e o número de brotações para a espécie. Para os experimentos de concentração de sacarose foram utilizados 4 tratamentos: 60, 30, 15 e 7,5 g L⁻¹ sacarose, e para o experimento de concentração de sais os tratamentos consistiram de 4 diferentes concentrações de sais (2MS, MS, ½ MS e ¼ MS). A concentração de sacarose de 30 g L⁻¹ e o meio ½ MS apresentou os melhores resultados de crescimento para a espécie. Explantes oriundos de casa de vegetação inoculados na posição horizontal em ½ MS suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose incrementam parâmetros de crescimento e a taxa de multiplicação na propagação *in vitro* de *L. gracilis*.

Palavras-chaves: Micropropagação. Alecrim de tabuleiro. Meio de cultivo. Carboidratos. Origem do explante.

CHAPTER 2 EXPLANT POSITION, CONCENTRATION OF SALTS AND SUCROSE AFFECT THE *in vitro* CULTIVATION OF *Lippia gracilis* Schauer

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the type of explant, most suitable culture medium for the establishment and *in vitro* culture of *Lippia gracilis*, and also evaluate the influence of the explant position. For the establishment experiment, the treatments were: two types of explants (apical and nodal) taken from two cultivation environments (field and greenhouse), and inoculated in two types of culture medium (MS and MS/2). Half of the salt concentration and the use of explants from a greenhouse reduced the rates of contamination, oxidation, and necrosis in the *in vitro* establishment of *Lippia gracilis*. In the explant position experiment, the treatment consisted of the position with which the explants were inoculated: horizontally and vertically. Explants inoculated horizontally increased the multiplication rate and the number of shoots for the species. For the sucrose concentration experiments, 4 treatments were used: 60, 30, 15 and 7.5 g L⁻¹ sucrose, and for the salt concentration experiment the treatments consisted of 4 different concentrations of salts (2MS, MS, ½ MS and ¼ MS). The sucrose concentration of 30 g L⁻¹ and the use of ½ MS culture medium presented the best growth results for the species. Explants from greenhouse inoculated horizontally in ½ MS culture medium supplemented with 30 g L⁻¹ of sucrose increase growth parameters and the rate of multiplication in the *in vitro* propagation of *L. gracilis*.

Keywords: Micropropagation. Alecrim de Tabuleiro. Culture Medium. Carbohydrates. Explant Origin.

1 INTRODUÇÃO

Pesquisas com plantas medicinais nativas, não domesticadas e potencialmente úteis aos homens, são extremamente importantes e necessárias para gerar informações e ampliar o conhecimento sobre a utilização dessas espécies (DE SOUZA et al., 2012). A *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae), popularmente conhecida como alecrim do sertão, alecrim da chapada ou alecrim de tabuleiro, é uma planta típica da vegetação do semiárido nordestino, caracterizada por ser um pequeno arbusto caducifólio, ramificado, com caule quebradiço, de até 2 m de altura (LORENZI; MATOS, 2002). Com propriedades medicinais, utilizam-se das folhas e flores dessa espécie para tratamento de doenças cutâneas, ferimentos externos, queimaduras e no combate de feridas e úlceras, pois o óleo essencial presente em suas folhas apresentam efeito cicatrizante (PASCUAL et al., 2001). Há relatos de sua utilização por comunidades rurais do semiárido nordestino no combate a gripes, tosse, sinusite, bronquite, congestão nasal, dores de cabeça e icterícia (ALBUQUERQUE et al., 2006). Mendes et al. (2010), relataram que o óleo essencial extraído das folhas possuem efeito analgésico e antiinflamatório.

Estudos envolvendo propagação vegetativa da espécie são importantes, pois a propagação via sementes torna-se inviável devido a dificuldade de coleta, manipulação e viabilidade das mesmas. Técnicas de propagação vegetativa *in vitro* em espécies aromáticas permitem a padronização da matéria-prima pela multiplicação de clones com alto teor de óleo essencial e níveis elevados dos constituintes majoritários para a espécie (SANTOS et al., 2016).

A seleção de um meio de crescimento que melhor se adapta ao explante é necessário para determinar a concentração mais adequada dos componentes, pois, mesmo quando o meio contém todos os nutrientes exigidos pela planta, sua concentração pode afetar a capacidade da planta de extrair nutrientes e água, essenciais para a adaptação *in vitro* da espécie (PINHAL et al., 2017).

A contaminação microbiana é a principal causa de perdas em laboratórios de cultura de tecidos de plantas. Em muitos casos, a fonte de contaminação não é facilmente detectada, entretanto é mais comum estarem associados a microrganismos da manipulação individual. Entre os microrganismos mais comuns, os fungos são frequentemente detectados, e são altamente prejudiciais, pois crescem rapidamente no meio de cultivo, competindo com as plantas por nutrientes do meio, além de produzir metabólitos fitotóxicos (ALBUQUERQUE et al., 2006).

Espécies lenhosas quando cultivadas *in vitro*, apresentam altas concentrações de compostos fenólicos e a abscisão foliar do material vegetal no momento da inoculação, ocasionam acúmulo de etileno nos tecidos submetidos ao ambiente *in vitro*, promovendo oxidação, podendo tornar o explante mais frágil e até mesmo provocar a morte do material vegetal (SARTOR et al., 2013).

O estabelecimento *in vitro* envolve a determinação do tipo de explante e do meio de cultivo que vai permitir a melhor adaptação dos explantes às condições laboratoriais (ALBUQUERQUE et al., 2016). No entanto, a multiplicação em escala comercial exige um melhor conhecimento dos fatores que controlam a morfogênese *in vitro*. Os sistemas convencionais podem ser melhorados pela manipulação dos fatores de cultivo. Testes específicos são necessários para estabelecer um protocolo ideal para atender as respostas esperadas. Diversos estudos indicam que explantes cultivados horizontalmente são mais efetivos na micropropagação devido ao maior contato com o meio de cultura favorecendo a absorção de nutrientes em relação aos cultivados na posição vertical (DE ASSIS et al., 2012)

Alterações nos componentes do meio de cultivo e posição do explante vem sendo relatado para melhorar o crescimento e desenvolvimento de diversas espécies cultivadas *in vitro*. Amorim Faria et al., (2007) avaliando diferentes espécies de *Passiflora* spp., observaram maior comprimento das brotações oriundas de segmentos nodais no meio MS completo em relação a segmentos apicais e não houve diferença para os tipos de explantes no meio MS com metade da concentração de sais. Sementes de *Comanthera curralensis* germinadas *in vitro* apresentaram melhores resultados para o número e comprimento de raízes quando cultivadas em meio MS com metade da concentração dos sais (ALBUQUERQUE et al., 2016). Já *Orthophytum mucugense* germinadas *in vitro* não houve diferença significativa nos parâmetros de crescimento quando cultivadas em meio MS completo e com metade de concentração de sais (BELLINTANI et al., 2007). Para *Uncaria guianensis* a posição de inoculação do explante, horizontal e vertical exerceu influência no número médio de brotações alongadas por explantes originais (PEREIRA et al., 2006). *Citrus limonia* Osbeck apresentou maior crescimento sob altas doses de sacarose no cultivo *in vitro* (SCHMILDT et al., 2015) e *Billbergia zebrina* apresentou melhor desenvolvimento do sistema radicular das brotações quando cultivadas em meio com metade da concentração de sacarose recomendada para o meio MS (MARTINS et al., 2015). *Mentha arvensis* apresentaram maior acúmulo de matéria seca quando cultivadas em meio MS suplementado com 30 gramas de sacarose (OLIVEIRA et al., 2016).

Apesar do grande potencial medicinal da espécie, até o momento resultados concretos em termos de eficiência de protocolos de estabelecimento, desenvolvimento, regeneração e conservação *in vitro* não foram encontrados para *Lippia gracilis*. Diante do exposto objetivou-se avaliar o tipo do explante e o meio de cultivo mais adequados para o estabelecimento e cultivo *in vitro* de *L. gracilis* e a influência da posição do explante na propagação da espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Estabelecimento *in vitro*

Para o estabelecimento *in vitro*, utilizaram-se segmentos apicais e nodais de plantas matrizes oriundas de cultivo em campo e casa de vegetação. As plantas oriundas do campo foram cultivadas em canteiros no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As plantas matrizes do ambiente protegido foram oriundas de propagação vegetativa de estacas apicais (± 5 cm) coletadas de plantas adultas no Horto de plantas medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), enraizadas em bandeja de polipropileno e após 30 dias replantadas em vasos de plástico com uma mistura de solo + areia na proporção de 3:1 (v/v). Realizou-se poda drástica nas matrizes cultivadas em ambiente protegido, seguidos de adubação com sulfato de amônio e rega constante, com o objetivo de estimular a rebrota, para proceder a coleta do material vegetal para estabelecimento. Foram aplicadas duas doses de fungicida e bactericida sistêmico, Kazumin, 7 dias e 2 antes da coleta do material, nas matrizes a campo e em ambiente protegido na dosagem 3 mL L⁻¹ de água (0,06 g de ingrediente ativo), objetivando reduzir a contaminação no estabelecimento.

Os segmentos apicais e nodais foram lavados em água corrente por 30 minutos e imersos em solução de hipoclorito de sódio 50% v/v (1,25% de cloro ativo), sob agitação constante por 15 minutos. Em fluxo laminar asséptico, os explantes ($\pm 1,0$ cm) foram inoculados em tubos de ensaio (150 x 25 mm), contendo 15 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) completo e com metade da concentração dos sais suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ ágar, e pH $5,7 \pm 0,1$, ajustado com NaOH e HCl (0,1 e 0,5 N), antes da autoclavagem (125° C, 25 min a 1,2 atm) para realização dos testes de estabelecimento.

Após a inoculação os tubos foram colocados em sala de crescimento com lâmpadas fluorescentes e intensidade de 39 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 h de luz e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Os explantes foram avaliados quanto a porcentagem de contaminação, oxidação e

necroses nas diferentes condições avaliadas, de 3 em 3 dias até estabilização aos 14 dias. O material vegetal foi herborizado e a exsiccata encontra-se depositada no herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (PAMG/EPAMIG), sob registro PAMG 57859

2.2 Posição do explante

As plântulas estabelecidas, aos 35 dias, foram multiplicadas em frascos contendo 40 mL do meio MS com metade da concentração de sais e mantidas sob condições idênticas de luz e temperatura. Segmentos nodais (1,0 cm) foram inoculados nas posições vertical e horizontal, em tubos de ensaio contendo 15 mL do meio MS com metade da concentração dos sais, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar, e pH 5,7 ± 0,1, ajustado com NaOH e HCl (0,1 e 0,5 N), antes da autoclavagem (125° C, 25 min a 1,2 atm). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com dez repetições por tratamento e cada repetição composta por três plantas, totalizando trinta plantas por tratamento. Após 30 dias foram avaliados os parâmetros de crescimento para cada tratamento. Para o crescimento, as plântulas obtidas dos tratamentos, foram avaliadas quanto a altura da parte aérea e comprimento da raiz (cm), número de brotações, número de folhas, biomassa seca de folhas, caule, raiz e total (mg).

2.3 Concentrações de sacarose

Para avaliar o efeito das diferentes concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* da *L. gracilis*, segmentos nodais (1,0 cm) de plântulas previamente estabelecidas *in vitro* foram utilizados. Quatro diferentes concentrações de sacarose (60, 30, 15 e 7,5 g L⁻¹) no meio MS foram testadas. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com sete repetições por tratamento e três plantas por repetição. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (150 x 25 mm) contendo 15 mL do meio MS com as diferentes concentrações de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar (Himedia[®], tipo I) e pH 5,7 ± 0,1, ajustado com NaOH e HCl (0,1 e 0,5 N). Os tubos de ensaio com os meios de cultivo foram autoclavados a 125° C por 25 min a 1,2 atm. Após a inoculação os explantes foram colocados em sala de crescimento com lâmpadas brancas frias fluorescentes (OSRAM[®], Brazil) e intensidade de 39 μmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 h de luz e temperatura de 25 ± 1°C. Após 35 dias as plântulas obtidas foram avaliadas quanto ao comprimento da parte aérea (cm), comprimento de raiz (cm), número de folhas, número de brotações, biomassa seca de folhas, caule, raiz e total (mg).

2.4 Concentrações de sais

Para avaliar o efeito das diferentes concentrações de sais no cultivo *in vitro* da *L. gracilis*, foram utilizados segmentos nodais (1,0 cm) de plântulas previamente estabelecidas *in vitro*. Quatro diferentes concentrações de sais do meio MS (2MS, MS, ½ MS, ¼ MS), correspondente aos 4 tratamentos, foram testadas. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com sete repetições por tratamento e três plantas por repetição. Foram utilizados tubos de ensaio (150 x 25 mm) contendo 15 mL do meio de cultivo, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar (Himedia[®], tipo I), e pH 5,7 ± 0,1, ajustado com NaOH e HCl (0,1 e 0,5 N). Os tubos de ensaio com os meios de cultivo foram autoclavados a 125° C por 25 min a 1,2 atm. Após a inoculação os tubos foram colocados em sala de crescimento com lâmpadas brancas frias fluorescentes (OSRAM[®], Brazil) e intensidade de 39 µmol m⁻² s⁻¹, fotoperíodo de 16 h de luz e temperatura de 25 ± 1°C. Após 35 dias as plântulas obtidas foram avaliadas quanto ao comprimento da parte aérea (cm), comprimento de raiz (cm), número de folhas, número de brotações, biomassa seca de folhas, caule, raiz e total (mg).

2.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à ANAVA pelo teste F (p<0,05), utilizando-se o software Statística[®], versão 12 (trial version, StatSoft). Após verificada a significância das variáveis pelo teste F, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estabelecimento *in vitro*

Os diferentes meios de cultivo, explantes e procedência do explante afetaram as variáveis analisadas (TABELA 1). Vale ressaltar que não foi necessário a utilização de reguladores de crescimento para o estabelecimento *in vitro* da *Lippia gracilis*, pois as plântulas sobreviventes desenvolveram e enraizaram normalmente.

Pode-se observar que as diferentes condições de cultivo das plantas matrizes, influenciaram nos índices de contaminação, pois apesar de ter sido aplicado fungicida/bactericida sistêmico em ambas as matrizes, os índices de contaminação nas plantas originadas do campo (95%), ainda foram elevados (TABELA 1).

Tabela 1- Porcentagem de brotos contaminados (cont.), oxidados (oxid.) e necrosados (necr.) em explantes de *Lippia gracilis* cultivados *in vitro* sob influência dos ambientes, meio de cultivo e tipo de explante durante 14 dias após inoculação. Lavras, MG, 2017.

MEIO DE CULTIVO	EXPLANTES	CAMPO			AMBIENTE PROTEGIDO		
		Cont.	Oxid.	Necr.	Cont.	Oxid.	Necr.
(%)							
MS	Apicais	95	40	50	29	35	18
	Nodais	100	12	65	37	26	5
1/2 MS	Apicais	90	62	33	37	21	8
	Nodais	93	20	47	67	0	8
Média		95	34	49	43	28	10

O ambiente protegido reduziu os índices de contaminação em plântulas de *L. gracilis* (43%). Segmentos apicais oriundos de casa de vegetação tiveram menores índices de contaminação, no entanto, apresentaram maiores porcentagens de oxidação e necrose em explantes oriundos desse ambiente. A concentração de nutrientes dos meios de cultivo pode interferir no desenvolvimento de patógenos, porém no presente estudo, o ambiente de cultivo das matrizes parece ter influenciado mais nesse parâmetro do que o tipo de meio.

Pode-se observar que houve redução da contaminação nos explantes apicais em relação aos nodais sob mesmas condições de cultivo. Meristemas apicais apresentam conexões plasmodesmáticas reduzidas e intenso ritmo de divisão celular, comparado a gemas axilares (AMORIM FARIA et al., 2007), o que pode ter levado a redução nos índices de contaminação para esses tipos de explantes. Resultados distintos foram obtidos em *Calathea crotalifera*, onde explantes nodais apresentaram menores porcentagens de contaminação quando comparados a explantes apicais (EFZUENI ROZALI et al., 2014). O ambiente protegido foi eficiente na redução dos índices de contaminação, pois verifica-se que mesmo com aplicação de fungicida e bactericida sistêmico nas plantas a campo, os índices de contaminação nessas ainda foi elevado.

O tipo de explante, apical e nodal, foi determinante nos índices de oxidação do que as demais condições testadas. Houve redução dos índices para esse parâmetro nos segmentos nodais, em relação aos apicais, inclusive não sendo detectado no tratamento 1/2 MS em ambiente protegido para os segmentos nodais, conforme observado na Tabela 1.

Resultados semelhantes foram encontrados por Marinho et al. (2011) testando diferentes métodos para reduzir os índices de oxidação no estabelecimento de *Lippia gracilis*, incluindo redução na concentração de sais do meio. Os autores não encontraram diferença significativa entre os tratamentos utilizados, corroborando com os resultados encontrados

nesse estudo que não demonstraram diferença entre os diferentes meios testados. Embora os explantes oriundos de casa de vegetação apresentaram redução nos índices avaliados, às estratégias empregadas no estabelecimento *in vitro* de *L. gracilis*, não resultou na eliminação total dos microrganismos contaminantes. Mesmo empregando uma elevada concentração de hipoclorito de sódio (50% v/v), esta não foi capaz de eliminar a contaminação microbiana e pode ter sido responsável pelos elevados índices de oxidação e necrose.

Estudos sugerem que os índices de oxidação são dependentes de fatores diversos, além da concentração de sais do meio, como por exemplo, o tempo de contato dos explantes com o hipoclorito de sódio, utilizado na desinfestação (PASCOAL GOLLE et al., 2013). Pereira et al. (2011) utilizando diferentes concentrações de hipoclorito em *Musa* sp. para desinfestação no estabelecimento *in vitro*, encontraram que os níveis de oxidação aumentaram gradativamente com o aumento da concentração do agente descontaminante.

Vários aspectos são responsáveis pela oxidação fenólica, como aspectos genéticos, tipos de explantes, e idade das plantas matrizes, pois tecidos jovens oxidam menos que os tecidos maduros (SCHERER BASSAN et al., 2006). Porém no presente estudo, pode-se observar que diversos fatores influenciaram conjuntamente nesse parâmetro, como tipo de explante, concentração de sais, e a idade do explante.

O ambiente de cultivo das matrizes foi efetivo no controle de necrose dos explantes. Plantas cultivadas em ambiente protegido reduziram os índices para esse parâmetro em relação às plantas do campo (TABELA 1). Além disso, o hipoclorito de sódio utilizado na desinfestação pode promover alterações cromossômicas que podem levar a redução no índice de divisão celular, pois a combinação do cloro ativo do produto com as membranas celulares dos microrganismos levam a formação de compostos tóxicos que podem inibir enzimas que levam a necrose, não só dos organismos contaminantes, como também dos tecidos vegetais (BORGES et al., 2005; DOMINI et al., 2005). A utilização de hipoclorito de sódio na desinfestação de explantes de cana de açúcar também provocou fitotoxicidade, levando a 100% de necrose e morte dos brotos (MOUTIA; DOOKUN, 1999). Outro fator que pode levar os explantes a necrose no momento do estabelecimento *in vitro*, é a idade das plantas matrizes, pois tecidos jovens apresentam uma redução significativa nesse parâmetro em relação a tecidos maduros (ZULFIQAR et al., 2009). Gonzales et al., (2000) também encontraram altos valores de oxidação e necrose em explantes nodais de *Vaccinium corymbosum* e *Rubus* spp. cultivados a campo durante o estabelecimento *in vitro*.

3.2 Posição do explante

Independente da posição da inoculação do explante as plantas de *L. gracilis* apresentaram-se vigorosas (FIGURA 1). No entanto, aquelas originadas dos explantes inoculados horizontalmente apresentaram as maiores médias para as variáveis de crescimento analisadas, com exceção da altura da parte aérea e comprimento de raiz (TABELA 2). Observa-se que explantes na horizontal apresentaram mais do que o dobro do número de brotações em relação aos inoculados verticalmente, aumentando assim a taxa de multiplicação dos explantes inoculados nessa posição.

Figura 1- Aspecto visual das plântulas de *Lippia gracilis* aos 30 dias, cultivadas *in vitro* sob diferentes posições do explante (V: Vertical; H: Horizontal).



Fonte: Do autor (2017).

O aumento do número de brotações dos segmentos nodais inoculados na horizontal, pode ser explicado pela quebra da dominância apical induzida pelo meristema, quando inoculados na vertical, inibindo a translocação de auxina, levando ao estímulo do crescimento de brotos laterais (DE ASSIS et al., 2012). Segundo Taiz e Zeiger (2017) o transporte de auxina na planta é polar, e esse comportamento é importante para controlar a inibição do desenvolvimento de gemas axilares, portanto tratamentos que inibem ou reduzem o movimento de auxinas nos explantes, estimula o aumento do número de brotos por explante (RADMANN et al., 2009), corroborando com os dados encontrados no presente estudo.

As melhores respostas para o número de folhas e de biomassa seca nos explantes inoculados na horizontal justifica-se pelo maior número de brotações existentes nesse tratamento.

Tabela 2- Crescimento *in vitro* de *Lippia gracilis* cultivada em meio ½ MS durante 30 dias sob diferentes posições do explante (Horizontal e vertical) (A: Altura da parte aérea; CR: Comprimento da raiz; NB: Número de brotos; NF: Número de folhas; BSF: Biomassa de folha; BSC: Biomassa de caule; BSR: Biomassa de raiz; BST: Biomassa de total).

	A	CR	NB	NF	BSF	BSC	BSR	BST
Horizontal	3,24 b	1,85 b	4,34 a	32,90 a	20,31 a	10,26 a	7,64 a	38,20 a
Vertical	4,68 a	2,35 a	2,00 b	19,31 b	16,63 b	6,50 b	8,28 a	31,40 b

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna pertencem ao mesmo grupo pelo teste Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade

Explantes inoculados na vertical apresentaram maior altura da parte aérea do que os inoculados na horizontal. Isso pode ser devido as limitações impostas pelo tubo de ensaio, restringindo o espaço de crescimento, com o aumento do número de brotações nos explantes inoculados horizontalmente (DE ASSIS et al., 2012). Explantes inoculados na horizontal apresentaram redução no comprimento de raiz em relação aos inoculados verticalmente (TABELA 2). Essa redução pode ser explicada pelo fato de que nesse tratamento os tecidos vegetais possuíam uma maior área de contato com o meio de cultivo, aumentando assim a área de absorção dos nutrientes, em relação aos inoculados na vertical (KERESA et al., 2012).

Além das condições de cultivo, a resposta organogênica *in vitro* é dependente da espécie. Mongomake et al. (2009) encontraram resultados distintos para *Vigna subterranea*, onde explantes inoculados na vertical apresentaram maior número de brotações do que os inoculados na horizontal. *Corylus avellana* apresentou melhores respostas para o número de brotações e para o comprimento dos brotos, quando foram inoculados na horizontal, comparados aos cultivados na vertical (PRANDO et al., 2014). Corroborando com o presente estudo, em *Hyptis marruboides* inoculadas horizontalmente houve aumento nos parâmetros de crescimento, matéria seca e número de brotações axilares em relação aos inoculados verticalmente (BOTREL et al., 2015), assim como, em *Aloysia triphylla* foi observado maior número de brotações e acúmulo de matéria seca, quando os explantes foram inoculados horizontalmente no meio MS (SILVA et al., 2017).

3.3 Concentrações de sacarose

O tratamento com maior concentração de sacarose (60 g) apresentou 29% de sobrevivência e plântulas com tamanho menor que 0,5 cm com algumas raízes (dados não aferidos). Isto pode ter ocorrido devido ao desequilíbrio osmótico causado pela alta concentração de sacarose no meio de cultura. Segundo George et al. (2008) a sacarose não tem somente um efeito nutritivo para as plantas, mas também influenciam o crescimento e desenvolvimento através de propriedades osmóticas. O aumento na concentração desses constituintes pode ter causado um desequilíbrio osmótico, levando a morte do explante, ou impedindo crescimento celular e organogênese adequados.

As diferentes concentrações de sacarose no meio de cultivo promoveram alteração no crescimento de *Lippia gracilis* (FIGURA 2).

Figura 2-Aspecto visual das plântulas de *Lippia gracilis* aos 30 dias, cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de sacarose.



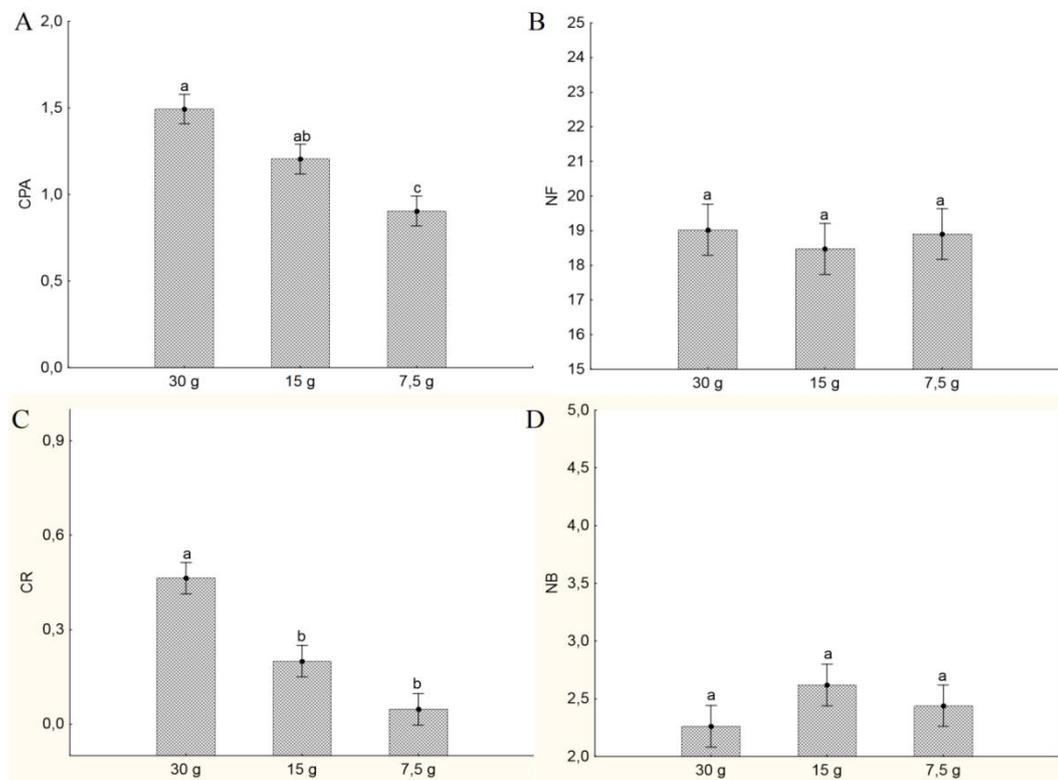
Fonte: Do autor (2017).

Observa-se uma tendência de redução dos comprimentos de parte aérea e de raiz, à medida que as concentrações de sacarose diminuem (FIGURA 3 A e C). O tratamento com a concentração de sacarose original para o meio MS (30 g) proporcionou os melhores valores para essa variável. Esses resultados evidenciam a importância da sacarose no meio de cultivo para fornecer energia para o crescimento das brotações, pois a sua redução pode ter provocado uma deficiência energética para o crescimento adequado dos explantes nos tratamentos em que houve diminuição de açúcares no meio (MONFORTI et al., 2015).

A sacarose é importante, pois ela é a principal fonte de carboidrato para as plantas, uma vez que os explantes não dispõem de condições adequadas para aumentar a atividade

fotossintética no ambiente *in vitro* (ADELBERG et al., 2007). Segundo Barralez-Lopez et al. (2015) a ausência de sacarose no meio de cultura promove baixos índices de enraizamento, corroborando com os dados encontrados nesse estudo, onde houve redução progressiva do comprimento das raízes, com a redução dos níveis de sacarose no meio (FIGURA 3 C). Segundo Monforti et al. (2015) o gasto energético para formação de raízes nas plântulas é elevado, por isso a redução dos níveis de sacarose nos tratamentos levou a redução progressiva no comprimento de raízes encontrados nesse estudo. Besson et al. (2010) encontraram maior comprimento de parte aérea em *Miltonia flavescens* cultivadas *in vitro* sob concentrações de sacarose de 3 a 4,5%. Já para *Occimum selloi* cultivado em meio MS, a suplementação com 1,5% de sacarose no meio, induziu maior comprimento de parte aérea e a suplementação de 3% estimulou maior comprimento de raízes (MONFORT et al., 2015). Oliveira et al. (2016) encontraram o ponto máximo para comprimento de parte aérea de *Mentha arvensis* em 2,29% de sacarose e ponto máximo para número de brotações em 1,46%.

Figura 3-Crescimento *in vitro* de *Lippia gracilis* cultivada em meio MS durante 30 dias sob diferentes concentrações de sacarose (30, 15 e 7,5 g/L). A: Comprimento da parte aérea (CPA); B: Número de folhas (NF); C: Comprimento da raiz (NR); D: Número de brotos (NB).

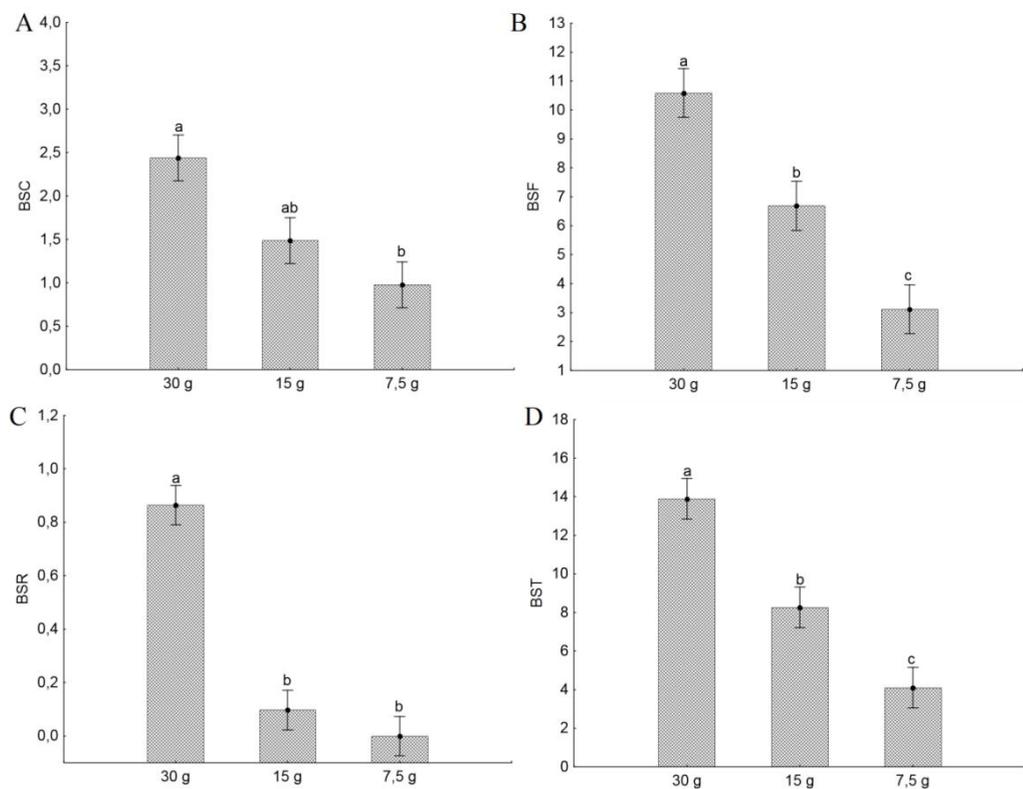


Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente no nível de 5% pelo teste Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: Do autor (2017).

A redução das concentrações de sacarose promoveram diminuição na matéria seca de folhas, caule, raiz e total (FIGURA 4 A-D). Propágulos cultivados com a concentração de 30 g de sacarose apresentaram os melhores resultados para essas variáveis. Além de ser fonte energética para os explantes se desenvolverem no ambiente *in vitro*, a sacarose é importante, pois fornece esqueleto carbônico para o crescimento das plântulas promovendo acúmulo de matéria seca (MONFORT et al., 2015). Logo presume-se que a sacarose no presente estudo foi essencial para o crescimento de *L. gracilis* cultivada *in vitro*, pois com a redução dos níveis de carboidrato não há o fornecimento adequado de esqueletos de carbono para a biossíntese e acúmulo de matéria seca, levando a uma queda progressiva nesses parâmetros com a diminuição dos teores de açúcar no meio de cultivo. Segundo Longo et al. (2012) meios de cultivo que induzam maiores índices de matéria seca devem ser selecionados pois facilitam a aclimatização em substrato não estéril, reduzindo assim os riscos de morte após o cultivo *in vitro*.

Figura 4-Crescimento *in vitro* de *Lippia gracilis* cultivada em meio MS durante 30 dias sob diferentes concentrações de sacarose (30, 15 e 7,5 g/L). A: Biomassa de caule (BSC); B: Biomassa de folha(BSF); C: Biomassa de raiz(BSR); D: Biomassa de total(BST).



Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente no nível de 5% pelo teste Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: Do autor (2017).

Estudos relatam a influencia da sacarose no cultivo *in vitro* para várias espécies. Monfort et al. (2015) encontraram maior acúmulo de matéria seca de parte aérea quando foi utilizado 15 g de sacarose no meio MS e maior acúmulo de matéria seca de raízes com 30 g de açúcar em *Ocimum selloi* cultivado *in vitro* em meio MS. Longo et al. (2012) encontraram maiores índices de matéria seca de folhas para *Allium sativum* L. cultivado em meio MS com 30 g de sacarose. Já para *Ananas comosus* L. houve redução no acúmulo de massa seca ao utilizar 15 g de sacarose no meio de cultivo (DA SILVA et al., 2012).

3.4 Concentrações de sais

O tratamento com a concentração de sais duas vezes do meio MS (T1: 2MS), apresentou 25% de sobrevivência, e plântulas com tamanho menor que 0,5 cm e sem raízes (dados não aferidos). Além dos fatos citados anteriormente para sacarose que podem ter levado a essa alta taxa de mortalidade e impedido o crescimento das plântulas, a alta concentração de sais nesse tratamento pode ter sido tóxica também para os explantes, pois o meio MS padrão é considerado um meio com altas concentrações de sais.

As diferentes concentrações de sais no meio de cultivo promoveram alterações no crescimento de *Lippia gracilis* (FIGURA 5). Plântulas cultivadas sob o meio MS com metade da concentração de sais apresentaram as maiores médias para o comprimento de parte aérea e o número de brotações (FIGURA 6 A e D). Para o comprimento de raiz os meios 0,5 MS e 0,25 MS apresentaram os melhores resultados (FIGURA 6 C). Existem relatos na literatura que indicam que espécies lenhosas são mais responsivas ao cultivo *in vitro*, quando ocorre redução de macronutrientes no meio (SCHMILDT et al., 2015; BERTOZZO; MACHADO, 2010), corroborando com os dados encontrados nesse estudo, onde ocorreu melhora nos parâmetros de crescimento com a redução da concentração do meio MS.

Schmidt et al. (2015) encontraram maior comprimento de parte aérea para *Citrus limonia* quando cultivado *in vitro* contendo 66,7% de sais do meio MS. *Vriesea incurvata* também apresentou melhores respostas de crescimento quando cultivada em meio com concentrações diluídas de macro e micronutrientes (SASAMORI et al., 2016). Para *Genipa americana* o meio ½ MS apresentou os melhores dados para comprimento da parte aérea em relação ao MS (DOS SANTOS ALMEIDA et al., 2013).

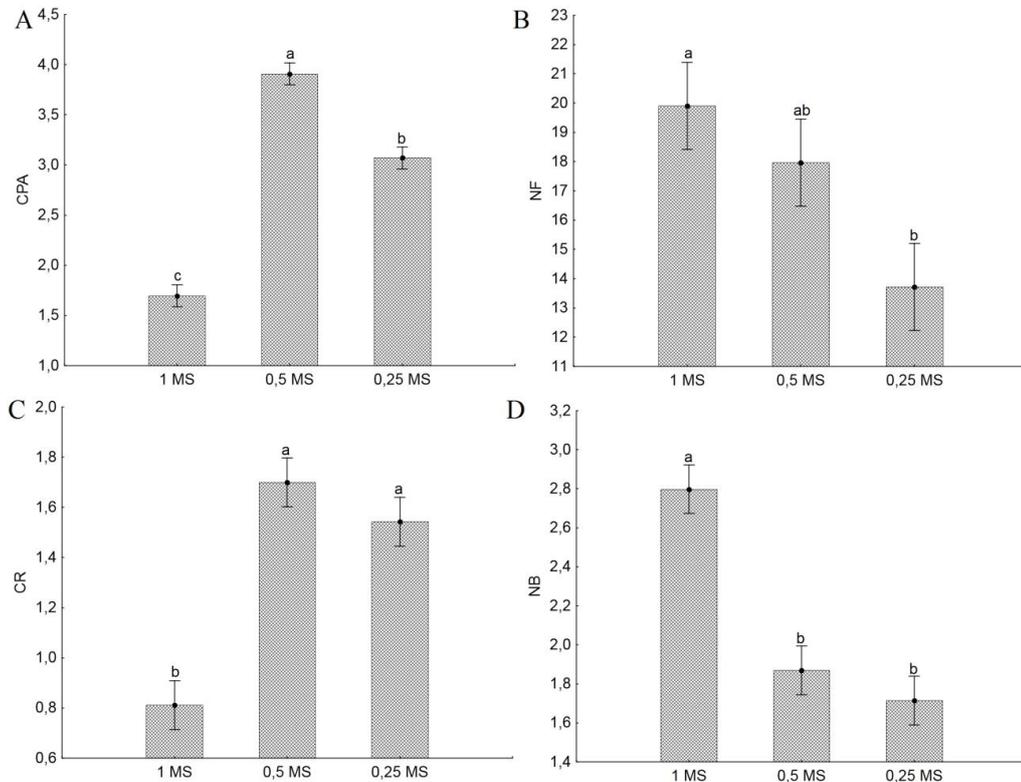
Figura 5-Aspecto visual das plântulas de *Lippia gracilis* aos 30 dias, cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de sais.



Fonte: Do autor (2017).

O meio com metade da concentração de sais proporcionou melhores resultados para o comprimento e biomassa seca da raiz (FIGURA 7 C). George et al. (2008) sugerem que meios com altas concentrações de sais, como o meio MS, frequentemente inibem a formação de raízes, e quando objetiva-se o enraizamento no cultivo *in vitro*, deve-se preferir meios mais diluídos. Isso também pode estar relacionado com a diminuição dos níveis de nitrogênio no meio de cultivo, pois normalmente NH_4^+ inibe o crescimento de raiz e NO_3^- estimula o crescimento, logo com a redução da concentração do meio de cultivo pode ter promovido maior relação nitrato/amônio e estimulado o desenvolvimento de raiz (MONFORT et al., 2015). Esses autores também relataram que o nitrogênio é importante para diferenciação da parte aérea, podendo ser esse o motivo para o meio MS apresentar os melhores resultados para biomassa seca de caule, folhas e total (FIGURA 7 A, B e D).

Figura 6- Crescimento *in vitro* de *Lippia gracilis* cultivada em meio MS durante 30 dias sob diferentes concentrações de sais (MS, ½ MS e ¼ MS). A: Comprimento de parte aérea (CPA); B: Número de folhas (NF); C: Comprimento de raiz (CR); D: Número de brotações (NB).

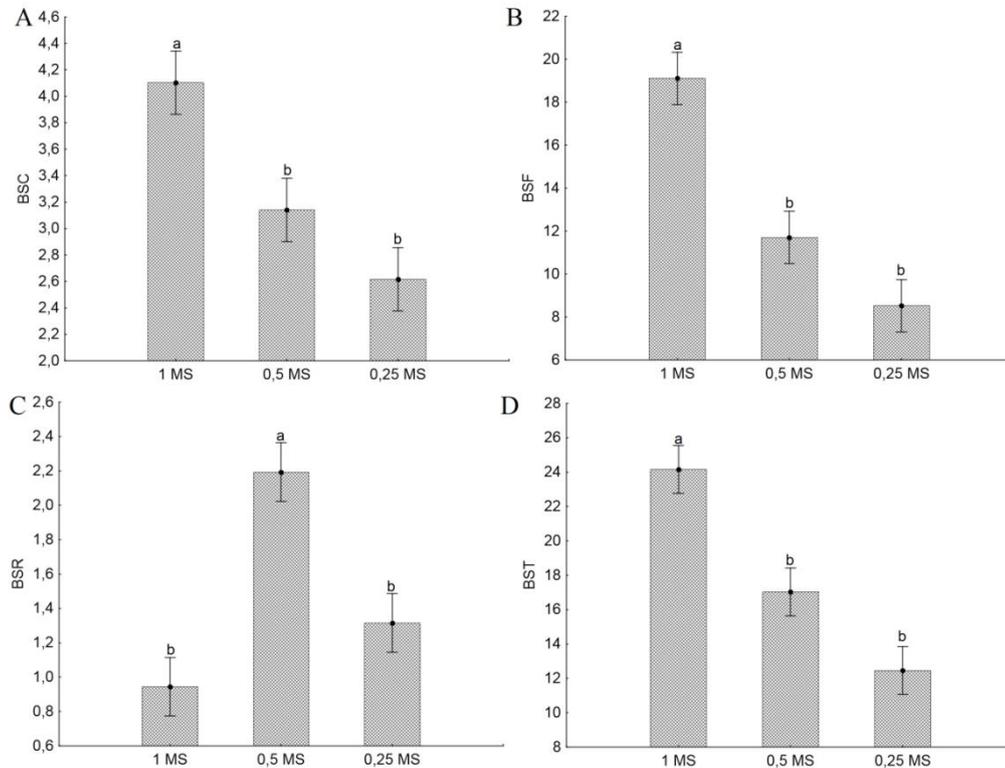


Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente no nível de 5% pelo teste Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: Do autor (2017).

Porém apesar do meio MS ter proporcionado aumento do acúmulo de matéria seca para folhas e caules, ele prejudicou o crescimento e desenvolvimento de raízes, e na micropropagação, o melhor desenvolvimento das raízes das plântulas, leva a uma aclimatização mais rápida e melhor taxa de sobrevivência em campo (CHANDRA et al., 2010). O número de brotações e de folhas também foram superiores no meio MS, podendo ser explicado pela maior concentração de nitrogênio no meio, que pode ter promovido melhor desenvolvimento de parte aérea.

Figura 7-Crescimento *in vitro* de *Lippia gracilis* cultivada em meio MS durante 30 dias sob diferentes concentrações de sais (MS, ½ MS e ¼ MS). A: Biomassa seca de caules (BSC); B: Biomassa seca de folhas (BSF); C: Biomassa seca de raiz (BSR); D: Biomassa seca total (BST).



Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente no nível de 5% pelo teste Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: Do autor (2017).

Ocimum selloi não apresentou diferença significativa para matéria seca de brotações quando cultivadas em meio MS, ½ MS e ¼ MS (MONFORT et al., 2015). Schildt et al. (2015) encontraram maiores valores para matéria fresca de *Citrus limonia* quando cultivados com 66% de sais do meio MS. *Physalis peruviana* apresentaram maiores valores para massa fresca quando cultivadas em meio MS com 75% da concentração de sais (RODRIGUES et al., 2013).

4 CONCLUSÕES

A origem do explante de ambiente protegido e o uso do meio 0,5 MS foram eficientes para reduzir os índices de contaminação, oxidação e necrose no estabelecimento *in vitro* de *Lippia gracilis*.

A inoculação horizontal dos explantes de *L. gracilis* proporciona maior taxa de multiplicação e número de brotações.

A concentração de sacarose e sais é crítica para o cultivo *in vitro* de *L. gracilis*, pois afeta significativamente o crescimento e desenvolvimento da espécie.

Explantes oriundos de casa de vegetação inoculados na posição horizontal em 0,5 MS suplementados com 30 g L⁻¹ de sacarose incrementam parâmetros de crescimento e a taxa de multiplicação na propagação *in vitro* de *L. gracilis*.

REFERÊNCIAS

- ADELBERG, Jeffrey; DELGADO, Maria; TOMKINS, Jeffrey. *In vitro* sugar and water use in diploid and tetraploid genotypes of daylily (*Heemerocallis* spp.) in liquid medium as affected by density and plant growth regulators. **HortScience**, Virginia, v. 42, n. 2, p. 325-328, Apr. 2007.
- ALBUQUERQUE, Cynthia Cavalcanti de et al. Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 4, p. 527-535, Jul. 2006.
- ALBUQUERQUE, Mara Márcia Sampaio et al. *In vitro* establishment of *Comanthera curralensis*, "sempre viva" native of Chapada Diamantina-Bahia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 6, p. 991-995, Jun. 2016.
- AMORIM FARIA, Gláucia et al. Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 4, abr. 2007.
- BARRALES-LÓPEZ, A. et al. Improved *in vitro*. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, North Carolina, v. 51, n. 3, p. 274-283, Jun. 2015.
- BELLINTANI, Moema Cortizo et al. Estabelecimento *in vitro* de *Orthophytum mucugense* e *Neoregelia mucugensis*, bromélias endêmicas da Chapada Diamantina, Bahia-Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. S2, p. pg. 1101-1103, Jul. 2007.
- BERTOZZO, Fernanda; MACHADO, Isaac Stringueta. Meios de cultura no desenvolvimento de ápices caulinares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) *in vitro*. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, p. 1477-1482, Dez. 2010.
- BESSON, Jean Carlos Fernando et al. Fontes e concentrações de carboidratos no crescimento vegetativo e no enraizamento *in vitro* de *Miltonia flavescens* Lindl. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 1, Jan. 2010.
- BORGES, Clarissa de Souza et al. AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DE FORMOL E HIPOCLORITO DE SÓDIO UTILIZADOS NA DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES EM CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS. In: **XIV Congresso de Iniciação Científica, Universidade Federal de Pelotas**. 2005.
- BOTREL, P. P. et al. Factors affecting *in vitro* propagation and chromatographic analysis of compounds in *Hyptis marruboides* epl., a threatened medicinal plant. **Acta Hort**. The Hague v. **1083**. p. 319-325, May 2015.
- CHANDRA, Sheela et al. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 32, n. 9, p. 1199-1205, Sep. 2010.
- DA SILVA, ADRIANO BORTOLOTTI et al. Luz natural, sacarose e fitorreguladores na anatomia foliar e crescimento *in vitro* de abacaxizeiro micropropagado. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 8, n. 1-2, p. 1-9, Jan. 2012.

DE ASSIS, Kerlley Cristina et al. *In vitro* cultivation of *Anacardium othonianum* Rizz.: Effects of growth regulator, explant orientation and lighting. **African Journal of Biotechnology**, Nairobo, v. 11, n. 7, p. 1559-1566, Jan. 2012.

DE SOUZA, A. V. et al. Efeito da adubação mineral e do estresse hídrico no rendimento de óleo essencial de alecrim do mato. In: **Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. Horticultura Brasileira, Brasília, DF, v. 30, n. 2, p. S5979-S5984, jul. 2012.

DONINI, L. P. et al. Preparo de lâminas foliares de aráceas ornamentais: desinfestação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 4, p. 517-522, Dez. 2005.

DOS SANTOS ALMEIDA, Camila et al. Efeito do meio de cultura na germinação *in vitro* jenipapeiro. **Scientia Plena**, São Cristovão, v. 9, n. 10, Out. 2013.

DOS SANTOS, Clesivan Pereira et al. Harvest time and geographical origin affect the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Industrial Crops and Products**, London, v. 79, p. 205-210, Jan. 2016.

EFZUENI ROZALI, Shahril; RASHID, Kamaludin A.; MAT TAHA, Rosna. Micropropagation of an exotic ornamental plant, *Calathea crotalifera*, for production of high quality plantlets. **The Scientific World Journal**, Cairo, v. 2014, Jun. 2014.

GEORGE, Edwin F.; HALL, Michael A.; DE KLERK, Geert-Jan. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: **Plant propagation by tissue culture**. Basingstoke, 2008. p. 115-173.

GONZALEZ, M. V. et al. Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from field-grown plants. **Annals of Applied Biology**, London, v. 137, n. 1, p. 73-78, Aug. 2000.

KERESA, Snjezana et al. Efficient Axillary Shoot Proliferation and *in vitro* Rooting of Apple cv. 'Topaz'. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici**, Cluj-Napoca, v. 40, n. 1, p. 113, 2012.

LONGO, ANA ELISA DE OLIVEIRA E. et al. Micropropagação e bulbificação *in vitro* de alho (*Allium sativum* L.). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 8, n. 1-2, p. 18-26, Ago. 2016.

LORENZI, Harri; MATOS, Francisco J.; FRANCISCO, J. Matos. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2002.

MARINHO, M. J. et al. Estabelecimento de protocolo para micropropagação de *Lippia gracilis* Schauer. **Rev. bras. plantas med**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 246-252, Mar. 2011.

MARTINS, João Paulo Rodrigues et al. Impacts of photoautotrophic and photomixotrophic conditions on *in vitro* propagated *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, London, v. 123, n. 1, p. 121-132, Oct. 2015.

- MENDES, S. S. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 129, n. 3, p. 391-397, Jun. 2010.
- MONFORT, Lucila Elizabeth Fragoso et al. Micropropagação e germinação de sementes *in vitro* de atoveran. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 62, n. 2, p. 215-223, Abr. 2015.
- MONGOMAKÉ, K. et al. *In vitro* plantlets regeneration in Bambara groundnut [*Vigna subterranea* (L.) Verdc.(Fabaceae)] through direct shoot bud differentiation on hypocotyl and epicotyl cuttings. **African Journal of Biotechnology**, Nairob, v. 8, n. 8, Apr. 2009.
- MOUTIA, M.; DOOKUN, A. Evaluation of surface sterilization and hot water treatments on bacterial contaminants in bud culture of sugarcane. **Experimental Agriculture**, Cambridge, v. 35, n. 3, p. 265-274, Jul. 1999.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- OLIVEIRA, Thainá et al. Crescimento *in vitro* de *Mentha arvensis* L. cultivada com diferentes concentrações de sacarose. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.18, n.3, p.685-690, Mar. 2016.
- PASCOAL GOLLE, Diego et al. Desinfestação superficial de explantes isolados de ramos semilenhosos e herbáceos de *Eugenia involucrata* dc.(myrtaceae). **Cerne**, Lavras, v. 19, n. 1, Mar. 2013.
- PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of ethnopharmacology**, Limerick, v. 76, n. 3, p. 201-214, Aug. 2001.
- PEREIRA, Gustavo Alves; CORRÊA, Luiz de Souza; BOLIANI, Aparecida Conceição. Disinfestation and establishment of *in vitro* explants of banana 'Grande naine' in different concentrations of sodium hypochlorite. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 33, n. SPE1, p. 222-226, Oct. 2011.
- PEREIRA, R. de CA et al. Germinação, avaliação do ácido giberélico e posição do explante no alongamento *in vitro* de *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmelin Rubiaceae (Unha-de-gato). **Cien Agrotec**, Lavras, v. 30, p. 637-642, Jul./Ago. 2006.
- PINHAL, Hernane Fernandes et al. Concentration of ms medium and cutting of seeds on *in vitro* establishment of baruzeiro (*Dipteryx alata* Vog.). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 33, n. 2, Mar./Apr. 2017.
- PRANDO, MA Sandoval et al. Effect of coconut water and growth regulator supplements on *in vitro* propagation of *Corylus avellana* L. **Scientia horticultrae**, Amsterdam, v. 171, p. 91-94, May 2014.
- RADMANN, Elizete Beatriz et al. Influência da composição do meio de cultivo e do tipo de explante na micropropagação do porta-enxerto de *Prunus* sp.'GXN-9'. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 10, n. 2, Mar./Abr. 2009.

- RODRIGUES, Filipe Almendagna et al. Diferentes concentrações de sais do meio ms e bap na multiplicação *in vitro* de *Physalis peruviana* L. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 1, Jan./Feb. 2013.
- SARTOR, Fernanda Raquel et al. Diferentes meios de cultura e antioxidantes no estabelecimento *in vitro* do jacarandá da Bahia. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 2, Mar./Abr. 2013.
- SASAMORI, Márcio Hisayuki; ENDRES JÚNIOR, Delio; DROSTE, Annette. Baixas concentrações de macronutrientes beneficiam a propagação *in vitro* de *Vriesea incurvata* (Bromeliaceae), uma espécie endêmica da Floresta Atlântica, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 67, n. 4, Out./Dez. 2016.
- SCHERER BASSAN, Josiana et al. Oxidação fenólica, tipo de explante e meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 16, n. 4, Out./Dez. 2006.
- SCHMILDT, Omar; SCHMILDT, Edilson Romais; DE OLIVEIRA, Marcio José Vieira. Sais e sacarose na germinação *in vitro* de limoeiro ‘cravo’. **Nucleus**, Ituverava, v. 12, n. 1, p. 215-222, Abr. 2015.
- SILVA, G. M. et al. Effect of chemical and physical factors in *in vitro* propagation and volatile fraction analysis of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. **Acta Hort.**, The Hague, v. 1155. p. 309-316, Mar. 2017.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal 6ªed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2017.**
- ZULFIQAR, Bushra et al. Effect of explant sources and different concentrations of plant growth regulators on *in vitro* shoot proliferation and rooting of avocado (*Persea americana* Mill.) cv. “Fuerte”. **Pak J Bot**, Karachi, v. 41, n. 5, p. 2333-2346, Dec. 2009.

CHAPTER 3 QUALITY AND INTENSITY OF LIGHT AFFECTS PLANT GROWTH AND VOLATILE COMPOUNDS OF *Lippia gracilis* Schauer *in vitro* *

Luiz Eduardo Santos Lazzarini¹ • Suzan Kelly Vilela Bertolucci¹ • Fernanda Ventorim Pacheco • Jaqueline dos Santos¹ • Sâmia Torres Silva¹ • Alexandre Alves de Carvalho¹ • José Eduardo Brasil Pereira Pinto¹✉

Abstract The aim of this study was to evaluate different intensities, luminous spectra, and explant type in the growth and analysis of volatile compounds of *Lippia gracilis in vitro*. Treatments were: light intensities of 26, 51, 69, 94, and 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ obtained with fluorescent lamps and light-emitting diode (LED) lamps at wavelengths white, red, blue, 2.5R:1B, and 1R:2.5B. At 30 days of culture in Murashige and Skoog (MS) medium with half concentration of salts were evaluated growth and development, production of photosynthetic pigments, chlorophyll a, b, total, and carotenoids, and volatile constituents by headspace. The light quality and intensity significantly influenced *in vitro* growth of *L. gracilis*. The apical segments were superior in all parameters evaluated in relation to nodal segments. Among all, the light intensities 94 and 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ showed the best growth parameters for *L. gracilis*. The red light showed the best growth values in relation to the others. Therefore, the red LED light spectrum and the fluorescent lamp with 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ were beneficial for the *in vitro* growth of *L. gracilis*. Variations in number, content, and profile of volatile compounds under influence of light intensity and quality were observed. Major constituents ρ -cymene, γ -terpinene, thymol, carvacrol, and *E*-caryophyllene, regardless of light conditions were identified. The light intensity 94 and 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ were best for growth and the blue LED light showed higher production of carvacrol. The amount and composition of volatile compounds varied according to light intensity and quality. For *in vitro* culture of *L. gracilis*, it is recommended to use red LED light and high light intensities for satisfactory growth and development of the species.

Keywords Irradiances • Light spectrum • Secondary metabolites • Medicinal plant • Photosynthetic pigments • LEDs

* Capítulo elaborado de acordo com as normas do periódico Plant Cell, Tissue and Organ Culture.

1 INTRODUCTION

Lippia gracilis Schauer (Verbenaceae), known locally as rosemary of arid area, is a typical plant from northeastern semiarid region of Brazil (Lorenzi & Matos, 2002). Its leaves and flowers are used in the treatment of skin diseases, external injuries, burns, wounds, and ulcers due to its healing properties (Pascual et al., 2001). There are reports of its analgesic and anti-inflammatory use in the treatment of colds, cough, sinusitis, bronchitis, nasal congestion, headache, and jaundice (Albuquerque et al., 2006; Mendes et al., 2010). The essential oil of this species have been shown antimicrobial, acaricide, anti-inflammatory, and cytotoxic activities, mainly due to its high content of thymol and carvacrol monoterpenes (Santos et al., 2016).

Tissue culture techniques are based on several programs of micropropagation and genetic engineering of plants and play an important role in obtaining quality plant material for the pharmaceutical and chemical industry (Miguel & Marum 2011; Peña-Ramírez et al., 2012). However, for *in vitro* culture, several factors may interfere in plant development, such as components of the culture medium, supplementation of growth regulators, moisture within the vial, and light conditions (Us-Camas et al., 2014).

Plants use light as a source of energy in the photosynthetic process and respond according to light intensity, quality, and duration (Muneer et al., 2014). In addition, light is not only an energy source, also functioning as a key signal that regulates plant development (Qian et al., 2016). In *Capsicum chinense*, the highest plantlet growth observed *in vitro* culture was under $28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (López et al., 2015). For *Momordica grosvenori* there was a progressive improvement in growth parameters with increasing light intensity, reaching maximum at $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Zhang et al., 2009). *Rehmanni aglutinosa* showed a significant increase in growth parameters when cultured under blue and red LED lamps and when compared to the fluorescent lamp (Manivannan et al., 2015). *Achillea millefolium* showed the highest growth under blue LED (Alvarenga et al., 2015). For *Plectranthus amboinicus*, best growth of plantlet was observed under red LED (Silva et al., 2017). Thus, the challenge of *in vitro* culture is to standardize the light source with sufficient intensity and quality for plant development, since the responses vary among species (Dong et al., 2014).

In the cultivation of species of medicinal interest, the light directly and indirectly changes the production of compounds because the luminous conditions of the *in vitro* culture are directly related in the synthesis of secondary metabolites. It was observed, for example, that the combination of blue, red, and white spectra increased anthocyanin accumulation in *Perilla frutescens* (Park et al., 2013). Sesquiterpenes of *A. millefolium* decreased when the

plantlets were cultivated under high light intensities (Alvarenga et al., 2015). In *Ruta graveolens*, blue and white LEDs increased total phenolic acid production (Szopa et al., 2012). *Gynura bicolor* plantlet grown under red LEDs showed reduction in total monoterpenes produced in their essential oil (Ren et al., 2014). In *P. amboinicus*, the blue monochromatic light produced higher carvacrol content (Silva et al., 2017)

Thus, the control of the light environment under *in vitro* culture can produce more vigorous plantlets with higher production of active principles of interest for the pharmaceutical and chemical industry (Saez et al., 2013). Thereby, the aim of this study was to evaluate the growth and the analysis of the volatile fraction of *L. gracilis* plantlets grown *in vitro* under different light intensities and qualities using LEDs.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Establishment of plant material

The plant material was herborized and the exsiccate was deposited in the PAMG herbarium of the Agricultural research agency of the state of Minas Gerais (EPAMIG) under registration PAMG 57859. The apical and nodal segments were used as explants, washed with running water for 30 min and immersed in sodium hypochlorite solution (1.25% active chlorine) under constant agitation for 15 min. Explants were inoculated into test tubes (150 x 25 mm) containing 15 mL of MS medium (Murashige & Skoog, 1962) with half concentration of salts. After inoculation, the tubes were placed in a growth room with cold-white fluorescent lamps (Osram®, Brazil) and intensity of $39\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, photoperiod of 16 h, and temperature of 25 ± 1 °C. The plantlets were multiplied in flasks containing 40 mL of MS medium with half concentration of salts and kept under identical light and temperature conditions until sufficient material was obtained for the experiments.

2.2 Light intensity

Nodal and apical segments (1 cm) were inoculated in test tubes containing 15 mL of MS medium with half concentration of salts supplemented with 30 g/L sucrose, 6 g/L agar (Himedia®, type I), and pH 5.7 ± 0.1 . The test tubes with culture medium were autoclaved at 125 °C for 20 min at 1.2 atm. Explants were cultured under five intensities: 26, 51, 69, 94, and $130\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ under a photoperiod of 16 h and 25 ± 1 °C. The light intensity was measured by a QSO-S Procheck + Sensor-PAR Photon Flux (Decagon Devices-Pullman-Washington-USA). After 30 days, the growth, analysis of volatile fraction, and photosynthetic pigments were evaluated. Four replicates per treatment were used with three plantlets per

replicate. The plantlets were evaluated in relation to shoot length (cm), root length (cm), number of segments, number of shoots, number of leaves, and leaf, stem, root, and total dry biomass (mg). Pigments analyzed were chlorophyll a, b, total chlorophyll (a+b), and carotenoids, which were extracted from 0.15 g of homogenized leaf fresh matter in 3 mL of 80% acetone in the dark and analyzed in spectrophotometer (Tecan Rchisto Infinite M200 PRO). The pigment content was calculated according to the methodology described by Lichtenthaler & Buschmann (2001). Leaves of three plantlets were analyzed in each treatment and performed in triplicate.

2.3 Light quality

Nodal and apical segments (1 cm) from *in vitro* plantlets were inoculated in test tubes containing 15 mL of MS medium with half concentration of salts supplemented with 30 g/L sucrose, 6 g/L agar (Himedia®, type I), and pH 5.7 ± 0.1 . The test tubes with culture medium were autoclaved at 125 °C for 20 min at 1.2 atm. Explants were placed in a growth room under red light; blue; white; 2.5 red:1 blue, and 1 red: 2.5 blue. The colored spectra were obtained with LED lamps with intensity of $42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (TECNAL© Piracicaba, Brazil). Luminous spectra were measured by a manual SPECTRA PEN Z850 spectroradiometer (Qubit Systems-Kingston, Ontario-USA). The experiment was conducted under a photoperiod of 16 h and 25 ± 1 °C. Four replicates per treatment were used with three plantlets per replicate. The plantlets were evaluated as described previously for the experiment of light intensity.

2.4 Chemical analysis by headspace GC/MS

Chemical analysis by headspace GC/MS were performed on an Agilent® 7890A gas chromatography coupled with a mass selective detector Agilent® 5975C Series MSD (Agilent Technologies, California, USA), operated by electron impact ionization at 70 eV in scan mode at a speed of 1 scan s^{-1} , with material acquisition interval of 40-400 m/z equipped with a headspace extractor CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland).

Leaves of nodal and apical segments of *L. gracilis* were dried in a convection oven at 40 °C for 72 h. Samples with 100 mg of the plant material were conditioned in 20 mL headspace vials, sealed with silicone septum/PTFE, kept in the dark until analysis. Vials were incubated individually by the autosampler at 110 °C for 30 min. The volume of 500 μL of the vapor phase was injected in split mode at 50:1 ratio.

A HP-5MS fused silica capillary column (30 m length x 0.25 mm internal diameter x 0.25 μm film thickness) (CA, USA) was used. Helium gas was used as carrier gas with flow of 1.0 mL min^{-1} ; the injector and transfer line temperatures for the mass spectrometer were maintained at 240 $^{\circ}\text{C}$. The initial oven temperature was 50 $^{\circ}\text{C}$, followed by a temperature ramp of 3 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ up to 240 $^{\circ}\text{C}$, followed by a ramp of 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ up to 280 $^{\circ}\text{C}$. The concentrations of the compounds of the volatile fraction were expressed as percentage of relative area of the chromatographic peaks \pm standard deviation. For each treatment, analyzes were performed in triplicates.

Constituents were identified by comparing their retention indices relative to *n*-alkanes series (C_9 - C_{20}), (Sigma-Aldrich®, St Louis, USA) and by comparing the mass spectra from the NIST/EPA/NHI (NIST, 2008) database and from the literature (Adams, 2007). The retention indices were calculated using the equation proposed by Van Den Dool and Kratz (1963) and the literature retention indices were consulted for the assignments (Adams, 2007).

2.5 Statistical analysis

The experimental design was completely randomized in a 5 x 2 factorial design (5 luminous conditions x 2 explant types, apical and nodal) for each experiment intensity and light quality. The data were submitted to ANAVA by the F test ($p < 0.05$), using Sisvar® software, version 5.0 (Ferreira, 2011). After checking the significance of variables by the F test, the means were compared by the Scott-Knott test at 5% probability. Standardized data were subjected to multivariate analysis, i.e., principal component analysis (PCA), using Statistica software (trial version 12, StatSoft Inc., USA) for the assessment of chemical composition diversity of *L. gracilis* plants treated with different light intensity and LED light. The eigenvalues for light intensity were: 3.402, 2.463 and for quality were: 3.079, 1.934 and below 1 for the remaining PCs. The first two principal components together explained 97.75% (light intensity) and 83.58% (light quality) of the total variance, and they were included in the discussion. Correlation-based PCA of major compounds constituents (including α -terpinene, γ -terpinene, p-cymene, thymol, carvacrol, *E*-caryophyllene) was performed.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Light intensity

Interaction between the segment type and light intensities was observed (Table 1). Plantlets obtained from apical segments showed the highest means for the analyzed growth

variables at different intensities except for the number of shoots and leaves. Although the different light conditions affected the *in vitro* growth of *L. gracilis*, plantlets were vigorous in all treatments (Figure 1). Axillary buds have a certain dormancy degree, so it is relatively common that apical segments that do not have dormancy originate plants larger than nodal segments (Sharma et al, 2013). The highest number of shoots and leaves observed in plantlets obtained from nodal segments can be related to the number of buds present in this type of segment. Nodal segments have two axillary buds, thus the number of shoots and leaves are higher than the apical, which generally only develops one plantlet.

Table 1: *In vitro* growth of *L. gracilis* grown in MS/2 medium for 30 days under different light intensities (26, 51, 69, 94, and 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (SL: Shoot length; NSg: number of segments (nodal+apical); RL: Root length; NSh: Number of shoots; NL: Number of leaves; LDB: leaf dry biomass; SDB: Stem dry biomass; RDB: Root dry biomass; TDB: Total dry biomass). A: apical segment and N: nodal segment.

Light Intensity ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	SL (cm)		NSg		RL (cm)		NSh		NL		LDB (mg plantlet ⁻¹)		SDB (mg plantlet ⁻¹)		RDB (mg plantlet ⁻¹)		TDB (mg plantlet ⁻¹)	
	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N
26	11.63 ^{aA}	4.32 ^{aB}	5.58 ^{bA}	3.13 ^{bB}	4.13 ^{cA}	2.48 ^{cB}	1.25 ^{aB}	2.15 ^{aA}	12.4 ^{aB}	18.33 ^{aA}	27.68 ^{cA}	12.66 ^{cB}	14.40 ^{aA}	5.72 ^{bB}	20.53 ^{bA}	5.59 ^{dB}	62.61 ^{cA}	23.97 ^{bB}
51	9.03 ^{bA}	4.63 ^{aB}	6.01 ^{aA}	4.2 ^{aB}	5.2 ^{aA}	4.13 ^{aB}	1.00 ^{aB}	2.00 ^{aA}	15.15 ^{aB}	20.73 ^{aA}	35.58 ^{bA}	29.98 ^{bB}	13.87 ^{aA}	9.15 ^{aB}	22.66 ^{bA}	21.94 ^{aB}	75.11 ^{cA}	61.06 ^{aB}
69	8.75 ^{bA}	3.90 ^{aB}	6.78 ^{aA}	3.68 ^{aB}	5.2 ^{aA}	3.98 ^{aB}	1.00 ^{aB}	2.18 ^{aA}	13.65 ^{aB}	21.18 ^{aA}	44.16 ^{bA}	28.59 ^{bB}	13.71 ^{bA}	7.64 ^{aB}	23.21 ^{bA}	18.27 ^{bB}	81.08 ^{cA}	54.40 ^{aB}
94	8.73 ^{bA}	2.84 ^{bB}	6.00 ^{aA}	4.02 ^{aB}	5.7 ^{aA}	4.02 ^{aB}	1.00 ^{aB}	2.18 ^{aA}	12.93 ^{aB}	20.75 ^{aA}	51.86 ^{aA}	37.56 ^{aB}	14.76 ^{aA}	9.09 ^{aB}	24.27 ^{aA}	15.52 ^{bB}	90.89 ^{bA}	62.18 ^{aB}
130	6.67 ^{cA}	2.98 ^{bB}	6.05 ^{aA}	3.90 ^{aB}	4.65 ^{bA}	3.3 ^{bB}	1.18 ^{aB}	1.93 ^{aA}	14.9 ^{aB}	19.35 ^{aA}	55.47 ^{aA}	32.96 ^{aB}	12.51 ^{bA}	6.04 ^{bB}	28.9 ^{aA}	12.55 ^{cB}	96.88 ^{aA}	51.55 ^{aB}

Averages followed by the same lowercase letter on the columns and capital on the rows belong to the same group by Scott-Knott test at 5% probability.

Fig. 1 Plantlets of *L. gracilis* grown under different light intensities *in vitro* (26, 51, 69, 94, and 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) after 30 days



Shoot length increased with the reduction of light intensity. Similar results were observed for *A. millefolium* and *Alocasia amazonica* (Alvarenga et al 2015; Jo et al. 2008). Such results indicate that these species present favorable responses to survive in low light intensity environments. The increase in height of plants that develop in shaded environments is considered the most common response and reported by some authors, because the plant would have the purpose of reaching light faster (Morales et al., 2000).

The number of segments, root length, and leaf, stem, root, and total biomass were higher with increasing light intensity, especially in treatments 51 and 94 $\mu\text{mol m}^{-2}$

s⁻¹. Similar results were found for *Hyptis suaveolens*, whose best growth responses in apical and nodal segments were obtained with increasing light intensity (Andrade et al., 2017). The increase in root length may be related to auxin levels as there is evidence that light intensity affects the synthesis and transport of this hormone, thus directly influencing root formation (Zhang et al., 2009) because low concentrations of this hormone associated with its degradation by high light intensity contributes in the increase of root growth (Taiz & Zeiger, 2017).

Different results were observed for *Comanthera mucugensis* and *Momordica grosvenori* grown *in vitro* where the increase in light intensity promoted reduction of root length (Lima-Brito et al., 2016; Zhang et al., 2009). Regarding light intensity, no significant effect was observed for shoot and leaf numbers, regardless of the segment type (Table 1).

Reduction of leaf and stem biomass in plantlets grown under low light intensity associated with the longer shoot length (Table 1) may indicate etiolation. Etiolation is an evolutionary adaptation of plants, which convert the energy contained in the plant tissues to the stem elongation as an important strategy to search for light in natural environments (Kerbaui & Chaer, 2011). The increase of biomass production in plantlets grown under high light intensities indicates that *L. gracilis* is a plant adapted to high light intensity environments. This fact can be associated to its environment of origin (semiarid), which receives high irradiances (Gomes et al., 2011).

Plants adapted to the environment with high light intensities present high photosynthetic rates and high growth rates under intense light (Larcher, 2006). Studies with *Ocimum gratissimum* *in vivo* under different light intensities verified a linear increase in dry matter production with increasing light intensity, corroborating with data found in the present study (Fernandes et al., 2013).

The production of photosynthetic pigments was influenced by the type of segment and the different light intensities (Table 2). In general, plantlets originated from apical explants had higher production of chlorophyll *a*, *b*, total, and carotenoids regardless of light conditions. The amount of chlorophyll *b* was higher in plantlets originated from nodal segments. It is noteworthy that chlorophyll *a* levels were higher in plantlets originated from apical explants, especially under low light intensities while chlorophyll *b* was higher in plantlets originating from nodal explants under high light intensities.

Table 2 - Photosynthetic pigments (chlorophyll *a*, *b*, total, and carotenoids) of *L. gracilis* S. grown *in vitro* in MS/2 medium for 30 days under different light intensities (26, 51, 69, 94, and 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{S}^{-1}$).

Light intensity ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Chlorophyll (mg.g^{-1})						Carotenoids	
	a		b		Total		A	N
	A	N	A	N	A	N		
26	1.23 ^{bA}	0.67 ^{bB}	0.55 ^{bA}	0.47 ^{cA}	1.78 ^{bA}	1.14 ^{cB}	0.56 ^{bA}	0.36 ^{bB}
51	1.60 ^{aA}	1.04 ^{aB}	0.55 ^{bB}	0.78 ^{bA}	2.15 ^{aA}	1.81 ^{bB}	0.58 ^{bA}	0.52 ^{aA}
69	1.04 ^{bA}	0.84 ^{bB}	0.63 ^{bB}	0.98 ^{aA}	1.67 ^{bA}	1.81 ^{bA}	0.61 ^{bA}	0.45 ^{aB}
94	1.10 ^{bA}	1.04 ^{aA}	1.12 ^{aA}	1.10 ^{aA}	2.22 ^{aA}	2.14 ^{aA}	1.12 ^{aA}	0.44 ^{aB}
130	1.16 ^{bA}	0.86 ^{bB}	0.55 ^{bB}	1.05 ^{aA}	1.71 ^{bA}	1.90 ^{bA}	0.56 ^{bA}	0.50 ^{aA}

Averages followed by the same lowercase letter on the columns and capital on the rows belong to the same group by Scott-Knott test at 5% probability

The greater accumulation of chlorophyll *a* and total observed in apical explants may have provided the greater growth observed in plantlets obtained from this segment type. In addition, the greater amount of chlorophyll *a* may demonstrate a faster degradation of chlorophyll *b* in relation to chlorophyll *a* and an imbalance among photosystems, resulting in greater energy investment in PSII (Engel & Poggiani, 1991). Thus, plants obtained from apical explants may have promoted increased photophosphorylation and consequently ATP synthesis through increased investment in PSII.

According to Whatley & Whatley (1982), the increase in chlorophyll *b* contents under low irradiances is an important feature of plant adaptation to shaded environments because this pigment captures photons with higher wavelengths observed in this environment type. Thus, it can be inferred that the studied species (*L. gracilis*) does not present adaptation in environments with low light intensities in relation to the photosynthetic pigments because the levels of chlorophyll *b* increased in conditions of greater light intensity. This result is in agreement with the environment of origin of the species, which is Caatinga (Gomes et al., 2011).

In general, an increase in the synthesis of carotenoids was observed. Carotenoids are pigments that act as photoprotectors by rapidly extinguishing the excited states of chlorophyll and protecting it from oxidation (Taiz & Zeiger, 2013). Thus, high levels of carotenoids in plants under high light intensities are associated with sufficient protection of the light receptor complexes of the photosystems. High levels of carotenoids in plants grown under high light intensities were observed for *Withania somnifera* (Lee et al., 2007) and *A. millefolium* (Alvarenga et al., 2015). The increase in carotenoid levels associated with the equilibrium of photosystems (PSI and PSII) may have led to an

increase in the photosynthetic activity and hence the higher production of dry biomass observed under these conditions. These results indicate that the species is adapted to conditions of high light intensities.

The light intensity changed the volatile chemical composition of *L. gracilis* grown *in vitro* (Table 3). At the intensities of 51, 69, 94, and 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, the chemical profile was less complex (12 to 14 constituents detected), therefore showing a small variation among these treatments. However, when comparing the chemical profile of the latter treatments with plants grown under 26 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a greater chemical complexity was observed in plants grown under this light intensity, totalizing 16 detected volatile chemical constituents. The thymol methyl ether and, α -humulene were constituents responsible for the greater chemical complexity of plantlets grown under intensity of 26 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Regardless of the treatment, more than 98.57% of the total chemical composition was identified and grouped into four classes: monoterpene hydrocarbons, oxygenated monoterpenes, aromatic monoterpenes, and sesquiterpene hydrocarbons. Chemical constituents from aromatic monoterpenes were characterized by showing carvacrol (38.52 to 46.05%) and *p*-cymene (25.32 to 28.38%) as the major constituents. Among other constituents present in the samples, it is possible to highlight γ -terpinene (6.90 to 12.42%), thymol (5.89 to 6.41%), and *E*-caryophyllene (4.35 to 5.53%) (Table 3). These constituents were already observed by other authors for the studied species (Cruz et al., 2013; Neto et al., 2010; Santos et al., 2016; Ferraz et al., 2013).

The light intensity of 26 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ reduced the percentage of total relative area of constituents of the aromatic monoterpenes class (70.08%), caused by the decrease in the carvacrol content in relation to other samples. On the other hand, it increased the total content of the monoterpene hydrocarbons (21.95%) mainly because the γ -terpinene content increased in comparison to other treatments (Figures 2). The higher production of monoterpene hydrocarbons under high light intensities may also be associated with their functions. Research suggests that monoterpenes act as plant protectors to environmental stresses and may be involved in the stabilization of cell membranes through lipid-lipid, lipid-protein, protein-protein interactions or by action against reactive oxygen species (ROS) (Hartikainen et al., 2009; Holopainen, 2011).

Data from the literature indicate that plants of the Lamiacea family biosynthesize carvacrol and thymol from the oxidation of *p*-cymene, α -terpinene, and γ -terpinene (Crocoll et al. 2010, Poulouse and Croteau 1978, Stefanaki et al. 2016). However,

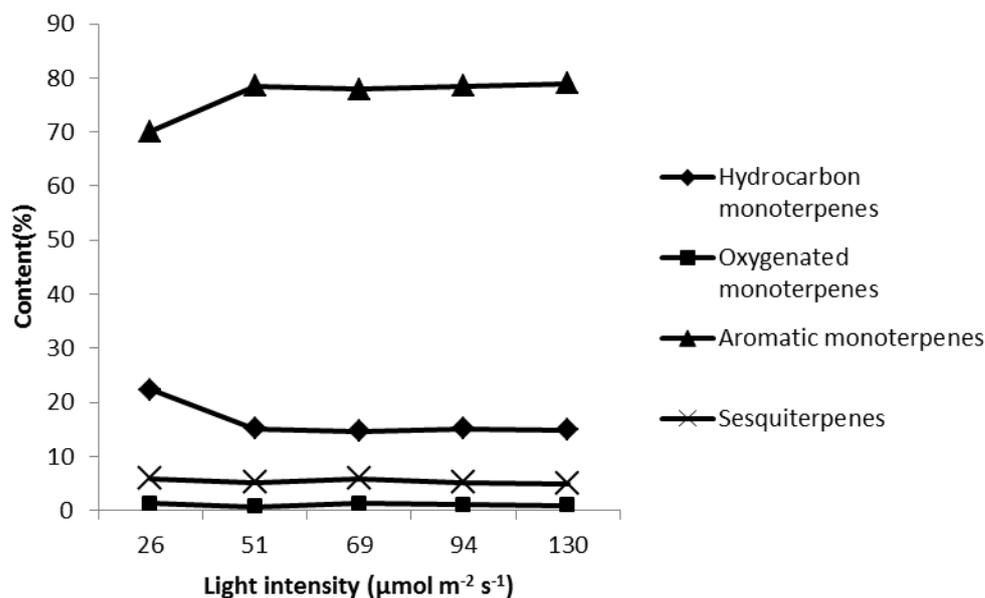
Crocoll (2011) studied the biosynthesis of phenolic monoterpenes in *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* and suggested the direct conversion from γ -terpinene to carvacrol by a P450 monoterpene hydroxylase. In the present study, an increase in light intensity caused a reduction in γ -terpinene levels and an increase in carvacrol levels, suggesting that γ -terpinene might have been converted directly to carvacrol. The hypothesis of this direct conversion is justified because no variations in p-cymene levels were observed.

Table 3 - Volatile chemical composition of *L. gracilis* plantlets grown *in vitro* for 30 days under different light intensities.

Compounds	RI*	Light Intensity ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)				
		26	51	69	94	130
		Content (%) \pm SD				
Monoterpene hydrocarbon		21.95	15.15	14.6	14.92	14.66
α -thujene	925	2.07 \pm 0.04	1.67 \pm 0.07	1.60 \pm 0.09	1.77 \pm 0.20	1.70 \pm 0.15
α -pinene	932	0.37 \pm 0.01	0.33 \pm 0.00	0.31 \pm 0.03	0.34 \pm 0.03	0.32 \pm 0.02
Myrcene	991	3.42 \pm 0.08	2.96 \pm 0.05	2.82 \pm 0.38	3.02 \pm 0.29	2.97 \pm 0.19
α -terpinene	1016	3.23 \pm 0.28	2.50 \pm 0.02	2.35 \pm 0.24	2.47 \pm 0.20	2.26 \pm 0.16
Limonene	1027	0.44 \pm 0.01	0.41 \pm 0.00	0.38 \pm 0.04	0.42 \pm 0.05	0.38 \pm 0.03
γ -terpinene	1057	12.42 \pm 0.28	7.28 \pm 0.21	7.14 \pm 0.65	6.90 \pm 0.29	7.3 \pm 0.16
Oxygenated monoterpenes		1.11	0.74	1.22	1.09	0.91
<i>cis</i> -sabinene hydrate	1065	0.41 \pm 0.02	0.28 \pm 0.01	0.39 \pm 0.04	0.33 \pm 0.04	0.38 \pm 0.04
Umbellulone	1179	0.20 \pm 0.02	nd	0.29 \pm 0.02	0.25 \pm 0.00	nd
terpinen-4-ol	1183	0.50 \pm 0.01	0.46 \pm 0.01	0.54 \pm 0.11	0.51 \pm 0.03	0.53 \pm 0.05
Aromatic monoterpenes		70.08	78.46	77.91	78.55	79.06
p-cymene	1023	25.32 \pm 0.87	26.87 \pm 0.76	25.45 \pm 3.06	27.96 \pm 2.27	28.38 \pm 1.36
thymol methyl ether	1248	0.17 \pm 0.01	nd	nd	Nd	nd
Thymol	1293	6.07 \pm 0.06	6.16 \pm 0.24	6.41 \pm 0.59	6.13 \pm 0.26	5.89 \pm 0.06
Carvacrol	1302	38.52 \pm 1.22	45.43 \pm 0.58	46.05 \pm 1.81	44.46 \pm 2.57	44.79 \pm 1.35
Sesquiterpene hydrocarbon		5.43	5.16	5.88	5.14	4.35
<i>E</i> -caryophyllene	1418	5.03 \pm 0.09	4.87 \pm 0.28	5.53 \pm 1.21	4.89 \pm 0.45	4.35 \pm 0.56
α -humulene	1452	0.16 \pm 0.00	nd	nd	Nd	nd
α -bulnesene	1505	0.24 \pm 0.02	0.29 \pm 0.04	0.35 \pm 0.04	0.25 \pm 0.04	nd
Total (%)		98.57	99.51	99.61	99.70	98.98
Number of compounds		16	13	14	14	12

*HP-5MS column retention index in elution order. nd: not detected. SD: standard deviation ($n=3$).

Fig. 2 Chemical nature of the volatile constituents of *L. gracilis* plantlets grown *in vitro* for 30 days under different light intensities (26, 51, 69, 94, and 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).



According to Jensen et al. (2011), an efficient electron donation is a prerequisite for the optimal activity of P450. As the increase in light intensity causes photoinhibition in photosystem I, a shift in the electron transport chain to the cytochrome P450 occurs, thus promoting its activation. Therefore, the increase of carvacrol at high light intensities (51 to 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) may be associated with possible oxidative stress caused by the increase in irradiance and the activation of P450 monoterpenehydroxylase.

3.2 Light quality

Interaction between the segment type and light qualities was observed (Table 4). Plantlets obtained from apical segments showed the highest means for the analyzed growth variables at different light qualities except for the number of shoots and leaves. The different light spectra provided by the LED lamps changed the growth of *L. gracilis* (Table 4). Although the different light conditions affected the *in vitro* growth of *L. gracilis*, plantlets were vigorous in all treatments (Figure 3). Plantlets grown under red and white lights had the highest averages for shoot length, root length, and leaf, stem, root, and total dry biomass. It is noteworthy that the blue light spectrum had a negative effect on the growth of the species.

The increased shoot length observed in plantlets grown under red LEDs may indicate the influence of phytochrome on the growth of the species. Light is perceived

by plants through photoreceptors such as phytochromes and cryptochromes that generate a series of specific physiological responses through these receptors (Taiz & Zeiger, 2013).

The red LED lamp emits a narrow light spectrum (660 nm) very close to the maximum absorbance for chlorophyll and phytochromes (Muneer et al. 2014). Furthermore, increased growth of *in vitro* cultured plants provided by red light was also observed for other species: *Vaccinium corymbosum* (Hung et al., 2016) and *Scrophularia takesimensis* (Jeong & Sivanesan, 2015), *Oncidium spp.* (Chung et al., 2010) and *P. amboinicus* (Silva et al., 2017). However, for apical and nodal segments of *Hyptis suaveolens*, the best growth parameters were provided by white LED light and red-blue combinations (Andrade et al., 2017). According to Manivannan et al. (2015) this growth may be related to the ability of red light to induce the formation of endogenous gibberellin in the plant, which is an important growth regulator involved in cell elongation.

It was observed increase of the root length under the red light. Results found in this study indicate that root induction is probably dependent on this light spectrum. In micropropagation, the better plantlet root development leads to a faster acclimatization and better survival rate in the field (Chandra et al., 2010). In contrast, the percentage of survival was similar for all the evaluated spectra. The use of LED lamps in *Rubus idaeus* stimulated root elongation and increased the weight of dry matter of the area compared to plants grown with fluorescent lamps (Poncetta et al., 2017)

There was increase of the biomass in the red light. Studies showed that red light promoted starch accumulation in higher plants (Li et al., 2013), which may explain the increased dry biomass found in this study for this light spectrum.

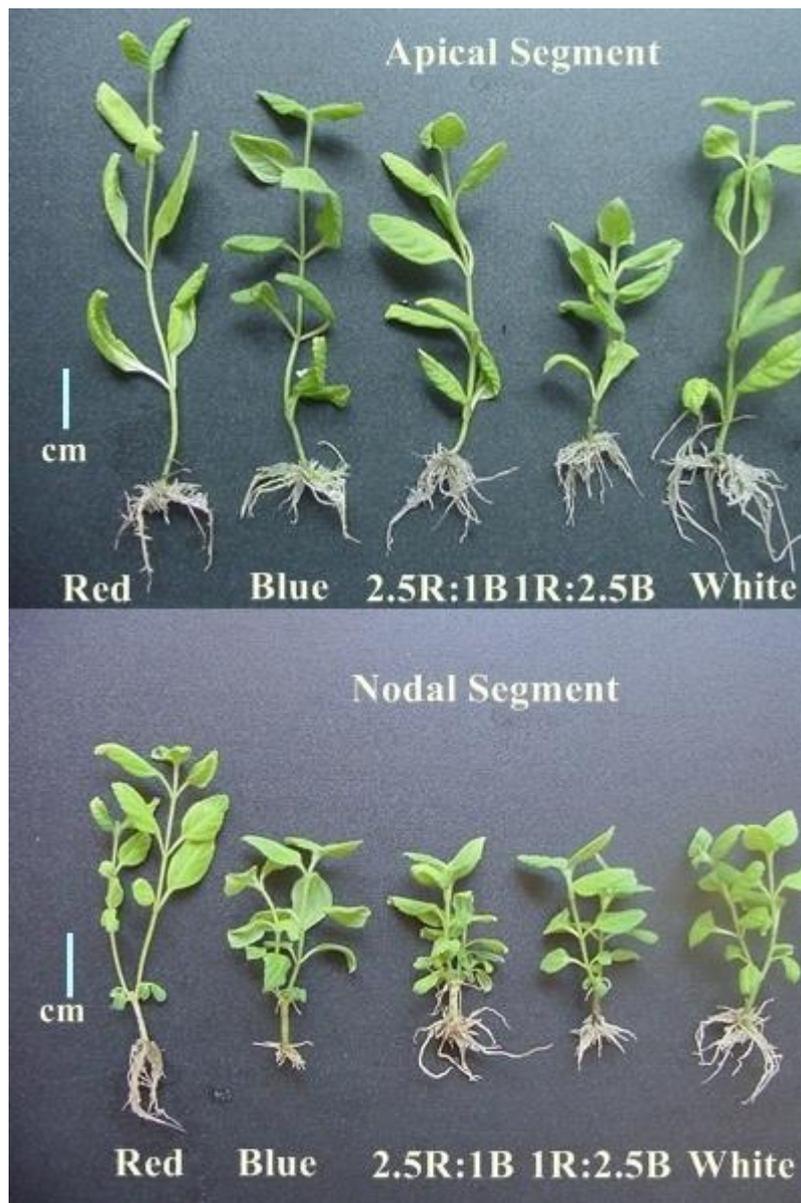
The lowest dry matter production of *L. gracilis* plantlets grown under blue light was also observed for *Vanilla planifolia* (Bello et al., 2016), *R. glutinosa* (Manivannan et al., 2015), *Vitis* spp (Poudel et al. 2008), and *P. amboinicus* (Silva et al., 2017). These results indicate that the light quality influences the *in vitro* growth of plants and its effect specific for the species (Li et al., 2013). It is noteworthy that the red light spectrum is more stimulating for growth and morphogenesis of *L. gracilis* .

Table 4. *In vitro* growth of *L. gracilis* grown in MS/2 medium for 30 days under different luminous spectra (,red, blue, 2.5R:1B, 1R: 2.5B, White) (SL: Shoot length; NSg: number of segments (nodal+apical); RL: Root length; NSh: Number of shoots; NL: Number of leaves; LDB: leaf dry biomass; SDB: Stem dry biomass; RDB: Root dry biomass; TDB: Total dry biomass).

Light Quality	SL (cm)		NSg		RL (cm)		NSh		NL		LDB (mg plantlet ⁻¹)		SDB (mg plantlet ⁻¹)		RDB (mg plantlet ⁻¹)		TDB (mg plantlet ⁻¹)	
	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N
	Red	10.43 ^{aA}	4.23 ^{aB}	4.08 ^{aA}	2.81 ^{aB}	4.15 ^{aA}	2.55 ^{aB}	1.00 ^{aB}	2.1 ^{aA}	10.75 ^{aB}	18 ^{aA}	32.28 ^{aA}	15.56 ^{bB}	11.45 ^{bA}	3.56 ^{bB}	14.61 ^{bA}	5.42 ^{aB}	58.33 ^{aA}
Blue	7.68 ^{bA}	2.37 ^{bB}	4.50 ^{aA}	2.29 ^{aB}	2.18 ^{cA}	1.05 ^{cB}	1.18 ^{aB}	1.85 ^{aA}	10.83 ^{aB}	16.92 ^{aA}	24.55 ^{dA}	16.87 ^{aA}	13.45 ^{aA}	5.89 ^{aB}	17.22 ^{aA}	3.63 ^{bB}	55.21 ^{aA}	26.38 ^{aB}
2.5R:1B	6.75 ^{cA}	2.47 ^{bB}	4.68 ^{aA}	2.68 ^{aB}	3.03 ^{bA}	1.83 ^{bB}	1.43 ^{aB}	2.15 ^{aA}	13.92 ^{aB}	18.08 ^{aA}	21.73 ^{dA}	11.32 ^{bB}	7.27 ^{cA}	2.37 ^{cB}	6.81 ^{dA}	3.34 ^{bB}	35.79 ^{cA}	17.04 ^{cB}
1R:2.5B	5.15 ^{dA}	2.15 ^{bB}	4.50 ^{aA}	2.21 ^{aB}	3.00 ^{bA}	1.8 ^{bB}	1.00 ^{aB}	2.1 ^{aA}	11.18 ^{aB}	13.93 ^{aA}	26.25 ^{cA}	12.84 ^{bB}	7.35 ^{cA}	3.39 ^{cB}	7.38 ^{dA}	5.51 ^{aB}	40.96 ^{bA}	21.74 ^{bB}
White	8.00 ^{bA}	2.77 ^{bB}	5.00 ^{aA}	2.59 ^{aB}	4.6 ^{aA}	2.03 ^{aB}	1.00 ^{aB}	1.93 ^{aA}	11.83 ^{aB}	17.93 ^{aA}	26.42 ^{bA}	14.62 ^{bB}	7.45 ^{cA}	3.49 ^{cB}	9.98 ^{cA}	3.74 ^{bB}	43.84 ^{bA}	21.85 ^{bB}

Averages followed by the same lowercase letter on the columns and capital on the rows belong to the same group by Scott-Knott test at 5% probability

Fig. 3 Plantlets of *L. gracilis* grown under different luminous spectra *in vitro* after 30 days.



Results obtained in the present study were similar to those reported for *A. millefolium* (Alvarenga et al., 2015), *Curcuma longa* (Trouwborst et al., 2016), and *Salvia splendens* (Heo et al., 2006). Plant responses to the blue light spectrum are due to pigments such as phytochromes, cryptochromes and phototropins, which when stimulated control the expression of some genes, opening stomata, flowering, and other processes, leading to the greater stimulation of photosynthesis (Cheynier et al. Al., 2013), which for *L. gracilis* seems to be related to the blue light wavelength.

The production of photosynthetic pigments was influenced by the type of segment and the different light qualities (Table 5). Regarding the different light spectra, it was observed that plantlets originated from apical explants had higher pigment

production under the blue spectrum (Table 5), while those originating from nodal explants showed higher production under white light, followed by blue light conditions. The increase in chlorophyll production under blue light was also observed for *V. corymbosum* (Hung et al., 2016), *Vitis* spp (Poud el et al., 2008), and *Lactuca sativa* (Muneer et al., 2014). However, *Staphylea pinnata* plantlets grown under combined blue-red LEDs increased chlorophyll levels in relation to plantlets grown under fluorescent lamps (Szewczyk-Taranek et al., 2017).

Table 5 - Photosynthetic pigments (chlorophyll *a*, *b*, total, and carotenoids) of *L. gracilis* S. grown *in vitro* in MS/2 medium for 30 days under different luminous spectra (Red, Blue, 2.5Red:1Blue, 1Red:2.5Blue, White).

Light quality	Chlorophyll (mg.g ⁻¹)						Carotenoids	
	(mg/g)							
	a		b		total		A	N
	A	N	A	N	A	N	A	N
Red	0.87 ^{cA}	0.67 ^{cB}	0.62 ^{bA}	0.18 ^{cB}	1.48 ^{cA}	0.85 ^{cB}	0.57 ^{bA}	0.17 ^{cB}
Blue	1.37 ^{aA}	0.94 ^{aB}	0.80 ^{aA}	0.33 ^{bB}	2.17 ^{aA}	1.27 ^{bB}	0.78 ^{aA}	0.30 ^{bB}
2.5R:1B	1.06 ^{bA}	1.03 ^{aA}	0.52 ^{cA}	0.56 ^{aA}	1.58 ^{cA}	1.59 ^{aA}	0.87 ^{aA}	0.26 ^{bB}
1R:2.5B	1.04 ^{bA}	0.84 ^{bB}	0.68 ^{bA}	0.14 ^{cB}	1.72 ^{bA}	0.98 ^{cB}	0.55 ^{bA}	0.32 ^{bB}
White	0.94 ^{cA}	1.02 ^{aA}	0.29 ^{dB}	0.53 ^{aA}	1.23 ^{dB}	1.55 ^{aA}	0.43 ^{cA}	0.44 ^{aA}

Averages followed by the same lowercase letter on the rows and capital on the columns belong to the same group by Scott-Knott test at 5% probability

The increase in pigment production obtained in plantlets grown under blue light spectrum corroborates with Tsunoyama et al. (2002), which state that blue light influences the biosynthesis of chlorophyll and other pigments through genetic regulation. Moreover, blue light is involved in the development of chloroplasts, where these pigments are synthesized and perform their functions (Gupta & Jatothu, 2013; Liu et al., 2014). According to Larcher (2006), changes in chlorophyll biosynthesis by changes in spectral quality may provide advantages regarding plant growth and reproduction. Thus, these results indicate that *L. gracilis* adapts chromatically to improve its photosynthetic performance. However, other studies already observed reduction in chlorophyll levels in plants grown under blue light, such as *Oncidium* spp (Chung et al., 2010), *Ocimum basilicum* (Lim & Eom, 2013), and *Platycodon grandiflorum* (Liu et al., 2014).

The blue light plays an important role in the regulation of photosynthetic characteristics because it provides greater production of photosynthetic pigments and the development of organelles responsible for photosynthesis (Liu et al., 2014;

Yamazaki, 2010). However, only the isolated blue light spectrum and higher production of photosynthetic pigments under these conditions seems to have had no effect on dry biomass production for *L. gracilis*.

The volatile chemical profile of plantlets grown under different spectral light qualities presented low complexity, totaling the presence from 10 to 16 chemical constituents characterized almost entirely (> 98.83%) and grouped into four classes: monoterpene hydrocarbons, oxygenated monoterpenes, aromatic monoterpenes, and sesquiterpene hydrocarbons (Table 6). As observed previously, the major constituents were carvacrol (41.05 to 48.11%) and *p*-cymene (24.54 to 32.40%), both of which were aromatic monoterpenes. Among other constituents present in the samples, it is possible to highlight γ -terpinene (3.74 to 7.36%), thymol (4.62 to 5.65%), and *E*-caryophyllene (6.02 to 11.73%) (Table 6).

The less complex profile was observed in plants grown under blue LED totaling 10 chemical constituents detected. Among non-detected chemical constituents are α -pinene, limonene, *cis*-sabinene hydrate, umbellulone, thymol methyl ether, and α -humulene. The synthesis of total aromatic monoterpenes was boosted under blue monochromatic light and in treatments with presence of the blue component in greater proportion (1R:2.5B), 78.14% and 78.96%, respectively.

The blue monochromatic light seems to have stimulated the direct conversion from γ -terpinene to carvacrol with *p*-cymene as a by-product of this biosynthesis, as previously mentioned (Crocoll, 2011). The highest accumulation of carvacrol (48.11%) occurred in this isolated wavelength. The blue light absorption by plants increases the energetic state compared with red light due to the greater energy available at that wavelength (Taiz & Zeiger, 2013), which may be the reason for the direct conversion from γ -terpinene to carvacrol, besides the existing relation of this factor in the activation of cytochrome P450 (Jensen et al., 2011). The lowest content of monoterpene hydrocarbons (8.04%) was observed in plantlets grown under blue LED. Similar results were also found for *P. amboinicus* where the blue monochromatic light led to greater accumulation of carvacrol (Silva et al., 2017).

On the other hand, the most complex volatile chemical profile was observed in plants grown under red monochromatic light (16 constituents detected). Among constituents that contributed to increase the chemical complexity, α -humulene was observed only when plantlets grown under red monochromatic light. The red light radiation, regardless of its proportion, seemed to activate the accumulation of

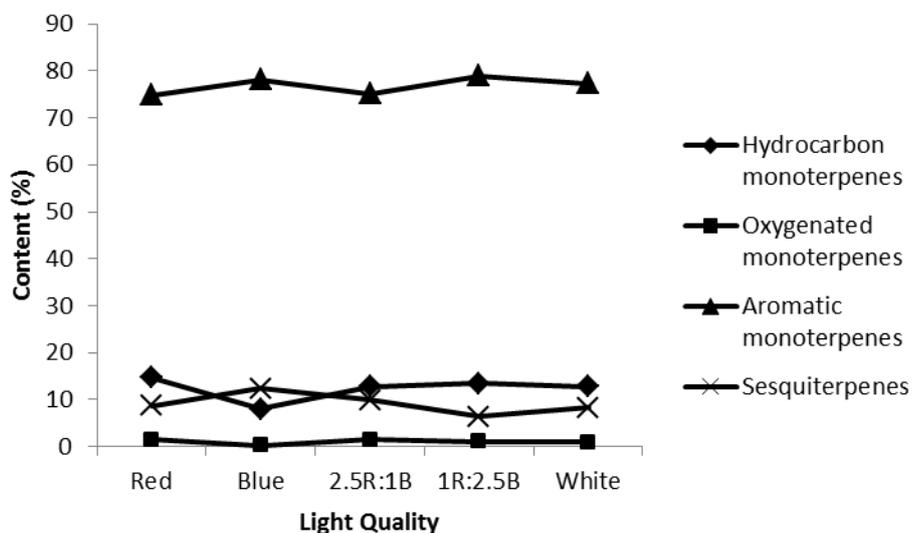
monoterpene hydrocarbons. In all treatments where the red light component was present (Red, 2.5R:1B, 1R:2.5B, and White) the total monoterpene hydrocarbon contents were more expressive (12.77 to 14.74%).

Table 6 - Volatile chemical composition of *L. gracilis* plantlets grown *in vitro* under different light qualities at 30 days.

Compounds	RI*	Red	Blue	2.5R:1B	1R:2.5B	White
		Content (%) \pm SD				
Monoterpene hydrocarbon		14.74	8.04	12.77	13.47	12.73
α -thujene	925	1.55 \pm 0.08	1.27 \pm 0.07	1.53 \pm 0.06	1.60 \pm 0.15	1.55 \pm 0.04
α -pinene	932	0.33 \pm 0.01	nd	0.36 \pm 0.02	0.35 \pm 0.05	0.33 \pm 0.01
Myrcene	991	2.59 \pm 0.35	1.74 \pm 0.00	2.45 \pm 0.16	2.59 \pm 0.37	2.49 \pm 0.26
α -terpinene	1016	2.53 \pm 0.30	1.29 \pm 0.11	2.24 \pm 0.14	2.25 \pm 0.32	2.19 \pm 0.30
Limonene	1027	0.38 \pm 0.03	nd	0.42 \pm 0.03	0.48 \pm 0.07	0.42 \pm 0.03
γ -terpinene	1057	7.36 \pm 1.04	3.74 \pm 0.64	5.77 \pm 0.37	6.20 \pm 1.24	5.75 \pm 1.80
Oxygenated monoterpenes		1.41	0.29	1.44	1.09	0.91
<i>cis</i> -sabinene hydrate	1065	0.29 \pm 0.00	nd	0.31 \pm 0.00	0.20 \pm 0.00	nd
Umbellulone	1179	0.46 \pm 0.00	nd	0.42 \pm 0.05	0.30 \pm 0.00	0.36 \pm 0.01
terpinen-4-ol	1183	0.66 \pm 0.02	0.29 \pm 0.00	0.71 \pm 0.04	0.59 \pm 0.00	0.55 \pm 0.11
Aromatic monoterpenes		74.91	78.14	75.13	78.96	77.25
ρ -cymene	1023	24.54 \pm 1.79	24.87 \pm 0.38	28.53 \pm 1.72	32.40 \pm 3.65	28.59 \pm 0.52
thymol methyl ether	1248	0.50 \pm 0.01	nd	0.53 \pm 0.08	0.30 \pm 0.00	0.39 \pm 0.04
Thymol	1293	5.65 \pm 0.06	5.16 \pm 0.11	5.02 \pm 0.41	4.62 \pm 0.31	5.21 \pm 0.09
Carvacrol	1302	44.22 \pm 1.94	48.11 \pm 2.19	41.05 \pm 1.15	41.64 \pm 2.03	43.06 \pm 1.23
Sesquiterpene hydrocarbon		8.7	12.36	9.88	6.48	8.22
<i>E</i> -caryophyllene	1418	7.70 \pm 3.38	11.73 \pm 1.62	9.34 \pm 1.37	6.02 \pm 2.41	7.76 \pm 0.94
α -humulene	1452	0.34 \pm 0.00	nd	nd	nd	nd
α -bulnesene	1505	0.66 \pm 0.02	0.63 \pm 0.02	0.54 \pm 0.06	0.46 \pm 0.00	0.46 \pm 0.10
Total (%)		99.76	98.83	99.22	99.99	99.11
Number of compounds		16	10	15	15	14

*HP-5MS column retention index in elution order. nd: not detected. SD: standard deviation ($n=3$).

Fig. 4 Chemical nature of the volatile constituents of *L. gracilis* plantlets grown *in vitro* for 30 days under different light qualities (Red, Blue, 2.5R:1B, 2.5B:1R, and White).



3.3 Principal Components Analyses (PCA)

The resulting of the principal components analyses (scores and loadings) provides a conceptual overview of the treatments by showing 97.75% (light intensity) and 83.58% (light quality) of the total variance (Figure 5 and 6). PCs separated these treatments in three groups low, intermediate and higher light intensity. It is possible to conclude that *L. gracilis* illuminated with lower light ($26 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) showed higher α -terpinene and γ -terpinene content. The plants cultivated in higher light intensity (94 and $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) had more concentration of ρ -cymene. It can observe that the intermediate light (51 and $69 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) had tymol and *E*-caryophyllene content. For treatments with light quality, the PCs separated in three groups red, blue and remaining LED light. Plants of *L. gracilis* illuminated with red light showed higher thymol and γ -terpinene content. And the plants cultivated in blue light had more concentration of carvacrol and *E*-caryophyllene. It can observe that the white, 2.5R/1B and 1R/2.5B light had higher ρ -cymene content.

In both experiments the correlation seems very similar. The analyses of loadings allowed observing that carvacrol had negative correlation with terpinene. Ours data confirm that there is a direct conversion from γ -terpinene to carvacrol as reported for Crocoll (2011).

Fig. 5 Score and Loadings of the principal components analyses (PCA) on the matrix correlation built using data for six major compounds under light intensity of *L. gracilis*.

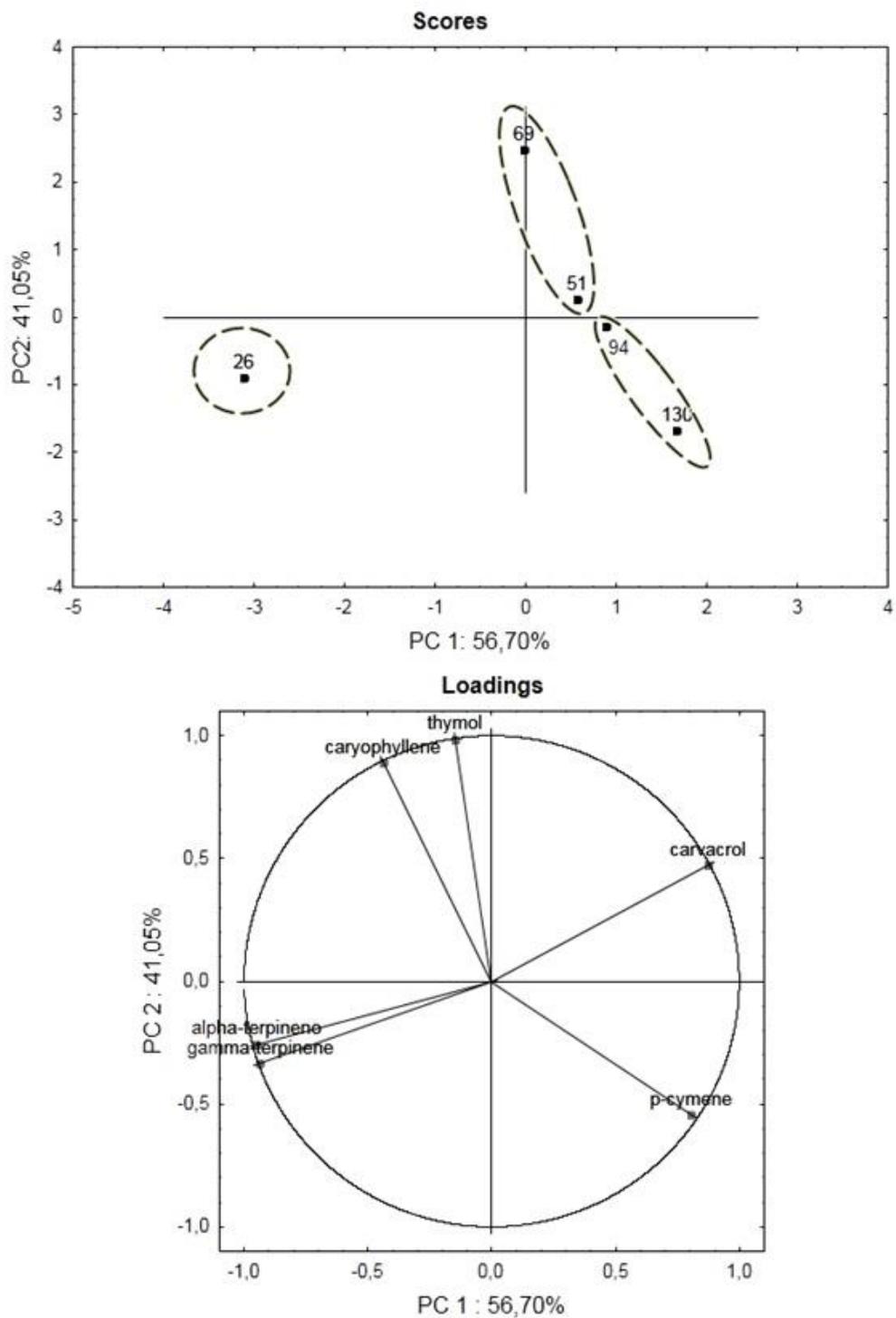
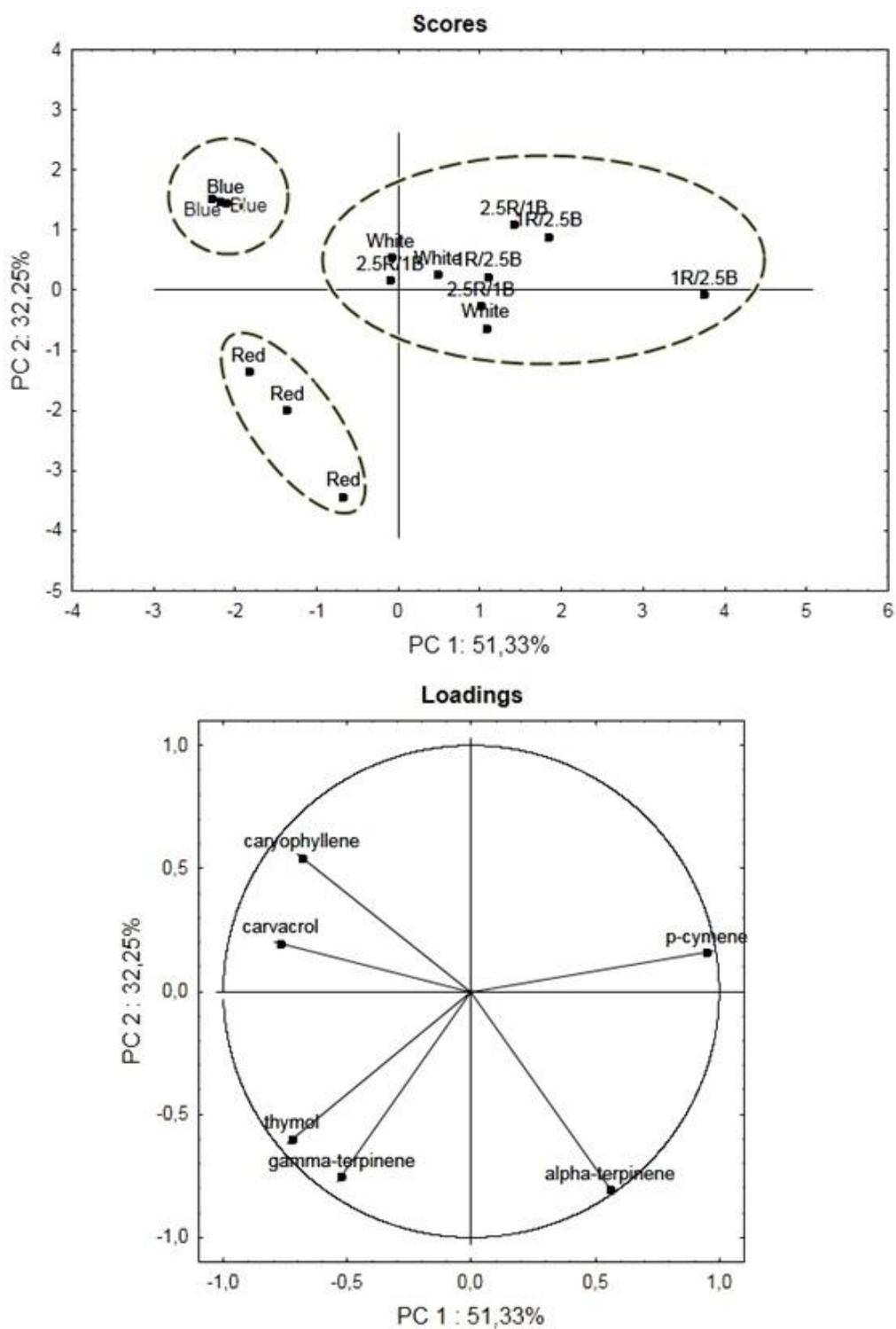


Fig. 6 Score and Loadings of the principal components analyses (PCA) on the matrix correlation built using data for six major compounds under LED color of *L. gracilis*.



The thymol was negatively correlated to ρ -cymene. This can be explained because these compounds are mediated by hydroxylation reaction (Rowshan et al, 2013). Global evaluation of the dates it is noteworthy that there is difference in total dry weight and compounds content when the plants cultured under the intensity and color light.

4 CONCLUSIONS

The light is critical for the *in vitro* culture of *L. gracilis*, since it affects the growth and production of volatile compounds. In general, apical explants were superior for all evaluated growth parameters and photosynthetic pigments. Red light and intensity $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ were better for *in vitro* growth of *L. gracilis*. The light intensities 51 and $94 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and blue light spectrum promoted greater accumulations of photosynthetic pigments in *L. gracilis*. It was found that different light conditions changed the profile of volatile constituents, both quantitatively and qualitatively. The light intensity 94 and $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ were best for growth and the blue light spectrum carvacrol production.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and the Minas Gerais State Research Foundation (FAPEMIG - Fundação de Pesquisa do Estado de Minas Gerais) for the financial support (scholarships and research grants).

REFERENCES

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**, 4th ed. Allured 324 Publishing Corporation, Carol Stream, 804p., 2007.
- ALBUQUERQUE, C.C; CAMARA, T.R.; MARIANO, R.L.R; WILLADINO, L.; MARCELINO JUNIOR, C.; ULISSES, C. Antimicrobial Action of the Essential Oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Brazilian archives of biology and technology**, v.49, n.4, p.527-535, 2006.doi: 10.1590/S1516-89132006000500001
- ALVARENGA, I.C.A.; PACHECO, F.V.; SILVA, S.T.; BERTOLUCCI, S.K.V.; PINTO, J.E.B.P. *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, v. 122, p. 299-308. 2015.doi:10.1007/s11240-015-0766-7
- ANDRADE, H.B; BRAGA, A.F.; BERTOLUCCI, S.K.V.; HSIE, B.S.;SILVA, S.T.; PINTO, J.E.B.P. Effect of plant growth regulators, light intensity and LED on growth and volatile compound of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit *in vitro* plantlets. **ActaHortic.** v.1155, p. 277-284, 2017. doi:10.17660/actahortic.2017.1155.40
- BELLO, J.J.B.; ESTRADA, E.M.; VELAZQUEZ, J.H.C.; RAMOS, V.M. Effect of LED light quality on *in vitro* shoot proliferation and growth of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). **Afr. J. Biotechnol.**, Vol., 15, n. 8, p. 272-277, 2016.doi: 10.5897/AJB2015.14662
- BUAH, J.N. *In vitro* Growth of Dwarf Cavendish Banana Plantlets in Different Culture Vessels and Light Intensities. **Int. J. Agric. Res.**, v. 11, n.1, p. 23-31, 2016.doi: 10.3923/ijar.2016.23.31
- CABELLO, M.L.R.; PRAENA, D.G.; PUERTO, M.; PICHARDO, S.; JOS, A.; CARMEÁN, A.M. *In vitro* pro-oxidant/antioxidant role of carvacrol, thymol and their mixture 337 in the intestinal Caco-2 cell line. **Toxicology in vitro**, v.29, n. 4, p. 647-656, 2015.doi:10.1016/j.tiv.2015.02.006
- CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnol.Lett.**,v. 32, n. 9, p. 1199–1205, 2010.doi: 10.1007/s10529-010-0290-0
- CHEYNIER, V.; COMTE, G.; DAVIES, K.M.; LATTANZIO, V.; MARTENS, S. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant PhysiolBiochem.**, v. 72, p. 1–20, 2013.doi:10.1016/j.plaphy.2013.05.009
- CHUNG, J.P.; HUANG, C.Y.; DAI, T.E. Spectral effects on embryogenesis and plantlet growth of *Oncidium* ‘Gower Ramsey’. **Scientia Horticulturae**, v. 124,p. 511–516, 2010.doi: 10.1016/j.scienta.2010.01.028

CROCOLL, C.; ASBACH, J.; NOVAK, J.; GERSHENZON, J.; DEGENHARDT, J. Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. **Plant Molecular Biology**.73:587-603, 2010.

CROCOLL, C. Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme. Dissertation. Friedrich-Schiller-Universität, Jena. 2011

CRUZ, E.M.O.; COSTA-JUNIOR, L.M.; PINTO, J.A.O.; SANTOS, D.A.; ARAUJO, S.A.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; BACCI, L.; ALVES, P.B.; CAVALCANTI, S.C.H.; BLANK, A.F. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 195, n. 1-2, p.198– 202, 2013.doi: 10.1016/j.vetpar.2012.12.046

DONG, C.; FU, Y.; LIU, G.; LIU, H. Growth, photosynthetic characteristics, antioxidant capacity and biomass yield and quality of wheat (*Triticum aestivum*L.) exposed to LED light sources with different spectra combinations. **J. Agro. Crop.Sci.** v. 200, p. 219-230, 2014.doi:10.1111/jac.12059

DOOL, H.V.; KRATZ, P.D. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-352 liquid partition chromatography. **J Chromatogr** v.11, p. 463-467, 1963. doi:10.1016/ S0021-9673(01)80947-X

ENGEL, V.L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofilas nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasilia, v.3, n.1, p.39-45,1991.

FERNANDES, V.F.; ALMEIDA, L.B.;FEIJO, E.V.R.S.; SILVA D.C.;OLIVEIRA, R.A.; MIELKE, M.S.; COSTA, L.C.B. Light intensity on growth, leaf micromorphology and essential oil production of *Ocimum gratissimum*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 23, n. 3, p. 419–424, 2013. doi:10.1590/S0102-695X2013005000041

FERRAZ, R.P.C.; BOMFIM, D.S.; CARVALHO, N.C.; SOARES, M.B.P.; DA SILVA, T.B.; MACHADO, W.J.; PRATA, A.P.N.; COSTA, E.V.; MORAES, V.R.S.; NOGUEIRA, P.C.L.; BEZERRA, D.P. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). **Phytomedicine**, v. 20, p. 615– 621, 2013.doi:10.1016/j.phymed.2013.01.015

FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciencia e Agrotecnologia (UFPA)**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

GOMES, S.V.F.; NOGUEIRA, P.C.L.; MORAES, V.R.S. Aspecto químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Ecletica química**, v. 36, n.1, p. 64-77, 2011.doi: 10.1590/S0100-46702011000100005

GUPTA, S.D.; JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) *in vitro* plant growth and morphogenesis. **Plant.Biotechnol.Rep.**, v.7, p. 211–220, 2013.doi: 10.1007/s11816-013-0277-0

HARTIKAINEN,K.; NERG,A.M.; KIVIMÄENPÄÄ, M.; SOPPELA, S.; MÄENPÄÄ, M.; OKSANEN, E.;ROUSI,M.; HOLOPAINEN, T. Emission of volatile organic compounds and leaf structural characteristics of European aspen (*Populus tremula*) grown under elevated ozone and temperature. **Tree Physiol.**, vol. 29, p. 1163–1173, 2009.doi:10.1093/treephys/tpp033

HEO, J.W.; LEE, C.W.; PAEK, K.Y. Influence of mixed LED radiation on the growth of annual plants. **J Plant Biol.**, v. 49, p. 286–290, 2006.doi: 10.1007/BF03031157

HOLOPAINEN, J.K. Can forest trees compensate for stress-generated growth losses by induced production of volatile compounds? **Tree Physiol.**, vol. 31, p. 1356–1377, 2011.doi:10.1093/treephys/tpr111

HUNG, C.D.; HONG, C.H.; KIM, S.K.; LEE, K.H.; PARK, J.Y.; NAM, M.W.; CHOI, D.H.; LEE, H.I. LED light for *in vitro* and ex vitro efficient growth of economically important highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). **Acta Physiol. Plant**, v.38, p. 152, 2016. doi:10.1007/s11738-016-2164-0

JENSEN, K.; JENSEN, P. E.; MØLLER, B. L. (2011). Light-driven cytochrome p450 hydroxylations. **ACS chemical biology**, v.6, n.6, p. 533-539, 2011. doi: 10.1021/cb100393j

JEONG, B.R.; SIVANESAN, I. Direct adventitious shoot regeneration, *in vitro* flowering, fruiting, secondary metabolite content and antioxidant activity of *Scrophularia takesimensis* Nakai. **Plant Cell Tiss Organ Cult.**, v. 123, p. 607–618, 2015.doi: 10.1007/s11240-015-0864-6

JO, A.; TEWARI, R.K.; HAHN, J.; PAEK, K.Y. Effect of photoperiod and light intensity on *in vitro* propagation of *Alocasia amazonica*. **PlantBiotechnol Rep.**, v. 2, p. 207–212, 2008.doi:10.1007/s11816-008-0063-6

KERBAUY, G. B.; CHAER, L. Micropropagação comercial de orquídeas conquistadas, desafios e perspectivas. In: GERALD, L. T. S. (Orgs.). **Biofábrica de plantas: produção industrial de plantas *in vitro***. 1. ed. São Paulo: Antiqua. p. 177-205. 2011.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: RIMA Artes e Textos, 531 p., 2006.

LEE, S.H.; TEWARI, R.K.; HAHN E.K.; PAEK, K.Y. Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania somnifera* (L.) Dunal.plantlets. **Plant Cell Tiss Organ Cult.**v.90, n. 2, p. 141–151, 2007.doi: 10.1007/s11240-006-9191-2

LI, H.; TANG, C.; XU, Z. The effects of different light qualities on rapessed (*Brassica napus* L.) plant growth and morphogenesis *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v. 150, p. 117–124, 2013. doi:10.1016/j.scienta.2012.10.009

LICHTENTHALER, H.K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS 393 spectroscopy. In: Wrolstad RE (ed) **Current protocols in food analytical chemistry**. Wiley, New York. 394 p., 2001. doi: 10.1002/0471142913.faf0403s01

LIM, Y.J.; EOM, S.H. Effects of different light types on root formation of *Ocimum basilicum* L. cuttings. **Scientia Horticulturae**, v. 164, p. 552–555, 2013. doi: 10.1016/j.scienta.2013.09.057

LIMA-BRITO, A.; ALBUQUERQUE, M.M.S.; RESENDE, S.V.; CARNEIRO, C.E.; SANTANA, J.R.F. Rustificação *in vitro* em diferentes ambientes e aclimatização de microplantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *Mucugensis*. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 47, n. 1, p. 152-161, 2016. doi: 10.5935/1806-6690.20160018

LIU, M.; XU, Z.; GUO, S.; TANG, C.; LIU, X.; JAO, X. Evaluation of leaf morphology, structure and biochemical substance of balloon flower (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) plantlets *in vitro* under different light spectra. **Scientia Horticulturae**, v.174, p. 112–118, 2014. doi: 10.1016/j.scienta.2014.05.006

LOPEZ, A.B.; PAZ, A.R.; TREJO, C.; RANGEL, E.E.; RODRIGUEZ, J.L.L. Improved *in vitro* rooting and acclimatization of *Capsicum chinense* Jacq. plantlets. **In vitro Cell.Dev.Biol.**, v.51.n.3, p. 274-283, 2015. doi: 10.1007/s11627-015-9671-3

LORENZI H; MATOS FJA. **Plantas Mediciniais do Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 512 p. 2002.

MANIVANNAN, A.; SOUNDARARAJAN, P.; HALIMAH. N. KO, C.H.; JEONG, B.R. Blue LED light enhances growth, phytochemical contents, and 401 antioxidant enzyme activities of *Rehmannia glutinosa* cultured *in vitro*. **Hort. Environ. Biotechnol.**, v. 56, p 105-113, 2015. doi: 10.1007/s13580-015-0114-1

MENDES, S.S.; BOMFIM, R.R.; JESUS, H.C.R. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v.129, p. 391–397. 2010. doi: 10.1016/j.jep.2010.04.005

MIGUEL, C.; MARUM, L. An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. **Journal of experimental botany**, v.62, p. 3713-3725, 2011. doi:10.1093/jxb/err155

MORAES-NETO, S. P.; GONÇALVES, J. L. M.; MASSANORI, T.; CENCI, S.; GONÇALVES, C. **Crescimento de mudas de algumas espécies arbóreas que ocorrem na Mata Atlântica, em função do nível de luminosidade**. Revista Árvore, Viçosa-MG, n. 24 p. 35-45, 2000.

MUNEER, S., KIM, E. J., PARK, J. S.; LEE, J. H. Influence of Green, Red and Blue Light Emitting Diodes on Multiprotein Complex Proteins and Photosynthetic Activity under Different Light Intensities in Lettuce Leaves (*Lactuca sativa* L.). **International journal of molecular sciences**,v.15, p. 4657-4670, 2014.doi:10.3390/ijms15034657

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant**,v. 15, p. 473-497, 1962.doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

NETO, R.M.; MATOS, F.J.A.; ANDRADE, V.S.; DE MELO, M.C.N.; CARVALHO, C.B.M.; GUIMARÃES, S.B.; PESSOA, O.D.L.; SILVA, S.L.; SILVA, S.F.R.; VASCONCELOS, P.R.L. The essential oil from *Lippia gracilis* Schauer, Verbenaceae, in diabetic rats. **Rev. Bras. Farmacogn.** V. 20, n. 2, p. 261-266, 2010. doi: 10.1590/S0102-695X2010000200021

NIST National Institute of Standards and Technology—Chemistry Web Book <http://webbook.nist.gov/chemistry>. 412. (2008) Accessed 30 Sep 2016.

PARK, S.Y.; LEE, J.G.; CHO, H.S.; SEONG, E.S.; KIM, H.Y.; YU, C.Y.; KIM, J.K. Metabolite profiling approach for assessing the effects of colored light-emitting diode lighting on the adventitious roots of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Mayer). **Plant Omics J**,v. 6, p. 224–230, 2013.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ-MATA, VILLAR. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**,v. 76, p. 201-214, 2001.doi: 10.1016/S0378-8741(01)00234-3

PEÑA-RAMÍREZ, Y.; JUÁREZ-GÓMEZ, J.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, J.A.; ROBERT, M.L.. Tissue culture methods for the clonal propagation and genetic improvement of Spanish redcedar (*Cedrela odorata*). **Plant cell culture protocols**, v. 877,p. 129–141, 2012. doi: 10.1007/978-1-61779-818-4_10

PONCETTA, P.; IORATTI, D.; MIGNANI,I.;GIONGO L. *In vitro* propagation of red raspberry under light-emitting diodes (LEDs). *Acta Horti*.v.1155, p. 369-374, 2017. doi:10.17660/ActaHortic.2017.1155.54

POUDEL, P.R.; KATAOKA, I.; MOCHIOKA, R. Effect of red and blue light emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. **Plant Cell Tiss Organ Cult.**, v. 92, p. 147–153, 2008. doi: 10.1007/s11240-007-9317-1

POULOSE, A.J.; CROTEAU, R. Biosynthesis of aromatic monoterpenes: conversion of γ -terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. **Archives of Biochemistry and Biophysics**.187:307-314. 1978 doi: 10.1016/0003-9861(78)90039-5

QIAN, H.; LIU, T.; DENG, M.; MIAO, H.; CAI, C.; SHEN, W.; WANG, Q. Effects of light quality on main health-promoting compounds and antioxidant capacity of Chinese

kale sprouts. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1232–1238, 2016. doi:10.1016/j.foodchem.2015.10.055

REDDY, N.S.; NAVANESAN, S.; SINNIHAH, S.K.; WAHAB, N.A.; SIM, K.S. Phenolic content, antioxidant effect and cytotoxic activity of *Leea indica* leaves. **BMC Comp. Alter. Med.**, v. 12, p. 128-134, 2012. doi: 10.1186/1472-6882-12-128

REN, J.; GUO, S.; XU, C.; YANG, C., AI, W.; TANG, Y.; QIN, L. Effects of different carbon dioxide and LED lighting levels on the anti-oxidative capabilities of *Gynura bicolor* DC. **Adv. Space Res.**, v. 53, n. 2, p. 353–366, 2014. doi:10.1016/j.asr.2013.11.019

ROWSHAN, V.; BAHMANZADEGAN, A.; SAHARKHIZ, M. J. Influence of storage conditions on the essential oil composition of *Thymus daenensis* Celak. **Industrial Crops and Products**, London, v. 49, p. 97-101, Aug. 2013. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.04.029

SAEZ, P.L.; BRAVO, L.; LATSAGUE, M.I.; TONEATTI, M.J.; SANCHEZ-OLATE, M.; RIOS, D.G. Light energy management in micropropagated plants of *Castanea sativa*, effects of photoinhibition. **Plant Sci.**, v. 201-202, p. 12–24, 2013. doi:10.1016/j.plantsci.2012.11.008

SANTOS, C.P; PINTO, J.A.O.; SANTOS, C.A.; CRUZ, E.M.O.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; ANDRADE, T.M.; SANTOS, D.A.; ALVES, P. B.; BLANK, A.F. Harvest time and geographical origin affect the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Industrial Crops and Products**, v. 79, p. 205–210, 2016. doi:10.1016/j.indcrop.2015.11.015

SHARMA, S.; SHAHZAD, S.; SILVA, J.A.T. Synseed technology - A complete synthesis. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 2, p. 186-207, 2013. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.09.007

SILVA, S. T., BERTOLUCCI, S. K. V., DA CUNHA, S. H. B., LAZZARINI, L. E. S., TAVARES, M. C., PINTO, J. E. B. P. Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 1-10, 2017. doi: 10.1007/s11240-017-1195-6

STEFANAKI, A.; COOK, C.M.; LANARAS, T.; KOKKINI, S. The Oregano plants of Chios Island (Greece): Essential oils of *Origanum onites* L. growing wild in different habitats. **Industrial Crops and Products**.82:107-113. 2016. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.11.086

SZEWCZYK-TARANEK, B.; PAWLOWSKA, B.; PROKOPIUK, B.; ZUPNIK, M. Effectiveness of LED and fluorescent light on *in vitro* shoot proliferation of *Staphylea pinnata*. **Acta Hort.** v.1155, p. 375-380, 2017. doi:10.17660/ActaHortic.2017.1155.55

SZOPA, A.; EKIERT, H.; SZEWCZYK, A.; FUGAS, E. Production of bioactive phenolic acids and furanocoumarins in *in vitro* cultures of *Ruta graveolens* L. and *Ruta graveolens* ssp. *divaricata* (Tenore) Gams. under different light conditions. **Plant Cell Tiss Organ Cult.**v.110, n.3, p. 329–336, 2012.doi: 10.1007/s11240-012-0154-5

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 5th edn.Artmed Editora, Porto Alegre. 2013.

TROUWBORST, G.; HOGEWONING, S.W.; KOOTEN, O.V.; HARBINSON, J. Plasticity of photosynthesis after the “red light syndrome” in cucumber. **Environmental and Experimental Botany**, v. 121,p. 75–82, 2016.doi: 10.1016/j.envexpbot.2015.05.002

TSUNOYAMA, Y. MORIKAWA, K.; SHIINA, T.; TOYOSHIMA, Y. Blue light specific and differential expression of a plastid σ factor, Sig5 in *Arabidopsis thaliana*, **FEBSLetters**, v.516, p.225-228, 2002.doi: 10.1016/S0014-5793(02)02538-3

US-CAMAS, R., RIVERA-SOLÍS, G., DUARTE-AKÉ, F. & DE-LA-PEÑA, C. *in vitro* culture: an epigenetic challenge for plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**,v. 118, p. 187-201, 2014.doi: 10.1007/s11240-014-0482-8

WATHELEY, F.H.; WHATLEY, F.R. **A luz e a vida das plantas: temas de biologia**. São Paulo: EDUSP, v. 30, 101p, 1982.

YAMAZAKI, J.Y. Is light quality involved in the regulation of the photosynthetic apparatus in attached rice leaves? **Photosynth.Res.**, v. 105, n. 1, p. 63-71, 2010.doi: 10.1007/s11120-010-9567-3

ZHANG, M.; ZHAO, D.; MA, Z.; LI, X.; XIAO, Y. Growth and photosynthetic capability of *Momordica grosvenori* plantlets grown photoautotrophically in response to light intensity. **Hortscience**,v. 44, n.3, p. 757–763, 2009.

CAPÍTULO 4 SISTEMAS DE VENTILACAO NATURAL AFETAM O CRESCIMENTO E ANÁLISE DA FRAÇÃO VOLÁTIL DE *Lippia gracilis* CULTIVADAS *in vitro*

RESUMO

Objetivou-se avaliar diferentes sistemas de ventilação natural e tipo de explante no crescimento e produção de compostos voláteis de *L. gracilis in vitro*. Os tratamentos consistiram de 4 sistemas de membranas (sem membrana, 1, 2 e 4 membranas porosas) e dois tipos de explantes (segmentos nodais com e sem par de folhas). A avaliação dos parâmetros de crescimento e retirada de amostras para determinação dos teores de pigmentos fotossintéticos e análise química da fração volátil foram realizados aos 35 dias de cultivo em meio ½ MS. Os sistemas de ventilação natural influenciaram significativamente o crescimento *in vitro* de *L. gracilis*. Propágulos oriundos de explantes com um par de folhas obtiveram as melhores respostas experimentais. O sistema de ventilação natural com quatro membranas proporcionou os melhores parâmetros de crescimento para *L. gracilis* nos explantes com folhas. Já para os explantes sem folhas, as melhores respostas de crescimento ocorreram com o uso de uma membrana porosa. Observou-se variação nos dados de área foliar somente nos explantes sem folhas que de maneira geral foram superiores aos com folhas. Houve redução dos pigmentos fotossintéticos com o aumento do número de membranas porosas no frasco de cultivo. Observou-se também variação do número, conteúdo e perfil dos compostos voláteis sob influência dos sistemas de ventilação natural. Foram identificados os constituintes majoritários *p*-cimeno, γ -terpineno, timol, carvacrol e *E*-cariofileno, independente das condições experimentais. O maior teor de carvacrol foi observado em propágulos cultivados com quatro membranas porosas. Para o cultivo *in vitro* de *Lippia gracilis*, recomenda-se utilizar explantes com um par de folhas e quatro membranas porosas para crescimento e desenvolvimento satisfatório da espécie.

Palavras-chaves: Sistemas Alternativos de Membranas. Trocas Gasosas. Alecrim de Tabuleiro. Micropropagação.

CHAPTER 4 NATURAL VENTILATION SYSTEMS AFFECT THE GROWTH AND ANALYSIS OF VOLATILE FRACTION OF *Lippia gracilis* CULTIVATED *in vitro*

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate different natural ventilation systems and explant type on the growth and production of *L. gracilis* volatile compounds *in vitro*. The treatments consisted of 4 membrane systems (membraneless, 1, 2, and 4 porous membranes) and two types of explants (nodal segments with and without pair of leaves). The evaluation of the parameters of growth, withdraw of samples for determination of the photosynthetic pigment contents, and chemical analysis of the volatile fraction were carried out at 35 days of culture in ½ MS culture medium. Natural ventilation systems significantly influenced the *in vitro* growth of *L. gracilis*. Propagules from explants with a pair of leaves had the best experimental responses. The four-membrane natural ventilation system provided the best growth parameters for *L. gracilis* in explants with leaves. For leafless explants, the best growth responses occurred with the use of one porous membrane. Variation in leaf area data was observed only in leafless explants, which were generally superior to the explants with leaves. There was a reduction of the photosynthetic pigments with the increase of porous membranes number on the culture flask. Variation in the number, content, and profile of volatile compounds was also observed under the influence of natural ventilation systems. The major constituents identified were ρ -cimene, γ -terpinene, thymol, carvacrol, and E-caryophyllene, independent of the experimental conditions. The highest carvacrol content was observed in propagules cultured in four porous membranes flasks. For the *in vitro* culture of *Lippia gracilis*, it is recommended to use explants with one pair of leaves and four porous membranes for satisfactory growth and development of the species.

Keywords: Alternative systems of Membranes. Gas Exchange. Alecrim de Tabuleiro. Micropropagation.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Lippia* (Verbenaceae) compreende um grande número de espécies de importância medicinal e econômica. De maneira geral o gênero apresenta perfil de composição química consistente, atividades farmacológicas e uso popular através da medicina tradicional (TREVISAN et al., 2016). A *Lippia gracilis* Schauer é uma espécie aromática arbustiva, altamente ramificado, endêmica do nordeste do Brasil, comumente encontrada nos estados da Bahia, Sergipe e PiauÍ, e popularmente conhecida como alecrim da chapada ou alecrim de tabuleiro (LORENZI; MATOS, 2002). A espécie tem sido utilizada para muitos propósitos medicinais nessas regiões, como por exemplo, para tratamento de doenças cutâneas, queimadura, feridas, ulcera gripe, doenças respiratórias, congestão nasal, dentre outras. O óleo essencial dessa espécie tem demonstrado ação antimicrobiana, inseticida, acaricida, antiinflamatória e atividade citotóxica, principalmente devido aos altos teores dos monoterpenos timol e carvacrol (DOS SANTOS et al., 2016).

Vários programas de micropropagação e melhoramento genético de plantas possuem como base técnicas de cultura de tecidos, que apresentam um papel importante na obtenção de material vegetal de qualidade para a indústria farmacêutica e química (MIGUEL; MARUM, 2011; PEÑA-RAMÍREZ et al., 2012). Porém no cultivo *in vitro*, existem vários fatores que podem interferir no desenvolvimento vegetal, como por exemplo, componentes do meio de cultura, adição exógena de reguladores de crescimento, umidade no interior do recipiente de cultivo, e condições de luz nas salas de crescimento (US-CAMAS et al., 2014). A habilidade de regeneração da planta, por meio da cultura de tecidos, é conhecida há varias décadas, entretanto o problema de como essa diferenciação acontece e as mudanças anatômicas e fisiológicas no processo de regeneração e como essas alterações influenciam na transferência as condições de campo, ainda são objetos de estudo (ISAH, 2015). Plantas cultivadas *in vitro* são heterotróficas, pois dependem do açúcar presente no meio de cultivo e do CO₂ dentro do frasco e em virtude disso geralmente apresentam anomalias, como inabilidade fotossintética, baixo teor de clorofila, mau funcionamento da abertura estomática, ausência de cutícula nas folhas, parênquima anormal das folhas e do xilema, baixas trocas gasosas, redução da concentração de CO₂, alta umidade e acumulação de etileno e para solucionar esses entraves no cultivo *in vitro* tradicional, sistemas fotoautotróficos e fotomixotróficos são propostos (VAHDATI; HASSANKHAH, 2014; CHEN, 2015).

O uso de diferentes tipos de membranas porosas, nos recipientes de cultivo *in vitro*, e que permitem maiores trocas gasosas, pode aumentar o crescimento dos explantes, além de permitir um sistema de propagação autotrófico. A modificação do microambiente, por meio das trocas gasosas permite manter as concentrações de CO₂ adequadas para estimular a fotossíntese e promovem a redução da concentração de etileno e umidade relativa no frasco de cultivo (SALDANHA et al., 2012). Sistemas mixotróficos *in vitro* são induzidos por membranas porosas, que permitem as trocas gasosas, e também pela redução do carboidrato exógeno no meio de cultivo. Além das vantagens já citadas, a redução do açúcar no meio de cultivo, previne também o rápido crescimento de microrganismos, reduz custos e aumenta as taxas de sobrevivência durante a aclimatização (IAREMA et al., 2012).

Existem vários relatos que demonstram que a modificação do microambiente, denominado sistemas mixotróficos que utilizam o CO₂ como fonte de carbono em vez do açúcar foi implementado com sucesso para várias espécies. *Plectranthus amboinicus* apresentou melhores respostas de crescimento e teor de carvacrol com o aumento das trocas gasosas no ambiente de cultivo, por meio das membranas porosas (SILVA et al., 2017). Plântulas de *Cattleya walkeriana* cultivadas em sistemas mixotróficos apresentaram maior espessura do mesófilo foliar e maior crescimento das plantas (da Silva et al., 2014). Em *Pfaffia glomerata* cultivada em sistemas que proporcionaram maiores trocas gasosas, ocorreu melhor crescimento das plântulas e maiores teores de pigmentos fotossintéticos em comparação com sistemas de cultivo *in vitro* convencionais (SALDANHA et al., 2012). Assim objetivou-se avaliar o crescimento, área foliar, teor de pigmentos fotossintetizantes e a análise da fração volátil de plântulas de *Lippia gracilis* cultivadas *in vitro* sob sistemas mixotróficos.

2 MATERIAIS E METODOS

2.1 Estabelecimento *in vitro* do material vegetal

Foram utilizados como explante segmentos apicais e nodais (± 5 cm) de *L. gracilis* cultivadas em casa de vegetação, que foram esterilizados com água corrente por 30 minutos e imersos em solução de hipoclorito de sódio (1,25% de cloro ativo), sob agitação constante por 15 minutos. Em câmara de fluxo laminar asséptico os explantes (± 1 cm) foram inoculados em tubos de ensaio (150 x 25 mm), contendo 15 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração dos sais.

Após a inoculação os tubos foram mantidos em sala de crescimento, sob lâmpadas brancas frias fluorescentes (OSRAM[®], Brazil) com intensidade de $39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 h de luz e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. O material vegetal foi herborizado e a exsicata encontra-se depositada no herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (PAMG/EPAMIG), sob registro PAMG 57859.

2.2 Sistemas alternativos de membranas

As plântulas estabelecidas, foram multiplicadas em frascos contendo 40 mL do meio MS com metade da concentração dos sais e mantidas sob as mesmas condições até obtenção de material vegetal suficiente para realizar o experimento. Segmentos nodais (± 1 cm), com e sem par de folhas foram cultivados *in vitro* em diferentes sistemas de ventilação natural (SVN). Para isto, os explantes foram excisados de plântulas cultivadas *in vitro* e inoculadas sob fluxo laminar asséptico, em frascos de 200 mL, contendo 40 mL de meio de cultura MS com metade da concentração de sais e suplementado com 15 g L^{-1} de sacarose, 6 g L^{-1} de Agar (Himedia[®], tipo I), e pH $5,7 \pm 0,1$. Os frascos com os meios de cultivo foram autoclavados a 125°C por 25 min a 1,2 atm. O experimento foi conduzido sob um fotoperíodo de 16 h de luz e $25 \pm 1^\circ \text{C}$. Após a inoculação, os tubos foram colocados em sala de crescimento com lâmpadas brancas frias fluorescentes (OSRAM[®], Brazil) e intensidade de $39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 h e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, onde os tratamentos consistiram nos sistemas de ventilação natural (SVN) e presença ou ausência do par de folhas nos explantes, composto por quatro tratamentos com seis repetições e dois frascos por repetição: sem membrana (SM), uma membrana (SVN1), duas membranas (SVN2) e quatro membranas (SVN4) e dois tipos de explantes. As membranas, de politetrafluoroetileno, foram utilizadas nas tampas dos frascos, e permitiam a ventilação natural, além de funcionarem como filtros, e confeccionadas de acordo com Saldanha et al. (2012), e colocadas nas tampas dos frascos.

As plântulas foram avaliadas quanto ao comprimento da parte aérea e comprimento da maior raiz (cm); número de brotações, folhas e raízes; matéria seca de folhas, caules e raízes (mg); área foliar (cm^2), teores de pigmentos fotossintetizantes e análise química da fração volátil das folhas aos 35 dias de cultivo. A área foliar foi medida no software WinFOLIA utilizando um escaner EPSON PERFECTION V700

PHOTO a partir de todas as folhas presentes nas seis plântulas avaliadas, representando cada tratamento.

Os pigmentos fotossintéticos analisados foram clorofila a, b, clorofila total (a+b) e carotenóides. A extração e quantificação dos pigmentos foram realizados em sala escura, segundo a metodologia de Lichtenthaler e Buschmann (2001), a partir de 150 mg de matéria fresca foliar que foram homogeneizadas em 3 mL de acetona a 80%, seguidos por leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 663,2; 646,2 e 470 nm. Folhas de três plântulas foram analisadas em cada tratamento e analisadas em triplicatas.

2.3 Análise estatística

Os dados obtidos, para os parâmetros de crescimento, foram submetidos à ANAVA pelo teste F ($p < 0,05$), utilizando-se o software Statistica[®], versão 12 (trial version, StatSoft). Após verificada a significância das variáveis pelo teste F, as médias de crescimento foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade e os dados de pigmentos fotossintéticos e área foliar foram comparadas pelo teste de Scott - Knot a 5% de probabilidade.

2.4 Análise química por headspace CG/EM

Amostras de folhas de *L. gracilis* foram coletadas de plântulas aos 35 dias de cultivo *in vitro*. O material vegetal foi seco em estufa de circulação forçada de ar a 40°C por 72h e 100 mg de folhas secas foram acondicionadas em *vials* para *headspace* de 20 mL, vedados com septo de silicone/PTFE.

Para extração da fração volátil de *L. gracilis* empregou-se a técnica de *headspace* estático, utilizando-se um extrator/amostrador *headspace* automático CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland) acoplado ao sistema de CG/EM. As condições operacionais foram: temperatura de incubação da amostra de 110 °C durante 30 minutos, temperatura da seringa a 120 °C e, 500 µL da fase de vapor foram injetados no sistema cromatográfico.

As análises químicas foram realizadas em um sistema de cromatografia em fase gasosa Agilent[®] 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilente[®] MSD 5975C (Agilente Technologies, California, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo

de aquisição de massas de 40-400 m/z. Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m. de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme)(California, EUA). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min. As temperaturas do injetor e a linha de transferência para o MS foram mantidas em 240 °C. A temperatura inicial do forno foi de 50 °C, seguido por uma rampa de temperatura de 3°C/min até 240 °C e, finalizado com uma rampa de 10 °C/min até 280 °C. A injeção foi realizada no modo *split* a uma razão de injeção de 1:50. As análises foram realizadas em triplicata, sendo as concentrações dos constituintes presentes expressas pela porcentagem de área relativa dos picos cromatográficos.

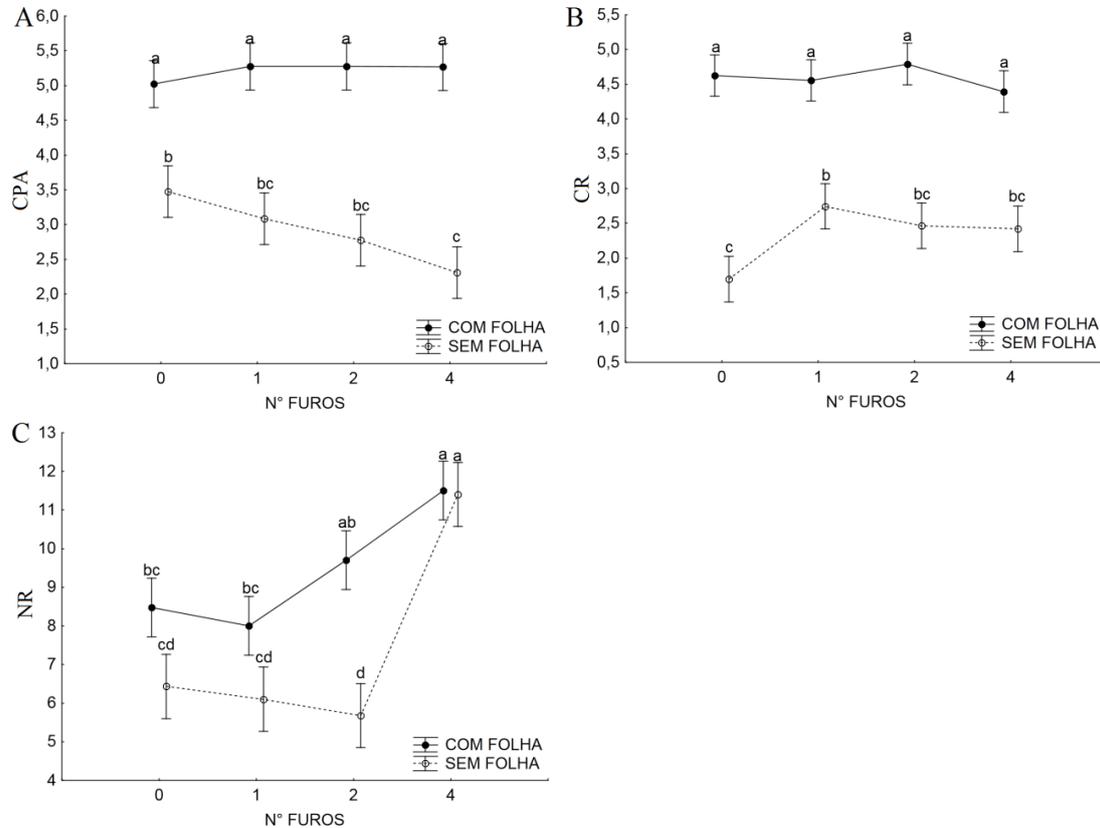
Os constituintes foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à co-injeção de uma solução padrão de n-alcenos (C8-C20, Sigma-Aldrich[®], St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca (NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007). O índice de retenção foi calculado usando a equação proposta por Van Den Dool e Kratz, (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção da literatura (ADAMS, 2007).

3 RESULTADOS E DISCUSSAO

3.1 Parâmetros de crescimento *in vitro*

Foram observadas interações entre a presença ou ausência de folha no explante e os SVN (FIGURA 1). Com exceção dos parâmetros de área foliar, as plântulas oriundas de explantes com um par de folhas, apresentaram as melhores respostas biométricas (FIGURAS 1 e 2). No entanto independente das condições experimentais as plântulas de *L. gracilis* apresentaram-se vigorosas em todos os tratamentos (FIGURA 2). As plântulas obtidas dos explantes com folhas apresentaram as maiores médias para as variáveis de crescimento analisadas nos diferentes SVN. As plântulas cultivada sob diferentes SVN não apresentaram efeito no comprimento da parte aérea e da raiz, pois não foi observado diferença significativa entre os tratamentos quando se utilizou explantes com um par de folhas, apesar da tendência de crescimento nessa variável (FIGURA 1A e 1B). Já quando se utilizou o explante sem o par de folhas, houve um decréscimo no comprimento da parte aérea com o aumento do número de membranas (FIGURA 1A).

Figura 1- Crescimento *in vitro* de *Lippia gracilis* cultivada em meio MS durante 35 dias sob diferentes sistemas de ventilação natural (0: SM; 1: SVN1; 2: SVN2 e 4: SVN4). A: Comprimento da parte aérea (CPA); B: Comprimento da raiz (CR); C: Número de raiz (NR).

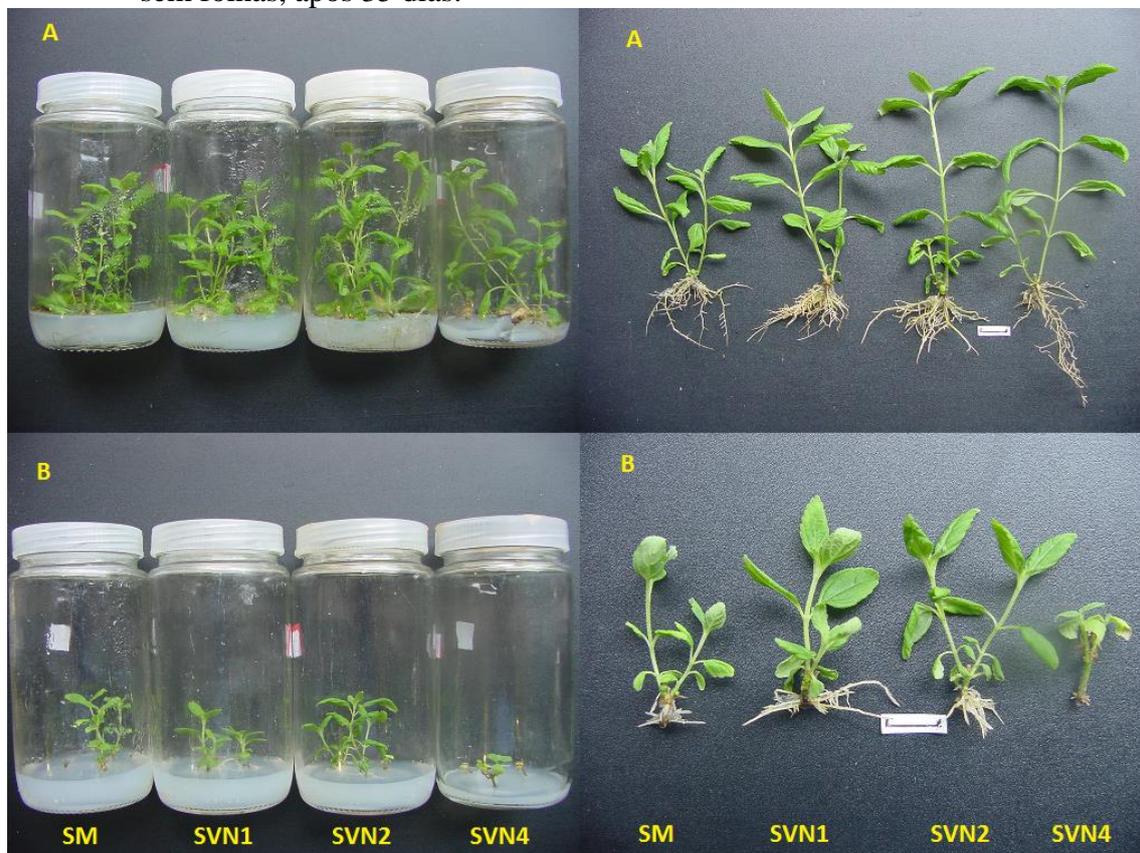


Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente no nível de 5% pelo teste Duncan. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: Do autor (2017).

O aumento das trocas gasosas no ambiente de cultivo promoveu aumento no número de raízes (FIGURA 1C) nos tratamentos, porém com comportamentos distintos para as duas condições do explante. Nos explantes com folhas observa-se uma tendência de crescimento nessa variável à medida que se aumenta o número de membranas porosas nas tampas, e naqueles explantes sem folhas houve uma queda nesse parâmetro, nos tratamentos de SM, SVN1 e SVN2 e um aumento drástico no SVN4. Na micropropagação, o melhor desenvolvimento das raízes das plântulas, como os observados nesse estudo para o SVN4, geralmente viabilizam a aclimatização, pois proporcionam melhor taxa de sobrevivência em campo (CHANDRA et al., 2010).

Figura 2-Plântulas de *Lippia gracilis* cultivadas *in vitro* sob diferentes sistemas de ventilação natural (SM: Sem membrana; SVN1: 1 membrana; SVN2: 2 membranas; SVN4: 4 Membranas, A- Explantes com folhas; B- explantes sem folhas, após 35 dias.

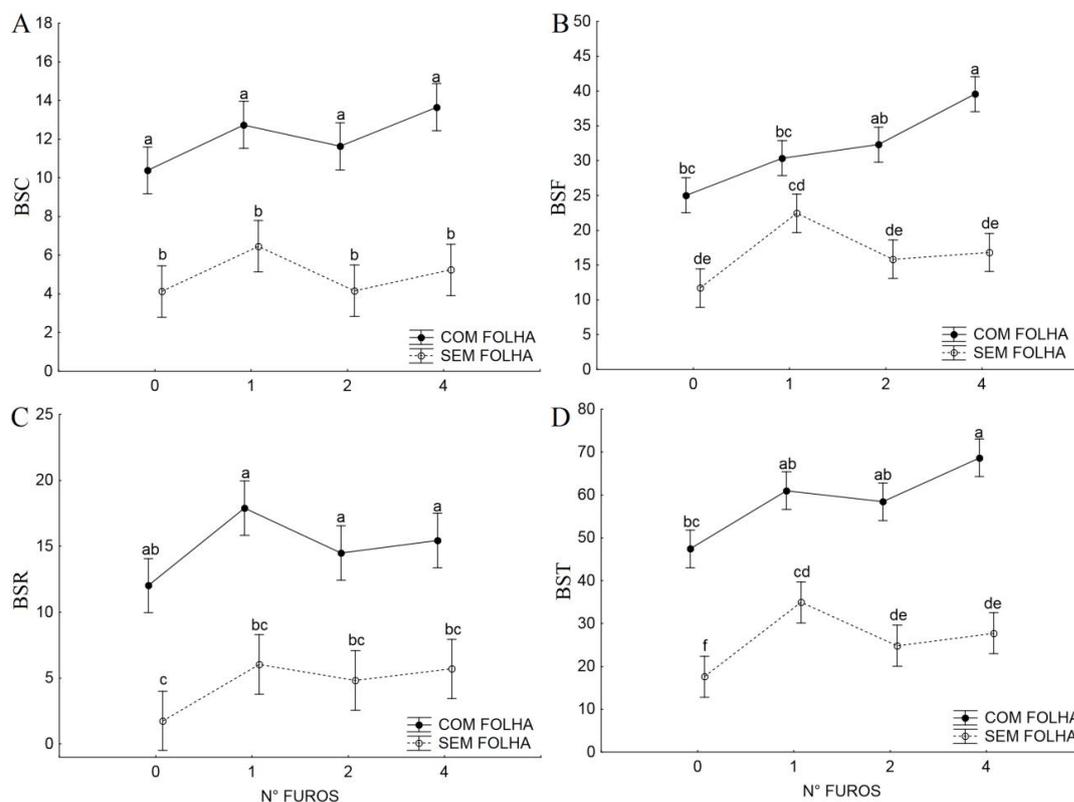


Fonte: Do autor (2017).

Essa melhora nos parâmetros de crescimento da planta com o aumento das trocas gasosas através das membranas porosas pode ser explicada pelo fato de que a utilização dessas membranas nas tampas dos frascos de cultivo aumenta a concentração de CO_2 dentro do frasco, e diminui a concentração de etileno e os níveis de umidade relativa, fatores que promovem o crescimento da plântula (ZOBAYED et al., 2002; XIAO et al., 2010). *Pfaffia glomerata* apresentaram melhores respostas de crescimento *in vitro*, quando houve aumento na concentração de CO_2 no meio de cultivo (SALDANHA et al., 2014). Cha-um et al. (2011) observaram melhores resultados para o comprimento e número de raízes em *Macadamia tetraphylla* quando cultivadas *in vitro* em ambiente enriquecido com CO_2 . Foram encontrados melhores respostas de crescimento para *Cattleya walkeriana* cultivadas *in vitro* sob sistemas de ventilação natural e 20g/L de sacarose, em relação ao método de cultivo convencional (SILVA et al., 2014).

De maneira geral, observou-se um comportamento similar para o acúmulo de biomassa seca para os dois tipos de explantes. No entanto, aquele com o par de folhas, como já discutido, apresentou melhores respostas (FIGURA 3). O SVN1 promoveu melhores resultados para a biomassa seca de folha e total em relação aos demais tratamentos nos explantes sem folhas (FIGURA 3B e 3D). Nessas mesmas condições o SM apresentou o pior valor para a matéria seca de raiz (FIGURA 3C), e não houve diferença significativa da matéria seca do caule (FIGURA 3A). Em relação aos explantes com folhas, observou-se aumento da matéria seca de folha e total à medida que se aumentou o número de membranas nos frascos, onde o SVN4 apresentou os melhores valores para essas variáveis (FIGURA 3B e 3D). Para a matéria seca de caule, apesar de haver crescimento, não foi observada diferença significativa. Observou-se superioridade para matéria seca de raízes quando se utilizou membranas porosas em relação ao tratamento controle, sem membranas (FIGURA 3A e 3C).

Figura 3-Acúmulo de biomassa em plântulas *in vitro* de *Lippia gracilis* cultivada em meio MS durante 35 dias sob diferentes sistemas de ventilação natural (0: SM; 1: SVN1; 2: SVN2 e 4: SVN4). A: Biomassa seca de caules (BSC); B: Biomassa seca de folhas (BSF); C: Biomassa seca de raízes (BSR); D: Biomassa seca total (BST).



Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente no nível de 5% pelo teste Duncan. As barras representam o erro padrão da média
Fonte: Do autor (2017).

Os maiores índices de matéria seca com o aumento do número de membranas nas tampas dos frascos, para aqueles explantes em que foram deixados um par de folhas, pode ser devido ao aumento da concentração de CO₂, que podem ter levado a um aumento da atividade fotossintética das plântulas sob essas condições, e pode se tornar ainda mais pronunciado com o crescimento a longo prazo (MOHAMED; ALSADON, 2010). Com o aumento do número de membranas porosas, ocorre uma maior evaporação de água dentro dos frasco provocando diminuição da umidade relativa e alterações das propriedades do meio de cultivo, sendo esse o motivo que pode ter levado a redução dos índices de crescimento nos explantes que não possuíam folhas. Na ausência de folhas, os explantes são totalmente dependentes das condições *in vitro* para iniciarem o desenvolvimento e emitirem o primeiro par de folhas, e assim começar a realizar fotossíntese e suprir suas necessidades se tornando mixotróficas. A perda de água dentro do frasco, à medida que se aumenta o número de membranas porosas, resulta em aumento da concentração dos agentes gelificantes, reduzindo assim a quantidade de água disponível para o explante, e também aumenta a concentração de solutos no meio de cultivo, que não somente reduzem o potencial osmótico do meio, como também podem se tornar tóxicos para os explantes (IVANOVA; IVAN STADEN, 2010).

Cattleya walkeriana apresentaram melhores resultados de matéria seca quando cultivadas em sistemas de ventilação natural contendo 10 e 22 g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura, em relação ao sistema convencional (SILVA et al., 2014). A utilização de duas membranas porosas foi benéfica para o cultivo *in vitro* de segmentos nodais de *Plectranthus amboinicus*, devido ao aumento da matéria seca das folhas sob essas condições (SILVA et al., 2017). Segmentos nodais de *Pfaffia glomerata* cultivadas *in vitro* aumentaram significativamente os índices de matéria seca da parte aérea, raiz e total quando houve aumento da concentração de CO₂ dentro do frasco de cultivo (SALDANHA et al., 2014).

3.2 Área foliar

Foi observado interação entre a presença ou ausência de folha no explante e os sistemas de ventilação natural para área foliar (TABELA 1). Pode-se observar que para área foliar total (AFT) a utilização de membranas porosas promoveu aumento para essa variável quando os explantes tinham um par de folhas. Já para os explantes sem o par de

folhas, o SVN4 provomeu os piores valores em relação aos demais que não diferiram estatisticamente. Quando se compara os tipos de explantes, observa-se superioridade dos explantes com folhas, em relação aos sem folhas nos tratamentos SVN1, SVN2 e SVN4.

Houve diferença entre os tipos de explantes somente quando cultivados nos tratamentos SM e SVN1 para área foliar específica (AFE) onde o tratamento SM foi superior nos explantes sem folhas e o SVN1 foi superior quando foi deixado um par de folhas no explante. De maneira geral os explantes sem folhas apresentaram-se superiores dos que os explantes com folhas para a razão de peso das folhas (RPF). A AFE é calculada pela razão entre a área foliar e a massa seca das folhas, refletindo assim a espessura das folhas. A RPF expressa a fração de massa seca não exportada das folhas para o resto das plantas (SILVA; DANTAS, 2014). Levando em conta que as folhas são o centro de produção de massa seca, através da fotossíntese, e que o resto da planta é dependente dessa produção, pelos resultados encontrados, essa superioridade desses parâmetros nos explantes sem folhas, já era esperado, já que os resultados de matéria seca nesses tratamentos foram inferiores aos dos tratamentos com folhas. Não houve diferença significativa entre os tipos de explantes na razão de área foliar (RAF).

Quando se refere às diferenças entre os tratamentos, observou-se que os explantes com um par de folhas, não diferiram significativamente, e os tratamentos sem folhas, apresentaram diferença significativa (TABELA 1). Observou-se que os tratamentos SM e SVN2 promoveram os melhores resultados para AFE. Não houve diferença para nenhuma das variáveis, sistemas de ventilação natural e tipo de explantes na RPF. Para a RAF os tratamentos SM e SVN2, nos explantes sem a presença de folhas, foram superiores aos demais.

Observa-se que o SVN1 apresentou o menor valor para a RAF e os maiores índices de matéria seca nos explantes sem folhas. Segundo Benincasa (2003) a área foliar é o componente morfológico e a matéria seca das folhas é o anatômico da (RAF) pois relaciona a superfície com o peso seco das folhas. Presume-se então que quanto menor a RAF, maior será a eficiência da planta em produzir massa seca, corroborando com os resultados encontrados nesse estudo.

Estudos prévios sugerem que o aumento na concentração de CO₂ no ambiente de cultivo aumenta o crescimento das plantas e a área foliar, mesmo sob condições de estresse hídrico, como ocorre nesses experimentos em que o aumento no número de membranas aumenta a evaporação da água do meio de cultivo. Essa característica,

teoricamente aumenta a taxa fotossintética levando a melhores respostas de crescimento (PEREZ-JIMENEZ et al., 2015). Porém, no presente estudo, resultados contrários foram observados para os parâmetros de área foliar, indicando que apesar da tendência, a resposta para essas variáveis é espécie específica.

Tabela 1- Valores médios da área foliar total (AFT), área foliar específica (AFE), razão de peso das folhas (RPF), razão de área foliar (RAF) de *Lippia gracilis* S. cultivadas *in vitro* em meio MS/2 durante 35 dias sob diferentes sistemas de ventilação natural (sem membrana-SM; sistema de ventilação natural (SVN) com 1, 2 e 4 membranas), explante com folha (F) e sem folha (S).

Trats.	AFT		AFE		RPF		RAF	
	F	S	F	S	F	S	F	S
SM	13,9 b A	10,74 a A	0,57 a B	0,92 a A	0,54 a B	0,67 a A	0,3 a B	0,62 a A
SVN1	22,84 a A	13,28 a B	0,77 a A	0,40 b B	0,51 a B	0,67 a A	0,38 a A	0,27 b A
SVN2	24,83 a A	13,20 a B	0,79 a A	0,89 a A	0,56 a B	0,64 a A	0,44 a A	0,56 a A
SVN4	23,5 a A	7,62 b B	0,62 a A	0,47 b A	0,58 a A	0,61 a A	0,35 a A	0,28 b A

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas pertencem ao mesmo grupo pelo teste Scott knott ao nível de 5% de probabilidade.

Cha-um et al. (2011) observaram aumento da área foliar no cultivo *in vitro* de *Macadamia tetraphyla*, quando se enriqueceu os frascos de cultivo com CO₂, e baixas concentrações de sacarose, em relação ao cultivo com menores concentrações de CO₂. *Papaver setigerum* apresentou aumento progressivo na área foliar específica à medida que ocorreu aumento da concentração de CO₂ no ambiente de cultivo (ZISKA et al., 2008). Foi observado aumento dos índices de área foliar no cultivo *in vitro* de *Pfaffia glomerata*, com a utilização de uma ou duas membranas porosas nas tampas dos frascos de cultivo, independente da presença ou ausência de sacarose (IAREMA et al., 2012).

3.3 Pigmentos fotossintéticos

Como os resultados de crescimento previamente analisados, apresentaram-se superiores para todas as variáveis nos explantes com folhas, a análise dos pigmentos foi realizada somente para essa condição experimental. Para todos os parâmetros avaliados houve redução nos pigmentos fotossintéticos (TABELA 2) na medida em que se

aumentou os níveis de CO₂ no interior dos frascos, através das membranas porosas, sendo observado os maiores valores para o tratamento SM.

Conforme citado anteriormente, o aumento do número de membranas porosas provocou um aumento da evaporação de água do meio de cultivo o que pode induzir estresse hídrico para as plantas. O estresse hídrico contribui para efeitos prejudiciais no aparelho fotossintético, e pode levar a uma diminuição da eficiência do PSII, o que pode indicar baixa regulação da fotossíntese ou fotoinibição (PEREZ-JIMENES et al., 2015), podendo ser esse o motivo que levou a redução nos índices de clorofila e carotenóides observados nesse estudo. Porém os resultados encontrados nesse trabalho diferem dos obtidos por Saldanha et al. (2012) onde a utilização de membranas porosas aumentaram os teores de pigmentos fotossintéticos para *Pfaffia glomerata* em relação aos sistemas sem membranas.

Tabela 2- Pigmentos fotossintéticos (clorofilas a, b, total e carotenóides) de *L. gracilis* S. cultivadas *in vitro* em meio MS/2 durante 35 dias sob diferentes sistemas de ventilação natural (sem membrana-SM; sistema de ventilação natural (SVN) com 1, 2 e 4 membranas).

Trats.	CLOROFILA (mg g ⁻¹)			CAROTENOIDES (mg g ⁻¹)
	a	b	Total	
SM	1,82 a	1,87 a	3,69 a	1,84 a
SVN1	1,20 b	1,17 b	2,37 b	1,17 b
SVN2	1,02 c	1,02 c	2,04 c	0,99 c
SVN4	0,82 d	0,82 d	1,64 d	0,82 d

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas linhas pertencem ao mesmo grupo pelo teste Scott knott ao nível de 5% de probabilidade.

Oplopanax elatus apresentou maiores níveis de clorofila quando cultivado sob condições fotoautotróficas com sistemas de ventilação natural em relação aos sistemas heterotróficos sem ventilação forçada de ar (PARK et al., 2011). *Gevuina avellana* apresentou aumento significativo dos níveis de clorofila a e b nos tratamentos em que foram utilizados sistemas de ventilação natural nos frascos de cultivo (ALVAREZ et al., 2012). *Pfaffia glomerata* cultivada *in vitro* em condições elevadas de CO₂ dentro dos frascos, apresentaram maior concentração de clorofila total e carotenóides (SALDANHA et al., 2014).

3.4 Análises químicas por *headspace* – CG/EM

As análises químicas da fração volátil de *L. gracilis*, cultivadas *in vitro*, indicaram um perfil químico pouco complexo com a presença de 12 a 14 constituintes químicos identificados (TABELA 3). Estes constituintes caracterizaram 99,95 a 100% da composição química total.

Monoterpenos (hidrocarbonetos, oxigenados e aromáticos) compreenderam a classe majoritária de constituintes voláteis (94,62 a 96,24%). Já a classe dos sesquiterpenos hidrocarbonetos foi representada apenas pela presença de *E*-cariofileno (3,71 a 5,35%).

Os constituintes principais, independente do ambiente de cultivo, foram representados pelos monoterpenos aromáticos, *p*-cimeno, timol e carvacrol e pelo monoterpeno hidrocarboneto γ -terpineno. Destes, o carvacrol com teores na faixa de 41,28 a 51,22% foi o majoritário. Estes constituintes já foram relatados por outros autores para a espécie estudada (DE OLIVEIRA CRUZ et al., 2013; NETO et al., 2010; DOS SANTOS et al., 2016; FERRAZ et al., 2013).

Os diferentes sistemas de cultivo *in vitro* afetaram a composição química volátil de *L. gracilis* (TABELA 3). Do ponto de vista qualitativo o α -felandreno estava presente apenas nas plântulas do cultivo sem membrana e o hidrato de *cis*-sabineno não foi detectado nas amostras do cultivo com duas membranas.

Com relação aos resultados quantitativos, as diferenças mais expressivas foram observadas para o *p*-cimeno (16,66 a 24,01%) e o carvacrol (41,28 a 51,22%). O menor teor de *p*-cimeno (16,66%) e o maior teor de carvacrol (51,22%) foram observados no tratamento com quatro membranas. O menor teor de γ -terpineno e o maior teor de timol também foram observados nesse tratamento. Segundo Polouse e Croteau (1978), a biossíntese de carvacrol e timol tem início na aromatização do *p*-cimeno, a partir do γ -terpineno. Assim, os menores teores de *p*-cimeno e γ -terpineno no tratamento com quatro membranas pode ser justificada pela sua conversão em carvacrol e timol.

Essa hipótese é corroborada pelos menores teores de carvacrol e timol e pelos maiores de *p*-cimeno e γ -terpineno no tratamento sem membranas. Conforme a rota biossintética proposta por Polouse e Croteau. (1978), a baixa concentração de CO₂ no ambiente sem membrana inibiu a conversão do *p*-cimeno a carvacrol. Por outro lado, a alta concentração de CO₂ favoreceu a conversão do *p*-cimeno a carvacrol no tratamento com quatro membranas.

Tabela 3- Composição química volátil de plântulas de *L. gracilis* cultivadas *in vitro* por 35 dias sob diferentes sistemas de ventilação natural, (sem membrana-SM; sistema de ventilação natural (SVN) com 1, 2 e 4 membranas).

SISTEMAS DE VENTILAÇÃO NATURAL					
Constituintes	Área (%) ± DP				
	IR ¹	SM	SVN1	SVN2	SVN4
Monoterpenos hidrocarbonetos		22,55	21,62	21,93	16,52
α-tujeno	924	2,18 ± 0,055	1,91 ± 0,078	1,87 ± 0,107	1,24 ± 0,084
α-pineno	930	0,40 ± 0,034	0,34 ± 0,007	0,34 ± 0,025	nd
Mirceno	990	3,4 ± 0,093	3,07 ± 0,203	3,18 ± 0,105	2,25 ± 0,137
α-felandreno	1003	0,31 ± 0,052	nd	nd	nd
α-terpineno	1015	3,23 ± 0,139	3,05 ± 0,165	3,11 ± 0,020	2,34 ± 0,046
Limoneno	1026	0,47 ± 0,008	0,39 ± 0,037	0,44 ± 0,007	0,34 ± 0,018
γ-terpineno	1056	12,56 ± 0,576	12,86 ± 0,575	12,99 ± 0,036	10,35 ± 0,295
Monoterpenos Oxigenados		1,25	1,18	0,7	1,51
hidrato de cis-sabineno	1064	0,30 ± 0,014	0,31 ± 0,019	nd	0,36 ± 0,066
terpinen-4-ol	1174	0,39 ± 0,013	0,37 ± 0,048	0,32 ± 0,021	0,52 ± 0,065
2,5 dimetoxiacetofenona	1485	0,56 ± 0,093	0,50 ± 0,061	0,38 ± 0,100	0,63 ± 0,070
Monoterpenos Aromáticos		72,44	73,01	73,22	76,59
ρ-cimeno	1022	24,01 ± 0,548	21,68 ± 0,396	22,08 ± 0,440	16,66 ± 0,913
Timol	1293	7,15 ± 0,168	7,34 ± 0,074	7,20 ± 0,058	8,71 ± 0,202
Carvacrol	1303	41,28 ± 1,407	43,99 ± 1,077	43,94 ± 0,723	51,22 ± 1,466
Sesquiterpenos		3,71	4,16	4,15	5,35
<i>E</i> -cariofileno	1414	3,71 ± 0,304	4,16 ± 0,123	4,15 ± 0,051	5,35 ± 0,260
Total (%)		99,95	99,97	100	99,97
Nº de constituintes		14	13	12	12

*Índice de retenção em coluna HP-5MS na ordem de eluição. nd: não detectado. DP: desvio padrão (n=3).

Foi possível observar então que a concentração de carvacrol aumentou na seguinte ordem: SM, SVN2, SVN1 e SVN4. As concentrações de ρ-cimeno também diminuíram nessa ordem, evidenciando a conversão direta a carvacrol. Silva et al. (2017) também encontraram aumento nos teores de carvacrol em *Plectranthus amboinicus* cultivados *in vitro* sob SVN4.

O estresse hídrico provocado pela evaporação da água nos frascos de cultivos pode ter desencadeado um processo metabólico comum em plantas submetidas ao estresse, e o aumento no nível de carvacrol onde houve maior evaporação de água no frasco, SVN4 pode ter sido uma forma de defesa da planta a esse estresse. Pesquisas sugerem que monoterpenos agem como protetores das plantas aos estresses ambientais podendo estar envolvidos na estabilização das membranas das células através de interações lípideo-lípideo, lípideo-proteína, proteína-proteína ou por ação contra as

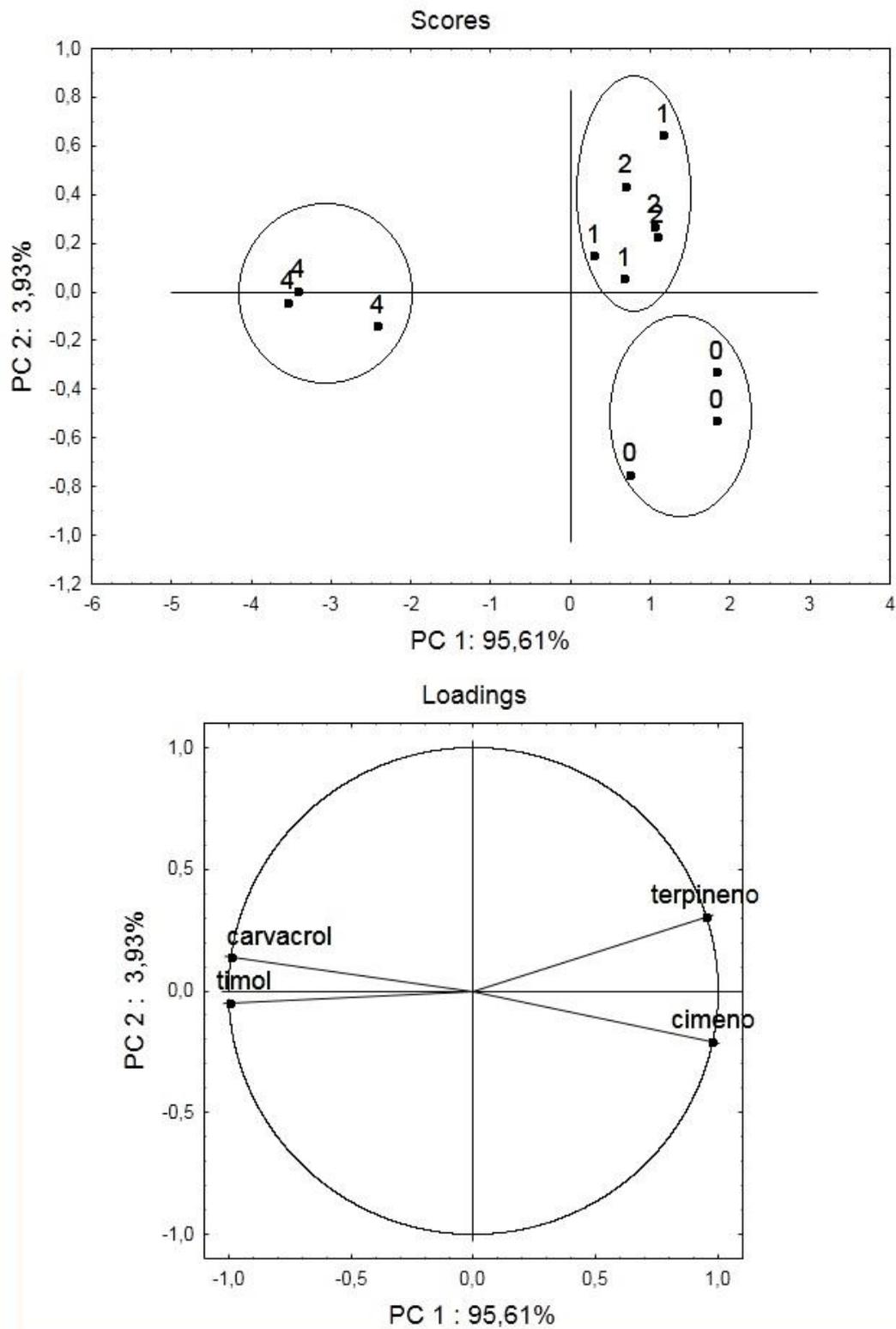
espécies reativas de oxigênio (ROS) (HARTIKAINEN et al., 2009; HOLOPAINEN, 2011).

3.5 Análise dos componentes principais (PCA)

A análise de PCA aplicada para os quatro constituintes principais confirma a discussão acima (FIGURA 4). Na Figura 4A contem os escores, onde as dois componentes principais (PC1+PC2) explicam 99,54% da variância dos dados. A Figura 4B apresenta os loadings que revelam a relação entre os compostos voláteis principais com o tipo de sistema de ventilação empregado. A PCA foi separada em três grupos. Nota-se que no sistema de quatro membranas há o agrupamento de timol e carvacrol, nos sistemas de 1 e 2 membranas agruparam o γ -terpineno e sem membrana o ρ -cimeno. A PCA permitiu também confirmar que o timol e carvacrol apresentam correlação negativa com o ρ -cimeno e γ -terpineno.

Outra hipótese para o fenômeno observado pode ser explicado pela condição de estresse hídrico no ambiente com quatro membranas, por ter maior evaporação de água, pode ter desencadeado o processo metabólico de produção de carvacrol, conforme discutido anteriormente. Alguns trabalhos demonstram que existe correlação entre a emissão de isoprenos, unidade estrutural dos terpenoides, e a fotossíntese, pois a produção desses compostos é estimulada pela luz, declina no escuro e é inibida pela ausência de CO₂ (NIINEMETS et al., 2002; WILKINSON et al., 2009; SHAO et al., 2001; SANADZE, 2004; LORETO et al., 1996a, 1996b). Segundo LORETO; SHARKEY (1990) a emissão de isoprenos esta relacionada ao metabolismo do carbono fotossintético. Sanadze et al. (1990) demonstraram existir evidencias de que os cloroplastos isolados são capazes de produzir isopreno a partir do CO₂. Possel et al. (2010) relataram que quando ocorre fotoinibição ou diminuição da fotossíntese, ocorre também inibição da rota biossintética responsável pela formação de isoprenos, mono e diterpenos. Portanto com o aumento no número de membranas porosas, e consequente aumento do CO₂ no interior dos frascos, pode ter ocorrido maior emissão de isoprenos e levado ao aumento dos compostos majoritários, como observados para o tratamento SVN4.

Figura 4-Score e Loading da análise dos componentes principais (PCA) na correlação matricial construída usando dados para quatro compostos majoritários sob diferentes sistemas de ventilação natural de *Lippia gracilis*.



Fonte: Do autor (2017).

Estudos sobre a influência das trocas gasosas na emissão de terpenos têm sido reportados na literatura. Elevada exposição a CO₂ reduziu significativamente os níveis de quatro dos oito monoterpenos mais abundantes em plântulas de *Pseudotsuga menziesii* (SNOW et al., 2003). Wilkinson et al. (2009) avaliando duas espécies a campo sob diferentes concentrações de CO₂, encontraram que plantas de *Eucalyptus globulus* aumentaram a emissão de isopreno sob baixas concentrações de CO₂. Já para *Liquidambar styraciflua*, esses autores não encontraram diferenças na emissão desses compostos sob essas mesmas condições.

4 CONCLUSÕES

O sistema de ventilação natural com quatro membranas apresenta os melhores resultados para o crescimento e acúmulo de matéria seca nos explantes em que o par de folhas estava presente. Já nos explantes sem folha o sistema de ventilação natural com uma membrana foi o mais eficiente para o crescimento e acúmulo de matéria seca.

Somente os explantes sem folha apresentam diferenças em relação aos parâmetros da área foliar, que de maneira geral, foram superiores aos com folhas. Os maiores valores para os parâmetros avaliados dos pigmentos fotossintéticos são encontrados para o sistema de cultivo sem membranas.

O sistema de ventilação natural com quatro membranas promove maior acúmulo de carvacrol e menores teores de γ -terpineno e ρ -cimeno.

Para o cultivo *in vitro* de *Lippia gracilis*, recomenda-se utilizar explantes com um par de folhas e quatro membranas porosas no frasco de cultivo.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**, 4th ed. Allured 324 Publishing Corporation, Carol Stream, 804p., 2007.
- ALVAREZ, Carolina et al. Effects of light and ventilation on physiological parameters during *in vitro* acclimatization of *Gevuina avellana* mol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, London, v. 110, n. 1, p. 93-101, Jul. 2012.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Funep, 2ª ed. 41p. 2003.
- CHANDRA, Sheela et al. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 32, n. 9, p. 1199-1205, Sep. 2010.
- CHA-UM, Suriyan et al. Promoting root induction and growth of *in vitro* macadamia (*Macadamia tetraphylla* L. 'Keauu') plantlets using CO₂-enriched photoautotrophic conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, London, v. 106, n. 3, p. 435, Sep. 2011.
- CHEN, Chiachung. Application of growth models to evaluate the microenvironmental conditions using tissue culture plantlets of *Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'V3'. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 191, p. 25-30, Aug. 2015.
- CROCOLL, Christoph. **Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme**. 2011. Tese de Doutorado. Jena, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Diss., 2011.
- DA SILVA, Fabricio Francisco Santos; DANTAS, Bárbara França. Taxas de crescimento de mudas de quixabeira submetidas a diferentes condições. **Scientia Plena**, São Cristovão, v. 10, n. 9, 2014.
- DE OLIVEIRA CRUZ, Elizangela Mércia et al. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus*. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 195, n. 1, p. 198-202, Jul. 2013.
- DOOL, H.V.; KRATZ, P.D. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-352 liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.11, p. 463-467, 1963.
- DOS SANTOS, Clesivan Pereira et al. Harvest time and geographical origin affect the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Industrial Crops and Products**, London, v. 79, p. 205-210, Jan. 2016.
- FERRAZ, Rosana PC et al. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 20, n. 7, p. 615-621, May 2013.

HARTIKAINEN, Kaisa et al. Emissions of volatile organic compounds and leaf structural characteristics of European aspen (*Populus tremula*) grown under elevated ozone and temperature. **Tree physiology**, Oxford, v. 29, n. 9, p. 1163-1173, Sep. 2009.

HOLOPAINEN, Jarmo K. Can forest trees compensate for stress-generated growth losses by induced production of volatile compounds? **Tree physiology**, Oxford, v. 31, n. 12, p. 1356-1377, Nov. 2011.

IAREMA, Lourdes et al. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, London, v. 110, n. 2, p. 227-238, Aug. 2012.

ISAH, Tasiu. Adjustments to *in vitro* culture conditions and associated anomalies in plants. **Acta Biologica Cracoviensia s. Botanica**, Cracow. v. 57, n. 2, p. 9-28, Dec. 2015.

IVANOVA, M.; STADEN, J. V. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schonland ex Pillans. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 60, n. 2, p. 143-150, Mar. 2010.

LICHTENTHALER, H.K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS 393 spectroscopy. In: Wrolstad RE (ed) **Current protocols in food analytical chemistry**, New York. 394 p., Nov. 2001.

LORENZI, Harri; MATOS, Francisco J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2002.

LORETO, Francesco; SHARKEY, Thomas D. A gas-exchange study of photosynthesis and isoprene emission in *Quercus rubra* L. **Planta**, Berlin, v. 182, n. 4, p. 523-531, Jul. 1990.

LORETO, Francesco et al. Different sources of reduced carbon contribute to form three classes of terpenoid emitted by *Quercus ilex* L. leaves. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 93, n. 18, p. 9966-9969, Sep. 1996a.

LORETO, Francesco et al. Evidence of the photosynthetic origin of monoterpenes emitted by *Quercus ilex* L. leaves by ¹³C labeling. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 110, n. 4, p. 1317-1322, Apr. 1996b.

MIGUEL, Célia; MARUM, Liliana. An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 11, p. 3713-3725, Jul. 2011.

MOHAMED, MA-H.; ALSADON, A. A. Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 123, n. 3, p. 295-300, Jan. 2010.

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

NETO, Renato et al. The essential oil from *Lippia gracilis* Schauer, Verbenaceae, in diabetic rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 261-266, Apr./May 2010.

NIINEMETS, Ülo et al. Monoterpene emissions in relation to foliar photosynthetic and structural variables in Mediterranean evergreen *Quercus* species. **New Phytologist**, Lancaster, v. 153, n. 2, p. 243-256, Feb. 2002.

NIST National Institute of Standards and Technology—Chemistry Web Book
<http://webbook.nist.gov/chemistry>. 412. (2008) Accessed 17 May 2017.

PARK, S. Y. et al. Improved growth and acclimatization of somatic embryo-derived *Oplopanax elatus* plantlets by ventilated photoautotrophic culture. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 55, n. 3, p. 559-562, Sep. 2011.

PEÑA-RAMÍREZ, Yuri et al. Tissue culture methods for the clonal propagation and genetic improvement of Spanish red cedar (*Cedrela odorata*). **Plant Cell Culture Protocols**, Totowa, p. 129-141, Apr. 2012.

PÉREZ-JIMÉNEZ, Margarita et al. A regime of high CO₂ concentration improves the acclimatization process and increases plant quality and survival. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, London, v. 121, n. 3, p. 547-557, Jun. 2015.

POULOSE, A. J.; CROTEAU, Rodney. Biosynthesis of aromatic monoterpenes: conversion of γ -terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 187, n. 2, p. 307-314, Apr. 1978.

SALDANHA, Cleber Witt et al. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, London, v. 110, n. 3, p. 413-422, Sep. 2012.

SALDANHA, Cleber Witt et al. CO₂-enriched atmosphere and supporting material impact the growth, morphophysiology and ultrastructure of *in vitro* Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, London, v. 118, n. 1, p. 87-99, Jul. 2014.

SANADZE, G. A. The principal scheme of photosynthetic carbon conversion in cells of isoprenereleasing plants. In: **Current research in photosynthesis**, Dordrecht, p. 3025-3031, Aug. 1990.

SANADZE, G. A. Biogenic isoprene (a review). **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 51, n. 6, p. 729-741, Nov. 2004.

SHAO, Min et al. Volatile organic compound emissions from Scots pine: mechanisms and description by algorithms. **Journal of Geophysical Research: Atmospheres**, New York, v. 106, n. D17, p. 20483-20491, Sep. 2001.

- SILVA, Adriano Bortolotti da et al. *In vitro* growth and leaf anatomy of *Cattleya walkeriana* (Gardner, 1839) grown in natural ventilation system. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, n. 6, p. 883-890, Nov./Dez. 2014.
- SILVA, Sâmia Torres et al. Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, London v. 129, n. 3, p. 501-510, Jun. 2017.
- TREVISAN, Maria TS et al. Composition of essential oils and ethanol extracts of the leaves of *Lippia* species: Identification, quantitation and antioxidant capacity. **Records of Natural Products**, Istanbul, v. 10, n. 4, p. 485, Jul. 2016.
- US-CAMAS, Rosa et al. *In vitro* culture: an epigenetic challenge for plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, London, v. 118, n. 2, p. 187-201, Aug. 2014.
- VAHDATI, K.; HASSANKHAH, A. Developing a photomixotrophic system for micropropagation of *Persian walnut*. **Acta Hortic.**, The Hague, v. 1050, p. 181-187, Aug. 2014.
- XIAO, Yulan; NIU, Genhua; KOZAI, Toyoki. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, London, v. 105, n. 2, p. 149-158, May 2011.
- ZISKA, Lewis H.; PANICKER, Sini; WOJNO, Heidi L. Recent and projected increases in atmospheric carbon dioxide and the potential impacts on growth and alkaloid production in wild poppy (*Papaver setigerum* DC.). **Climatic change**, Dordrecht, v. 91, n. 3, p. 395-403, Dec. 2008.
- WILKINSON, Michael J. et al. Leaf isoprene emission rate as a function of atmospheric CO₂ concentration. **Global Change Biology**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 1189-1200, Nov. 2009.
- ZOBAYED, S. M. A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Multiple shoot induction and leaf and flower bud abscission of *Annona* cultures as affected by types of ventilation. **Plant cell, tissue and organ culture (PCTOC)**, London, v. 69, n. 2, p. 155-165, May 2002.

CAPÍTULO 5 REGULADORES DE CRESCIMENTO NA MICROPROPAGAÇÃO E FRAÇÃO VOLÁTIL DE *Lippia gracilis* Schauer UTILIZANDO ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito de diferentes reguladores de crescimento e suas combinações na proliferação de brotos, crescimento, desenvolvimento e análise da fração volátil de *Lippia gracilis* cultivada *in vitro*. Foram realizados dois experimentos. No primeiro foram utilizadas 5 diferentes concentrações de BAP: 0,0; 0,5; 0,75 ; 1,00 e 1,25 mg L⁻¹ e 3 concentrações de ANA: 0,0; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹, em esquema fatorial. No segundo, os tratamentos consistiam em: 0,0 BAP + 0,0 TDZ; 0,25 BAP + 0,25 TDZ; 0,3 BAP + 0,2 TDZ; 0,2 BAP + 0,3 TDZ; 0,1 BAP + 0,4 TDZ; 0,4 BAP + 0,1 TDZ mg L⁻¹. Aos 30 dias de cultivo em meio MS com metade da concentração dos sais, foram avaliados o crescimento e constituintes voláteis. Os reguladores de crescimento influenciaram significativamente o crescimento *in vitro* de *L. gracilis*. Foi observado calogênese em todas as combinações de reguladores de crescimento. Os dados de crescimento para o primeiro experimento foram preditos a partir da superfície de resposta tridimensional (3D) das diferentes variáveis analisadas. O BAP influenciou negativamente os parâmetros de crescimento avaliados no segundo experimento. No segundo experimento a presença de reguladores de crescimento reduziu o comprimento de parte aérea e de raiz em todas as combinações. Quando a concentração de TDZ foi maior que BAP, foram encontrados valores intermediários para as variáveis analisadas. A combinação entre os reguladores estimulou o maior número de brotações. Observou-se também variação do número, conteúdo e perfil dos compostos voláteis sob influência dos reguladores de crescimento. Foram identificados os constituintes majoritários ρ -cimeno, γ -terpineno, Timol, carvacrol e *E*-cariofileno, independente das condições experimentais. Porém tanto no primeiro quanto no segundo experimento, a utilização de reguladores de crescimento reduziu significativamente os níveis de carvacrol.

Palavras-chaves: Citocininas. Auxinas. Micropropagação. Alecrim de Tabuleiro.

CHAPTER 5 GROWTH REGULATORS IN MICROPROPAGATION AND VOLATILE FRACTION OF *Lippia gracilis* Schauer USING RESPONSE SURFACE ANALYSIS

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of different growth regulators and their combinations on shoot proliferation, growth, development, and analysis of the volatile fraction of *Lippia gracilis* grown *in vitro*. Two experiments were carried out. In the first experiment, 5 different concentrations of BAP were used: 0.0; 0.5; 0.75; 1.00 and 1.25 mg L⁻¹, and 3 ANA concentrations: 0.0; 0.5 and 1.0 mg L⁻¹, in a factorial design. In the second, the treatments consisted of: 0.0 BAP + 0.0 TDZ; 0.25 BAP + 0.25 TDZ; 0.3 BAP + 0.2 TDZ; 0.2 BAP + 0.3 TDZ; 0.1 BAP + 0.4 TDZ; 0.4 BAP + 0.1 TDZ mg L⁻¹. At 30 days of culture in half strength MS medium, growth and volatile constituents were evaluated. Growth regulators significantly influenced *in vitro* growth of *L. gracilis*. Calogenesis was observed in all combinations of growth regulators. Growth data for the first experiment were predicted from the three-dimensional (3D) response surface of the analyzed variables. The BAP negatively influenced the growth parameters evaluated in the second experiment. In the second experiment the presence of growth regulators reduced shoot and root length in all combinations. When TDZ concentration was higher than BAP, intermediate values were found for the analyzed variables. The combination between regulators stimulated the highest number of shoots. Variation in number, content and profile of volatile compounds was also observed under the influence of growth regulators. The major constituents identified were ρ -cymene, γ -terpinene, thymol, carvacrol, and E-caryophyllene, independent of the experimental conditions. However, in both the first and second experiments, the use of growth regulators significantly reduced carvacrol levels.

Key words: Cytokines. Auxin. Micropropagation. Alecrim de Tabuleiro.

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da humanidade, o homem se beneficia do uso de plantas medicinais, tendo relatos de sua utilização para fins curativos, até mesmo antes do surgimento da escrita. Atualmente essa prática ainda é utilizada por grande parte da população mundial como tratamento alternativo de diversas enfermidades (CARNEIRO et al., 2014). O gênero *Lippia*, o segundo maior da família Verbenaceae, apresenta aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores e possuem os países das Américas do sul e central como seus maiores centros de dispersão, sendo que somente no Brasil existem aproximadamente 120 espécies do gênero. No nordeste do país as plantas dessa espécie são utilizadas na medicina popular no tratamento de resfriados, gripes, bronquite e tosse (GOMES et al., 2011).

A *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae), popularmente conhecida como alecrim do sertão, alecrim da chapada ou alecrim de tabuleiro, é uma planta típica da vegetação do semiárido nordestino, caracterizada por ser um pequeno arbusto caducifólio, ramificado, com caule quebradiço, de até 2 m de altura e a sua propagação é realizada via estaquia de ramos mais finos (LORENZI; MATOS, 2002). É utilizada na medicina popular no tratamento de resfriados, tosses, sinusite, bronquite e dor de cabeça, além de ser utilizada também externamente para tratar doenças de pele, queimaduras, feridas e úlceras (DOS SANTOS et al., 2016). As folhas dessa espécie são ricas em óleo essencial com ação antibactericida, moluscicida, larvicida, antinociceptivo, e antiinflamatória (FERRAZ et al., 2013).

A totipotência das células vegetais permite que elas sejam prontamente utilizadas para a propagação *in vitro* ou desenvolvimento de cultura de células (DAVIES; DEROLE, 2014). A micropropagação permite a multiplicação em massa, a conservação das espécies, bem como a produção de plantas livres de microorganismos (SILVA et al., 2017). O uso de reguladores de crescimento no meio de cultivo supre possíveis deficiências endógenas como também melhora as condições de cultivo *in vitro*. As concentrações e o tipo de regulador adicionado ao meio influenciam o crescimento e desenvolvimento da maioria das culturas sob essas condições (HARTMANN et al., 2002). Reguladores de crescimento são substâncias químicas sintéticas, com ação similar aos hormônios vegetais, que atuam sobre o metabolismo vegetal provocando respostas fisiológicas nas plantas (LAMAS, 2001). Atuam como sinalizadores químicos agindo na regulação do crescimento e desenvolvimento de

plantas ligando-se a receptores, desencadeando assim uma série de mudanças celulares, que afetam o desenvolvimento de órgãos ou tecidos (RODRIGUES et al., 2003).

Os fitorreguladores mais utilizados na cultura de tecidos são as auxinas e citocininas e o balanço entre essas substâncias exercem diversos efeitos na diferenciação da parte aérea, raízes e formação de calos. As citocininas atuam nos processos de divisão e diferenciação celular. As auxinas controlam o crescimento e alongamento celular, principalmente na formação de raízes laterais e adventícias (TAIZ; ZEIGER, 2017). A citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) é a mais comumente utilizada, mostrando-se eficaz na multiplicação de diversas espécies lenhosas. O ácido naftalenoacético (ANA) é a auxina mais utilizada em combinações com citocininas visando indução e alongamento de brotos e enraizamento (DE OLIVEIRA et al., 2016). O thidiazuron (TDZ) possui efeitos similares tanto de citocininas como de auxinas é considerado um bioregular altamente eficaz na morfogênese de plantas na cultura de tecidos (DIENGGAN; MURTHY, 2014).

No cultivo *in vitro*, diversos estudos com diferentes concentrações e/ou combinações de reguladores de crescimento tem sido utilizados nos meios de cultivo visando adequá-los as necessidades de interesse para a espécie em questão, estimulando respostas como crescimento, alongamento e multiplicação da parte aérea. A utilização de 2,5 mg L⁻¹ de BAP com 1,0 mg L⁻¹ de ANA promoveu maior taxa de multiplicação em *Heliconia latispatha* cultivadas *in vitro* (DE JESUS RODRIGUES et al., 2016). Já para *Hancornia speciosa* cultivada *in vitro* foram encontrados melhores resultados de taxa de multiplicação e número de brotações na ausência de BAP e ANA, que quando adicionados ao meio promoveram a formação de calos (DE OLIVEIRA et al., 2016). O meio MS suplementado com 2 mg L⁻¹ de BAP e 1 mg L⁻¹ de TDZ promoveram melhores resultados para indução de múltiplos brotos em *Boucerosia umbellata* cultivada *in vitro* (SUSHEELA et al., 2016). Assim objetivou-se avaliar o efeito desses diferentes reguladores de crescimento (BAP, ANA e TDZ) e suas combinações na proliferação de brotos, crescimento, desenvolvimento e análise da fração volátil de *Lippia gracilis* cultivada *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Estabelecimento *in vitro* do material vegetal

As plantas matrizes do ambiente protegido foram oriundas de propagação vegetativa de estacas apicais (± 5 cm) coletadas de plantas adultas no Horto de plantas medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), enraizadas em bandeja de polipropileno e após 30 dias replantadas em vasos de plástico com uma mistura de solo + areia na proporção de 3:1 (v/v).

Foi realizada poda drástica nessas matrizes, seguida de adubação com sulfato de amônio e rega constante, com o objetivo de estimular a rebrota, para proceder a coleta do material vegetal para o estabelecimento *in vitro*. Foi aplicado duas doses de fungicida e bactericida sistêmico, Kazumin, 7 dias e 2 antes da coleta do material, nas matrizes a campo e em ambiente protegido na dosagem 3 mL L^{-1} (0,06 g de ingrediente ativo) de água, objetivando reduzir a contaminação *in vitro*. Os segmentos apicais e nodais foram lavados em água corrente por 30 minutos e imersos em solução de hipoclorito de sódio (1,25% de cloro ativo) sob agitação constante por 15 minutos. Em câmara de fluxo laminar asséptico, os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (150 x 25 mm), contendo 15 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração dos sais suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, 6 g L^{-1} de ágar, e pH $5,7 \pm 0,1$, ajustado com NaOH e HCl (0,1 e 0,5 N), antes da autoclavagem (125° C , 25 min a 1,2 atm).

Após a inoculação os tubos foram colocados em sala de crescimento com lâmpadas fluorescentes e intensidade de $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 h de luz e temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{ C}$. Após 30 dias as plântulas foram multiplicadas em frascos contendo 40 mL de meio MS com metade da concentração de sais e mantidas sob condições idênticas de luz e temperatura até obter material suficiente para realização dos experimentos. O material vegetal foi herborizado e a exsicata encontra-se depositada no herbário PAMG, da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), sob registro PAMG 57859.

2.2 Crescimento do explante com BAP X ANA

Segmentos nodais (1cm) foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS com metade da concentração dos sais, suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, 6 g L^{-1} de ágar (Himedia ®, tipo I), e pH $5,7 \pm 0,1$, acrescido das diferentes

combinações entre os reguladores 6-benzilaminopurina (BAP) e ácido nafatlenoacético (ANA). Os tubos de ensaio contendo os meios de cultivo foram autoclavados a 125° C por 20 min a 1,2 atm. Foram utilizadas cinco diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,5; 0,75 ; 1,00 e 1,25 mg L⁻¹) e três concentrações de ANA (0,0; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹) totalizando 15 tratamentos e cultivados em salas de crescimento com fotoperíodo de 16 h de luz e 25 ± 1° C. Após 30 dias foram avaliados o crescimento e análise da fração volátil. Quatro repetições por tratamento foram usados com três plântulas por repetição em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (5 x 3). As plântulas obtidas foram avaliadas quanto ao comprimento da brotação (cm), comprimento de raiz (cm), número de brotações, biomassa seca de folhas, caule, raiz, calos e total (mg).

2.3 Crescimento do explante com BAP x TDZ

Segmentos nodais (1cm) foram inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS com metade da concentração dos sais, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar (Himedia ®, tipo I), e pH 5,7 ± 0,1, acrescido de diferentes combinações entre os reguladores 6-benzilaminopurina (BAP) e thidiazuron (TDZ). Os tubos de ensaio com os meios de cultivo foram autoclavados a 125° C por 20 min a 1,2 atm. Foram utilizadas seis diferentes combinações de BAP (Sigma-Aldrich®) e TDZ (Sigma-Aldrich®) de forma que a concentração final de reguladores no meio não ultrapasse 0,5 mg L⁻¹. Os tratamentos consistiram em: 0,0 BAP + 0,0 TDZ; 0,25 BAP + 0,25 TDZ; 0,3 BAP + 0,2 TDZ; 0,2 BAP + 0,3 TDZ; 0,1 BAP + 0,4 TDZ; 0,4 BAP + 0,1 TDZ mg L⁻¹, totalizando seis tratamentos e cultivados em salas de crescimento com fotoperíodo de 16 h de luz e 25 ± 1° C. Foram utilizados quatro repetições por tratamento com quatro plântulas por repetição em um delineamento inteiramente casualizado (DIC). As plântulas, após 30 dias, foram avaliadas como descrito anteriormente para o experimento de BAP x ANA.

2.4 Análise química por *headspace*-CG/EM

Amostras de folhas de *L. gracilis* foram coletadas de plântulas aos 30 dias de cultivo *in vitro*. O material vegetal foi seco em estufa de circulação forçada de ar a 40°C por 72h e 100 mg de folhas secas foram acondicionadas em *vials* para *headspace* de 20 mL, vedados com septo de silicone/PTFE.

Para extração da fração volátil de *L. gracilis* empregou-se a técnica de *headspace* estático, utilizando-se um extrator/amostrador *headspace* automático CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland) acoplado ao sistema de CG/EM. As condições operacionais foram: temperatura de incubação da amostra de 110 °C durante 30 minutos, temperatura da seringa a 120 °C e, 500 µL da fase de vapor foram injetados no sistema cromatográfico.

As análises químicas foram realizadas em um sistema de cromatografia em fase gasosa Agilent® 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilente® MSD 5975C (Agilente Technologies, California, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z. Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m. de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme)(California, EUA). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min. As temperaturas do injetor e a linha de transferência para o MS foram mantidas em 240 °C. A temperatura inicial do forno foi de 50 °C, seguido por uma rampa de temperatura de 3°C/min até 240 °C e, finalizado com uma rampa de 10 °C/min até 280 °C. A injeção foi realizada no modo *split* a uma razão de injeção de 1:50. As análises foram realizadas em triplicata, sendo as concentrações dos constituintes presentes expressas pela porcentagem de área relativa dos picos cromatográficos.

Os constituintes foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à co-injeção de uma solução padrão de n-alcanos (C8-C20, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca (NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007). O índice de retenção foi calculado usando a equação proposta por Van Den Dool e Kratz, (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção da literatura (Adams, 2007).

2.5 Análise estatística

No experimento BAP x ANA foi utilizado Delineamento Composto Central Rotativo (CCRD) para investigar os efeitos das doses dos fatores independentes "ANA" e "BAP". O delineamento completo consistiu em 60 corridas experimentais, incluindo 4 repetições dos pontos centrais. A análise de Pareto Chart e gráficos de superfície de resposta (3D) com o efeito das diferentes doses dos reguladores de crescimento foram plotados com auxílio do Software Statistica (trial version, 12 StatSoft). Os dados

obtidos do experimento BAP X TDZ foram submetidos à ANAVA pelo teste F ($p < 0,05$), utilizando-se o software Statistica[®], versão 12 (trial version, StatSoft). Após verificada a significância das variáveis pelo teste F, as médias foram comparadas pelo teste de Duncan à 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

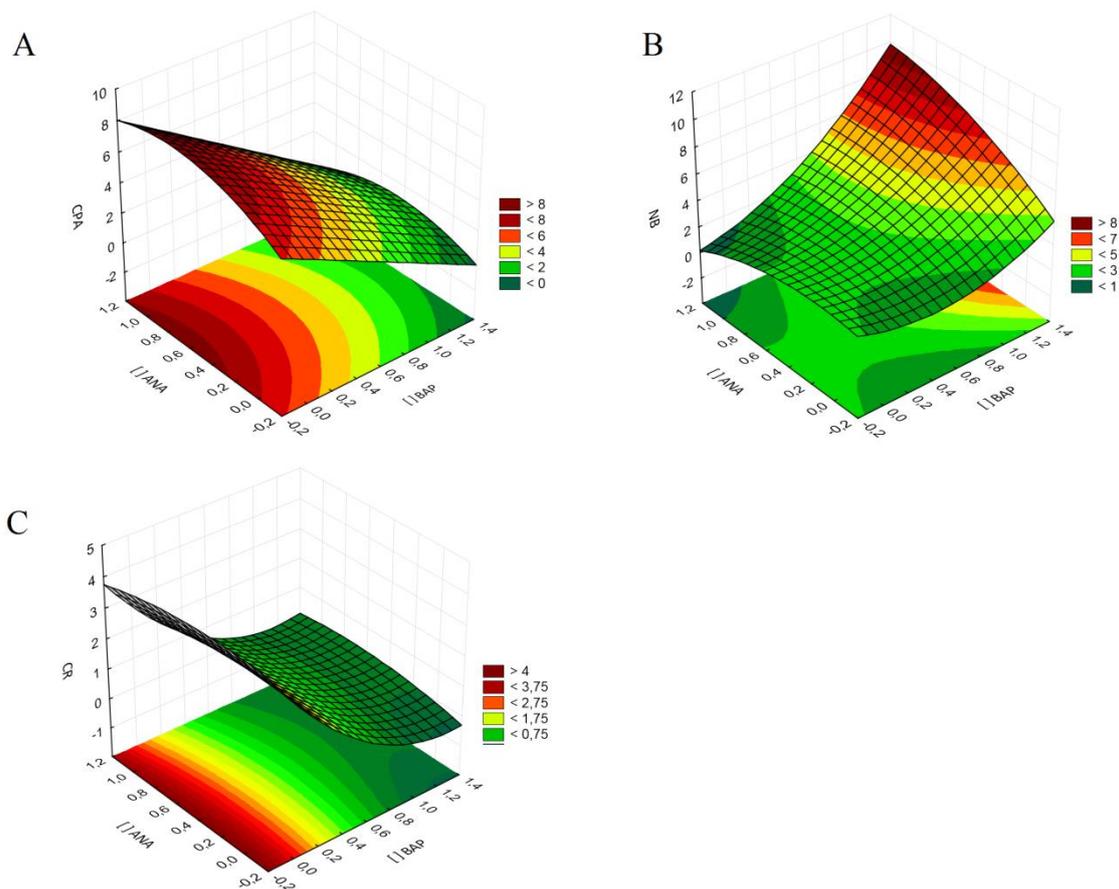
3.1 Crescimento do explante com BAP x ANA

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é simétrica de segunda ordem e constituída por duas partes (fatorial), com um ou mais pontos centrais, e a axial. A MSR é um método utilizado para projetar experiências, modelar, avaliar efeitos variáveis e otimizar as condições de crescimento. Os métodos de design ortogonal não podem medir os efeitos interativos entre as variáveis, mas as MSR podem superar essas desvantagens (LIU et al., 2015). Custodio et al. (2000) mostraram que a metodologia de superfície de resposta é eficiente na análise de experimentos em arranjo fatorial, quando os fatores em questão são quantitativos.

Os dados de crescimento podem ser preditos a partir da superfície de resposta tridimensional (3D) das diferentes variáveis analisadas. Nas Figuras 1 e 2, a superfície de resposta (3D) mostra o efeito de diferentes combinações de reguladores de crescimento BAP e ANA no comprimento da parte aérea (CPA), número de brotações (NB), comprimento de raiz (CR), biomassa seca de caule (BSC), biomassa seca de folhas (BSF), biomassa seca de raiz (BSR), biomassa seca de calos (BSCALOS) e biomassa seca total (BST).

As parcelas da superfície de resposta ilustram a magnitude dos valores de resposta dos reguladores de crescimento (BAP e ANA) com os parâmetros de crescimento (CPA, NBROT, CR, BSC, BSF, BSR, BSCALOS, BSTsemcalos, BST). Os índices de subida mais íngremes implicam que o valor da resposta teve um efeito maior nos parâmetros de crescimento na variável NBROT, no entanto, de maneira geral, todas as variáveis analisadas apresentaram respostas decrescentes para as diferentes combinações analisadas. Observa-se que os maiores valores foram encontrados sob baixas dosagens de BAP, independente de ANA para as variáveis CPA e CR (FIGURAS 1A e C) e BSC, BSF e BSR (FIGURAS 2A - C).

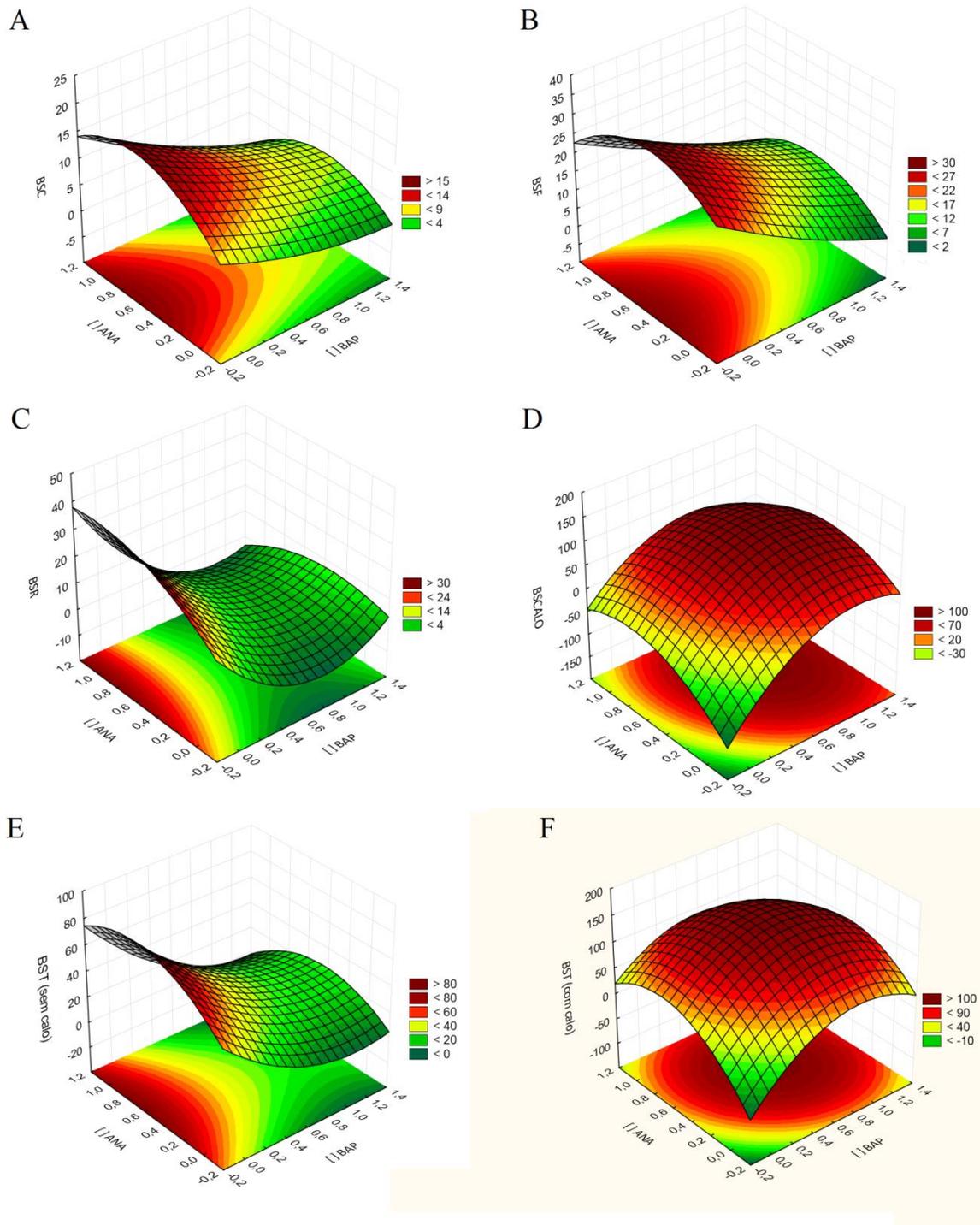
Figura 1-Análise de superfície de resposta no crescimento *in vitro* de *Lippia gracilis* cultivada em meio MS com metade da concentração de sais, durante 30 dias suplementados com diferentes doses de BAP x ANA. A: Comprimento da parte área (CPA); B: Número de brotações (NB); C: comprimento de raiz (CR).



Fonte: Do autor (2017)

As auxinas promovem a divisão celular, alongamento e diferenciação celular, e também são as responsáveis pela dominância apical nas plantas (TAIZ; ZEIGER, 2017), além de desempenharem papel fundamental no desenvolvimento no crescimento de órgãos, especialmente as raízes (ROSSI; SARTORETTO, 2013). Portanto era esperada essa superioridade nesses parâmetros (CPA e CR) para os tratamentos em que a dosagem de ANA era maior do que a de BAP.

Figura 2- Análise de superfície de resposta no crescimento *in vitro* de *Lippia gracilis* cultivada em meio MS com metade da concentração de sais, durante 30 dias suplementados com diferentes doses de BAP x ANA. A: Biomassa seca de caule (BSC); B: Biomassa seca de folhas (BSF); C: Biomassa seca de raiz (BSR); D: Biomassa seca de calos (BSCalos) e E: Biomassa seca total sem calos (BSTsem calos); F: Biomassa seca total (BST).



Fonte: Do autor (2017)

Observou-se redução de todos os parâmetros, com exceção para NB, BSCALO e BST, à medida que a dosagem de BAP aumentou. As citocininas são fitohormônios responsáveis pelo controle da divisão e diferenciação celular e formação de gemas caulinares. Atuam também na quebra da dominância apical, levando a uma consequente redução no comprimento das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2017), corroborando com os dados observados no presente estudo, onde houve redução para esses parâmetros à medida que as concentrações de BAP aumentaram (FIGURA 1A).

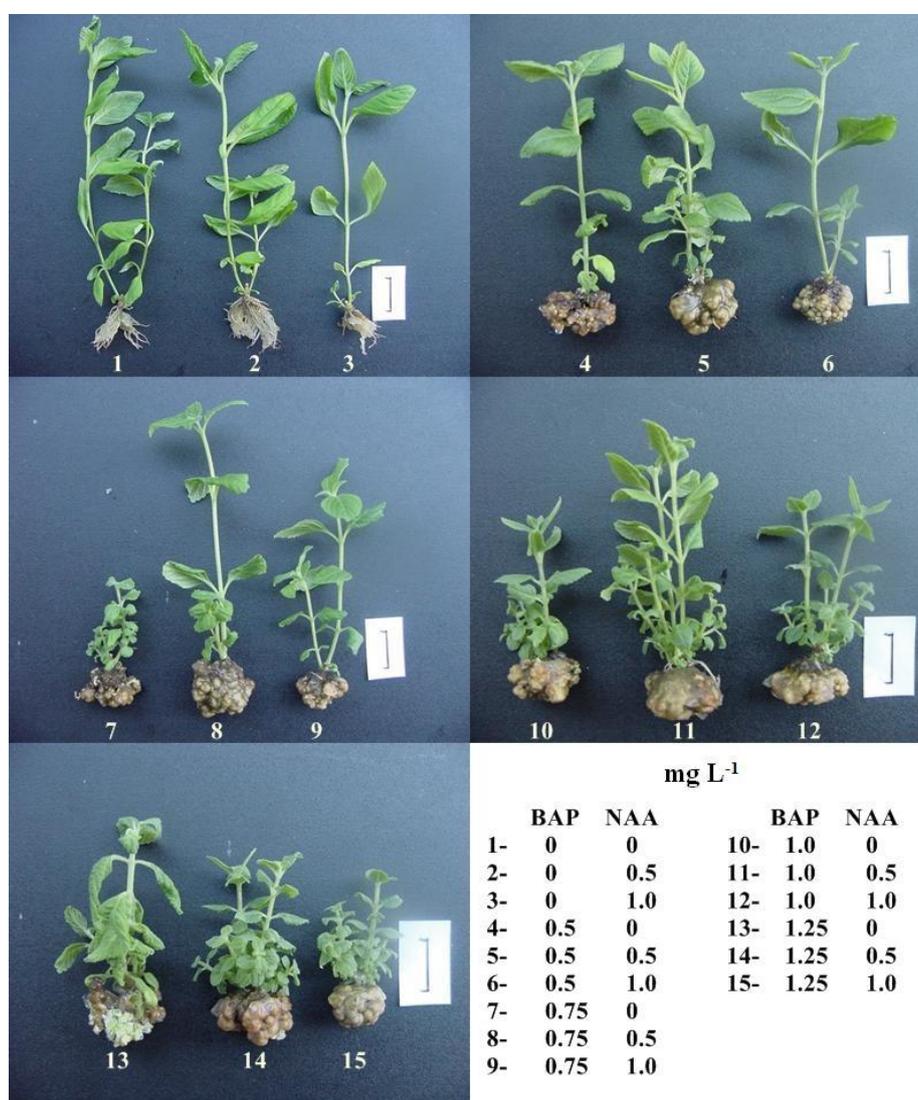
Foi encontrado maior número de brotações axilares nas maiores doses de BAP x ANA (FIGURA 1B). Auxinas e citocininas são dois tipos de reguladores de crescimento que são frequentemente utilizados para induzir a morfogênese em plantas, e que são utilizados conjuntamente para estimular brotações (SJAHRIL et al., 2016). Vale ressaltar que os níveis ideais de reguladores de crescimento para estimular a maior quantidade de brotos é uma resposta espécie-específica, e deve ser analisada caso a caso. Segundo Abgariani Colombo et al. (2010) no cultivo *in vitro*, o uso e a combinação de reguladores de crescimento são necessários para compensar as deficiências dos níveis hormonais endógenos, uma vez que os explantes são isolados das plântulas que suprem essas necessidades. O fato de haver um aumento do número de brotações com o aumento das concentrações de BAP e ANA, evidencia a importância de estabelecer a proporção adequada de auxina e citocinina que parece ser benéfica para a produção de múltiplos brotos (DE JESUS RODRIGUES et al., 2016).

Todas as combinações de reguladores de crescimento avaliadas nesse experimento promoveram a formação de calos na base do explante (FIGURA 3). Segundo a análise de superfície de resposta, as concentrações intermediárias de BAP e ANA resultaram no maior efeito sobre a biomassa seca de calos e total (FIGURA 2D e F). O comportamento similar da superfície de resposta tridimensional das duas variáveis (BSCALOS e BST) é devido à biomassa seca de calos, ser muito superior as de folha, caule e raiz, fazendo com que a biomassa seca total, adquira a mesma característica de resposta que a de calos. Pode-se observar que quando a biomassa seca de calos não é contabilizada a BST apresenta comportamento similar das outras variáveis na análise de superfície de resposta, onde houve maior acúmulo de massa seca sob baixas dosagens de BAP (FIGURA 2E).

Resultados similares foram encontrados por Andrade et al. (2017), avaliando diferentes doses de BAP e ANA no cultivo *in vitro* de *Hyptis suaveolens*, também encontraram produção de calos em todas as combinações testadas, enquanto no

tratamento controle, sem a presença de reguladores, não foi encontrada formação de calos. A combinação de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP no meio MS promoveram maior número de brotações e comprimento da parte aérea para *Chrysanthemum morifolium* (SJAHRIL et al., 2016). Para *Caesalpinia pyramidalis*, a utilização de reguladores de crescimento, BAP e ANA reduziu o número de brotações, número de folhas, comprimento da parte aérea e matéria seca da parte aérea (DOS SANTOS SILVA et al., 2013).

Figura 3- Aspecto visual das plântulas de *Lippia gracilis* aos 30 dias, cultivadas *in vitro* sob diferentes doses de BAP e ANA.



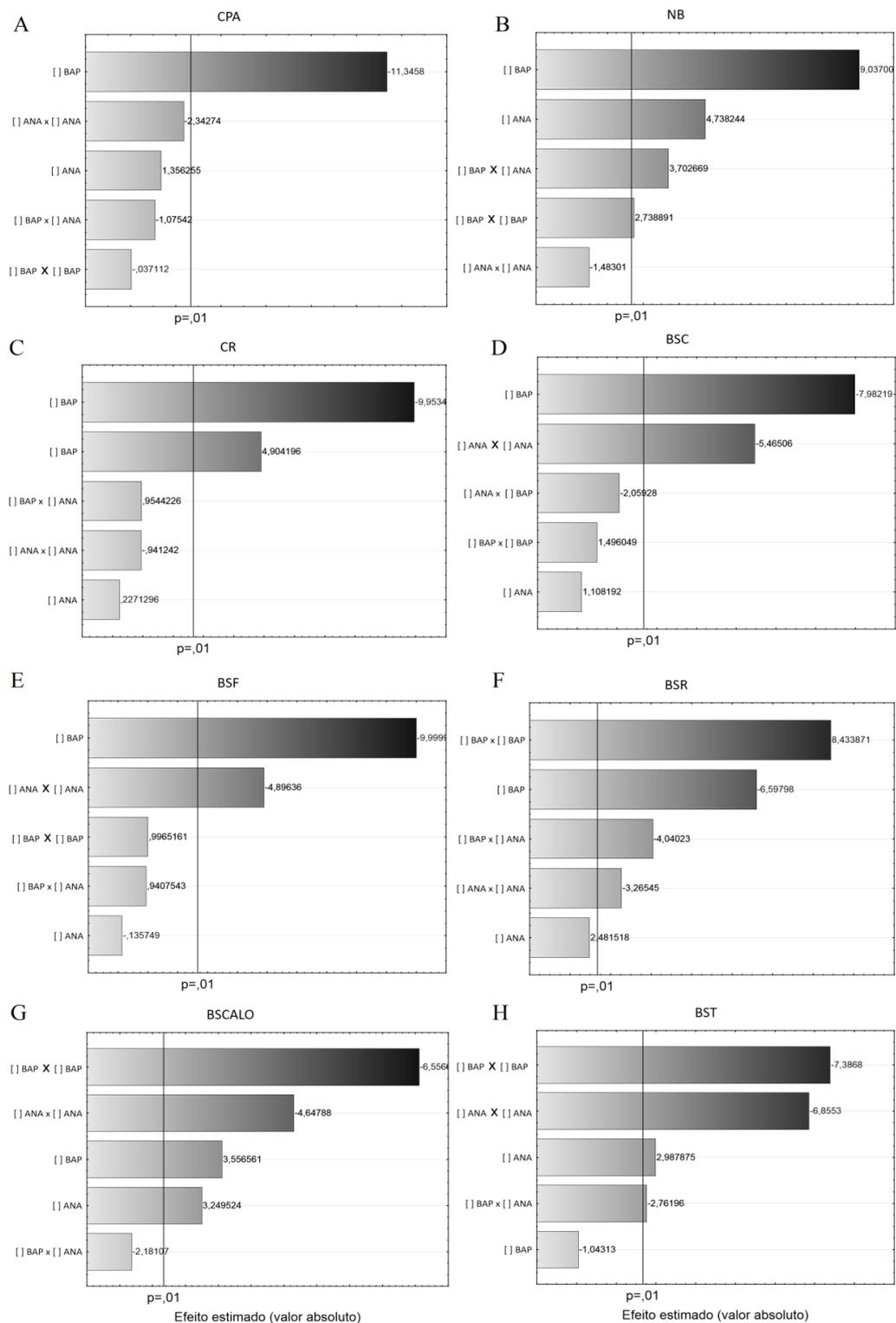
Fonte: Do autor (2017).

3.2 Definição de fatores prioritários pela análise de Pareto

Fatores prioritários foram utilizados para definir qual regulador de crescimento afetou majoritariamente os parâmetros avaliados no cultivo *in vitro* de *Lippia gracilis*. O gráfico de Pareto dos coeficientes padronizados correspondentes a variável independente e suas interações com significância estatística ($p < 0,01$) foram aplicados para investigar a contribuição relativa dos reguladores de crescimento testados (FIGURA 4)

Pode-se observar que somente o BAP influenciou negativamente, o comprimento da parte aérea, comprimento de raiz e biomassa seca de caule, folhas e raízes da *L. gracilis*, cultivada sob diferentes combinações de reguladores de crescimento, não havendo influência significativa do ANA para essas variáveis. Os dois reguladores de crescimento afetaram significativamente e positivamente o número de brotações e biomassa seca de calos, com contribuição maior do BAP em relação ao ANA para essas variáveis. Vale ressaltar que a combinação dos dois reguladores de crescimento influenciaram diretamente na calogênese, devido a contribuição positiva que os dois reguladores exerceram sobre esse parâmetro (FIGURA 4D). Com relação à biomassa seca total somente o ANA teve efeito positivo. Estes gráficos apresentam os valores absolutos dos efeitos estimados para cada variável estudada, bem como suas interações, levando em consideração o erro padrão. O fator BAP, ao nível de 99% de confiança, teve maior destaque negativo nos resultados da maioria das variáveis testadas.

Figura 4- Gráfico de pareto dos efeitos calculados dos reguladores de crescimento para as variáveis comprimento da parte aérea (CPA), número de brotações (NB), comprimento de raiz (CR), biomassa seca de caule (BSC), biomassa seca de folha (BSF), biomassa seca de raiz (BSR), biomassa seca de calos (BSCalos) e biomassa seca total (BST). A linha vertical define 99% do intervalo de confiança.



Fonte: Do autor (2017).

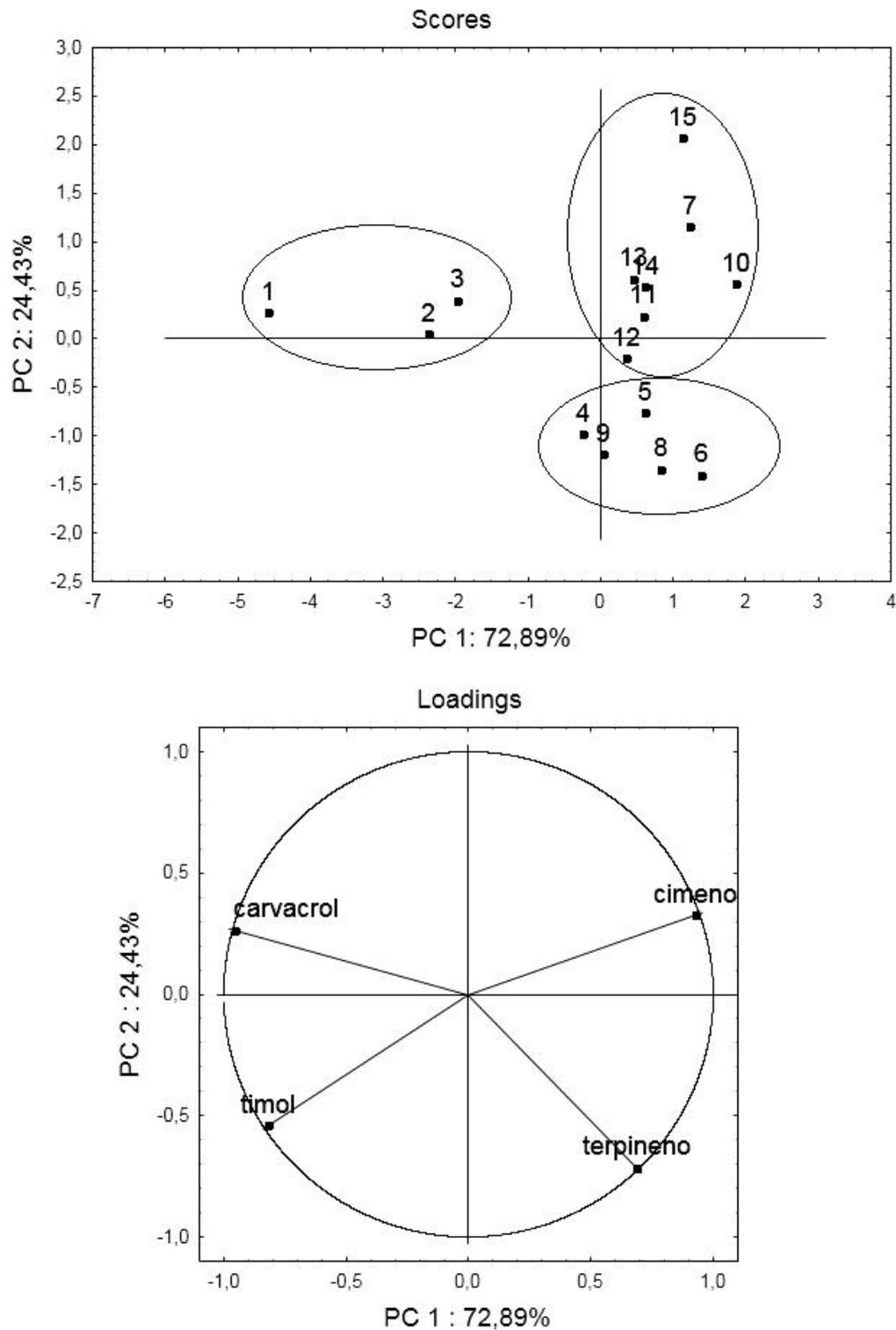
3.3 Análise química da fração volátil

As diferentes combinações de reguladores de crescimento, BAP e ANA, afetaram a composição química volátil das plântulas de *Lippia gracilis*. A composição química consistiu em monoterpenos (93,39 – 97,17%) e sesquiterpenos (2,56 – 6,55%). Além disso, 11,47 – 26,07% dos monoterpenos foram hidrocarbonetos, 0,65 – 1,43% monoterpenos oxigenados e 68,76 – 82,19% monoterpenos aromáticos. Os sesquiterpenos identificados (*E*-cariofileno, α -bulneseno e β -bisaboleno) pertenceram apenas ao tipo hidrocarboneto. Os constituintes majoritários foram γ -terpineno, p -cimeno, timol e carvacrol, independente das condições de cultivo totalizando 83,06 a 88,77% da composição química total.

Os efeitos dos reguladores de crescimento na produção de metabólitos secundários são variáveis. Podem ser verificadas alterações apenas no rendimento ou no teor desses compostos. Os reguladores de crescimento influenciam o crescimento e desenvolvimento das plantas, afetando processos fisiológicos e bioquímicos, ou até mesmo podem atuar na regulação de genes, portanto há várias maneiras pelas quais a utilização desses compostos podem afetar a produção de metabólitos secundários (PRINS et al., 2010). Ontogenia, taxa fotossintética, fotoperíodo, qualidade de luz, mudanças climáticas, nutrição, umidade, salinidade temperatura, estruturas de armazenamentos e reguladores de crescimento são fatores que afetam quantitativa e qualitativamente a produção de metabólitos secundários (SANGWAN et al., 2001).

Observa-se pela análise dos componentes principais (PCA) dos quatro compostos químicos majoritários um ajuste de 97,32% (PC_1+PC_2). PCs separou os tratamentos em três grupos, onde é possível observar que *L. gracilis* quando cultivada em meio sem a suplementação de regulador de crescimento acumulou maior teor de carvacrol e timol. O explante cultivado em meio com dosagens de BAP superior a 1,0 mg L⁻¹ apresentou maior teor de p -cimeno e abaixo de 0,75 mg L⁻¹ maior teor de γ -terpineno (FIGURA 5). A análise de loading permitiu observar que carvacrol e timol apresentaram correlação negativa com γ -terpineno e p -cimeno.

Figura 5- Análise dos componentes principais (PCA) na correlação matricial construída usando dados para quatro compostos majoritários sob diferentes doses de reguladores de crescimento (BAP x ANA) de *Lippia gracilis*. No gráfico de score os valores numéricos de 1 a 15 referem-se aos tratamentos conforme indicado na Figura 3.



Fonte: Do autor (2017).

Os dados confirmam que há uma conversão de um composto para outro. Segundo Crocoll (2011) e Poulou e Croteau (1978), esses constituintes são precursores do carvacrol, e provavelmente houve maior conversão desses elementos sob essas condições de cultivo, ou seja, sem nenhum regulador de crescimento. Por outro lado, a medida que os reguladores iam sendo utilizados houve aumento do teor total dos monoterpenos hidrocarbonados, devido principalmente ao aumento nos níveis de γ -terpineno. Diversos trabalhos relatam a influência dos reguladores de crescimento na produção de óleo essencial e na composição química do tecidos *in vitro*. Santos-Gomes e Fernandes-Ferreira (2003) observaram aumento do óleo essencial de *Salvia officinalis* no meio de cultivo com cinetina. *Thymus vulgaris* cultivada *in vitro* aumentou de maneira significativa os compostos voláteis, incluindo o timol, em 315% (AFFONSO et al., 2009).

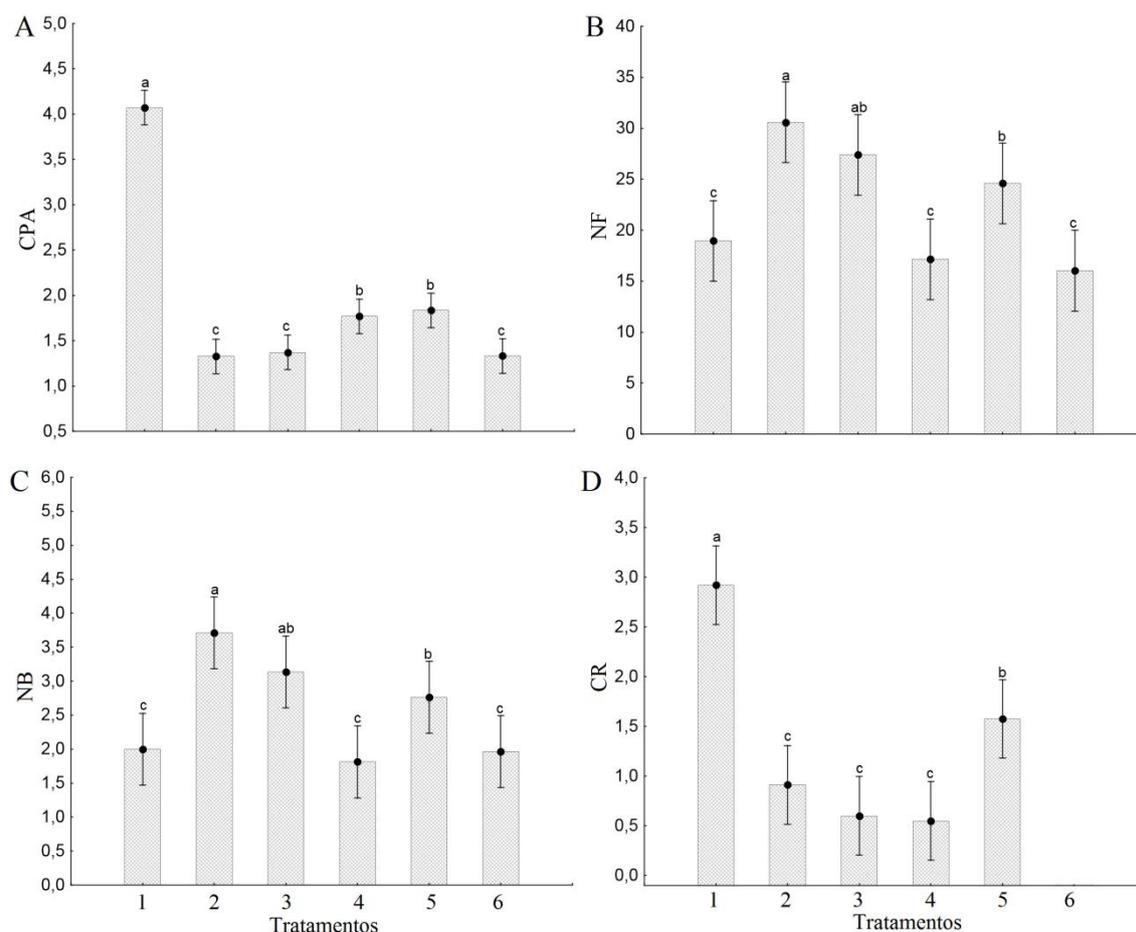
3.4 Crescimento do explante com BAP X TDZ

Na Figura 7 observa-se os segmentos nodais de *Lippia gracilis* cultivados *in vitro* sob diferentes combinações de BAP + TDZ e as respostas morfogênicas (Figura 6). Para testar se diferentes composições de reguladores de crescimento no meio de propagação influencia a proliferação de brotos axilares de *L. gracilis*, segmentos nodais obtidos de plântulas *in vitro* foram transferidos para a metade da concentração de MS suplementado com diferentes combinações de BAP + TDZ. Após 30 dias em cultura a resposta foi avaliada. Os resultados mostraram que os meios suplementados com BAP + TDZ foram mais efetivos em promover o desenvolvimento de brotos do que aquele sem regulador de crescimento. O meio contendo BAP + TDZ produziu múltiplos brotos. O máximo número de múltiplos brotos (3,71) foi obtido no meio contendo 0,25BAP+0,25TDZ (Figura 6C). A indução de múltiplos brotos não pode ser observada no meio sem regulador de crescimento, apenas o crescimento dos brotos axilares. E o meio suplementado com o regulador de crescimento inibiu o alongamento das brotações, número de folhas e comprimento de raiz e induziu a formação de calos na base dos segmentos nodais (Figura 6A, B e D).

Segundo Sjahril et al. (2016) diferentes concentrações de reguladores de crescimento podem inibir o crescimento das plantas, ou até mesmo, ser tóxico para as plântulas, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo em que houve redução do crescimento com as diferentes combinações de reguladores. Esses

mesmos autores sugerem que a interação desses reguladores adicionados ao meio e os produzidos endogenamente determinam a velocidade e direção do desenvolvimento de uma cultura.

Figura 6- Crescimento *in vitro* de *Lippia gracilis* cultivada em meio MS com metade da concentração de sais, durante 30 dias suplementadas com diferentes doses de BAP x TDZ (1) 0,0 BAP x 0,0 TDZ; (2) 0,25 BAP X 0,25 TDZ; (3) 0,30 BAP X 0,20 TDZ; (4) 0,20 BAP X 0,30 TDZ; (5) 0,10 BAP X 0,40 TDZ; (6) 0,40 BAP X 0,10 TDZ mg L⁻¹. A: Comprimento da parte aérea (CPA); B: Número de folhas (NF); C: Número de brotos (NB) D: Comprimento da raiz (CR).



Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente no nível de 5% pelo teste Duncan. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: Do autor (2017).

Segundo Diengnan e Murthy (2014) o TDZ é mais eficiente na regeneração de brotos, porém os seus efeitos dependem não somente da sua concentração no meio de cultivo, mas também é uma resposta espécie-específica. As citocininas, até determinadas concentrações, podem estimular a produção de múltiplas brotações, pois exercem influência na divisão celular e na quebra de dormência das gemas axilares,

inibidas pela dominância apical (MONFORT et al., 2012). Os dados encontrados no presente estudo podem ter sido prejudicados pelo fato de que as diferentes combinações de reguladores utilizadas favoreceram a calogênese, interferindo diretamente no desenvolvimento de brotos e parte aérea.

Figura 7- Aspecto visual das plântulas de *Lippia gracilis* aos 30 dias, suplementados com diferentes doses de BAP X TDZ (T1: 0 BAP X 0 TDZ; T2: 0,25 BAP X 0,25 TDZ; T3: 0,3 BAP X 0,2 TDZ; T4: 0,2 BAP X 0,3 TDZ; T5: 0,1 BAP X 0,4 TDZ; T6: 0,4 BAP X 0,1 TDZ mg L⁻¹).

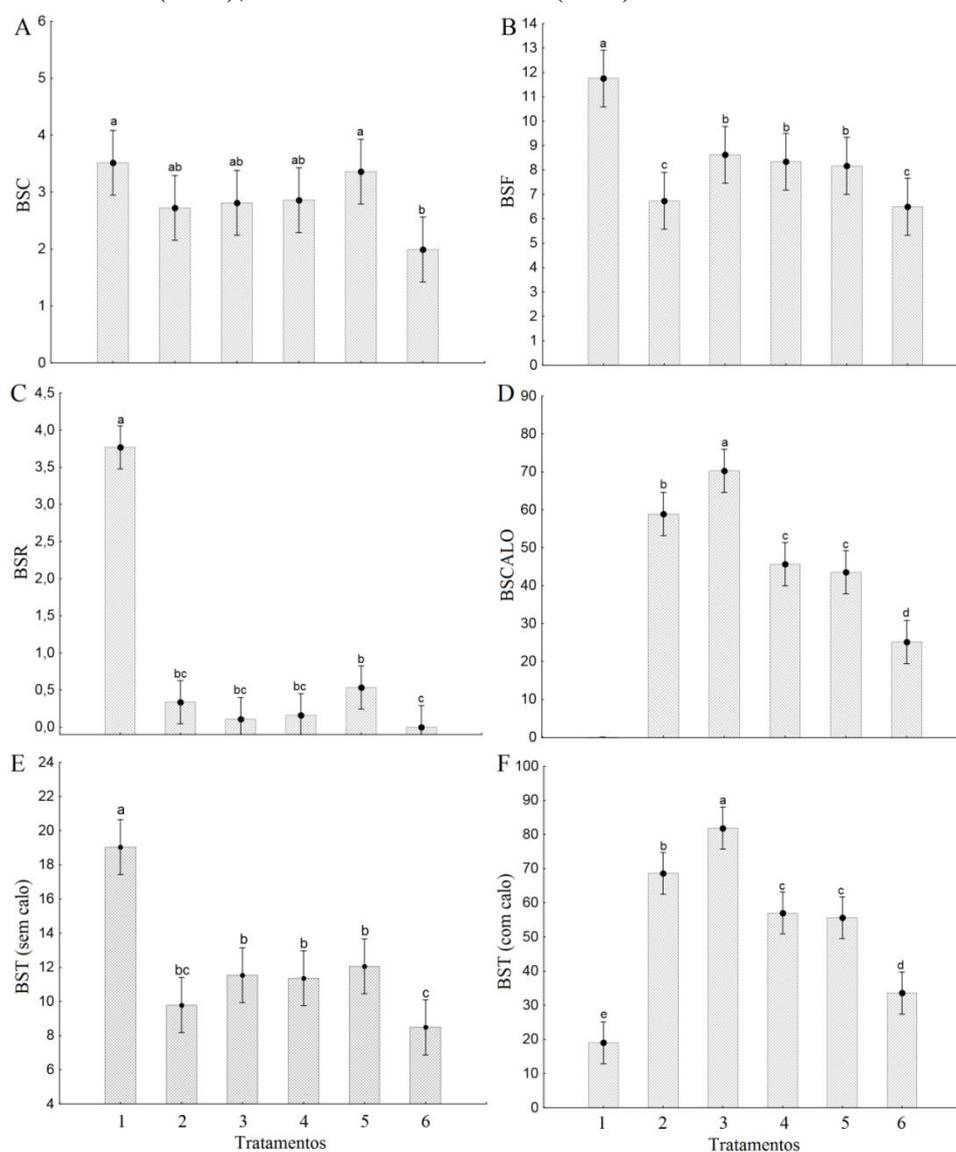


Fonte: Do autor (2017).

O BAP mostrou-se mais eficiente que o TDZ para o desenvolvimento de brotos e para o número de folhas em *Simmondsia chinensis*, enquanto o TDZ teve maior participação na calogênese em relação ao BAP (TAHA et al., 2016). Amali et al. (2014) utilizando uma combinação de BAP e TDZ de 1,0 mg L⁻¹ cada, encontraram efeito sinérgico desses reguladores na proliferação de brotos para *Sorghum bicolor*. Para *Boucerosia umbellata* cultivadas *in vitro* com 2 mg L⁻¹ BAP e 1 mg L⁻¹ TDZ apresentaram resposta máxima para a indução de múltiplos brotos e maior comprimento de parte aérea em relação a outras combinações de reguladores testadas (SUSHEELA et al., 2016).

Em geral, a suplementação de BAP+TDZ para proliferação de brotos resultou em uma redução significativa na biomassa das brotações (Figura 8), e o meio sem a suplementação dos reguladores de crescimento promoveu maior acúmulo de biomassa seca. Nesta espécie foi observado que mesmo baixas concentrações de regulador de crescimento induzem a formação de calos na base do segmento nodal. A concentração total de BAP+TDZ não ultrapassou 0,5 mg L⁻¹.

Figura 8- Crescimento *in vitro* de *Lippia gracilis* cultivada em meio MS com metade da concentração de sais, durante 30 dias suplementados com diferentes doses de BAP x TDZ (1) 0,0 BAP x 0,0 TDZ; (2): 0,25 BAP X 0,25 TDZ; (3) 0,30 BAP X 0,20 TDZ; (4) 0,20 BAP X 0,30 TDZ; (5) 0,10 BAP X 0,40 TDZ; (6) 0,40 BAP X 0,10 TDZ. A: Biomassa seca de caule (BSC); B: Biomassa seca de folhas (BSF); C: Biomassa seca de raízes (BSR); D: Biomassa seca de calos (BSC); E: Biomassa seca total (BST).



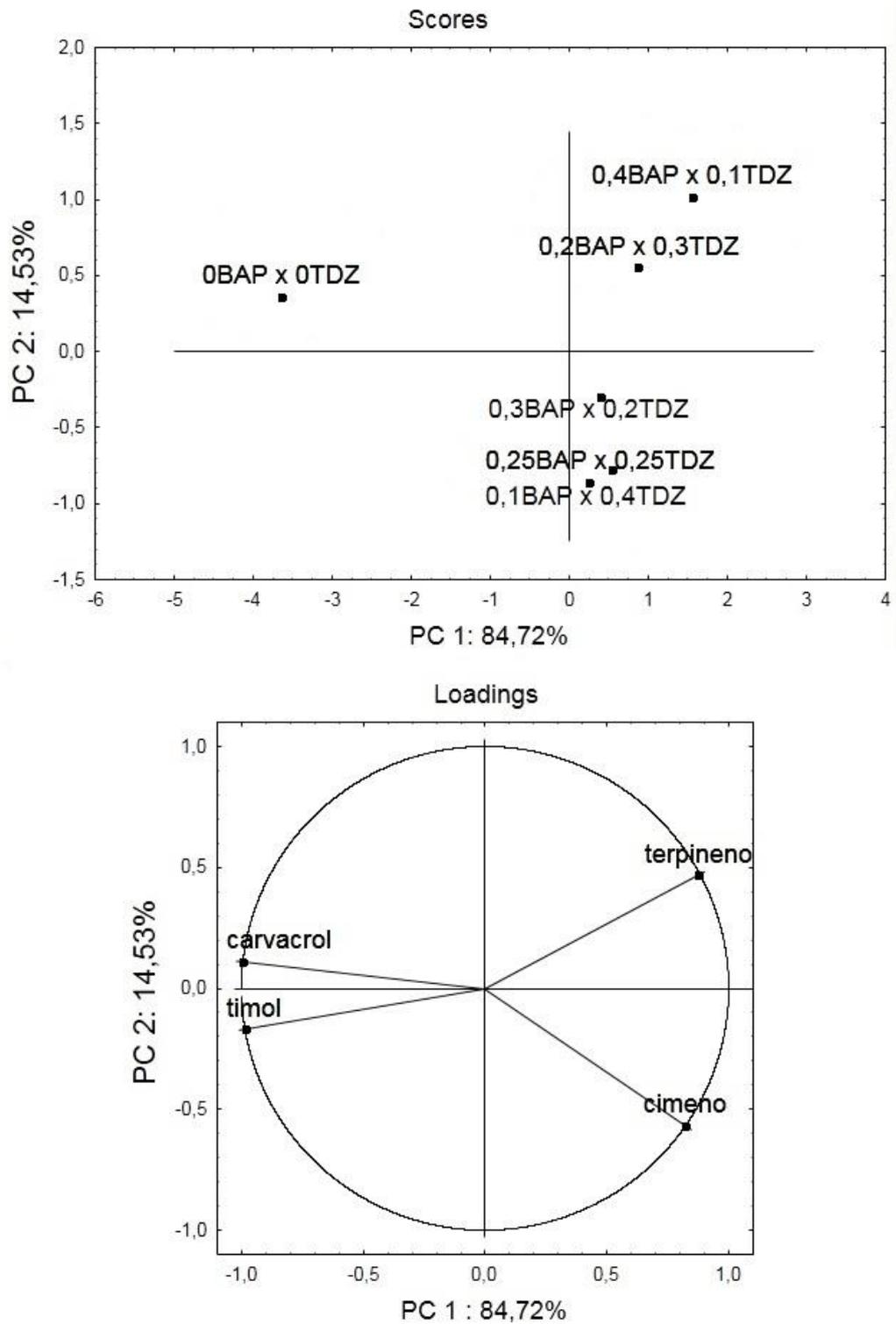
Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente no nível de 5% pelo teste Tukey.
Fonte: Do autor (2017).

Analisando a biomassa seca total com os calos, o meio sem RC foi menor devido a grande contribuição da formação de calos nos meios suplementados com BAP+TDZ (Figura 8F). Sem contabilizar a biomassa seca dos calos o meio sem RC acumulou maior biomassa seca total (Figura 8E). Resultados similares foram encontrados por Dos Santos Silva et al. (2013), avaliando a adição de diferentes reguladores de crescimento no cultivo *in vitro* de *Caesalpinia pyramidalis*, encontraram maiores médias para a matéria seca da parte aérea no meio sem regulador de crescimento. *Annona glabra* apresentou maior acúmulo de matéria seca no cultivo *in vitro* quando era utilizado BAP em relação ao TDZ (OLIVEIRA et al., 2007). Grzegorzczuk-Karolak et al. (2015), avaliando o efeito de diferentes citocininas no cultivo *in vitro* de *Scutellaria alpina*, relataram maior efetividade na proliferação de brotos e produção de biomassa quando foi utilizado o BAP em relação ao TDZ.

3.5 Análise química da fração volátil

As diferentes combinações de reguladores de crescimento, BAP e TDZ, afetaram a composição química volátil das plântulas de *Lippia gracilis* (TABELA 1). A composição química consistiu em monoterpenos (94,5 – 96,44%) e sesquiterpenos hidrocarbonetos (3,14 – 5,25%). Os monoterpenos foram representados por 18,56 – 32,7% de hidrocarbonetos; 0,73 – 1,76% de oxigenados e 63,01 – 76,44% de aromáticos. O sesquiterpeno hidrocarboneto foi representado pela presença única de *E*-cariofileno. Os constituintes majoritários foram γ -terpineno, *p*-cimeno, timol e carvacrol, independente das condições de cultivo totalizando 81,58 a 87,79% da composição química total. Tais constituintes também foram observados por outros autores para a espécie estudada (DE OLIVEIRA CRUZ et al., 2013; NETO et al., 2010; DOS SANTOS et al., 2016; FERRAZ et al., 2013).

Figura 9 - Análise dos componentes principais (PCA) na correlação matricial construída usando dados para quatro compostos majoritários sob diferentes doses de reguladores de crescimento (BAP x TDZ) de *Lippia gracilis*. No gráfico de escore os valores numéricos referem-se as dosagens dos reguladores de crescimento utilizadas nos experimentos.



Fonte: Do autor (2017).

Observa-se pela análise dos componentes principais (PCA) dos quatro compostos químicos majoritários um ajuste de 99,25% ($PC_1 + PC_2$). É possível observar que *L. gracilis* cultivada em meio sem a suplementação de regulador de crescimento acumulou maior teor de carvacrol e timol. O explante cultivado em meio com a maior dosagem de BAP ($0,4 \text{ mg L}^{-1}$) e menor de TDZ ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) apresentaram maior teor de γ -terpineno. Enquanto na maior dosagem de TDZ ($0,4 \text{ mg L}^{-1}$) e menor de BAP ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) houve maior acúmulo de ρ -cimeno (Figura 9). A análise de PCA permitiu observar que carvacrol apresentou uma correlação negativa com γ -terpineno. Os dados confirmam que há uma conversão de γ -terpineno para carvacrol como reportado por Crocoll (2011). O timol teve uma correlação negativa com o ρ -cimeno.

Estudos prévios relatam a influencia do uso de fitohormônios, na fração volátil de algumas espécies. A utilização de reguladores de crescimento afetou significativamente a produção de metabolitos secundários no cultivo *in vitro* de *Aconitum violaceum* (RAWAT et al., 2013). Diferentes tipos e concentrações de citocininas afetaram significativamente o acúmulo de metabolitos secundários com ação antioxidante em *Scutellaria alpina* cultivada *in vitro* (GRZEGORCZYK-KAROLAK et al., 2015). A utilização de TDZ no meio de cultivo promoveu redução nos níveis de compostos bioativos de *Hypericum hirsutum* e *Hypericum maculatum* cultivadas *in vitro* (COSTE et al., 2011).

4 CONCLUSÕES

A utilização de reguladores de crescimento afetou o crescimento, desenvolvimento e produção de compostos voláteis de *L. gracilis* cultivada *in vitro*.

As combinações de reguladores de crescimento testadas estimularam a brotação axilar e a calogênese na base do explante.

O meio suplementado com BAP x ANA também pode ser predito a partir da superfície de resposta tridimensional (3D).

Maior teor de carvacrol foi encontrado no meio sem regulador de crescimento.

REFERÊNCIAS

ABGARIANI COLOMBO, Larissa et al. Estabelecimento de protocolo para multiplicação *in vitro* de Bastão-do-imperador (*Etilingera elatior*) Jack RM Sm. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 4, Dec. 2010.

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**, 4th ed. Allured 324 Publishing Corporation, Carol Stream, 804p., 2007.

AFFONSO, Vanessa Ribeiro et al. Influence of growth regulators in biomass production and volatile profile of *in vitro* plantlets of *Thymus vulgaris* L. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 57, n. 14, p. 6392-6395, Jul. 2009.

AMALI, P. et al. Direct regeneration potential of *Sorghum bicolor* (L.) Moench under the influence of plant growth regulators. **Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol**, Kannankurichi, v. 15, p. 118-126, 2014.

ANDRADE, H. B. et al. Effect of plant growth regulators, light intensity and LED on growth and volatile compound of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit *in vitro* plantlets. **Acta Hort.** The Hague, v.1155, p. 277-284, Mar. 2017.

CARNEIRO, Fernanda Melo et al. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: Sociedade, Saberes e Práticas Educacionais**, Iporá, v. 3, n. 2, p. 44-75, Dez. 2014.

COSTE, Ana et al. Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, London, v. 106, n. 2, p. 279-288, Aug. 2011.

CROCOLL, Christoph. **Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme**. 2011. Tese de Doutorado. Jena, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Diss., 2011.

CUSTÓDIO, T. N.; MORAIS, A.R. de; MUNIZ, J. A.. Superfície de resposta em experimento com parcelas subdivididas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, p. 1008-1023, Out./Dez. 2000.

DAVIES, Kevin M.; DEROLE, Simon C. Prospects for the use of plant cell cultures in food biotechnology. **Current opinion in biotechnology**, London, v. 26, p. 133-140, Apr. 2014.

DE JESUS RODRIGUES, Antonio Anderson; DE OLIVEIRA SANTOS, Eder; DE CARVALHO, Ana Cristina Portugal Pinto. Photoperiod and growth regulators on *in vitro* shoot induction in *Heliconia latispatha*. **Ornamental Horticulture**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 343-349, 2016.

- DE OLIVEIRA CRUZ, Elizangela Mércia et al. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus*. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 195, n. 1, p. 198-202, Jul. 2013.
- DE OLIVEIRA, Kívia Soares; DE MORAIS FREIRE, Fúlvio Aurélio; ALOUFA, Magdi Ahmed Ibrahim. Efeito de 6-benzilaminopurina e ácido naftalenoacético sobre a propagação *in vitro* de *Hancornia speciosa*. **FLORESTA**, Curitiba, v. 46, n. 3, p. 335-342, Jul./Set. 2016.
- DIENGGAN, S.; MURTHY, B. N. S. Influence of plant growth promoting substances in micropropagation of strawberry cv. festival. **The Bioscan**, Sochi, v. 9, n. 4, p. 1491-1493, 2014.
- DOOL, H.V.; KRATZ, P.D. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-352 liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.11, p. 463-467, 1963.
- DOS SANTOS SILVA, Tecla et al. *In vitro* multiplication of *Caesalpinia pyramidalis* (Leguminosae). **SITIENIBUS série Ciências Biológicas**, Feira de Santana, v. 13, Dec. 2013.
- DOS SANTOS, Clesivan Pereira et al. Harvest time and geographical origin affect the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Industrial Crops and Products**, London, v. 79, p. 205-210, Jan. 2016.
- FERRAZ, Rosana PC et al. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 20, n. 7, p. 615-621, May 2013.
- FERREIRA, Edilene Cristina et al. Análise exploratória dos teores de constituintes inorgânicos em sucos e refrigerantes de uva. **Eclética Química**, Araraquara, v. 27, n. 1es, 2002.
- GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, Araraquara, v. 36, n. 1, p. 64-77, 2011.
- GRZEGORCZYK-KAROLAK, Izabela; KUŹMA, Łukasz; WYSOKIŃSKA, Halina. The effect of cytokinins on shoot proliferation, secondary metabolite production and antioxidant potential in shoot cultures of *Scutellaria alpina*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, London, v. 122, n. 3, p. 699-708, Sep. 2015.
- HARTMANN, Hudson T.; KESTER, Dale E.; DAVIES, JÚNIOR. FT; GENEVE, RL **Plant propagation: principles and practices**. 2002.
- LAMAS, F.M. Reguladores de Crescimento. In: Embrapa Agropecuária Oeste. Algodão: tecnologia de produção. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Embrapa Algodão. **Boletim técnico**. 296p. 2001.
- LIU, Yanqing; WANG, Hongwu; CAI, Xuan. Optimization of the extraction of total flavonoids from *Scutellaria baicalensis* Georgi using the response surface

methodology. **Journal of food science and technology**, Mysore, v. 52, n. 4, p. 2336-2343, Apr. 2015.

LORENZI, Harri; MATOS, Francisco J.; FRANCISCO, J. Matos. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2002.

MONFORT, L. E. F. et al. Effect of BAP on *in vitro* culture of *Ocimum selloi* Benth. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 14, n. 3, p. 458-463, 2012.

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

NETO, Renato et al. The essential oil from *Lippia gracilis* Schauer, Verbenaceae, in diabetic rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 261-266, Apr./May 2010.

NIST National Institute of Standards and Technology—Chemistry Web Book <http://webbook.nist.gov/chemistry>. 412. (2008) Accessed 10 Jan 2017.

OLIVEIRA, LM de et al. Efeito de citocininas na senescência e abscisão foliar durante o cultivo *in vitro* de *Annona glabra* L. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 29, n. 1, p. 25-30, Abr. 2007.

POULOSE, A. J.; CROTEAU, Rodney. Biosynthesis of aromatic monoterpenes: conversion of γ -terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 187, n. 2, p. 307-314, Apr. 1978.

PRINS, Cláudia L.; VIEIRA, Ivo JC; FREITAS, Silvério P. Growth regulators and essential oil production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 22, n. 2, p. 91-102, 2010.

RAMAWET, K.; MERRILION, J. Biotechnology – secondary metabolites. **Mohan Primlani for Oxford and YBH**, Delhi, p. 243–247, 1999.

RAWAT, Janhvi Mishra et al. Influence of plant growth regulators on indirect shoot organogenesis and secondary metabolite production in *Aconitum violaceum* Jacq. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 12, n. 44, p. 6287-6293, Oct. 2013.

RIBEIRO, C.S.N.; SILVA, H.; CARVALHO, J.M.F.C. Efeito do tiadiazuron na micropropagação *in vitro* de dois genótipos de mamona via organogênese. **Rev Bras Eng Agrícola e Ambient**. Campina Grande, v. 14, p. 366–371, 2010.

RODRIGUES, Osmar et al. **Redutores de crescimento**. Embrapa Trigo, 2003.

ROSSI, E.; SARTORETTO, L. M. Propagação *in vitro* da farinha-seca. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 73, p. 45-52, Kan./Mar. 2013.

- SAKAKIBARA, H.; TAKEI, K.; HIROSE N. Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. **Trend Plant Sci.** Cambridge, v. 11, p. 440-448, Sep. 2006.
- SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant growth regulation**, Dordrecht, v. 34, n. 1, p. 3-21, May 2001.
- SANTOS-GOMES, P.C.; FERNANDES-FERREIRA, M. Essential oils produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 51, n. 8, p. 2260-2266, 2003.
- SILVA, Sâmia Torres et al. Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, London v. 129, n. 3, p. 501-510, Jun. 2017.
- SILVA, T. S. et al. Multiplicação *in vitro* de *Caesalpinia pyramidalis* (Leguminosae). **SITIENIBUS série Ciências Biológicas**, Feira de Santana, v. 13, p. 1-6, Dez. 2013.
- SJAHRIL, Rinaldi et al. Performance of NAA, 2iP, BAP and TDZ on Callus Multiplication, Shoots Initiation and Growth for Efficient Plant Regeneration System in Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). **International Journal of Agriculture System**, Makassar, v. 4, n. 1, p. 52-61, Jun. 2016.
- SUSHEELA, B.; RANI, S. S.; PULLAIAH, T. Effect of Cytokinins on *In vitro* Propagation of *Boucerosia umbellata* (Haw.) Wight & Arn. (Syn.: *Caralluma umbellata* Haw.) from Nodal Explants of Field Grown Plants. **British Biotechnology Journal**, Bangkok, v. 12, n. 2, p. 1, Feb. 2016.
- TAHA, Rania A. et al. A Comparative Study on Different Cytokinin Types and Carbon Source Concentrations on *In vitro* Proliferation of Jojoba (*Simmondsia chinensis* Link (Schneider)). **International Journal of ChemTech Research**, Mumbai, v. 9, n. 8, p. 178-184, 2016.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal 6ªed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2017.**