



**DIENE XAVIER ARAÚJO**

**CULTIVO *IN VITRO* DE *Aeollanthus suaveolens* MART. EX  
SPRENG. (LAMIACEAE): INTENSIDADE, QUALIDADE DE  
LUZ E SISTEMA DE VENTILAÇÃO NATURAL**

**LAVRAS – MG  
2018**

**DIENE XAVIER ARAÚJO**

**CULTIVO *IN VITRO* DE *Aeollanthus suaveolens* MART. EX SPRENG.  
(LAMIACEAE): INTENSIDADE, QUALIDADE DE LUZ E SISTEMA DE  
VENTILAÇÃO NATURAL**

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

Prof. PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto  
Orientador

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2018**

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

Araújo, Diene Xavier.

Cultivo *in vitro* de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng.  
(Lamiaceae): Intensidade, qualidade de luz e sistema de ventilação  
natural / Diene Xavier Araújo.- 2018.

70 p. : il.

Orientador: José Eduardo Brasil Pereira Pinto.

Coorientadora: Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Micropropagação. 2. Planta medicinal. 3. Luz. I. Pinto, José  
Eduardo Brasil Pereira. II. Bertolucci, Suzan Kelly Vilela. III.  
Título.

O conteúdo desta obra é de responsabilidade do(a) autor(a) e de seu orientador(a).

**DIENE XAVIER ARAÚJO**

**CULTIVO *IN VITRO* DE *Aeollanthus suaveolens* MART. EX SPRENG.  
(LAMIACEAE): INTENSIDADE, QUALIDADE DE LUZ E SISTEMA DE  
VENTILAÇÃO NATURAL**

**IN VITRO TISSUE CULTURE OF *Aeollanthus suaveolens* MART. EX SPRENG.  
(LAMIACEAE): INTENSITY, LIGHT QUALITY, AND NATURAL VENTILATION  
SYSTEM**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Mediciniais Aromáticas e Condimentares para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 23 de fevereiro de 2018.

Dra. Flávia Dionízio Pereira IFPI  
Dr. Manuel Losada Gavilanes UFLA  
Dr. Alexandre Alves de Carvalho UFLA

Prof . PhD. José Eduardo Brasil Pereira Pinto  
Orientador

Prof<sup>ª</sup>. Dra Suzan Kelly Vilela Bertolucci  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2018**

*Aos meus queridos pais Alcária e Dulcelino, e ao meu  
irmão João Carlos (IN MEMORIAM)*  
**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, razão maior de minha vida e fonte de minha força diária por ter permitido e me guiado pelos caminhos que me trouxeram até aqui.

Aos meus pais Alcília e Dulcelino pelo amor incondicional, paciência e por sempre me apoiarem em todas as minhas escolhas.

Aos meu irmãos Diogo, Andréa e João Carlos (*In memoriam*) pela paciência, por todo amor e por sempre me ajudar nos momentos mais difíceis.

Às minhas tias Marilene, Marilurdes, Aldacira e Suelina pelo apoio, conselhos, orações e por todo amor. Aos demais familiares pelo apoio e torcida para que tudo desse certo para chegar até aqui.

Aos meus amigos Tainá, Fernanda Naiara, Ana Paula, Carol, Pablo, Luiz, Lívia, Maria de Fátima, Raíssa, Marlon e Adriane por todo carinho e por me acolherem, proporcionando momentos divertidos que tornaram esses dois anos mais leves.

Aos meus amigos Arlete, Nayla, Natália, Noélia, Nailcy e Bismarck pelo carinho, incentivo, por se fazerem presentes me ouvindo e me dando forças para não desisti em nenhum momento.

Aos meus amigos da graduação Fernanda, Danielson, Bárbara, Camilla, Lisbethe, Marco e Luciana pelo apoio, carinho e por toda atenção.

À minha amiga Suzana e ao professor Marco Antônio que gentilmente forneceram o objeto de estudo deste trabalho.

Aos meus companheiros de classe da pós-graduação, especialmente pela convivência diária, compartilhamento de informações e momentos descontração.

Ao prof<sup>o</sup> José Eduardo e a prof<sup>a</sup> Suzan pelos ensinamentos e orientação. Ao professor Manuel Gavilanes pela atenção, orientação e pela disponibilidade. Aos técnicos, Evaldo, Paulo, Leandro (Dico), Giulia por toda ajuda.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

E a todos que participaram de forma direta e indireta na realização desse estudo, deixo os meus inestimáveis agradecimentos.

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO

A espécie *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. é uma medicinal que apresenta importantes propriedades terapêuticas como ação anticonvulsivante, sedativa, anti-inflamatória e antimicrobiana. Na literatura consultada não foram encontrados trabalhos relacionados ao cultivo *in vitro* dessa espécie. A micropropagação de plantas medicinais possui diversas vantagens em relação ao cultivo convencional, como a obtenção de material vegetal de alta qualidade e otimização na produção de metabólitos secundários. No entanto, é necessário conhecer como os fatores ambientais afetam o crescimento *in vitro* dessas espécies. Sendo assim, objetivou-se avaliar o efeito da intensidade, qualidade de luz e sistema de ventilação natural no crescimento e na produção de pigmentos fotossintéticos de *Aeollanthus suaveolens*. Realizaram-se três experimentos: No primeiro, utilizaram-se segmentos nodais, os quais foram cultivados sob as intensidades de 20, 57, 78, 102 e 139  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  obtidas com *Light Emitting Diodes* (LEDs). No experimento de qualidade de luz, segmentos nodais foram cultivados sob (LEDs) amarelo; branco; verde; azul; vermelho; 1 azul:2 vermelho; 2 azul:1 vermelho; 1 azul:1 vermelho e lâmpada fluorescente branca fria. No terceiro, cultivaram-se segmentos nodais sob sistema convencional (SC) e sistema de ventilação natural com uma (SVN1), duas (SVN2) e quatro membranas porosas (SVN4). Nos três experimentos, avaliaram-se o crescimento e a concentração de pigmentos fotossintéticos. As intensidades acima de 78  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proporcionaram um melhor crescimento da espécie, apresentando maior acúmulo de matéria seca, sobretudo na intensidade de 139  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Enquanto a produção de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b*, total e carotenoides) foram maiores sob 20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A luz verde proporcionou maior crescimento da parte aérea e maior comprimento de raiz. As plântulas cultivadas sob espectro branco LED tiveram maior número de folhas e raízes, maior produção de matérias secas de folha e de caule. A lâmpada fluorescente promoveu maior acúmulo de matéria seca de raiz e total. As plântulas cultivadas sob luz amarela tiveram maior produção de clorofila *a*, total e carotenoides. A maior concentração de clorofila *b* foi observada no cultivo sob luz branca Led. O sistema de ventilação natural com 4 membranas proporcionou maior valor para todos os parâmetros de crescimento avaliados (números de brotos, folhas e raízes e comprimentos da parte aérea da maior raiz). Em relação ao conteúdo de pigmentos fotossintéticos, o aumento na troca gasosa elevou a produção de pigmentos das plantas. As adequações de luminosidade e o sistema de ventilação natural são alternativas eficazes na propagação *in vitro* dessa espécie. Intensidades acima de 78  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , espectro de luz branco (obtido com lâmpadas LEDs) e o aumento nas trocas gasosas utilizando sistema de ventilação natural com quatro membranas, são mais apropriados para a micropropagação de *A. suaveolens*.

**Palavras-chaves:** Micropropagação. Luminosidade. Trocas gasosas. Fotossíntese. Planta medicinal.

## ABSTRACT

The species *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. is a medicinal plant which has important therapeutic properties, such as anticonvulsant, sedative, anti-inflammatory, and antimicrobial action. There were no studies related to its *in vitro* cultivation in the consulted literature. Micropropagation of medicinal plants has several advantages over conventional cultivation, such as the possibility of obtaining high quality plant material and also optimizing the production of secondary metabolites. However, understand how the environmental factors affect the *in vitro* growth of these species is necessary. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of intensity, light quality, and natural ventilation system on the growth and production of photosynthetic pigments in *Aeollanthus suaveolens*. Three experiments were carried out: In the first one, nodal segments were used, which were grown under the light intensities of 20, 57, 78, 102, and 139  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , obtained using Light Emitting Diodes (LEDs). In the light quality experiment, nodal segments were cultivated under yellow; white; green; blue; red; 1 blue:2 red; 2 blue:1 red; 1 blue:1 red, and cold white fluorescent lamp. In the third experiment, nodal segments were grown under conventional system (SC) and under natural ventilation system with one (SVN1), two (SVN2), and four porous membranes (SVN4). In all three experiments, plant growth and the concentration of photosynthetic pigments were evaluated. The intensities above 78  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  supported a better growth of this species, presenting a higher accumulation of dry matter, especially in the intensity of 139  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . While the production of photosynthetic pigments (chlorophyll a, b, total, and carotenoids) were larger under 20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . The green light provided greater shoot growth and longer root length. Seedlings cultivated under white LED spectrum presented a greater number of leaves and roots, as well as a greater production of leaf dry matter and stem dry matter. The fluorescent lamp promoted greater accumulation of root dry matter and total dry matter. Seedlings grown under yellow light had higher production of chlorophyll a, total and carotenoids. The highest concentration of chlorophyll b was observed in plants under white LED light. The natural ventilation system with 4 membranes provided higher value for all evaluated growth parameters (numbers of shoots, leaves and roots, shoot length and longest root). Regarding photosynthetic pigments content, the increase in the gas exchange increased the pigment production of the plants. Adjustments of brightness and the use of natural ventilation system are an effective alternative for an *in vitro* propagation of this species. Intensities above 78  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , white light spectrum (obtained with LED light bulbs), and the increase in gas exchanges, using a natural ventilation system with four membranes, are more appropriate for the micropropagation of *A. suaveolens*.

**Keywords:** Micropropagation. Luminosity. Gas exchange. Photosynthesis. Medicinal plant.



## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO 1

- Figura 1 – Plântulas de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae) cultivadas *in vitro* durante 40 dias sob diferentes intensidades luminosas (20, 57, 78, 102 e 139  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ..... 31
- Figura 2 – Crescimento *in vitro* de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae) cultivada durante 40 dias sob diferentes intensidades luminosas (20, 57, 78, 102 e 139  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ..... 32
- Figura 3 – Produção de matérias secas de folhas, caule, raízes e total de plântulas de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae) cultivadas *in vitro* durante 40 dias sob diferentes intensidades de luz (20, 57, 78, 102 e 139  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )... 33
- Figura 4 – Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae), cultivadas *in vitro* durante 40 dias, submetida a diferentes intensidades de luz (20, 57, 78, 102 e 139  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )..... 35

### ARTIGO 2

- Figura 1 – Perfis espectrais nas fontes de luz utilizadas no experimento ..... 44
- Figura 2 – Aspectos de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. após 40 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes qualidades de luz ..... 46
- Figura 3 – Crescimento *in vitro* de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. cultivada durante 40 dias sob diferentes espectros luminosos ..... 48
- Figura 4 – Matéria seca de plântulas de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. cultivadas *in vitro*, sob diferentes qualidades de luz ..... 50

### ARTIGO 3

- Figura 1 – Esquema para a montagem das membranas porosas manufaturadas nas tampas dos recipientes de cultivo (A-J)..... 61
- Figura 2 – Plântulas de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae) em meio MS, sem adição de sacarose, sob sistema convencional (SC) e sistemas de ventilação natural, com uma (SVN1), com duas (SVN2) e quatro membranas porosas (SVN4)..... 64

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Tabela 1 – Área foliar total (AFT), razão de área foliar (RAF), área foliar específica (AFE) e razão de peso foliar (RPF) de plântulas de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae) cultivadas *in vitro* aos 40 dias, sob diferentes intensidades de luz (20, 57, 78, 102 e 139  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ..... 34

### ARTIGO 2

Tabela 1 – Concentração de pigmentos fotossintéticos ( $\text{mg/g}^{-1}$  MF) em plântulas de *Aeollanthus suaveolens* cultivadas *in vitro* sob a exposição a diferentes espectros luminosos: verde (VD), amarelo (AM), vermelho (V), fluorescente (FL), 1V:1A, 1V:2A; Branco (B), Azul (A) e 2V:1A ..... 51

### ARTIGO 3

Tabela 1 – Crescimento *in vitro* de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae) cultivada durante 40 dias sob sistemas de ventilação natural, com uma (SVN1), duas (SVN2), quatro membranas porosas (SVN4) e sistema convencional (SC). NB: número de brotos; CPA: comprimento da parte aérea; NF: número de folhas; NR: número de raízes; CMR: comprimento da maior raiz; matérias secas de folha (MSF); caule (MSC); raiz (MSR); total (MST). Relação entre SVN4 e SC (SVN4/SC). CV: coeficiente de variação ..... 63

Tabela 2 – Área foliar total (AFT), razão de área foliar (RAF), área foliar específica (AFE) e razão de peso das folhas (RPF) de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae) cultivada *in vitro* aos 40 dias, sob diferentes sistemas de cultivo (sistema convencional (SC) e sistema de ventilação natural (SVN) com 1, 2 e 4 membranas porosas). Coeficiente de variação (CV). ..... 65

Tabela 3 – Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae), cultivadas *in vitro* durante 40 dias, sob diferentes sistemas de cultivo: sistema convencional (SC) e sistemas de ventilação natural, com uma (SVN1), duas (SVN2) e quatro membranas porosas (SVN4). CV: coeficiente de variação ..... 66

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	<b>11</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Caracterização geral da espécie</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b>Cultura de tecidos em plantas medicinais</b> .....	<b>14</b>
<b>2.3</b>	<b>Influência da luz no cultivo <i>in vitro</i> de plantas</b> .....	<b>15</b>
<b>2.4</b>	<b>Sistema de ventilação natural</b> .....	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	<b>18</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>19</b>
	<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGOS</b> .....	<b>26</b>
	<b>ARTIGO 1- INTENSIDADES LUMINOSAS AFETAM O CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS NO CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>Aeollanthus suaveolens</i> MART. EX SPRENG. (LAMIACEAE)</b> .....	<b>26</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>28</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1</b>	<b>Estabelecimento do material vegetal <i>in vitro</i></b> .....	<b>29</b>
<b>2.2</b>	<b>Intensidade de luz</b> .....	<b>29</b>
<b>2.3</b>	<b>Quantificação de pigmentos fotossintéticos</b> .....	<b>30</b>
<b>2.4</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>36</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>37</b>
	<b>ARTIGO 2 - CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>Aeollanthus suaveolens</i> MART. EX SPRENG. (LAMIACEAE) SOB DIFERENTES QUALIDADES DE LUZ</b> .....	<b>40</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
<b>2.1</b>	<b>Estabelecimento do material vegetal <i>in vitro</i></b> .....	<b>43</b>
<b>2.2</b>	<b>Qualidade de luz</b> .....	<b>43</b>
<b>2.3</b>	<b>Quantificação de pigmentos fotossintéticos</b> .....	<b>45</b>
<b>2.4</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>45</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>52</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>53</b>
	<b>ARTIGO 3 – SISTEMA DE VENTILAÇÃO NATURAL NO CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>Aeollanthus suaveolens</i> MART. EX SPRENG. (LAMIACEAE)</b> .....	<b>57</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>59</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>60</b>
<b>2.1</b>	<b>Estabelecimento do material vegetal <i>in vitro</i></b> .....	<b>60</b>
<b>2.2</b>	<b>Sistema de ventilação natural</b> .....	<b>60</b>
<b>2.3</b>	<b>Quantificação de pigmentos fotossintéticos</b> .....	<b>62</b>
<b>2.4</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>63</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>63</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>67</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>68</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

A espécie *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (sinonímia *Aeollanthus heliotropioides* Oliv.) é uma Lamiaceae, conhecida popularmente como catinga-de-mulata ou macassá (MONTEIRO et al., 2005; TUCKER; MACIARELLO; ALKIRE, 2001). Essa espécie possui grande potencial medicinal, usada na medicina popular principalmente pelos seus efeitos sedativos e anticonvulsivantes (FERREIRA; TAVARES-MARTINS; PALHETA, 2017). Na literatura são encontrados vários estudos relacionados à composição química de seu óleo essencial (SIMIONATTO et al., 2007; SOUZA et al., 1997; TUCKER; MACIARELLO; ALKIRE, 2001). Entretanto informações sobre seus aspectos agrônômicos são escassos, em especial ao seu comportamento sob fatores das técnicas de cultura de tecidos.

A micropropagação é uma ferramenta importante na obtenção em escala comercial de material vegetal de alta qualidade e livre de microrganismos (CARVALHO; ARAÚJO, 2008). Essa técnica tem sido empregada em pesquisas envolvendo plantas medicinais (MANAN et al., 2016; YESMIN; HASHEM; ISLAM, 2015). Entretanto, no cultivo *in vitro*, vários fatores podem interferir no desenvolvimento vegetal, como por exemplo, componentes do meio de cultivo, umidade dentro do recipiente de cultivo e condições de luz nas salas de crescimento (US-CAMAS et al., 2014).

A luz é um dos requisitos mais importantes para o desenvolvimento de plântulas cultivadas *in vitro*, pois influencia nos aspectos morfológicos, anatômicos e fisiológicos. Além disso, interfere na qualidade das plântulas durante o processo de aclimatização. A qualidade e a intensidade de luz podem ter efeitos positivos ou negativos no cultivo *in vitro*. A qualidade de luz é um elemento fundamental na fotomorfogênese e também na fotossíntese (CHRISTIE; MURPHY, 2013). A intensidade de luz influencia a fotossíntese, pois afeta a concentração de clorofila e a ultraestrutura de cloroplastos (LEE; WETZSTEIN; SOMMER, 1985).

Além das condições de luminosidade, existem outros fatores que podem comprometer o crescimento das plantas como características do microambiente formado no recipiente. O cultivo convencional proporciona baixas trocas gasosas, alta umidade e acúmulo de etileno (CHEN, 2015; FOMENKOV et al., 2015; TRUJILLO-MOYA; GISBERT, 2012). O uso de sistema de ventilação natural é uma alternativa para amenizar esses problemas. Esse sistema

diminui a umidade relativa e aumenta a troca gasosa, além de manter a concentração de CO<sub>2</sub> elevada, o que estimula a fotossíntese (MOREIRA, et al., 2013; SALDANHA; et al., 2012).

Percebe-se, portanto, a crescente necessidade de estudos relacionados ao ambiente de cultivo *in vitro*, procurando otimizar o uso da técnica. Nesse sentido, objetivou-se avaliar o efeito da intensidade e qualidade luminosa e de sistemas de ventilação natural no crescimento e na produção de pigmentos fotossintéticos de plântulas de *Aeollanthus suaveolens* micropropagadas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Caracterização geral da espécie

A espécie *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng é uma aromática de origem africana, pertencente à família Lamiaceae, e a subfamília Nepetoideae (HARLEY, 2012). Tem como sinonímia *Aeollanthus heliotropoides* Oliv. (SEIDEMANN, 2005). No Brasil, é conhecida popularmente como catinga de mulata ou macassá (CARMO, et al., 2015; FERREIRA; TAVARES-MARTINS; PALHETA, 2017). É uma erva suculenta anual com aproximadamente 40 cm de comprimento, caule circular e ramificado, suas folhas são pecioladas revestidas de tricomas secretores com essência aromática, pré-floração valvar com flores metaclamídeas, bissexuadas e trímeras, androceu com estames didínamos, grão de pólen esférico, com carpelo dialicarpelar e unilocular; tem ovários ginobásico, súpero, com inflorescência em racemo (OLIVEIRA, et al., 2003; HARLEY, 2012).

Essa espécie é comumente usada em banhos de cheiros, rituais místicos e religiosos (FERREIRA; TAVARES-MARTINS; PALHETA, 2017; HARLEY, 2012). Na medicina popular, é principalmente utilizada devido aos seus efeitos sedativos e anticonvulsivantes (SIMIONATTO et al., 2007; SRINIVASAN; ROY, 2017). Além disso, é usada no combate à febre, dor de cabeça, início de derrame, dor de barriga e diarreia, sendo a folha a parte mais utilizada nas formas de chá e sumo (GOIS et al., 2016; LUPE, 2007). Segundo Ferreira, Tavares-Martins e Palheta (2017), *Aeollanthus suaveolens* possui elevada importância terapêutica, devido à presença de constituintes químicos, os quais são responsáveis por relevantes atividades biológicas como efeitos analgésicos e antimicrobianos.

A espécie apresenta vários estudos relacionados à fitoquímica de seu óleo essencial. Na composição química do óleo essencial de *Aeollanthus suaveolens*, foram identificados vários monoterpenos e sesquiterpenos, dentre eles, o linalol e o  $\beta$ -farneseno, como majoritários (TUCKER; MACIARELLO; ALKIRE, 2001). Além disso, o seu óleo essencial contém um derivado  $\delta$ -decalactona, ao qual, em conjunto com o linalol, é atribuída a propriedade sedativa da espécie (LUPE et al., 2007; ELISABETSKY; SOUZA et al., 1999). Segundo Simionatto et al. (2007), os óleos essenciais de folhas e das flores de *A. suaveolens* tiveram um alto teor de monoterpenos e sesquiterpenos.

O óleo essencial de *Aeollanthus suaveolens* tem várias atividades biológicas, como ação antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*; *Cryptococcus neoformans* e *Candida* sp (MARTINS et al., 2016; MBACK et al., 2016; SIMIONATTO et al., 2007). Segundo Martins et al. (2016), o óleo essencial possui pouca

atividade antioxidante pelo método de captura radical de DPPH quando comparado com o padrão. Além dessas atividades biológicas do óleo, o extrato hidroalcolico de *A. suaveolens* teve forte atividade analgésica e anti-inflamatória em camundongos (COSTA-LOTUFO et al., 2004).

Em relação à produção do óleo essencial, Batista et al. (2011) verificaram que a intensidade luminosa influenciou significativamente o teor do óleo de *Aeollanthus suaveolens*, onde o maior rendimento foi obtido das plantas cultivadas a pleno sol.

## **2.2 Cultura de tecidos em plantas medicinais**

Apesar dos avanços da medicina moderna, as plantas medicinais continuam desempenhando um importante papel na saúde da população mundial (SOUSA et al., 2008). Contudo, alguns fatores podem comprometer o uso das plantas medicinais para propósitos farmacêuticos, como a heterogeneidade dos indivíduos, devido as variabilidades genética e bioquímica (MORAIS et al., 2012). Neste contexto, torna-se imprescindível a realização de estudos mais aprofundados sobre o comportamento de espécies medicinais perante as práticas agronômicas (CHAVES, 2001).

O cultivo em campo de plantas medicinais para obtenção de constituintes ativos apresenta várias desvantagens, por exemplo, baixos rendimentos e flutuações nas concentrações devido a variações geográficas, sazonais e ambientais (MURTHY; LEE; PAEK, 2014). Essas limitações levaram ao uso de técnicas de cultura de tecidos para a produção de constituintes ativos. A micropropagação tem um papel importante na propagação comercial, fornecendo material vegetal de qualidade para a indústria farmacêutica e química (ARIKAT et al., 2004; MIGUEL; MARUM, 2011; PEÑA-RAMÍREZ et al., 2012). Além da produção de metabólitos secundários independente das condições sazonais e climáticas, a cultura de tecidos vegetal, também tem por finalidade evitar a coleta de espécies selvagens ameaçadas de extinção (PIERIK, 1987).

A cultura de tecidos vegetal é, portanto, uma ferramenta com alto potencial para a preservação de fontes vegetais, bem como a propagação comercial de plantas medicinais (CAMPOS, 2009). Esta técnica consiste no cultivo de células ou tecidos vegetais sob condições químicas e físicas apropriadas, representando uma das áreas de maior êxito da biotecnologia (BOONSNONGCHEEP, et al., 2010). De acordo com Moraes et al. (2012), a aplicação das técnicas de cultura de tecidos em plantas medicinais, principalmente a micropropagação, têm como perspectivas a obtenção de germoplasma competitivo e adaptado a diversos métodos de cultivo.

As plantas micropropagadas podem servir como modelos de plantas eficientes para estudar a acumulação de compostos voláteis em diferentes estágios de desenvolvimento (MANAN et al., 2016). No entanto, para a aplicação dessa técnica, é necessário padronizar alguns fatores como o meio de cultivo, regime de luz, qualidade e intensidade de luz (DONG et al., 2014).

Na literatura, há relatos de vários estudos sobre os benefícios do cultivo *in vitro* envolvendo plantas medicinais. Como exemplo de *Ziziphora tenuior* L. (Lamiaceae) (DAKAH et al., 2014); *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) (MANAN et al., 2016); *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (Lamiaceae) (SILVA et al., 2017); *Lavanda angustifolia* Mill. (Lamiaceae) (MACHADO et al., 2013); *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae) (ANDRADE et al., 2017).

### **2.3 Influência da luz no cultivo *in vitro* de plantas**

A energia luminosa é um dos fatores mais importante no crescimento e desenvolvimentos das plantas (FUKUDA, 2013). A luz influencia na síntese e produção de metabólitos primários e secundários, nos aspectos morfoanatômicos e fisiológicos (COSTA et al., 2009; KOPSELL; SAMS, 2013). Além disso, as plantas utilizam a luz como fonte de energia no processo fotossintético e respondem a essa energia luminosa de acordo com a intensidade, comprimento de onda e fotoperíodo (MUNEER et al., 2014).

Na cultura de tecidos, é fundamental controlar a intensidade e a qualidade de luz. Nas salas de crescimento, geralmente, utiliza-se lâmpadas fluorescentes, porém essas lâmpadas possuem um espectro amplo e heterogêneo, que podem comprometer o crescimento das plantas (ALVARENGA et al., 2015). O uso de Diodos de Emissão de Luz (LED) tem sido proposto como fonte luminosa para ambientes controlados, em instalações agrícolas ou em câmaras de crescimento de plantas, pois permitem o controle da composição espectral e o ajuste da intensidade da luz (LAZZARINI et al., 2017; ROCHA et al., 2013; YEH; CHUNG, 2009). Além disso, o uso de LEDs possibilita produção de muda de melhor qualidade, maior eficiência no processo produtivo, dentre outras vantagens (TARAKANOV et al., 2012).

As plantas têm diferentes respostas de crescimento e também na produção de metabólitos secundários quando expostas a diferentes condições de luz em uma cultura *in vitro* (ALVARENGA et al., 2015). De acordo com Szopa e Ekiert (2016), os diferentes espectros aplicados influenciaram o crescimento da matéria seca e a acumulação de metabólitos secundários (lignanais e ácidos fenólicos), sendo a luz azul mais eficaz para a produção de ambos os grupos.



As plantas além de serem sensíveis à qualidade de luz, também são sensíveis à intensidade de luz, também são sensíveis à intensidade desse fator ambiental. Segundo Singh et al. (2017), intensidades mais elevadas favorecem o acúmulo de matéria seca. A intensidade luminosa é essencial para o crescimento e no processo fotossintético das plantas (SÁEZ et al., 2012). Em situações em que há decréscimo na intensidade luminosa, pode ocorrer redução na atividade fotossintética. Por outro lado, a alta intensidade de luz pode ocasionar fotoinibição, que é um conjunto complexo de processos moleculares, definidos como a inibição da fotossíntese pelo excesso de luz, sendo reversível nos seus estágios iniciais (TAIZ et al., 2017).

Pesquisas relacionadas ao cultivo *in vitro* de plantas medicinais e aromáticas demonstram que diferentes respostas quanto ao crescimento em função da intensidade de luz. Plântulas de *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton cultivadas *in vitro* em diferentes intensidades luminosas (13, 28, 47 e 69  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) acumularam maior matéria seca da parte aérea e raízes quando submetidas a intensidade de 69  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (SILVA, 2013). Para *Momordica grosvenori* Swingle, o aumento da intensidade (100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) favoreceu o crescimento da espécie (ZHANG et al., 2009). Em *Capsicum chinense* Jacq. o maior crescimento observado no cultivo *in vitro* foi sob a intensidade de 28  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (BARRALES-LÓPEZ et al., 2015).

#### **2.4 Sistema de ventilação natural**

No sistema convencional de propagação *in vitro* (fotomixotrófico), os explantes crescem sob condições heterotróficas, o que pode gerar estresses que irão refletir no padrão anatômico e morfofisiológico. Nesse sistema os recipientes são mantidos fechados, prevenindo a desidratação das plantas e do meio de cultivo (SCHUELTER et al., 2015).

O microambiente no sistema fotomixotrófico possui alta umidade relativa, acúmulo de etileno e redução na concentração de  $\text{CO}_2$  (CHEN, 2006; SCHUELTER et al., 2015). A ausência de trocas gasosas diminui a concentração de  $\text{CO}_2$  dentro dos recipientes de cultivo, o que torna necessário o fornecimento de fontes de carboidratos exógenos (sacarose, por exemplo) no meio de cultivo para sustentar o crescimento e o desenvolvimento das plantas (KOZAI, 2010; XIAO; NIU; KOZAI, 2011). Nesse sistema as plantas possuem fotossíntese limitada e não apresentam cloroplastos totalmente funcionais. Essas condições podem influenciar as características anatômicas, fisiológicas e morfológicas, como hiperhidricidade e atraso no crescimento das plantas (ALVAREZ et al., 2012; IAREMA et al., 2012). Segundo Kozai e Xiao (2008), esses fatores causam alta mortalidade da planta durante a aclimatização.

O sistema de ventilação natural na micropropagação (sistema fotoautotrófico) é uma alternativa para amenizar esses problemas do cultivo *in vitro* tradicional (XIAO; NIU; KOZAI, 2011). A fotoautotrofia *in vitro* pode ser induzida pela exclusão de açúcares do meio e pelo aumento da troca gasosa no frasco de cultura (KOZAI ; XIAO, 2008). Existem outras vantagens na remoção de carboidratos do meio de cultivo, como a redução do crescimento de microrganismos nas culturas, além de reduzir custos e aumentar a sobrevivência da planta durante a aclimatização (KOZAI; XIAO, 2008; ZHU et al., 2015). De acordo com Zhu et al. (2015), em condições fotoautotróficas, o crescimento e a taxa de multiplicação são melhorados devido à redução da umidade relativa, o que aumenta o número de nós e brotos disponíveis.

A utilização desse método traz grandes vantagens para a micropropagação, a modificação do microambiente, provocada pela troca gasosa, mantém a concentração de CO<sub>2</sub> nas condições adequadas para a realização da fotossíntese, promove sistema radicular mais desenvolvidos, além de reduzir a umidade relativa e o acúmulo de etileno (HOANG et al. 2017; KOZAI; XIAO, 2008).

Sistemas alternativos de membranas diminuem a umidade relativa e aumentam a troca gasosa, além de manter a concentração de CO<sub>2</sub> elevada, o que estimula a fotossíntese (MOREIRA et al., 2013; SALDANHA et al., 2012). Estudo realizado por Kozai e Xiao (2008), mostrou que a capacidade fotossintética das plântulas em sistema de cultivo fotomixotrófico foi prejudicada pela presença de sacarose no meio de cultura quando comparada com as plantas cultivadas no sistema fotoautotrófico.

A fotossíntese e o crescimento de plantas *in vitro* são promovidos consideravelmente com o aumento da concentração de CO<sub>2</sub> no vaso durante o cultivo fotoautotrófico (IBARAKI; NOZAKI, 2005). Alguns trabalhos comprovaram que o aumento do CO<sub>2</sub>, promoveu o melhor enraizamento e reduziu as anomalias de crescimento das plântulas, melhorando a taxa fotossintética e síntese de metabólitos secundários (CHA-UM et al., 2011; TISSERAT; VAUGHN, 2001; ZHU et al., 2015).

As mudanças ambientais no cultivo *in vitro* podem levar a mudanças nos tecidos, o que pode ser evidenciado por estudos de anatomia foliar das plantas cultivadas nesses sistemas. Em estudo realizado com *Cattleya walkeriana* Gardner, Silva et al. (2014) verificaram que as plantas cultivadas em sistema de ventilação natural apresentaram maior espessura do mesofilo foliar, resposta diretamente relacionada com cultivos fotoautotróficos.

### 3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A espécie *Aeollanthus suaveolens* é considerada planta medicinal por possuir importantes propriedades terapêuticas, como ação anticonvulsivante, sedativa, anti-inflamatória e antimicrobiana. É conhecida popularmente como catinga de mulata, macassá, entre outros nomes, sendo muito utilizada em rituais místicos e religiosos em comunidades tradicionais indígenas e não indígenas. Apesar de ter grande potencial medicinal, esta espécie ainda é pouco estudada do ponto de vista agrônômico, fitoquímico e farmacológico. Na literatura consultada, não foram encontrados trabalhos relacionados ao cultivo *in vitro* da espécie. A micropropagação é uma técnica importante na propagação de plantas medicinais por possuir várias vantagens em relação ao cultivo convencional. No entanto, a otimização das condições ambientais na micropropagação torna-se imprescindível para o desenvolvimento das plantas. Diante disso, as condições de luminosidade nas salas de crescimento (intensidade, espectros e fotoperíodo) são critérios fundamentais para o crescimento das plantas. Esses fatores são responsáveis pelas diferentes respostas anatômicas e morfofisiológicas das plantas submetidas ao cultivo *in vitro*. Além das adequações de luminosidade, o sistema de ventilação natural é uma alternativa que tem mostrado grande eficiência na cultura de tecidos. Esse sistema aumenta a capacidade fotossintética das plântulas e reduz as anomalias que algumas espécies apresentam durante a micropropagação.

## REFERÊNCIAS

- 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 and Organ Culture**, v. 122, n. 2, p. 299–308, 2015.
- ALVAREZ, C.; SAÉZ, P.; SAÉZ, K.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; RÍOS, D. Effects of light and ventilation on physiological parameters during in vitro acclimatization of *Gevuina avellana* mol. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, p. 93–101, 2012.
- 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. **Acta Horticulturae**, v. 1155, p. 277–284, 2017.
- ARIKAT, N. A.; JAWAD, F. M.; KARAM, N. S.; SHIBLI, R. A. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). **Scientia Horticulturae**, v. 100, n. 1–4, p. 193–202, 2004.
- BARRALES-LÓPEZ, A.; ROBLEDO-PAZ, A.; TREJO, C.; ESPITIA-RANGEL, E.; RODRÍGUEZ-DE LA O, J. L. Improved in vitro rooting and acclimatization of *Capsicum chinense* Jacq. plantlets. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 51, n. 3, p. 274–283, 2015.
- BATISTA, C. R.; CARVALHO, B. C. F.; BEZERRA, A. N. S.; PEREIRA, I. C.; OLIVEIRA, E. C. P.; MOURÃO, R. H. V. Avaliação do rendimento de óleo essencial de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng (Lamiaceae) em função da intensidade luminosa. **63ª Reunião Anual da SBPC**, p. 6027, 2011. Disponível em: <<http://www.sbpnet.org.br/livro/63ra/resumos/resumos/6027.htm>>. Acesso em: 3 nov. 2107.
- BOONSNONGCHEEP, P.; KORSANGRUANG, S.; SOONTHORNCHAREONNON, N.; CHINTAPAKORN, Y.; SARALAMP, P.; PRATHANTURARUG, S. Effects of abiotic and biotic elicitors on growth and isoflavonoid accumulation in *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 103, n. 3, p. 333–342, 2010.
- CAMPOS, V. C. A. **Micropropagação de Amburana cearensis (Allemão) A.C. Smith**. 2009. 102 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais)–Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.
- CARMO, T. N.; LUCAS, F.C. A.; LOBATO, G. DE J.M.; GURGEL, E. S. C. Plantas medicinais e ritualísticas comercializadas na feira da 25 de Setembro, Belém, Pará. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v.11; n.21; p. 3440–3467, 2015.
- CARVALHO, J. M. F. C; ARAÚJO, S. S. Técnicas de Cultivo In Vitro Aplicadas na Mamoneira I. **Embrapa Algodão-Documentos (INFOTECA-E)**, p. 1–24, 2008.
- CHA-UM, S.; CHANSEETIS, C.; CHINTAKOVID, W.; PICHAKUM, A.; SUPAIBULWATANA, K. Promoting root induction and growth of in vitro macadamia (*Macadamia tetraphylla* L. 'Keauu') plantlets using CO<sub>2</sub>-enriched photoautotrophic conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, n. 3, p. 435–444, 2011.

CHAVES, F. C. M. **Produção de biomassa, rendimento e composição de óleo essencial de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) em função da adubação orgânica e épocas de corte.** 2001. 146 p. Tese (Doutorado em Agronomia - Área de Concentração em Horticultura)–Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2001.

CHEN, C. In Situ Measurement of Microclimate for the Plantlets cultured In Vitro. **Biosystems Engineering**, v. 95, n. 3, p. 413–423, 2006.

CHEN, C. Application of growth models to evaluate the microenvironmental conditions using tissue culture plantlets of *Phalaenopsis Sogo Yukidian* “V3”. **Scientia Horticulturae**, v. 191, p. 25–30, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.05.007>>. Acesso em: 27 out. 2017.

CHRISTIE, J. M.; MURPHY, A. S. Shoot phototropism in higher plants: New light through old concepts. **American Journal of Botany**, v. 100, n. 1, p. 35–46, 2013.

COSTA-LOTUFO, L. V.; LUCENA, D. F.; ANDRADE-NETO, M.; BEZERRA, J. N. S.; LEAL, L. K. A. M.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B. Analgesic, antiinflammatory and central depressor effects of the hydroalcoholic extract and fractions from *Aeolanthus suaveolens*. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 27, n. 6, p. 821–824, 2004.

COSTA, F. H. S.; PASQUAL, M.; PEREIRA, J. E. S.; CASTRO, E. M. Anatomical and physiological modifications of micropropagated ‘Caipira’ banana plants under natural light. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 3, p. 323–330, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-90162009000300007&lang=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162009000300007&lang=pt)>. Acesso em: 27 set. 2017.

DAKAH, A.; ZAID, S.; SULEIMAN, M.; ABBAS, S.; WINK, M. In vitro propagation of the medicinal plant *Ziziphora tenuior* L. and evaluation of its antioxidant activity. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 4, p. 317–323, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.12.002>>. Acesso em 3 nov. 2017.

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. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 200, n. 3, p. 219–230, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jac.12059>>. Acesso em 17 set. 2017.

ELISABETSKY, E.; SOUZA, G. P. C. Anticonvulsant properties of linalool and  $\gamma$ -decanolactone in mice. In: II WOCMAP Congress Medicinal and Aromatic Plants, Part 2: Pharmacognosy, Pharmacology, Phytomedicine, Toxicology 501. **Acta Horticulturae**, 1999, p. 227-234.

FERREIRA, L. R.; TAVARES-MARTINS, A.C.C.; PALHETA, I. C. Aspectos etnofarmacológicos e fitoquímicos de *Aeolanthus suaveolens* Mart. Ex Spreng. In: ALFARO, A. T. S.; TROJAN, D. G. **Ciências ambientais e o desenvolvimento sustentável na Amazônia**: 2017. Curitiba: Ed. Atena, 2017. p. 77–88.

FOMENKOV, A. A.; NOSOV, A. V.; RAKITIN, V. Y.; SUKHANOVA, E. S.; MAMAEVA, A. S.; SOBOL’KOVA, G. I.; NOSOV, A. M.; NOVIKOVA, G. V. Ethylene in the proliferation of cultured plant cells: Regulating or just going along? **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 62, n. 6, p. 815–822, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1134/S1021443715060059>>. Acesso em: 28 nov. 2017

FUKUDA, N. Advanced light control technologies in protected horticulture: A review of morphological and physiological responses in plants to light quality and its application. **Journal of Developments in Sustainable Agriculture**, v. 8, n. 1, p. 32–40, 2013.

GOIS, M. A. F.; LUCAS, F. C. A.; COSTA, J. C. M.; MOURA, P. H. B.; LOBATO, G. J. M. Etnobotânica de espécies vegetais medicinais no tratamento de transtornos do sistema gastrointestinal. **Brazilian Journal of Medicinal Plants, Campinas.**, v. 18, n. 2, p. 547–557, 2016.

HARLEY, R. M. Checklist and key of genera and species of the Lamiaceae of the Brazilian Amazon. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p. 129–144, 2012.

HOANG, N. N.; KITAYA, Y.; MORISHITA, T.; ENDO, R.; SHIBUYA, T. A comparative study on growth and morphology of wasabi plantlets under the influence of the micro-environment in shoot and root zones during photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 130, n. 2, p. 255–263, 2017.

IAREMA, L.; DA CRUZ, A. C. F.; SALDANHA, C. W.; DIAS, L. L. C.; VIEIRA, R. F.; DE OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 2, p. 227–238, 2012.

IBARAKI, Y.; NOZAKI, Y. Estimation of light intensity distribution in a culture vessel. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 80, n. 1, p. 111–113, 2005.

KOPSELL, D. A.; SAMS, C. E. Increases in Shoot Tissue Pigments, Glucosinolates, and Mineral Elements in Sprouting Broccoli after Exposure to Short-duration Blue Light from Light Emitting Diodes. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 138, n. 1, p. 31–37, 2013. Disponível em: <<http://journal.ashspublications.org/content/138/1/31%5Cnhttp://journal.ashspublications.org/content/138/1/31.short>>. Acesso em: 15 ago. 2017.

KOZAI, T. ; XIAO, Y. A commercialized photoautotrophic micropropagation system. **Plant Tissue Culture Engineering**. p. 355–371, 2008.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation - Environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of ornamental plants**. v. 10, n. 4, 188–204, 2010.

LAZZARINI, L. E. S.; PACHECO, F. V.; SILVA, S. T.; COELHO, A. D.; MEDEIROS, A. P. R.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J. E. B. P; SOARES, J. D. R. Uso de diodos emissores de luz (LED) na fisiologia de plantas cultivadas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 16, n. 2, p. 137–144, 2017.

LEE, N.; WETZSTEIN, H. Y.; SOMMER, H. E. Effects of Quantum Flux Density on Photosynthesis and Chloroplast Ultrastructure in Tissue-Cultured Plantlets and Seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards Improved Acclimatization and Field Survival. **Plant Physiology**, v. 78, p. 637–641, 1985. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1064790&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3 dez. 2107.

LUPE, F. A. **Estudo da composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da amazônia**. 2007. 120 p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Rstadual de Campinas, Campinas, SP, 2007.

- LUPE, F. A.; LEMES, A. C.; AUGUSTO, F.; BARATA, L. E. S. Fragrant lactones in the steam distillation residue of *Aeollanthus suaveolens* mart. ex Spreng and analysis by HS—SPME. **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, n. 3, p. 217–272, 2007.
- MACHADO, M. P.; CIOTTA, M. N.; DESCHAMPS, C.; ZANETTE, F.; CÔCCO, L. C.; BIASI, L. A. Propagação *in vitro* e caracterização química do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* cultivada no Sul do Brasil. **Ciência Rural**, v. 43, n. 2, p. 283–289, 2013.
- MANAN, A. A.; TAHA, R. M.; MUBARAK, E. E.; ELIAS, H. In vitro flowering, glandular trichomes ultrastructure, and essential oil accumulation in micropropagated *Ocimum basilicum* L. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 52, n. 3, p. 303–314, 2016.
- MARTINS, R. L.; SIMÕES, R. C.; RABELO, E. M.; FARIAS, A. L. F.; RODRIGUES, A. B. L.; RAMOS, R. S.; FERNANDES, J. B.; SANTOS, L. S.; ALMEIDA, S. S. M. S. Chemical composition, an antioxidant, cytotoxic and microbiological activity of the essential oil from the leaves of *Aeollanthus suaveolens* mart. ex Spreng. **PLoS ONE**, v. 11, n. 12, p. 1–10, 2016.
- MIGUEL, C.; MARUM, L. An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: Somaclonal variation and beyond. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 11, p. 3713–3725, 2011.
- MONTEIRO, S. S.; SIANI, A. C.; GARRIDO, I. S.; RAMOS, M. C. K. V.; AQUINO-NETO, F. R. Variabilidade química e resolução ótica do linalol no óleo essencial de *Aeollanthus suaveolens* (Lamiaceae). **Revista Fitos**, v. 1, n. 2, p. 58–63, 2005.
- MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F.; SILVA, A. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 110–121, 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-05722012000100016&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722012000100016&lng=pt&tlng=pt)>. Acesso em: 22 ago. 2017.
- MOREIRA, A. L.; SILVA, A. B.; SANTOS, A.; REIS, C. O.; LANDGRAF, P. R. C. *Cattleya walkeriana* growth in different micropropagation systems. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 10, p. 1804–1810, 2013.
- MUNEER, S.; KIM, E. J.; PARK, J. S.; LEE, J. H. Influence of green, red and blue light emitting diodes on multiprotein complex proteins and photosynthetic activity under different light intensities in lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 3, p. 4657–4670, 2014.
- MURTHY, H. N.; LEE, E. J.; PAEK, K. Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: Strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 1, p. 1–16, 2014.
- MBACK, M. N. N.; AGNANIET, H.; NGUIMATSIA, F.; DONGMO, P. M. J.; FOKOU, J. B. H.; BAKARNGA-VIA, I.; BOYOM, F. F.; MENUT, C. Optimization of antifungal activity of *Aeollanthus heliotropioides* oliv essential oil and Time Kill Kinetic Assay | **Journal de Mycologie Medicale**, v. 26, n. 3, p. 233–243, 2016.
- OLIVEIRA, A. S. C.; FAVACHO, A. C.; SOUSA, E. L. C.; NASCIMENTO, M. E. Estudo Morfológico da Catinga de Mulata (*Aeollanthus suaveolens* - Mart. ex. K. Spreng) In: Congresso Nacional de Botânica, 54., 2003, Belém. **Resumos**. Belém: Universidade Federal

rural da Amazônia, 2003. Disponível em: <https://www.botanica.org.br/trabalhos-cientificos/54CNBot/R1096-1.pdf>>. Acesso em: 25 ago. 2017.

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 Red Cedar (*Cedrela odorata*). **Plant Cell Culture Protocols**, v. 877, n. April 2012, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-818-4>>. Acesso em 25 nov. 2017.

PIERIK, R.L.M. **In Vitro Culture of Higher Plants**. (Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands), 1987.

ROCHA, P. S. G.; OLIVEIRA, R. P.; BASTOS, C. R.; SCIVITTARO, W. B. Diodos emissores de luz ( LEDs ) na micropropagação de amoreira-preta cv . Tupy. **Horticultura Argentina**, v. 32, n. 79, p. 14–19, 2013.

SÁEZ, P. L.; BRAVO, L. A.; SÁEZ, K. L.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; LATSAGUE, M. I.; RÍOS, D. G. Photosynthetic and leaf anatomical characteristics of *Castanea sativa*: A comparison between in vitro and nursery plants. **Biologia Plantarum**, v. 56, n. 1, p. 15–24, 2012.

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; AZEVEDO, J. L. F.; DIAS, L. L. C.; RÊGO, M. M.; OTONI, W. C. 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**, v. 110, n. 3, p. 413–422, 2012.

SCHUELTER, A. R.; LUZ, C. L.; SCHERER, A. M.; SOUZA, C. S.; STEFANELLO, S. Disponibilidade de luz, tipo de vedação e de frasco na germinação e crescimento inicial in vitro de plântulas de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 3, p. 183–190, 2015. Disponível em: <<http://www.bibliotekevirtual.org/index.php/2013-02-07-03-02-35/2013-02-07-03-03-11/868-sap/v14n03/13022-disponibilidade-de-luz-tipo-de-vedacao-e-de-frasco-na-germinacao-e-crescimento-inicial-in-vitro-de-plantulas-de-cubiu-solanum-sessiliflorum-dunal.html>>. Acesso em: 3 set. 2017.

SEIDEMANN, J. **World spice plants: economic usage, botany, taxonomy**. European Union: Springer, 2005.

SILVA, A. B.; LIMA, P. P.; OLIVEIRA, L. E. S.; MOREIRA, A. L. In vitro growth and leaf anatomy of *Cattleya walkeriana* (Gardner, 1839) grown in natural ventilation system. **Revista Ceres**, v. 61, n. 6, p. 883–890, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0034-737X201461060001>>. Acesso em: 7 nov. 2017.

SILVA, G. M. DA. **Micropropagação e produção de constituintes voláteis in vitro de *Aloysia triphylla* ( L' Hérit ) Britton**. 2013. 113 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

SILVA, S. T.; BERTOLUCCI, S. K. V.; 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**, v. 129, n. 3, p. 501–510, 2017.

SIMIONATTO, E.; PORTO, C.; STÜKER, C. Z.; DALCOL, I. I.; SILVA, U. F. Chemical



composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Aeolanthus suaveolens* MART. ex Spreng. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1923–1925, 2007.

SINGH, A. S.; JONES, A. M. P.; SHUKLA, M. R.; SAXENA, P. K. High light intensity stress as the limiting factor in micropropagation of sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 129, n. 2, p. 209–221, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11240-017-1170-2>>. Acesso em: 20 out. 2017

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; BARBOSA FILHO, J. M.; VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 642–654, 2008.

SOUZA, G. P. C.; ELISABETSKY, E.; NUNES, D. S.; RABELO, S. K. L.; SILVA, M. N. Anticonvulsant properties of  $\gamma$ -decanolactone in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 58, n. 3, p. 175–181, 1997.

SRINIVASAN, N.; ROY, A. Anticonvulsant properties of some medicinal plants: A review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 10, n. 2, p. 1–3, 2017.

SZOPA, A.; EKIERT, H. The importance of applied light quality on the production of lignans and phenolic acids in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. cultures in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 127, n. 1, p. 115–121, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TARAKANOV, I.; YAKOVLEVA, O.; KONOVALOVA, I.; PALIUTINA, G.; ANISIMOV, A. Light-emitting diodes: On the way to combinatorial lighting technologies for basic research and crop production. In: VII International Symposium on Light in Horticultural Systems. **Acta Horticulturae**, v. 956, p. 171–178, 2012.

TISSERAT, B.; VAUGHN, S. F. Essential oils enhanced by ultra-high carbon dioxide levels from Lamiaceae species grown in vitro and in vivo. **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 4, p. 361–368, 2001.

TRUJILLO-MOYA, C.; GISBERT, C. The influence of ethylene and ethylene modulators on shoot organogenesis in tomato. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 111, n. 1, p. 41–48, 2012.

TUCKER, A. O.; MACIARELLO, M. J. Essential Oil of *Aeollanthus suaveolens* Mart , ex Spreng. (Lamiaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 13, p. 198–199, 2001.

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, n. 2, p. 187–201, 2014.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, n. 2, p. 149–158, 2011.

YEH, N.; CHUNG, J. P. High-brightness LEDs-Energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n.

8, p. 2175–2180, 2009.

YESMIN, S; HASHEM, A.; ISLAM, M. S. I. Micropropagation of an important medicinal herb *Eclipta alba* (L.) Hassk. **Jahangirnagar University Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 1, p. 61–69, 2015.

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.

ZHU, C.; ZENG, Q.; MCMICHAEL, A.; EBI, K. L.; NI, K.; KHAN, A. S.; ZHU, J.; LIU, G.; ZHANG, X.; CHENG, L.; ZISKA, L. H. Historical and experimental evidence for enhanced concentration of artemisinin, a global anti-malarial treatment, with recent and projected increases in atmospheric carbon dioxide. **Climatic Change**, v. 132, n. 2, p. 295–306, 2015.

## SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

### ARTIGO 1- INTENSIDADES LUMINOSAS AFETAM O CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS NO CULTIVO *IN VITRO* DE *Aeollanthus suaveolens* MART. EX SPRENG. (LAMIACEAE)

#### RESUMO

A espécie *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae) é uma aromática de origem africana, sendo muito utilizada na medicina popular devido aos seus efeitos anticonvulsivantes e sedativos. A micropropagação tem sido aplicada no cultivo de espécies medicinais, por possibilitar a multiplicação em escala comercial. Uma das formas de otimizar o crescimento e desenvolvimento *in vitro* dessas espécies é variar as características da luz do ambiente. Assim, objetivou-se avaliar a influência de diferentes intensidades luminosas sobre o crescimento e a produção de pigmentos fotossintéticos de plântulas de *A. suaveolens* cultivadas *in vitro*. Segmento nodais foram cultivados sob diferentes intensidades luminosas (20, 57, 78, 102 e 139  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) obtidas com lâmpadas LEDs. Após 40 dias de cultivo, foram avaliadas as variáveis números de brotos e raízes, comprimentos da parte aérea e da maior raiz, área foliar, matérias secas de folha, caule, raiz e total, razão de área foliar, área foliar específica, razão de peso foliar e a produção dos pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b*, total e carotenoides). As diferentes intensidades de luz afetaram o crescimento e a produção de pigmentos fotossintéticos. As intensidades acima de 78  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proporcionaram um melhor crescimento da espécie, apresentando maior acúmulo de matéria seca, sobretudo na intensidade de 139  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Enquanto a produção de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b*, total e carotenoides) foram maiores sob 20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Assim, a partir dos resultados obtidos, pode se afirmar que altas intensidades de luz (acima de 78  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) são mais apropriadas, para o crescimento *in vitro* da espécie.

**Palavras-chave:** Planta medicinal. Catinga de mulata. Luminosidade. Fotossíntese.

## ABSTRACT

The species *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae) is an aromatic plant originally from Africa, widely used in folk medicine due to its anticonvulsive and sedative effects. Micropropagation has been applied in the cultivation of medicinal species, since it allows multiplication on a commercial scale. One of the ways to optimize growth and development *in vitro* of these species is to vary the light characteristics of the environment. Thus, this study aimed to evaluate the influence of different light intensities on the growth and production of photosynthetic pigments of *A. suaveolens* seedlings grown *in vitro*. Nodal segments were grown under different light intensities (20, 57, 28, 102, and 139  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), which were obtained using LED lamps. After 40 days of cultivation, the following variables were evaluated: number of shoots and roots, shoot and the longer root lengths, leaf area, leaves, stems, roots, and total dry matter, leaf area ratio, specific leaf area, leaf weight ratio, and the production of photosynthetic pigments (chlorophyll a, b, total, and carotenoids). The different light intensities affected the growth and the production of photosynthetic pigments. Light intensities above 78  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  provided a better growth of this species, presenting a higher accumulation of dry matter, especially in the intensity of 139  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , as long as the production of photosynthetic pigments (chlorophyll a, b, total and carotenoids) were larger under 20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Therefore, higher light intensities (above 78  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) are more appropriate for *in vitro* growth of the *A. suaveolens*.

**Keywords:** Medicinal plant. Catinga de mulata. Lightness. Photosynthesis.

## 1 INTRODUÇÃO

A espécie *Aeollanthus suaveolens* (sinonímia *Aeollanthus heliotropioides* Oliv.), conhecida popularmente como catinga de mulata, chegadinha e macassá. É uma planta aromática e medicinal de origem africana, pertencente à família Lamiaceae (FERREIRA; TAVARES-MARTINS; PALHETA, 2017; SEIDEMANN, 2005; SILVA; MARINI; MELO, 2015). Essa espécie tem uma grande importância terapêutica, devido à presença de constituintes químicos responsáveis por relevantes atividades biológicas, como efeitos anticonvulsivantes, analgésicos e antimicrobianos (FERREIRA; TAVARES-MARTINS; PALHETA, 2017; SIMIONATTO et al., 2007).

A micropropagação é uma técnica de cultura de tecidos muito utilizada em plantas medicinais por ter vantagens em relação à propagação convencional (MURTHY; LEE; PAEK, 2014). Essa técnica possibilita a obtenção de material vegetal de alta qualidade e a otimização na produção de metabólitos secundários (BOONSNONGCHEEP et al., 2010). Segundo Morais et al. (2012), o cultivo é independente de fatores climáticos e edáficos. Contudo, durante o cultivo *in vitro* as plantas ficam expostas a diferentes fatores que podem influenciar o êxito do crescimento das plantas, tais como, alta umidade dentro do recipiente de cultivo e as condições da sala de crescimento (temperatura, fotoperíodo e intensidade da luz) (US-CAMAS et al., 2014).

Dessa forma, o estabelecimento de técnicas de cultivo, como a adequação do nível de luminosidade, pode favorecer o crescimento e desenvolvimento de plantas propagadas *in vitro* (SÁEZ et al., 2013). A intensidade luminosa das salas de crescimento pode limitar o desenvolvimento de mecanismos fotossintéticos e fotoprotetores eficientes (SÁEZ et al., 2016). Nesse contexto, a intensidade de luz é considerada um dos fatores mais importantes para a fotossíntese de plântulas micropropagadas, além de participar ativamente do crescimento, regulando várias alterações anatômicas e morfofisiológicas das plantas (COSTA et al., 2009; IBARAKI; NOZAKI, 2005)

Estudos recentes sobre intensidade de luz no cultivo *in vitro* de plantas medicinais relatam diferentes respostas de crescimento e na produção de pigmentos fotossintéticos. Tais como os efeitos da intensidade luminosa no crescimento *in vitro* e pigmentos fotossintéticos de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (SILVA et al., 2017), *Achillea millefolium* L. (ALVARENGA et al., 2015), *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (ANDRADE et al., 2017), *Momordica grosvenori* Swingle (ZHANG et al., 2009), dentre outras espécies.

Na literatura consultada, não há registros sobre aspectos agrônômicos *in vitro* de

*Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng.. Nesse sentido, objetivou-se avaliar a influência de diferentes intensidades de luz sobre o crescimento e produção de pigmentos fotossintéticos de plântulas de *A. suaveolens* cultivadas *in vitro*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Estabelecimento do material vegetal *in vitro*

O estabelecimento da espécie foi realizado através de sementes obtidas de plantas cultivadas em casa de vegetação. O material vegetal passou por um processo de assepsia em hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) durante 5 minutos sob agitação constante. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram lavadas com água destilada autoclavada por 3 vezes e inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 5,5 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem a 121 °C a 0,1 atm por 20 min. Após a inoculação das sementes, os tubos foram mantidos em sala de crescimento em sala de crescimento com lâmpadas brancas frias fluorescentes e intensidade de 39 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fotoperíodo de 16 h e temperatura de 25 ± 1 °C. Após 30 dias, as plântulas originadas foram multiplicadas em frascos contendo 40 mL de meio MS.

### 2.2 Intensidade de luz

O primeiro e o segundo segmentos nodais com aproximadamente 1cm, foram inoculados em tubos de ensaio (20 x 150 mm) contendo 15 mL de meio MS, suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e com 5,5 g L<sup>-1</sup> de ágar (Himedia<sup>®</sup>, tipo I) e pH ajustado para 5,7 ± 0,1. Após a inoculação, os explantes foram cultivados sob cinco intensidades de luz: 20, 57, 78, 102, 139 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, obtidas com Diodos Emissores de Luz (LEDs), sob um fotoperíodo de 16 h e temperatura de 25 ± 1 °C. As intensidades luminosas foram mensuradas por um aparelho QSO-S Procheck + Sensor- PAR Photon Flux (Decagon Devices-Pullman-Washington-USA).

Após 40 dias foram avaliados o crescimento e a produção dos pigmentos fotossintéticos. O crescimento das plântulas foi avaliado quanto aos números de brotos (NB) e raízes (NR), comprimento da parte aérea (CPA, cm) e maior raiz (CMR, cm), área foliar total (AFT, cm<sup>2</sup>), matérias secas de folha (MSF), caule (MSC), raiz (MSC) e total (MST). A determinação das matérias secas foi realizada por meio da secagem do material vegetal, em

estufa de circulação forçada de ar a  $35 \pm 2$  °C, até a obtenção do peso constante, as quais foram expressas em miligramas (mg).

A área foliar total foi mensurada através do *software* WinFOLIA™ pelo *scanner* EPSON PERFECTION V700 PHOTO. Escolheram-se 5 plântulas representativas de cada tratamento, e destas avaliaram-se área foliar de todas as folhas. Avaliaram-se ainda a razão de área foliar ( $RAF = AFT/MS_{total}$ ), área foliar específica ( $AFE = AFT/MS_{folhas}$ ) e razão de peso das folhas ( $RPF = MS_{folha}/MS_{total}$ ), esses parâmetros foram calculados conforme Benincasa, (2003). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com 5 tratamentos (intensidades de luz) e 5 repetições. Cada repetição foi composta por cinco tubos contendo um segmento nodal, totalizando 25 plântulas por tratamento.

### 2.3 Quantificação de pigmentos fotossintéticos

A extração dos pigmentos clorofila *a*, *b*, clorofila total (*a+b*) e carotenoides foi realizada segundo Costa et al. (2014) com as seguintes adaptações para o método: quantidade do material vegetal e do solvente dimetilsulfóxido (DMSO) não saturado com  $CaCO_3$ . Foram utilizados 50 mg de matéria fresca de folhas, sem a nervura central. Em seguida, o material vegetal foi incubado em 10 mL de DMSO, em tubos Falcon envoltos em folha de alumínio e colocado em estufa sob temperatura de 65 ° C, durante 24 horas. Após esse período, alíquotas das soluções (3 mL) foram transferidas para uma cubeta de quartzo com volume de 3 cm<sup>3</sup> para realização das leituras de absorvância em espectro TECAN INFINITY M200 PRO operado com o sistema de processamento de dados I-control® versão 3.37. Utilizando-se os comprimentos de onda 480, 649 e 665 nm para carotenoides, clorofila *b* e *a*, respectivamente. Foi feita a leitura do branco, utilizando-se como apenas o DMSO. Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

A partir das leituras obtidas determinou-se a concentração das clorofilas *a*, *b* e carotenoides utilizando-se as equações propostas por Wellburn (1994): Clorofila *a* =  $(12,47 \times A_{665}) - (3,62 \times A_{649})$ ; clorofila *b* =  $(25,06 \times A_{649}) - (6,5 \times A_{665})$ ; carotenoides:  $(1000 \times A_{480} - 1,29 \times C_a - 53,78 \times C_b)/220$ , e a clorofila total por meio da soma dos resultados encontrados das equações para clorofila *a* e *b*, sendo os resultados expressos em mg/g.

### 2.4 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade. O programa estatístico SISVAR® (FERREIRA, 2011) foi utilizado para o processamento dos dados.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As diferentes intensidades de luz promoveram alterações no crescimento de *Aeollanthus suaveolens* (FIGURA 1). Em todos os tratamentos houve desenvolvimento da parte aérea e de raízes. As folhas das plântulas cultivadas sob baixa intensidade apresentaram-se menores em relação às que foram mantidas sob intensidades mais elevadas. Observou-se que a partir da intensidade intermediária ( $78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) houve melhor desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular e também maior número de brotos.

A intensidade de  $78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proporcionou o maior crescimento da parte aérea e maior número de raízes. O incremento na intensidade de luz (a partir de  $57 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) favoreceu o crescimento da maior raiz. Por outro lado, sob menor intensidade ( $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), notou-se menor crescimento do sistema radicular (FIGURA 2). Resultados semelhantes foram encontrados por Sáez et al. (2014) que cultivaram *Castanea sativa* Mill. *in vitro* sob diferentes intensidades luminosas, onde a maior ( $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) proporcionou melhor desenvolvimento do sistema radicular.

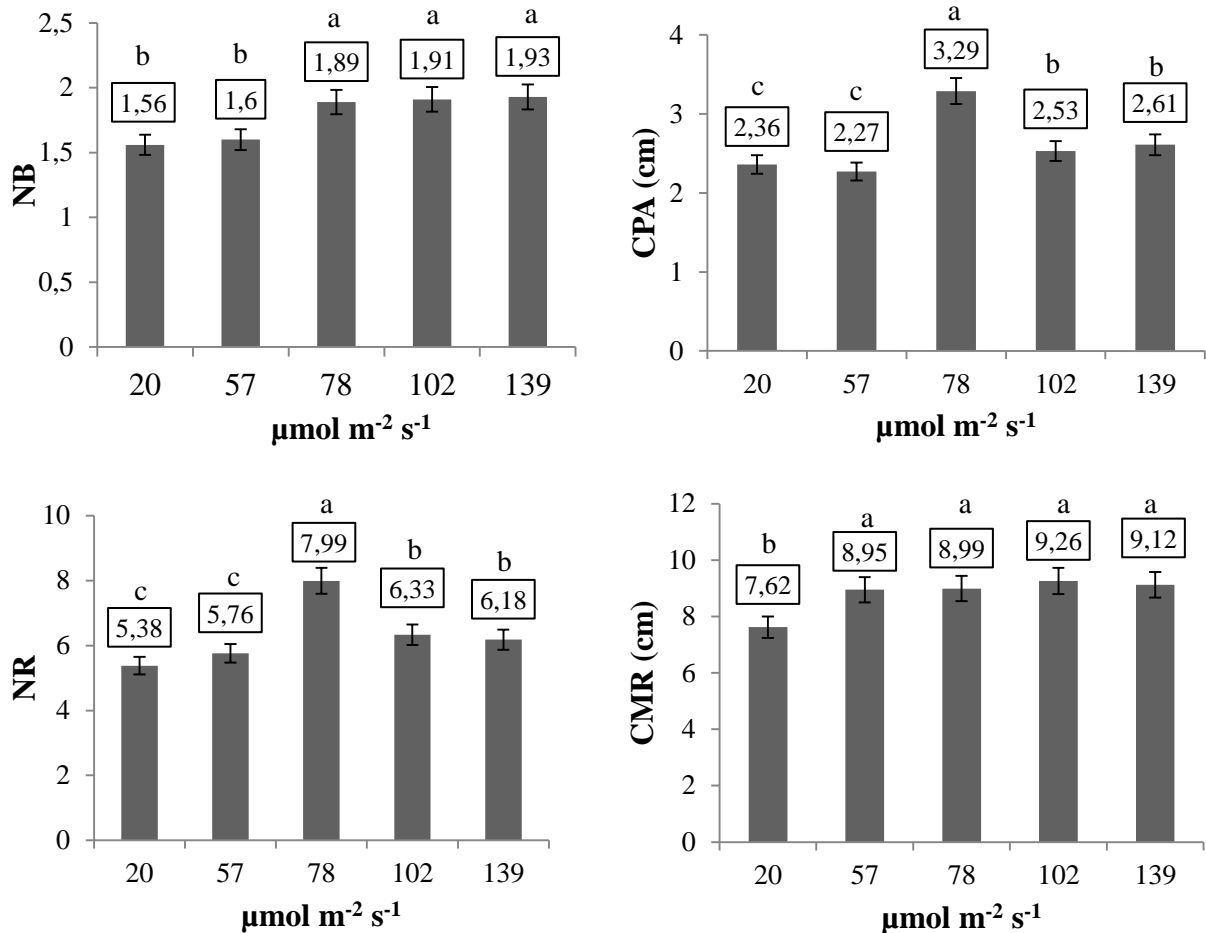
Figura 1 – Plântulas de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae) cultivadas *in vitro* durante 40 dias sob diferentes intensidades luminosas ( $20, 57, 78, 102$  e  $139 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).



Fonte: Do autor (2018).



Figura 2 – Crescimento *in vitro* de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae) cultivada durante 40 dias sob diferentes intensidades luminosas (20, 57, 78, 102 e 139  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).



Legenda: As barras representam o erro padrão ( $\pm$ ). As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Kott, ao nível de 5% de probabilidade. NB: número de brotos; CPA: comprimento da parte aérea; NR: número de raízes e CMR: comprimento da maior raiz.

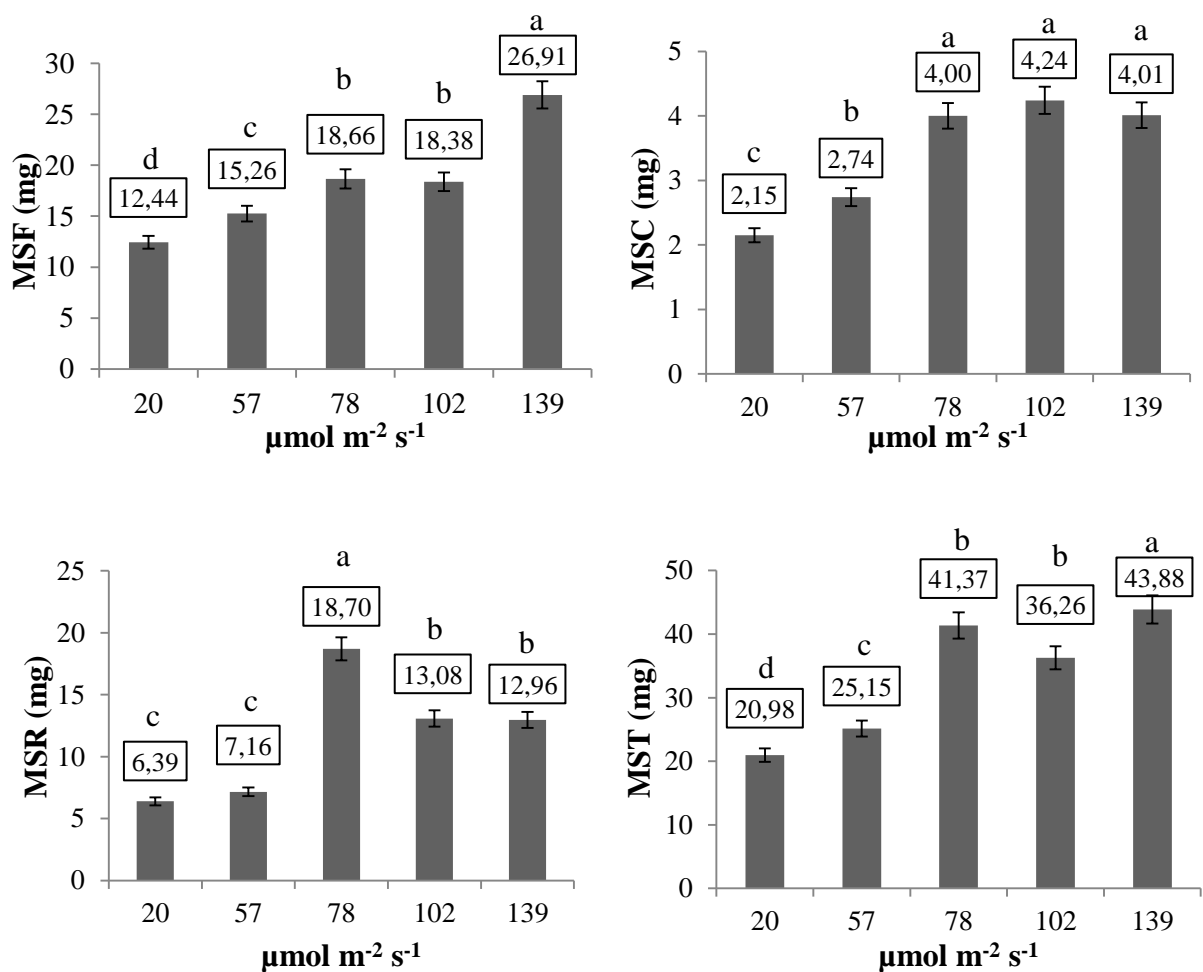
Fonte: Do autor (2018).

Cada espécie possui faixas de luz específicas para o seu crescimento em condições *in vitro*. Em estudo realizado com *Achillea millefolium* L., Alvarenga et al. (2015) relataram que baixas intensidades (27  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) favoreceram o crescimento das plântulas. Assim como no trabalho de Jo et al. (2008), plântulas de *Alocasia amazônica* (Araceae) apresentaram melhor crescimento sob baixas intensidades luminosas (15 e 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) em relação as cultivadas em maiores intensidades. Por outro lado, Silva et al. (2017) verificaram que intensidades intermediárias (69  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) proporcionou o melhor crescimento para *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (Lamiaceae) cultivada *in vitro*.

Em relação à produção das matérias secas da espécie, foi observado um aumento de

MSF, MSC, MSR e MST nas plantas cultivadas nas maiores intensidades de luz (FIGURA 3). A intensidade de  $139 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  obteve maior acúmulo de MSF e MST, a MSC teve maior produção a partir da intensidade intermediária ( $78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), não diferindo estatisticamente das intensidades  $102$  e  $139 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Enquanto que a MSR foi maior sob a intensidade de  $78 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Figura 3 – Produção de matérias secas de folhas, caule, raízes e total de plântulas de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae) cultivadas *in vitro* durante 40 dias sob diferentes intensidades de luz ( $20, 57, 78, 102$  e  $139 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).



Legenda: As barras representam o erro padrão ( $\pm$ ). As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. MSF: matéria seca de folhas; MSC: matéria seca de caules; MSR: matéria seca de raízes e MST: matéria seca total.

Fonte: Do autor (2018).

O aumento da produção de matéria seca nas plântulas cultivadas sob altas intensidades de luz indica que a *Aeollanthus suaveolens* é uma planta adaptada a ambientes que recebem

altas intensidades luminosas. Resultados semelhantes também são relatados para *Castanea sativa* Mill. em condições *in vitro*, sob diferentes intensidades de luz (SÁEZ et al., 2012) e *Hyptis suaveolens* L. (Point.) (ANDRADE et al., 2017). Segundo Larcher (2004), plantas que crescem sob forte radiação desenvolvem folhas espessas e possuem um metabolismo mais ativo, o que proporciona maior produção de matéria seca com maior conteúdo energético.

O incremento da intensidade luminosa favoreceu o aumento da área foliar (AFT), o maior valor foi observado na intensidade de  $139 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (TABELA 1). Esse comportamento sugere que baixas intensidades de luz são limitantes para a expansão foliar desta espécie. Estudo realizado com *Deffenbachia* cultivar *camille* teve resultado semelhante, as plântulas cultivadas *in vitro* apresentaram maior área foliar com aumento da intensidade de luz (EL-MAHROUK et al., 2015).

Os resultados para razão de área foliar (RAF) e área foliar específica (AFE) foram superiores nas baixas intensidades de luz. A RAF foi superior na intensidade de  $57 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e o menor valor foi observado na intensidade de  $139 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A RAF expressa a área foliar útil para produção de 1 grama de matéria seca. Sendo assim, alta intensidade luminosa favoreceu a maior produção de matéria seca em uma área foliar útil menor quando comparada as menores intensidades. Segundo Benincasa (2003) o efeito da menor RAF sob altas intensidades, é considerado como resultado da planta em se adaptar a diferentes condições de luz.

Tabela 1 – Área foliar total (AFT), razão de área foliar (RAF), área foliar específica (AFE) e razão de peso foliar (RPF) de plântulas de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae) cultivadas *in vitro* aos 40 dias, sob diferentes intensidades de luz (20, 57, 78, 102 e  $139 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Intensidades de luz ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	AFT ( $\text{cm}^2$ )	RAF $\text{cm}^2/\text{mg}$	AFE $\text{cm}^2/\text{mg}$	RPF $\text{mg}/\text{mg}$
20	6,527 c	0,304 b	0,025 a	0,851 a
57	8,541 b	0,347 a	0,023 a	0,848 b
78	10,921 a	0,264 c	0,014 b	0,823 c
102	9,045 b	0,279 c	0,016 b	0,800 d
139	11,975 a	0,274 d	0,010 c	0,802 d
CV (%)	9,72	9,97	15,07	1,15

As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2018).

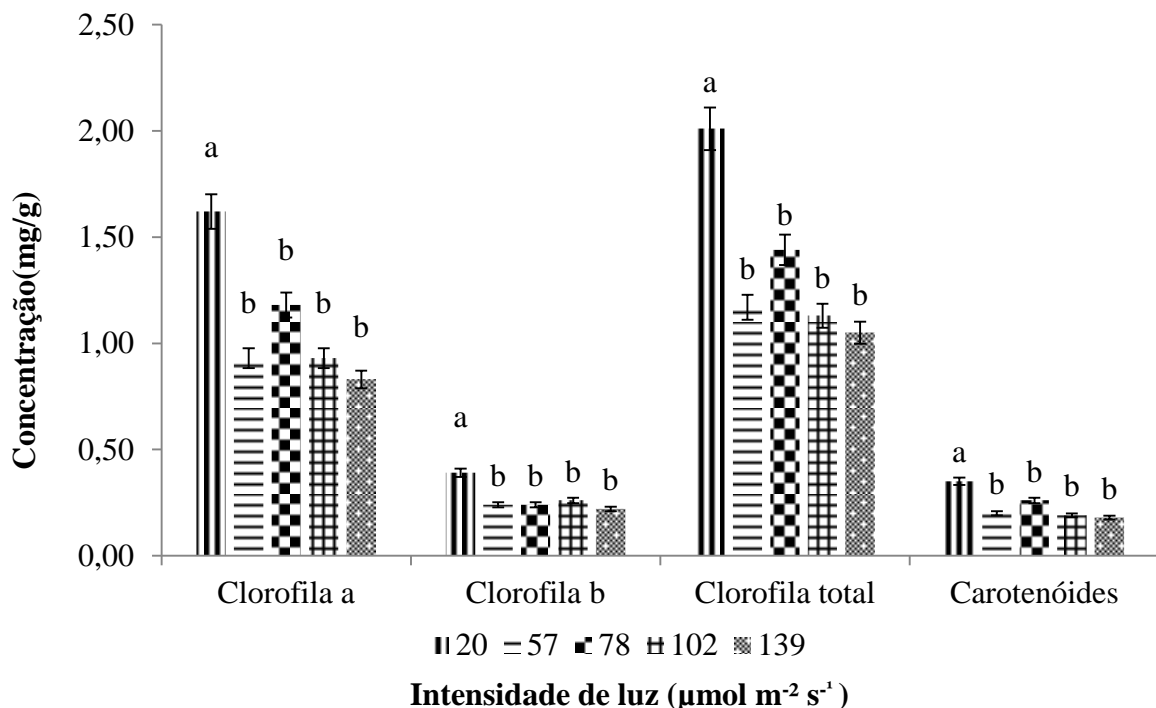
Em relação à variável área foliar específica (AFE), que relaciona a superfície e o peso da folha, as menores intensidades (20 e  $57 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) proporcionaram os maiores valores

(0,025 e 0,023, respectivamente). Este resultado afirma a plasticidade morfológica de *A. suaveolens* em resposta à intensidade luminosa. O aumento da AFE em condições de baixa luminosidade está diretamente relacionado com as alterações anatômicas que podem ocorrer nas plantas sob baixas intensidades luminosas como, cutículas, epiderme mais delgadas e menor proporção do parênquima paliçádico (GOBBI et al., 2011).

Para a razão de peso foliar (RPF), observou-se que a intensidade de  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  possibilitou o maior valor. RPF expressa a fração de biomassa seca não exportada das folhas para outras partes da planta (BENINCASA, 2003). Desse modo, o aumento da RPF indica que a proporção de biomassa seca retida nas folhas e aquela exportada para as demais partes das plantas aumentaram com decréscimo da intensidade de luz.

Além dos efeitos no crescimento, as diferentes intensidades influenciaram o conteúdo dos pigmentos fotossintéticos. Concentrações máximas de clorofila *a*, *b*, total e carotenóides foram observadas na menor intensidade luminosa ( $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (FIGURA 4).

Figura 4 – Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae), cultivadas *in vitro* durante 40 dias, submetida a diferentes intensidades de luz ( $20, 57, 78, 102$  e  $139 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).



Legenda: As barras representam o erro padrão ( $\pm$ ). As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2018).

O aumento da intensidade de luz promoveu uma redução na produção dos pigmentos fotossintéticos. Resultados semelhante a estes foram encontrados por Silva et al. (2017), que cultivaram *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (Lamiaceae) *in vitro* sob diferentes intensidades e constataram que o aumento da intensidade da luz reduziu a concentração de clorofila *a*, *b* e total e carotenoides. A maior quantidade de clorofila na baixa intensidade de luz demonstrou maior eficiência na absorção por unidade de biomassa na folha de *A. suaveolens*. Assim, as plântulas podem alcançar melhor interação de carbono sob a limitação de luz.

O excesso de luz pode causar maior degradação e conseqüentemente, uma redução nos níveis de clorofila. Além disso, em condições de déficit de luz, as plantas estabelecem uma série de mecanismos compensatórios, como o aumento substancial dos pigmentos fotossintéticos para manter seus processos fisiológicos (ZERVOUDAKIS et al., 2012). A baixa concentração de clorofila *b* pode ser uma resposta adaptativa importante da planta à alta luminosidade.

De acordo com Taiz et al. (2017), os carotenoides são pigmentos acessórios que desempenham um papel essencial na fotoproteção, uma vez que as membranas fotossintéticas podem ser facilmente danificadas pelas grandes quantidades de energia absorvida. Porém, sua redução em *A. suaveolens* pode estar associado a outros mecanismos de fotoproteção. Por se tratar de uma espécie medicinal, essa planta pode acionar seu metabolismo secundário para produção dos metabólitos secundários que a protegem contra danos foto-oxidativos.

#### 4 CONCLUSÃO

Intensidades de luz no intervalo de 20 a 139  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  afetam o crescimento e a produção de pigmentos fotossintéticos em *Aeollanthus suaveolens* Mart ex Spreng.. Esta espécie cresce melhor em ambientes com intensidade luminosa acima de 78  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . No entanto, sob intensidade de 139  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  o acúmulo de matéria seca de folhas e total alcança seu máximo. Enquanto a produção de pigmentos fotossintéticos (clorofilas *a*, *b*, total e carotenoides) são maiores sob 20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

## REFERÊNCIAS

- 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 and Organ Culture**, v. 122, n. 2, p. 299–308, 2015.
- 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. **Acta Horticulturae**, v. 1155, p. 277–284, 2017.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: FUNEP, 42p, 2003.
- BOONSNONGCHEEP, P.; KORSANGRUANG, S.; SOONTHORNCHAREONNON, N.; CHINTAPAKORN, Y.; SARALAMP, P.; PRATHANTURARUG, S. Effects of abiotic and biotic elicitors on growth and isoflavonoid accumulation in *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 103, n. 3, p. 333–342, 2010.
- COSTA, A. C.; ROSA, M.; MEGGUER, C. A.; SILVA, F. G.; PEREIRA, F. D.; OTONI, W. C. A reliable methodology for assessing the in vitro photosynthetic competence of two Brazilian savanna species: *Hyptis marruboides* and *Hancornia speciosa*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 117, n. 3, p. 443–454, 2014.
- COSTA, F. H. da S.; PASQUAL, M.; PEREIRA, J. E. S.; CASTRO, E. M. de. Anatomical and physiological modifications of micropropagated 'Caipira'; banana plants under natural light. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 3, p. 323–330, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-90162009000300007&lang=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162009000300007&lang=pt)>. Acesso em: 25 set. 2017.
- EL-MAHROUK, M. E.; DEWIR, Y. H.; MURTHY, H. N.; RIHAN, H. Z.; AL-SHMGANI, H. S.; FULLER, M. P. Effect of photosynthetic photon flux density on growth, photosynthetic competence and antioxidant enzymes activity during ex vitro acclimatization of *Dieffenbachia* cultivars. **Plant Growth Regulation**, v. 79, n. 1, p. 29–37, 2015.
- FERREIRA, L. R.; TAVARES-MARTINS, A.C.C.; PALHETA, I. C. Aspectos etnofarmacológicos e fitoquímicos de *Aeollanthus suaveolens* Mart. Ex Spreng. In: ALFARO, A. T. S.; TROJAN, D. G. **Ciências ambientais e o desenvolvimento sustentável na Amazônia**: 2017. Curitiba: Ed. Atena, 2017. p. 77–88.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, 2011.
- GOBBI, K. F.; GARCIA, R.; VENTRELLA, M. C.; NETO, A. F. G.; ROCHA, G. C. Área foliar específica e anatomia foliar quantitativa do capim-braquiária e do amendoim-forrageiro submetidos a sombreamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 7, p. 1436–1444, 2011.
- IBARAKI, Y.; NOZAKI, Y. Estimation of light intensity distribution in a culture vessel. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 80, n. 1, p. 111–113, 2005.

- JO, E. A.; TEWARI, R. K.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Effect of photoperiod and light intensity on in vitro propagation of *Alocasia amazonica*. **Plant Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3, p. 207–212, 2008.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: RiMa. 531p. 2004.
- MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F.; SILVA, A. . Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 110–121, 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-05722012000100016&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722012000100016&lng=pt&tlng=pt)>. Acesso em: 12 dez. 2017.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- MURTHY, H. N.; LEE, E. J.; PAEK, K. Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: Strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 1, p. 1–16, 2014.
- SÁEZ, P. L.; BRAVO, L. A.; LATSAGUE, M. I.; SÁNCHEZ, M. E.; RÍOS, D. G. Increased light intensity during in vitro culture improves water loss control and photosynthetic performance of *Castanea sativa* grown in ventilated vessels. **Scientia Horticulturae**, v. 138, p. 7–16, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2012.02.005>>. Acesso em: 23 out. 2017.
- SÁEZ, P. L.; BRAVO, L. A.; LATSAGUE, M. I.; TONEATTI, M. J.; COOPMAN, R. E.; ÁLVAREZ, C. E.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; RÍOS, D. G. Influence of in vitro growth conditions on the photosynthesis and survival of *Castanea sativa* plantlets during ex vitro transfer. **Plant Growth Regulation**, v. 75, n. 3, p. 625–639, 2014.
- SÁEZ, P. L.; BRAVO, L. A.; LATSAGUE, M. I.; TONEATTI, M. J.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; RÍOS, D. G. Light energy management in micropropagated plants of *Castanea sativa*, effects of photoinhibition. **Plant Science**, v. 201–202, n. 1, p. 12–24, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.11.008>>. Acesso em: 17 set. 2017.
- SÁEZ, P. L.; BRAVO, L. A.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; BRAVO, P. B.; RÍOS, D. G. Effect of photon flux density and exogenous sucrose on the photosynthetic performance during in vitro culture of *Castanea sativa*. **American Journal of Plant Sciences**, v. 7, n. 14, p. 2087–2105, 2016.
- SEIDEMANN, J. **World spice plants: economic usage, botany, taxonomy**. European Union: Springer, 2005.
- SILVA, M. D. P.; MARINI, F. S.; MELO, R. S. Levantamento de plantas medicinais cultivadas no município de Solânea, agreste paraibano: Reconhecimento e valorização do saber tradicional. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 881–890, 2015.
- 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**, v. 129, n. 3, p. 501–510, 2017.
- SIMIONATTO, E.; PORTO, C.; STÜKER, C. Z.; DALCOL, I. I.; SILVA, U. F. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Aeolanthus suaveolens*

MART. ex Spreng. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1923–1925, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

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, n. 2, p. 187–201, 2014.

WELLBURN, A. R. The Spectral Determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307–313, 1994. Disponível em:

<[http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)>. Acesso em: 3 nov. 2017

ZERVOUDAKIS, G.; SALAHAS, G.; KASPIRIS, G.; KONSTANTOPOULOU, E. Influence of light intensity on growth and physiological characteristics of common sage (*Salvia officinalis* L.). **Braz. Arch. Biol. Technol**, v. 55, n. 1, p. 89–95, 2012.

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.



## ARTIGO 2 - CULTIVO *IN VITRO* DE *Aeollanthus suaveolens* MART. EX SPRENG. (LAMIACEAE) SOB DIFERENTES QUALIDADES DE LUZ

### RESUMO

A espécie *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae) possui propriedades medicinais marcantes como atividade anticonvulsivante, antibacteriana e antifúngica. A cultura de tecidos permite a obtenção de material vegetal de alta qualidade e aperfeiçoa a produção de metabólitos secundários em plantas medicinais. Objetivou-se avaliar o crescimento e a produção de pigmentos fotossintéticos de plântulas de *Aeollanthus suaveolens* cultivadas *in vitro* sob diferentes espectros de luz. Segmentos nodais foram cultivados por 40 dias sob lâmpadas LEDs branca, verde, amarela, azul, vermelha e combinações de azul e vermelho (2 vermelhas:1 azul; 1 vermelha:2 azuis; 1 vermelha:1 azul) e lâmpadas fluorescente branca fria. Após 40 dias de cultivo, as plântulas foram avaliadas quanto aos comprimentos da parte aérea e da maior raiz, números de folhas e de raízes, matérias secas de folha, caule, raiz e total, e a produção dos pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b*, total e carotenoides). O crescimento e a concentração de pigmentos fotossintéticos das plântulas de *A. suaveolens* foram significativamente afetados pelos diferentes espectros luminosos. A luz verde proporcionou o maior crescimento da parte aérea (CPA) e maior comprimento de raiz (CMR). As plântulas cultivadas sob espectro branco LED tiveram maior número de folhas (NF) e raízes (NR), maior produção de matérias secas de folha (MSF) e de caule (MSC). A lâmpada fluorescente promoveu maior acúmulo de matéria seca de raiz (MSR) e total (MST). As plântulas cultivadas sob luz amarela tiveram maior produção de clorofila *a*, total e carotenoides. A maior concentração de clorofila *b* foi observada no cultivo sob luz branca Led. A utilização de lâmpadas LEDs é eficiente no cultivo *in vitro* de *A. suaveolens*, a luz branca LED é eficaz no crescimento e desenvolvimento das plântulas. Enquanto que a luz amarela estimula maior produção de pigmentos fotossintéticos.

**Palavras-chave:** Espectro. Luz. Fotossíntese.

## ABSTRACT

The species *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae), has remarkable medicinal properties, as anticonvulsant, antibacterial, and antifungal activities. Plant tissue culture allows the production of high quality plant material and also improves the production of secondary metabolites in medicinal plants. The objective of this study was to evaluate the growth and the production of photosynthetic pigments of seedlings of *Aeollanthus suaveolens*, grown *in vitro* under different light spectra. Nodal segments were cultivated for 40 days under white, green, yellow, blue, red, and combinations of blue and red (2 red: 1 blue, 1 red: 2 blue, 1 red: 1 blue) LEDs, and cold white fluorescent lamps. After 40 days of cultivation, shoot length, root length, leaf and root numbers, leaf, stem, root and total dry matter, as well as the production of photosynthetic pigments (chlorophyll a, b, total and carotenoids) in seedlings of *A. suaveolens* were evaluated. The growth and the concentration of photosynthetic pigments of *A. suaveolens* seedlings were significantly affected by different light spectra. The green light provided the highest shoot growth (CPA) and higher root length (CMR). Seedlings cultivated under white LED spectrum had a higher number of leaves (NF) and roots (NR), and also a greater production of leaf dry matter (MSF) and stem dry matter (MSC). The fluorescent light promoted a higher accumulation of root (MSR) and total dry matter (MST). Seedlings grown under yellow light had a higher production of chlorophyll a, total and carotenoids. The highest concentration of chlorophyll b was observed in seedlings under white LED light. Therefore, the use of LEDs is efficient in the *in vitro* cultivation of *A. suaveolens*. For this species, the white LED light is effective in the growth and development of seedlings, while the yellow light stimulates greater production of photosynthetic pigments.

**Keywords:** Spectrum. Light. Photosynthesis.

## 1 INTRODUÇÃO

A família Lamiaceae é importante economicamente, pois muitas espécies são utilizadas na culinária, e na produção de cosméticos (HARLEY, 2012; SIMIONATTO et al., 2007). Além disso, ela é destaque em muitos levantamentos etnobotânicos, a exemplo dos trabalhos de Almeida et al. (2009); Oliveira e Menini Neto (2012) e Rocha, Tavares-Martins e Lucas (2017). A espécie *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng pertence à família Lamiaceae, é conhecida popularmente como catinga de mulata, chegadinha e macassá (CARMO et al., 2015; SEIDEMANN, 2005; SILVA; MARINI; MELO, 2015). Possui propriedades medicinais marcantes como atividade anticonvulsivante, antibacteriana e antifúngica (FERREIRA; TAVARES-MARTINS; PALHETA, 2017; SIMIONATTO et al., 2007).

A cultura de tecidos tem sido empregada para a propagação de plantas medicinais para obtenção de maior número de plantas homogêneas. Essa técnica permite a obtenção de material vegetal de alta qualidade e também aperfeiçoa a produção de metabólitos secundários (MORAIS et al., 2012). No entanto, requer a análise de alguns parâmetros como o tipo de explante, a temperatura e condições de luminosidade (JEONG; SIVANESAN, 2015).

A luz é um fator ambiental fundamental para as plantas, pela ação direta ou indireta na regulação do desenvolvimento e crescimento das plantas (MORINI; MULEO, 2003). Na cultura de tecidos de plantas, geralmente, utiliza-se lâmpadas fluorescentes branca-fria como fonte de luz nas salas de crescimento. Entretanto, essas lâmpadas possuem uma composição espectral ampla e heterogênea, que podem influenciar o crescimento das plantas. Nesse sentido, o uso de Diodos Emissores de Luz (LEDs) tem sido considerado uma alternativa para melhorar a qualidade do cultivo *in vitro* (LAZZARINI et al., 2017). Esse sistema de iluminação possui características desejáveis, como a capacidade de controlar a composição espectral, longa durabilidade, especificidade do comprimento de onda e baixa quantidade de emissões térmicas (GUPTA; JATOTHU, 2013; YEH; CHUNG, 2009).

Muitos estudos *in vitro* investigaram o efeito da qualidade espectral no crescimento de plântulas através da aplicação lâmpadas LEDs (ANDRADE et al., 2017; CIOĆ et al., 2017; ROCHA et al., 2013). Alguns estudos relatam que o uso de LEDs é mais adequado para o crescimento das plantas do que lâmpadas fluorescentes. Como exemplo de *Rehmannia glutinosa* Libosch. (MANIVANNAN et al., 2015); *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) (ALVARENGA et al., 2015); *Pectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (Lamiaceae) (SILVA et al., 2017).

Nesse contexto, objetivou-se avaliar o crescimento e a produção de pigmentos fotossintéticos de plântulas de *Aeollanthus suaveolens* cultivadas *in vitro* sob diferentes espectros de luz.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Estabelecimento do material vegetal *in vitro*

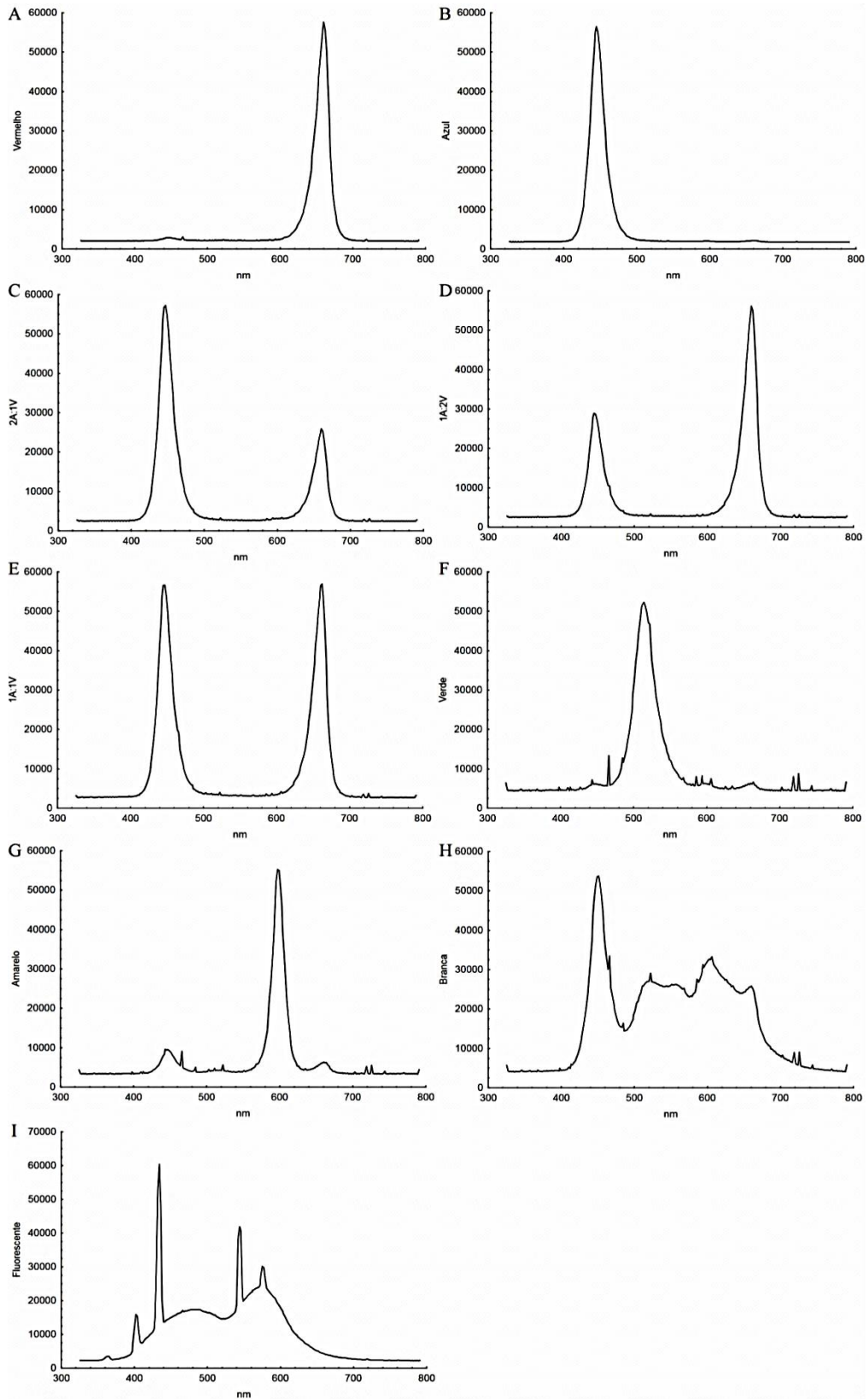
Sementes coletadas de plantas matrizes, cultivadas em casa de vegetação, foram tratadas com hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) por 5 minutos sob agitação constante. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram lavadas com água destilada autoclavada por três vezes e inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Em seguida, os tubos foram mantidos em sala de crescimento sob lâmpadas brancas-frias fluorescentes com intensidade de  $39\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 16 h e temperatura de  $25 \pm 1$  °C. Após 30 dias, as plântulas originadas foram multiplicadas em frascos contendo 40 mL de meio MS.

### 2.2 Qualidade de luz

O primeiro e o segundo segmentos nodais com aproximadamente 1cm foram utilizados como explantes, os demais segmentos foram descartados. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio (20 x 150 mm) contendo 15 mL de meio MS, suplementado 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 6g L<sup>-1</sup> de ágar (Himedia<sup>®</sup>, tipo I) e pH ajustado para  $5,7 \pm 0,1$ . Os tubos de ensaio com os meios de cultura foram autoclavados a 121° C por 20 min a 1,2 atm.

Após a inoculação, os explantes foram cultivados sob diferentes diodos emissores de luz LEDs (TECNAL<sup>®</sup> Piracicaba, Brasil): Verde (VD); amarelo (AM); branco (B); verde (VD); azul (A); vermelha (V); combinações de vermelho e azul: 1V:2A; 2V:1A; 1V:1A, com intensidade de  $42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , e sob lâmpada fluorescente (FL) branca fria de  $39\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Os espectros luminosos foram medidos por um espectrômetro manual SPECTRA PEN Z850 (Qubit Systems- Kingston, Ontario-USA). As distribuições espectrais dos LEDs e da lâmpada fluorescente utilizados neste experimento estão representadas na Figura 1.

Figura 1 – Perfis espectrais nas fontes de luz utilizadas no experimento.



Legenda: Vermelho (A); azul (B); 2A:1V (C); 1A:2V (D); 1A:1V (E); verde (F); amarelo (G); branco LED (H); fluorescente (I).  
 Fonte: Do autor (2018).

Após 40 dias foram avaliados o crescimento e a produção dos pigmentos fotossintéticos. As plântulas obtidas foram avaliadas quanto aos comprimentos da parte aérea (CPA, cm) e da maior raiz (CMR, cm), números de folhas (NF) e de raízes (NR), matérias secas de folha (MSF, mg), caule (MSC, mg), raiz (MSR, mg) e total (MST, mg). Para a determinação da matéria seca, as folhas, os caules e as raízes foram colocadas em sacos de papel kraft e acondicionados em estufa de circulação forçada de ar, a 35 °C, até peso constante. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com nove tratamentos e cinco repetições por tratamento. Cada repetição foi composta por cinco plântulas, totalizando 25 plântulas por tratamento.

### 2.3 Quantificação de pigmentos fotossintéticos

A extração dos pigmentos clorofila *a*, *b*, clorofila total (*a+b*) e carotenoides foi realizada segundo metodologia descrita por Costa et al. (2014) com as seguintes adaptações para o método: quantidade do material vegetal e do solvente dimetilsulfóxido (DMSO) não saturado com CaCO<sub>3</sub>. Foram utilizados 50 mg de matéria fresca de folhas, sem a nervura central. Em seguida, o material vegetal foi incubado em 10 mL de (DMSO), em tubos Falcon envoltos em folha de alumínio e colocados em estufa sob temperatura de 65 ° C, durante 24 horas. Alíquotas das soluções (3 mL) foram transferidas para uma cubeta de quartzo com volume de 3 cm<sup>3</sup> para a realização das leituras.

As leituras de absorvância foram realizadas em triplicata, por meio dos comprimentos de onda 480, 649 e 665 nm para carotenoides, clorofila *b* e *a*, respectivamente. Foi feita a leitura do branco, utilizando-se como apenas o DMSO. A absorvância dos extratos foi aferida em espectro TECAN INFINITY M200 PRO operado com o sistema de processamento de dados I-control<sup>®</sup> versão 3.37. A partir das leituras obtidas determinou-se a concentração das clorofilas *a*, *b* e carotenoides utilizando-se as equações propostas por Wellburn (1994): Clorofila *a* = (12,47 x A<sub>665</sub>) - (3,62 x A<sub>649</sub>); clorofila *b* = (25,06 x A<sub>649</sub>) - (6,5 x A<sub>665</sub>); carotenoides: (1000 x A<sub>480</sub> - 1,29 x C<sub>a</sub> - 53,78 x C<sub>b</sub>)/220, e a clorofila total por meio da soma dos resultados encontrados das equações para clorofila *a* e *b*, sendo os resultados expressos em mg/g.

### 2.4 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade. O programa estatístico SISVAR<sup>®</sup> (FERREIRA, 2011) foi utilizado para o processamento dos dados.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As diferentes qualidades de luz afetaram o crescimento das plântulas de *Aeollanthus suaveolens*. As plântulas cultivadas sob as luzes amarela e vermelha tiveram um menor desenvolvimento foliar e radicular em relação as outras que foram cultivadas nos demais espectros luminosos (FIGURA 2).

Figura 2 – Aspectos de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. após 40 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes qualidades de luz.



Legenda: VD (verde); AM (Amarelo); V (vermelho); FL (fluorescente); 1V:1A (1vermelho:1azul); 1V:2A (1vermelho:2azuis); B (branco); A (azul); 2V:1A (2vermelhos:1azul).  
Fonte: Do autor (2018).

Através da análise de variância observou-se a influência dos espectros luminosos sob as variáveis de crescimento. A luz verde proporcionou o maior crescimento da parte aérea (CPA) (FIGURA 3). Resultados semelhantes foram encontrados por Camargo et al. (2015) em experimento com *Oncidium baueri* Lindl, que obtiveram maiores médias no comprimento da parte aérea utilizando a mesma qualidade de luz. Em contra partida, Ferrari et al. (2016), registraram maiores resultados para essa variável em *Curcuma longa* L. sob o cultivo em luz azul. Segundo Erig e Schuch, (2005), a função do tipo de luz no crescimento e desenvolvimento das plantas ainda não está bem esclarecida, ela pode variar com a espécie de planta, o estágio de crescimento, condições ambientais entre outros fatores.

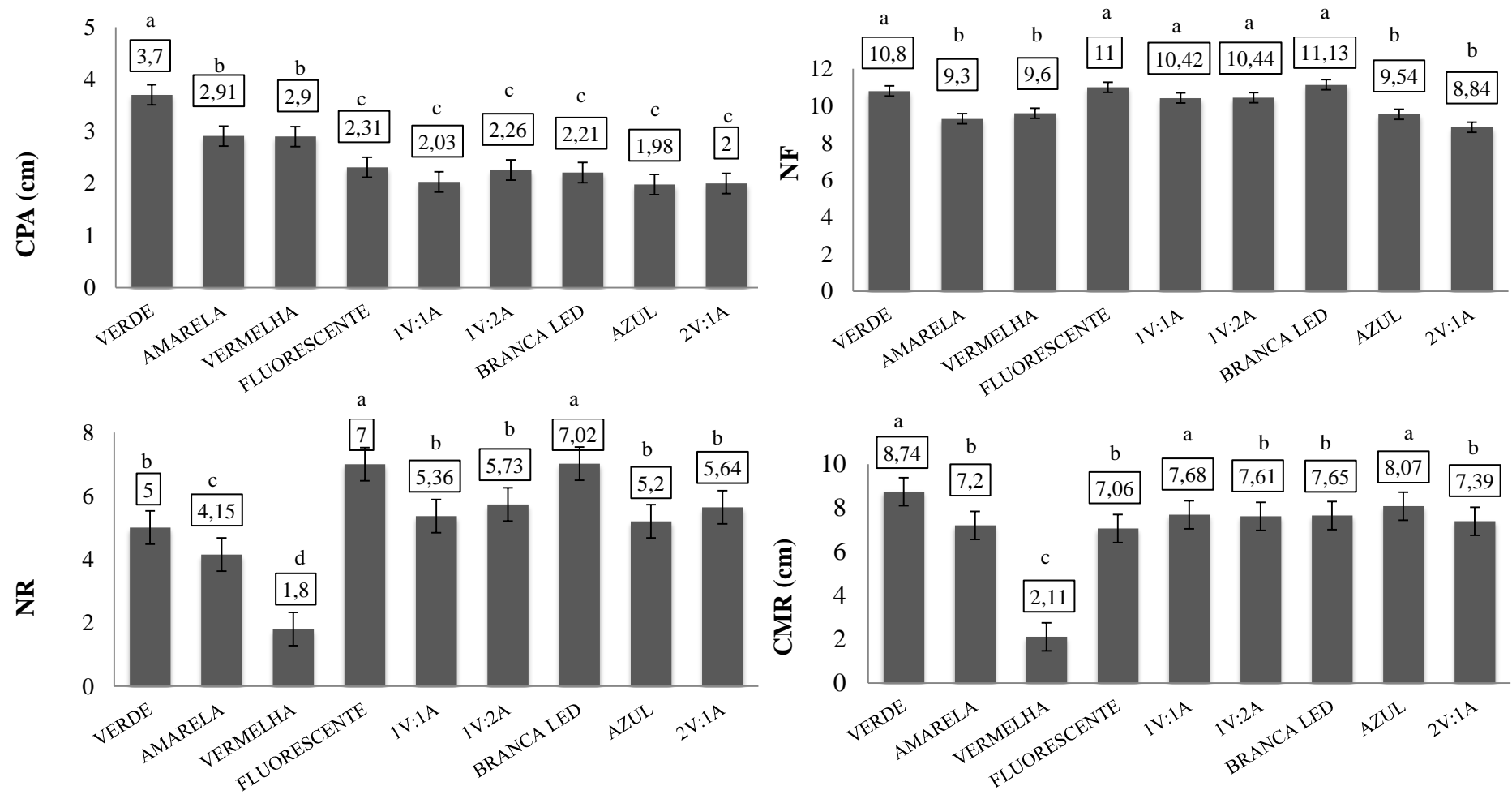
Em relação ao número de folhas (NF), a luz branca LED teve o maior valor, não diferindo estatisticamente das luzes verde, 1V:1A; 1V:2A e branca fluorescente (FIGURA 3). Esse aumento no número de folhas pode ser considerado uma característica importante para obtenção de princípios ativos. Em estudo realizado com *Stevia rebaudiana* Bertoni, a maior produção de folhas foi obtida no cultivo sob luz azul (RAMÍREZ-MOSQUEDA; IGLESIAS-ANDREU; BAUTISTA-AGUILAR, 2017). Segundo Araújo et al. (2009), as plantas irradiadas com luz branca absorvem mais os comprimentos de ondas azul e vermelho e grande parte do verde, necessários para ganhos energéticos pela fotossíntese, bem como para outros processos fisiológicos. Isto provavelmente justifique os resultados obtidos neste trabalho.

O maior número de raízes (NR) foi observado no cultivo sob os espectros de luz branca LED, não havendo diferença estatística significativa da branca fluorescente (FIGURA 3). Em experimento de multiplicação e enraizamento *in vitro* com *Rubus* sp, Pasa et al. (2012) verificaram que a qualidade de luz branca promove maior número de raiz na espécie em relação aos outros espectros, o que corrobora com a presente pesquisa.

Para o comprimento da maior raiz (CMR), a luz verde obteve a maior média, não diferindo estatisticamente dos espectros de luz azul e 1V:1A . Por outro lado, a luz vermelha teve o menor valor em relação aos outros tratamentos (FIGURA 3). Em estudo realizado por Nascimento et al. (2015), plântulas de *Kalanchoe daigremontiana* sob condições *in vitro* e submetidas a diferentes qualidades de luz, tiveram melhor crescimento de raiz quando cultivadas sob luzes branca e vermelha. De acordo com George (1996), a luz vermelha estimula a formação do sistema radicular em muitas espécies. Porém, neste trabalho, o comprimento de raízes foi significativamente positivo sob luzes verde, azul e combinação 1:1 de vermelho e azul.



Figura 3 – Crescimento *in vitro* de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. cultivada durante 40 dias sob diferentes espectros luminosos.



Legenda: Número de brotos (NB); Comprimento da parte aérea (CPA cm); Número de folhas (NF); Número de raiz (NR); Comprimento da maior raiz (CMR cm). As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Erro padrão ( $\pm$ ).

Fonte: Do autor (2018).

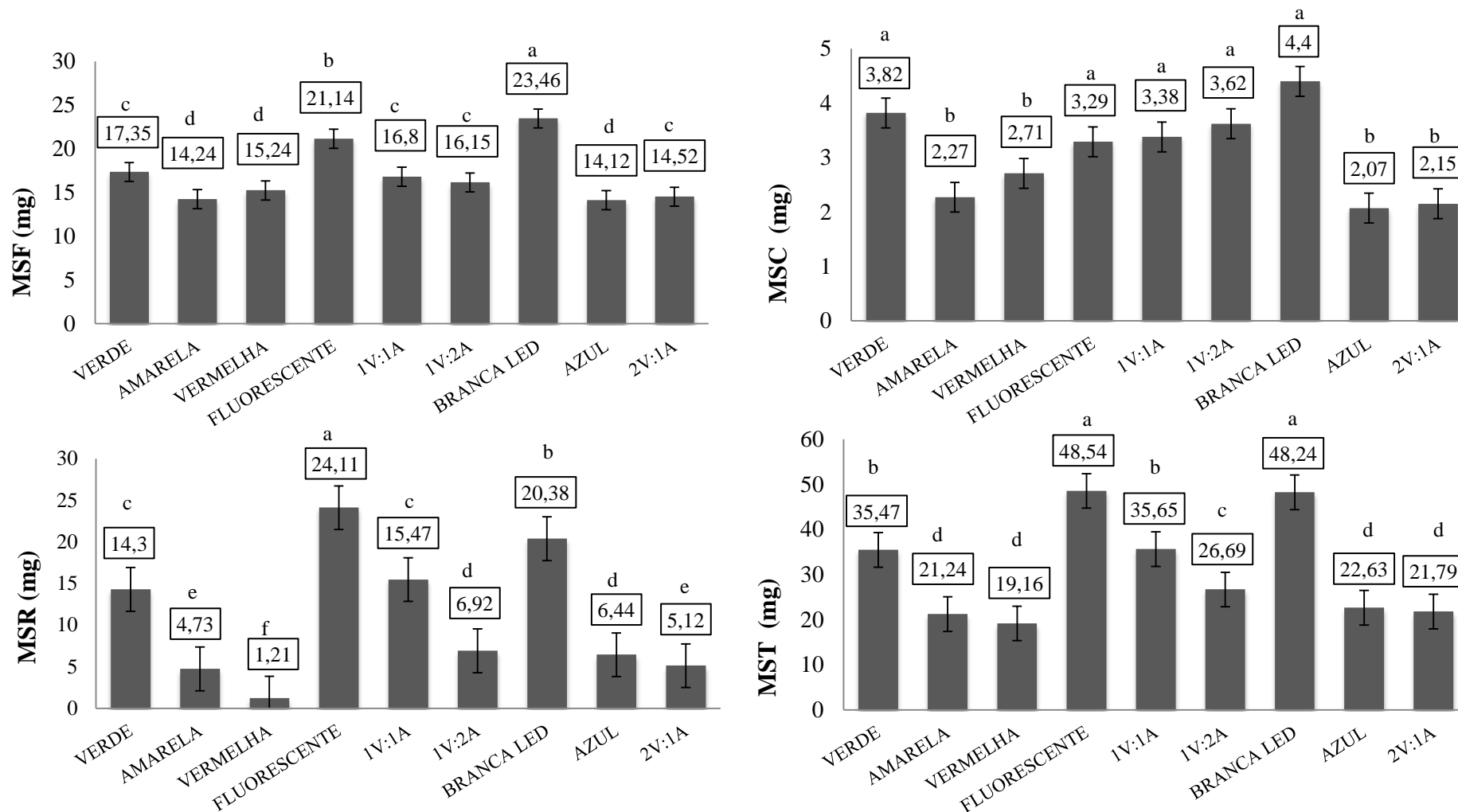
Em relação à produção de matéria seca de folhas (MSF), a luz branca LED obteve a maior média (FIGURA 4). A luz branca LED também proporcionou maior produção de matéria seca de caule (MSC), não diferindo estatisticamente dos espectros verde, fluorescente, 1V:1A e 1V:2A. Em estudos com *Achillea millefolium* L, a maior produção de matéria seca da parte aérea ocorreu no cultivo sob luzes azul, fluorescente e vermelha, respectivamente (ALVARENGA et al., 2015). Por outro lado, Ferrari et al. (2016), reportaram que as luzes branca e amarela proporcionaram maior produção de matéria seca da parte aérea em *Curcuma longa* L. cultivada *in vitro*. Esses resultados demonstram que cada espécie possui especificidade a ser submetida a diferentes qualidades de luz.

A maior produção de matéria seca de raiz (MSR) foi obtida no cultivo sob lâmpadas brancas fluorescentes. Em estudo realizado por Alvarenga et al. (2015), o espectro de luz azul influenciou positivamente na biomassa seca de raiz em plântulas de *Achillea millefolium* L., cultivadas *in vitro*. Em trabalho realizado com *Curcuma longa* L., espectros luminosos branco e amarelo proporcionaram maior quantidade de matéria seca da raiz (FERRARI et al., 2016).

As plântulas cultivadas sob lâmpadas brancas fluorescente tiveram maior produção de matéria seca total, seguido da branca LED, não havendo diferença significativamente entre elas (FIGURA 4). Resultados distintos foram encontrados por Bello-Bello et al. (2016), onde o acúmulo da matéria seca de raiz em *Vanilla planifolia* Andrews foi obtido de plântulas submetidas à combinação dos espectros azul e vermelho. Para *Anthurium andraeanum* (antúrio) a matéria seca total, também, foi favorecida na combinação de luz azul e vermelha, seguido pela luz branca (GU et al., 2012). Uma possível justificativa as variações de fitomassa em resposta a qualidade de luz envolvida, pode ser explicada pela presença do fitocromo nos vegetais, que absorve mais luz na região do vermelho e vermelho-distante, e em menor intensidade, a luz azul, alocando sua matéria em diferentes órgãos do vegetal (MATHEWS, 2010).

De acordo com Ferrari et al. (2016), as plantas se desenvolvem sob luzes variadas compostas de uma mistura em qualidade e quantidade, ativando vários fotorreceptores, como os fitocromos. Essas proteínas são responsáveis por desempenhar várias funções importantes como a regulação da expressão gênica, alterações de membranas, germinação de sementes e ciclos circadianos. As respostas observadas nesse experimento com *Aeollanthus suaveolens* provavelmente foram mediadas pelos fitocromos.

Figura 4 – Matéria seca de plântulas de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. cultivadas *in vitro*, sob diferentes qualidades de luz.



Legenda: Matéria seca de folha (MSF); caule (MSC); raiz (MSR); total (MST). As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Erro padrão ( $\pm$ ).

Fonte: Do autor (2018).

Quanto à concentração de pigmentos fotossintéticos, maiores médias de clorofila *a*, total e carotenoides foram encontradas nas plantas cultivadas sob luz amarela. A luz branca produziu maior concentração de clorofila *b* (TABELA 1). Resultado similar foi encontrado por Victório et al. (2007), onde a luz amarela proporcionou maior concentração de clorofila *a* e total em plântulas de *Phyllanthus tenellus* Roxb. No entanto, Rocha et al. (2010) avaliando o efeito de fontes luminosas na micropropagação de *Fragaria x ananassa* Duch. (morangueiro), observaram que as plântulas crescidas *in vitro* sob luz vermelha tiveram maior concentração de clorofila *a* e *b*, enquanto a luz verde reduziu os teores dessas clorofilas. Segundo Darko et al. (2014), a qualidade da luz é fundamental no funcionamento do aparato fotossintético, pois influencia na composição dos pigmentos.

Tabela 1 – Concentração de pigmentos fotossintéticos (mg/g<sup>-1</sup> MF) em plântulas de *Aeollanthus suaveolens* cultivadas *in vitro* sob a exposição a diferentes espectros luminosos: verde (VD), amarelo (AM), vermelho (V), fluorescente (FL), 1V:1A, 1V:2A; Branco (B), Azul (A) e 2V:1A.

Qualidade de Luz	Concentração de clorofila			Carotenoides
	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Clorofila Total	
	-----mg/g <sup>-1</sup> MF-----			
VD	0,328 b	0,084 b	0,413 b	0,080 b
AM	0,345 a	0,077 b	0,422 a	0,083 a
V	0,271 c	0,068 c	0,339 c	0,067 d
FL	0,267 c	0,077 b	0,345 c	0,066 d
1V1A	0,281 c	0,062 c	0,344 c	0,070 c
1V2A	0,190 f	0,043 e	0,233 e	0,040 f
B	0,243 d	0,161 a	0,404 b	0,052 f
A	0,214 e	0,051 d	0,265 d	0,048 f
2V1A	0,249 d	0,058 d	0,307 e	0,058 e
CV%	0,22	5,26	1,1	1,05

As médias seguidas da mesma letra na mesma coluna, não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Scott-knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2018).

Para morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.), o maior teor de carotenoides foi obtido em brotos sob luz vermelha (ROCHA et al., 2010). Entretanto, Moreno-Jiménez, Loza-Cornejo e Ortiz-Morales (2017), trabalhando com chile serrano (*Capsicum annum* L.) concluíram que a luz azul favorece a produção de pigmentos fotossintéticos como os carotenoides. Segundo Ramel, Mialoundama e Havaux (2013), a variação dos aparatos da fotossíntese são fundamentais durante a fase de aclimatização do vegetal por atuar na fotoproteção das moléculas de clorofila, dissipando o excesso de energia luminosa.

A eficiência da utilização de lâmpadas LEDs no cultivo protegido de plantas varia entre os espectros de luz e as espécies, uma vez que a influência dessas lâmpadas está atrelada às respostas fisiológicas específicas de cada espécie (LAZZARINI et al., 2017). Além disso, a qualidade da luz tem efeitos importantes sobre o crescimento e o desenvolvimento das plantas, especialmente para fotossíntese e fotomorfogênese. Segundo Guo et al. (2007), esses dois processos regulamentam o crescimento, a diferenciação e o metabolismo das plantas através de sinais recebidos pelos fotorreceptores.

#### **4 CONCLUSÃO**

A utilização de lâmpadas LEDs é eficaz no cultivo *in vitro* de *A. suaveolens*, a luz branca LED é eficiente no crescimento e desenvolvimento das plântulas. Enquanto que o espectro amarelo favorece a produção de pigmentos fotossintéticos. Se o objetivo é produzir ganho de massa das plântulas, os espectros, branco LED e fluorescente são os mais recomendados no cultivo *in vitro* dessa espécie. Por outro lado, a luz amarela pode ser utilizada antes da aclimatização das plântulas, pois pode auxiliar na fotoautotrofia através do aumento dos pigmentos fotossintéticos, e ter melhores resultados nesse processo.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, N. F. L.; SILVA, R. de S.; SOUZA, J. M.; QUIROZ, A. P. N.; MIRANDA, G. da S.; OLIVEIRA, H. B. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais na na cidade de Viçosa – MG. **Rev. Bras. de Farmaco.**, v. 90, n. 4, p. 316–320, 2009.
- 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 and Organ Culture**, v. 122, n. 2, p. 299–308, 2015.
- 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. **Acta Horticulturae**, v. 1155, p. 277–284, 2017.
- ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; RODRIGUES, F. A.; RODRIGUES, J. D.; CASTRO, E. M.; SANTOS, A. M. Crescimento in vitro de *Cattleya loddigesii* Lindl. em diferentes espectros luminosos associados com ácido giberélico. **Revista Ceres**, v. 56, n. 5, p. 542–546, 2009.
- BELLO-BELLO, J. J.; MARTÍNEZ-ESTRADA, E.; CAALMAL-VELÁZQUEZ, J. H.; MORALES-RAMOS, V. Effect of LED light quality on in vitro shoot proliferation and growth of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 8, p. 272–277, 2016. Disponível em: <<http://academicjournals.org/journal/AJB/article-abstract/D4EC58C57336>>. Acesso em: 25 out. 2017.
- CAMARGO, S.; DANIELE, C. I.; RODRIGUES, B.; MOREIRA, I. C.; MARINHO, A.; RICARDO, D. A. I.; FARIA, T. De; MÁRCIA, I. I.; SCHUCH, W. Fitorreguladores e espectros de luz na micropropagação de *Oncidium baueri* Lindl. **Ciência Rural**, v. 45, n. 11, p. 2007–2012, 2015.
- CARMO, T. N.; LUCAS, F.C. A.; LOBATO, G. DE J.M.; GURGEL, E. S. C. Plantas medicinais e ritualísticas comercializadas na feira 25 de setembro, Belém, Pará. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 11, n. 21, p. 3440-3467, 2015.
- CIOĆ, M.; SZEWCZYK, A.; ŻUPNIK, M.; KALISZ, A.; PAWŁOWSKA, B. LED lighting affects plant growth, morphogenesis and phytochemical contents of *Myrtus communis* L. in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 132, n. 3, p. 433–447, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11240-017-1340-2>>. Acesso em: 10 jan. 2018.
- COSTA, A. C.; ROSA, M.; MEGGUER, C. A.; SILVA, F. G.; PEREIRA, F. D.; OTONI, W. C. A reliable methodology for assessing the in vitro photosynthetic competence of two Brazilian savanna species: *Hyptis marruboides* and *Hancornia speciosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 117, n. 3, p. 443–454, 2014.
- DARKO, E.; HEYDARIZADEH, P.; SCHOEFS, B.; SABZALIAN, M. R. Photosynthesis under artificial light: the shift in primary and secondary metabolism. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1640, 2014. Disponível em: <<http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2013.0243>>. Acesso em: 27 nov. 2017.

- GUPTA, S. D.; JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in in vitro plant growth and morphogenesis. **Plant Biotechnology Reports**, v. 7, n. 3, p. 211–220, 2013.
- ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Tipo de luz na multiplicação in vitro de framboeseira (*Rubus idaeus* L.) “Batum”. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 3, p. 488–490, 2005.
- FERRARI, M. P. S.; ANTONIAZZI, D.; NASCIMENTO, A. B.; FRANZ, L. F.; BEZERRA, C. S.; MAGALHÃES, H. M. Espectros luminosos no desenvolvimento de plântulas de *Curcuma longa* cultivadas in vitro. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v. 19, n. 4, p. 247-251, out./dez. 2016.
- FERREIRA, L. R.; TAVARES-MARTINS, A.C.C.; PALHETA, I. C. Aspectos etnofarmacológicos e fitoquímicos de *Aeollanthus suaveolens* Mart. Ex Spreng. In: ALFARO, A. T. S.; TROJAN, D. G. **Ciências ambientais e o desenvolvimento sustentável na Amazônia**: 2017. Curitiba: Ed. Atena, 2017. p. 77–88.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, 2011.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture, part 1 - The technology**. 2nd. Edington, Exegetics Limited. 1574p., 1996.
- GU, A.; LIU, W.; MA, C.; CUI, J.; HENNY, R. J.; CHEN, J. Regeneration of *Anthurium andraeanum* from leaf explants and evaluation of microcutting rooting and growth under different light qualities. **HortScience**, v. 47, n. 1, p. 88–92, 2012.
- GUO, B.; LIU, Y. G.; YAN, Q.; LIU, C. Z. Spectral composition of irradiation regulates the cell growth and flavonoids biosynthesis in callus cultures of *Saussurea medusa* Maxim. **Plant Growth Regulation**, v. 52, n. 3, p. 259–263, 2007.
- HARLEY, R. M. Checklist and key of genera and species of the Lamiaceae of the Brazilian Amazon. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p. 129–144, 2012.
- JEONG, B. R.; SIVANESAN, I. Direct adventitious shoot regeneration, in vitro flowering, fruiting, secondary metabolite content and antioxidant activity of *Scrophularia takesimensis* Nakai. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 123, n. 3, p. 607–618, 2015.
- LAZZARINI, L. E. S.; PACHECO, F. V.; SILVA, S. T.; COELHO, A. D.; MEDEIROS, A. P. R.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J. E. B. P.; SOARES, J. D. R. Uso de diodos emissores de luz (LED) na fisiologia de plantas cultivadas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 16, n. 2, p. 137–144, 2017.
- MANIVANNAN, A.; SOUNDARARAJAN, P.; HALIMAH, N.; KO, C. H.; JEONG, B. R. Blue LED light enhances growth, phytochemical contents, and antioxidant enzyme activities of *Rehmannia glutinosa* cultured in vitro. **Horticulture Environment and Biotechnology**, v. 56, n. 1, 2015.
- MATHEWS, S. Evolutionary studies illuminate the structural-functional model of plant phytochromes. **The Plant Cell**, v. 22, n. 1, p. 4–16, 2010. Disponível em: <<http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.109.072280>>. Acesso em: 22 nov. 2017.

MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q.; SILVA, S. M.; RESENDE, R. F.; SILVA, A. . Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 1, p. 110–121, 2012. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-05722012000100016&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722012000100016&lng=pt&tlng=pt)>. Acesso em: 12 dez. 2017.

MORENO-JIMÉNEZ, A. M.; LOZA-CORNEJO, S.; ORTIZ-MORALES, M. Efecto de luz LED sobre semillas de *Capsicum annuum* L . var . serrano. **Biotecnología Vegetal**, v. 17, n. 3, p. 145–151, 2017.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NASCIMENTO, A. M. M.; SOUZA, B. B.; NASCIMENTO, K. S.; RÊGO, M. M.; BARROSO, P. A.; RÊGO, E. R. Influência da qualidade de luz e concentração de sais sobre a micropropagação de explantes embrionários de *Kalanchoe daigremontiana*. v. 2015, n. R 74, 2015. In: II Simpósio da Rede de Recursos Genéticos Vegetais do Nordeste, 2015, Fortaleza. **Anais do II Simpósio da RGV Nordeste**. Fortaleza, Embrapa Agroindústria Tropical, 2015 (R 74).

OLIVEIRA, E. R.; MENINI NETO, L. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pelos moradores do povoado de Manejo, Lima Duarte - MG. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 2, p. 311–320, 2012.

PASA, M. D. S.; CARVALHO, G. L.; SCHUCH, M. W.; SCHMITZ, J. D.; TORCHELSEN, M. D. M.; NICKEL, G. K.; SOMMER, L. R.; LIMA, T. S.; CAMARGO, S. S. Qualidade de luz e fitorreguladores na multiplicação e enraizamento in vitro da amoreira-preta “Xavante”. **Ciência Rural**, v. 42, n. 8, p. 1392–1396, 2012.

RAMEL, F.; MIALOUNDAMA, A. S.; HAVAUX, M. Nonenzymic carotenoid oxidation and photooxidative stress signalling in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 3, p. 799–805, 2013.

RAMÍREZ-MOSQUEDA, M. A.; IGLESIAS-ANDREU, L. G.; BAUTISTA-AGUILAR, J. R. The effect of light quality on growth and development of in vitro plantlet of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Sugar Tech**, v. 19, n. 3, p. 331–336, 2017.

ROCHA, P. S. G.; OLIVEIRA, R. P.; BASTOS, C. R.; SCIVITTARO, W. B. Diodos emissores de luz ( LEDs ) na micropropagação de amoreira-preta cv . Tupy. **Horticultura Argentina**, v. 32, n. 55, p. 14–19, 2013.

ROCHA, P. S. G.; OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B.; SANTOS, U. L. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação in vitro de morangueiro. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p. 1922–1928, 2010. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782010000900011&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782010000900011&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 25 set. 2017.

ROCHA, T. T.; TAVARES-MARTINS, A. C. C.; ARAÚJO LUCAS, F. C.; ASSIS, D. M. S. Traditional populations in environmentally protected areas : an ethnobotanical study in the Soure Marine Extractive Reserve of Brazil. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 16, n. 4, p. 410–427, 2017. Disponível em:

<<http://www.redalyc.org/html/856/85651256006/>>. Acesso em: 10 jan. 2018.



SEIDEMANN, J. **World spice plants: economic usage, botany, taxonomy**. European Union: Springer, 2005.

SILVA, M. D. P.; MARINI, F. S.; MELO, R. S. Levantamento de plantas medicinais cultivadas no município de Solânea, agreste paraibano: Reconhecimento e valorização do saber tradicional. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 881–890, 2015.

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**, v. 129, n. 3, p. 501–510, 2017.

SIMIONATTO, E.; PORTO, C.; STÜKER, C. Z.; DALCOL, I. I.; SILVA, U. F. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Aeolanthus suaveolens* MART. ex Spreng. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1923–1925, 2007.

VICTÓRIO, C. P.; MACHADO, R.; LUIZ, C.; LAGE, S. Qualidade de Luz e Produção de Pigmentos Fotossintéticos em Plantas In Vitro de *Phyllanthus tenellus* Roxb. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 213–215, 2007.

WELLBURN, A. R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307–313, 1994. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)>.

YEH, N.; CHUNG, J. P. High-brightness LEDs-Energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 8, p. 2175–2180, 2009.

**ARTIGO 3 – SISTEMA DE VENTILAÇÃO NATURAL NO CULTIVO *IN VITRO* DE  
*Aeollanthus suaveolens* MART. EX SPRENG. (LAMIACEAE)**

**RESUMO**

No cultivo *in vitro* convencional as plântulas são mantidas em recipientes fechados, com o objetivo de evitar a contaminação e ressecamento do explante. A ventilação dentro dos recipientes melhora o crescimento das plantas, além de afetar o metabolismo secundário, pois modificam as condições do microambiente formado. Diante disso, objetivou-se avaliar o uso de sistema de ventilação, no crescimento e na produção de pigmentos fotossintéticos de plântulas de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. cultivadas *in vitro*. Segmentos nodais contendo um par de folhas foram cultivados sob sistema convencional (SC), sistema de ventilação natural com uma (SVN1), duas (SVN2) e quatro membranas porosas (SVN4). Aos 40 dias, as plântulas foram avaliadas quanto ao crescimento e a produção de pigmentos fotossintéticos. Os sistemas de ventilação influenciaram a produção de pigmentos fotossintéticos. O maior número de membranas porosas (SVN4) além de favorecer o crescimento e desenvolvimento, aumentou a produção de pigmentos fotossintéticos de plântulas de *A. suaveolens* cultivadas *in vitro*. Os resultados para razão de área foliar (RAF), área foliar específica (AFE) e razão de peso das folhas (RPF) foram superiores nos sistemas de cultivo sem membranas e na presença de uma membrana (SVN1). Para o cultivo fotoautotrófico de *A. suaveolens in vitro*, recomenda-se o uso de ventilação natural com 4 membranas, pois promove melhor crescimento e aumenta a produção de pigmentos fotossintéticos, sendo superior ao sistema de vedação convencional.

**Palavras-chave:** Dióxido de carbono. Trocas gasosas. Fotossíntese.

## ABSTRACT

In a conventional *in vitro* plant tissue culture, the seedlings are kept in closed containers, in order to avoid the contamination and dryness of the explant. The ventilation inside the containers improves plant growth, and also affects the plant secondary metabolism, since they modify the conditions of the formed microenvironment. Thus, the objective of this study was to evaluate the use of a ventilation system on the growth and production of photosynthetic pigments of *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. grown *in vitro*. Nodal segments containing a pair of leaves were grown under conventional system (SC), natural ventilation system with one (SVN1), two (SVN2), and four porous membranes (SVN4). After 40 days, the production of photosynthetic pigments and seedling growth were evaluated. Ventilation systems influenced the production of photosynthetic pigments. The higher number of porous membranes (SVN4) supported the plant growth and development, and also increased the production of photosynthetic pigments in seedlings of *A. suaveolens* grown *in vitro*. Results show that leaf area ratio (RAF), specific leaf area (AFE), and leaf weight ratio (RPF) were higher in systems without membranes and in the presence of only one membrane (SVN1). For photoautotrophic *in vitro* cultivation of *A. suaveolens*, the use of natural ventilation with 4 membranes is recommended, as it promotes better growth and increases the production of photosynthetic pigments, being superior to the conventional sealing system.

**Keywords:** Carbon dioxide. Gas exchange. Photosynthesis.

## 1 INTRODUÇÃO

A espécie *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae), é uma aromática de origem africana, introduzida no Brasil para fins medicinais (FERREIRA; TAVARES-MARTINS; PALHETA, 2017). Na região Amazônica é conhecida como catinga de mulata, sendo empregada em banhos de cheiro, em rituais religiosos e em perfumes caseiros (HARLEY, 2012; LUPE, 2007). Ademais, na medicina popular, é utilizada no combate à febre, dor de cabeça, afecções da pele e olhos, e principalmente como sedativo e anticonvulsivante (LUPE, 2007; SIMIONATTO et al., 2007).

As técnicas de cultura de tecidos são ferramentas biotecnológicas importantes para a multiplicação e análise de plantas medicinais (SIAHSAR et al., 2011). Na micropropagação convencional, geralmente veda-se o recipiente de cultura para prevenir a contaminação e a desidratação dos explantes e do meio de cultivo (SCHUELTER et al., 2015). Entretanto, a tampa ou o tipo de vedação podem limitar as trocas gasosas entre os ambientes *in vitro* e *ex vitro*, causando distúrbios morfofisiológicos (SALDANHA et al., 2012).

O microambiente formado dentro do frasco no cultivo convencional possui alta umidade relativa, acúmulo de etileno e baixa concentração de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (CHEN, 2006; SCHUELTER et al., 2015). Outra característica importante no cultivo *in vitro* é a presença da sacarose no meio de cultivo, sendo considerada a principal ou única fonte de carbono e energia para o crescimento da planta (XIAO; NIU; KOZAI, 2011). Segundo Kozai e Xiao (2008), a presença da sacarose no meio de cultivo aumenta o risco de contaminação microbiana.

As plântulas cultivadas em sistemas convencionais de micropropagação podem ter anormalidades anatômicas e fisiológicas. Alguns desses problemas incluem redução da atividade fotossintética, baixo teor de clorofila, abertura do estômato, falta de camada de cutícula na folha, parênquima anormal da folha e do xilema (VAHDATI; HASSANKHAH, 2014). Essas alterações morfofisiológicas causam alta mortalidade das plantas durante a aclimatização (ALVAREZ et al., 2012). O uso de sistema de ventilação natural no cultivo *in vitro* é uma alternativa para reduzir esses problemas.

A utilização desse método traz grandes vantagens para a micropropagação. Esse sistema diminui a umidade relativa, aumenta a aeração e mantém as concentrações de CO<sub>2</sub> adequadas para estimular a fotossíntese (MOREIRA, 2013; SALDANHA et al., 2012). O uso de sistema de ventilação natural no cultivo *in vitro* tem apresentado respostas positivas para o crescimento e no acúmulo de metabólitos secundários em algumas espécies: *Plectranthus*

*amboinicus* (Lour.) Spreng. (Lamiaceae) (SILVA et al., 2017); *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) (RODRIGUES et al., 2012); *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) (SALDANHA et al., 2012); *Ananas comosus* L. Merr (Bromeliaceae) (SILVA et al., 2014).

Nesse sentido, objetivou-se avaliar os efeitos de sistemas de ventilação natural no crescimento e na produção de pigmentos fotossintéticos de plântulas de *Aeollanthus suaveolens* cultivadas *in vitro*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Estabelecimento do material vegetal *in vitro*

Sementes de *Aeollanthus suaveolens* obtidas de plantas matrizes, cultivadas em casa de vegetação foram empregadas neste trabalho. As sementes foram tratadas com hipoclorito de sódio (1% de cloro ativo) por 5 minutos sob agitação constante. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram lavadas com água destilada autoclavada por três vezes. Em seguida, inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 6 g L<sup>-1</sup> de ágar e pH ajustado para 5,7±0,1 antes da autoclavagem a 121 °C a 0,1 atm por 20 min. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento sob lâmpadas brancas-frias fluorescentes com intensidade de 39 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fotoperíodo de 16 h e temperatura de 25 ± 1 °C. Após 30 dias, as plântulas originadas foram multiplicadas em frascos contendo 40 mL de meio MS.

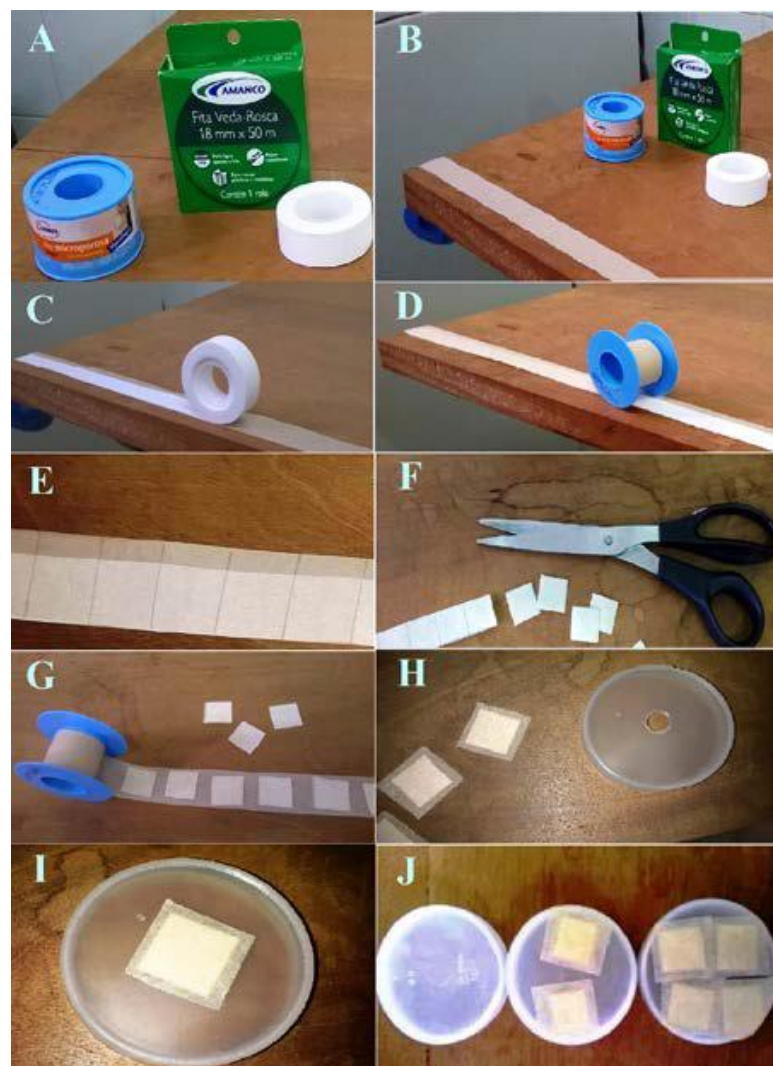
### 2.2 Sistema de ventilação natural

Segmentos nodais (±1 cm), com um par de folhas foram cultivados *in vitro* sob sistema convencional (SC) e sistema de ventilação natural (SVN). Os explantes foram retirados de plântulas estabelecidas *in vitro* e inoculados em frascos contendo 45 mL de meio MS sem adição de sacarose, suplementado com 5,5 g L<sup>-1</sup> de ágar (Himedia<sup>®</sup>, tipo I) e pH ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem a 121 °C a 0,1 atm por 20 min. Após a inoculação, os tubos foram colocados em sala de crescimento com lâmpadas brancas frias fluorescentes (OSRAM<sup>®</sup>, Brazil), intensidade de 39 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fotoperíodo de 16 h e temperatura de 25 ± 1 °C.

Os sistemas de ventilação natural foram obtidas pela presença de membranas de politetrafluoroetileno nas tampas dos frascos de cultivo. As membranas foram montadas conforme Saldanha et al., (2012). Utilizou-se fita microporosa bege Cremer<sup>®</sup> e PTFE

(politetrafluoroetileno) Amanco<sup>®</sup> (Figura 1A). As membranas porosas consistiam de 4 camadas, sendo a primeira de fita microporosa Cremer<sup>®</sup>, a segunda de PTFE e a terceira também de fita microporosa bege Cremer<sup>®</sup> (FIGURAS 1B, 1C, 1D, respectivamente). Após estas etapas, cortaram-se estas 3 primeiras camadas em quadrados de 1 cm<sup>2</sup> (FIGURA 1E-F). Distribuíram-se separadamente os quadrados sobre a face colável da fita microporosa, totalizando 4 camadas (FIGURA 1G). Em seguida, as camadas em quadrados de 1 cm<sup>2</sup> foram distribuídas separadamente sobre a face colável da fita microporosa Cremer<sup>®</sup>, totalizando as quatro camadas. Por fim, as camadas em quadrados foram cortadas homogeneamente e coladas sobre os furos de 1,0 cm de diâmetro presentes nas tampas dos recipientes de cultivo (FIGURA 1H-J).

Figura 1 – Esquema para a montagem das membranas porosas manufactured nas tampas dos recipientes de cultivo (A-J).



Fonte: Duarte (2016).

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), totalizando 4 tratamentos: sistema convencional (SC) (ausência de membrana); sistema de ventilação natural com uma (SVN1); duas (SVN2) e quatro membranas porosas (SVN4), cada tratamento foi constituído por 5 , com 4 frascos/repetição e 3 explantes por frasco.

Após 40 dias, as plântulas foram avaliadas quanto aos números de brotos (NB), folhas (NF) e raízes (NR) e comprimentos da parte aérea (CPA, cm) e da maior raiz (CMR, cm), área foliar total (AFT, cm<sup>2</sup>), matérias secas de folha (MSF, mg), caule (MSC, mg), raiz (MSR, mg) e total (MST, mg) e concentração de pigmentos fotossintéticos. Para a determinação da matéria seca, as folhas, os caules e as raízes foram colocados em sacos de papel e acondicionados em estufa de circulação forçada de ar, a 35 °C, até peso constante. A área foliar total foi medida no *software* WinFOLIATM utilizando um *scanner* EPSON PERFECTION V700 PHOTO a partir de todas as folhas presentes nas 5 plântulas representativas de cada tratamento. Avaliou-se ainda a razão de área foliar (RAF = AFT/MStotal), área foliar específica (AFE = AFT/MSfolhas) e razão de peso das folhas (RPF = MSfolha/MStotal), esses parâmetros foram calculados conforme Benicasa (2003). Além disso, foi estabelecida uma relação entre sistema de ventilação com 4 membranas e o sistema convencional (SVN4/SC).

### 2.3 Quantificação de pigmentos fotossintéticos

A extração dos pigmentos clorofila *a*, *b*, clorofila total (*a+b*) e carotenoides foi realizada segundo metodologia descrita por Costa et al. (2014a) com as seguintes adaptações para o método: quantidade do material vegetal e do solvente dimetilsulfóxido (DMSO) não saturado com CaCO<sub>3</sub>. Foram utilizados 50 mg de matéria fresca de folhas, sem a nervura central. Em seguida, o material vegetal foi incubado em 10 mL de DMSO, em tubos Falcon envoltos em folha de alumínio e colocado em estufa sob temperatura de 65 ° C, durante 24 horas. Após esse período, alíquotas das soluções (3 mL) foram transferidas para uma cubeta de quartzo com volume de 3 cm<sup>3</sup> para realização das leituras de absorbância em espectro TECAN INFINITY M200 PRO operado com o sistema de processamento de dados I-control<sup>®</sup> versão 3.37, nos comprimentos de onda 480, 649 e 665 nm para carotenoides, clorofila *b* e *a*, respectivamente. Foi feita a leitura do branco, utilizando-se como apenas o DMSO. Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

A partir das leituras obtidas determinou-se a concentração das clorofilas *a*, *b* e carotenoides utilizando-se as equações propostas por Wellburn (1994): Clorofila *a* = (12,47 x A<sub>665</sub>) - (3,62 x A<sub>649</sub>); clorofila *b* = (25,06 x A<sub>649</sub>) - (6,5 x A<sub>665</sub>); carotenoides: (1000 x A<sub>480</sub> -

$1,29 \times C_a - 53,78 \times C_b)/220$ , e a clorofila total por meio da soma dos resultados encontrados das equações para clorofila *a* e *b*, sendo os resultados expressos em mg/g.

## 2.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade. O programa estatístico SISVAR<sup>®</sup> (FERREIRA, 2011) foi utilizado para o processamento dos dados.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os sistemas de cultivo influenciaram o crescimento da espécie *Aeollanthus suaveolens* cultivada *in vitro* em meio MS sem a suplementação de sacarose. As plântulas cultivadas sob sistema de ventilação natural tiveram melhores respostas para as variáveis de crescimento em relação àquelas cultivadas no sistema sem ventilação. O SVN4 teve as maiores médias para todas as variáveis de crescimento analisadas. Por outro lado, as plântulas cultivadas na ausência de membranas apresentaram os menores valores para todos os parâmetros avaliados (TABELA 1).

Tabela 1 – Crescimento *in vitro* de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae) cultivada durante 40 dias sob sistemas de ventilação natural, com uma (SVN1), duas (SVN2), quatro membranas porosas (SVN4) e sistema convencional (SC). NB: número de brotos; CPA: comprimento da parte aérea; NF: número de folhas; NR: número de raízes; CMR: comprimento da maior raiz; matérias secas de folha (MSF); caule (MSC); raiz (MSR); total (MST). Relação entre SVN4 e SC (SVN4/SC). CV: coeficiente de variação.

Variáveis analisadas	Sistemas de cultivo					CV%
	SC	SVN1	SVN2	SVN4	SVN4/SC	
NB	1,12 c	1,59 b	1,67 b	2,01 a	1,79	13,56
CPA (cm)	1,75 c	3,08 b	4,58 a	4,69 a	2,7	11,55
NF	6,94 c	9,18 b	10,78 a	11,16 a	0,14	6,21
NR	4,90 c	5,57 b	5,60 b	6,59 a	1,3	6,17
CMR (cm)	4,92 c	8,48 b	8,50 b	9,14 a	1,8	5,58
MSF (mg)	5,74 d	14,01 c	22,69 b	25,85 a	4,5	8,36
MSC (mg)	0,97 d	2,75 c	4,92 b	6,00 a	6,1	10,69
MSR (mg)	2,55 d	7,87 c	11,87 b	13,99 a	5,5	8,28
MST (mg)	9,26 d	24,63 c	39,48 b	45,84 a	5,0	7,24

As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si na mesma linha, de acordo com o teste de Scott-knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor 2018.



Através da relação SV4/SC observou-se que as matérias secas no sistema de ventilação com quatro membranas obtiveram um ganho entre 4,5 a 6 vezes em relação ao sistema sem ventilação. Tal fato pode estar relacionado a uma condição fotoautotrófica promovido pelo maior número de membranas porosas. Isso permitiu maior absorção dos nutrientes devido a maior evapotranspiração do meio cultivo e maior troca gasosa promovida pelo aumento no número de membranas (FIGURA 1). A deficiência de crescimento das plântulas cultivadas na ausência explica-se devido à ausência de sacarose no meio de cultivo. Segundo Kozai (2010), a suplementação de uma fonte de carbono no meio de cultivo é importante, pois desempenha várias funções essenciais, fornecendo energia para o metabolismo vegetal.

Figura 2 – Plântulas de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae) em meio MS, sem adição de sacarose, sob sistema convencional (SC) e sistemas de ventilação natural, com uma (SVN1), com duas (SVN2) e quatro membranas porosas (SVN4).



Fonte: Do autor (2018).

As plântulas cultivadas com a presença de membranas apresentaram maior acúmulo de matéria seca, indicando a importância da troca gasosa para a morfogênese *in vitro* dessa espécie. Estes resultados podem estar relacionados ao aumento da taxa fotossintética causada pela maior disponibilidade de CO<sub>2</sub> sob sistema de ventilação natural em relação ao sistema convencional. Segundo Arigita et al. (2010), a estimulação da troca de gás entre o ambiente externo e o interno pelo sistema de ventilação natural favorece a absorção efetiva de nutrientes do meio de cultivo pelas plântulas, aumentando o crescimento das mesmas.

Vários estudos relataram que o aumento na troca gasosa, nos frascos utilizados na propagação *in vitro* de plantas, favorece o crescimento e desenvolvimento das plantas. Em estudo realizado por Saldanha et al. (2012), verificou-se que o sistema de ventilação natural melhorou o crescimento *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. O sistema de ventilação natural com uma e duas membranas, otimizaram o crescimento *in vitro* de segmentos apicais e nodais de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (SILVA et al., 2017). O sistema alternativo de membranas foi benéfico também para a propagação *in vitro* de *Azadirachta indica* A. Juss. (RODRIGUES et al., 2012).

Em relação à área foliar total (AFT), o tratamento SVN4 superou todos os outros sistemas de cultivo (TABELA 3). Acredita-se que o tratamento SVN4 proporcionou maior entrada de CO<sub>2</sub> e, conseqüentemente, maior capacidade fotossintética, proporcionando maior crescimento das plântulas. Segundo Souza et al. (2014) quanto maior a área foliar, maior a taxa fotossintética das plantas. Os resultados para razão de área foliar (RAF), área foliar específica (AFE) e razão de peso das folhas (RPF) foram superiores nos sistemas de cultivo sem membranas ou na presença de uma membrana (SVN1).

Tabela 2 – Área foliar total (AFT), razão de área foliar (RAF), área foliar específica (AFE) e razão de peso das folhas (RPF) de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae) cultivada *in vitro* aos 40 dias, sob diferentes sistemas de cultivo (sistema convencional (SC) e sistema de ventilação natural (SVN) com 1, 2 e 4 membranas porosas). Coeficiente de variação (CV).

Sistemas de Cultivo	AFT (cm <sup>2</sup> )	RAF (cm <sup>2</sup> /mg)	AFE (cm <sup>2</sup> /mg)	RPF (mg/mg)
SC	5,03 d	0,55 a	0,88 a	0,85 a
SVN1	12,00 c	0,49 a	0,86 a	0,83 a
SVN2	15,08 b	0,38b	0,67 b	0,82 b
SVN4	19,06 a	0,41 b	0,73 b	0,81 b
CV (%)	14,68	16,57	16,76	2,01

As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si na mesma coluna, de acordo com o teste de Scott-knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2018).

A RAF é a razão entre área foliar responsável pela interceptação de energia luminosa e CO<sub>2</sub>, e a matéria seca total da planta. A RAF declina enquanto a planta cresce em função do autossombreamento, com a tendência da diminuição da área foliar útil (BENINCASA, 2003). Esta pode ser uma explicação para os resultados do presente trabalho, pois o tratamento (SC) com menor AFT teve maior RAF. O mesmo ocorreu no trabalho de Souza et al. (2014) e de Chagas et al. (2013), estudando *Rosmarinus officinalis* L. e *Mentha arvensis* L., respectivamente em casa de vegetação.

A área foliar específica (AFE) expressa a razão entre a área foliar e a matéria seca da folha. Sendo considerado um importante fator do ponto de vista fisiológico, por descrever a alocação da biomassa da folha por unidade de área (SCALON; FRANCO, 2007). Segundo Barreiro et al. (2006), o decréscimo na AFE indicam aumento na espessura da folha resultante do aumento e do tamanho do número de células nas plantas.

A RPF representa a fração de matéria seca que não é exportada das folhas para as outras partes da planta. Em uma planta jovem que é constituída por grande parte de folhas, os valores da RPF são elevados e decrescem com o tempo, pois as outras partes das plantas que surgirão, crescerão a partir do material translocado das folhas. É um índice de análise de crescimento importante para plantas cujo interesse econômico está nas folhas (COSTA et al., 2014b; PEIXOTO; CRUZ; PEIXOTO, 2011).

Em relação ao conteúdo de pigmentos fotossintéticos, o aumento na troca gasosa elevou a produção de pigmentos das plantas. Os sistemas SVN2 e SVN4 obtiveram os acúmulos máximos clorofila *a*, total e carotenoides, não sendo estatisticamente diferentes do SV1 para a clorofila total. O SVN1 teve a maior concentração de clorofila *b*, os demais tratamentos (SC, SVN2, SVN4) não diferiram estatisticamente entre si.

Tabela 3 – Concentração de pigmentos fotossintéticos de plântulas de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. (Lamiaceae), cultivadas *in vitro* durante 40 dias, sob diferentes sistemas de cultivo: sistema convencional (SC) e sistemas de ventilação natural, com uma (SVN1), duas (SVN2) e quatro membranas porosas (SVN4). CV: coeficiente de variação

Sistemas de cultivo	Clorofila <i>a</i> (mg/g de MF)	Clorofila <i>b</i> (mg/g de MF)	Clorofila total (mg/g de MF)	Carotenoides (mg/g de MF)
SC	0,15 c	0,05 b	0,20 b	0,04 b
SVN1	0,23 b	0,11 a	0,33 a	0,04 b
SVN2	0,28 a	0,08 b	0,36 a	0,07 a
SVN4	0,29 a	0,09 b	0,38 a	0,08 a
CV%	10,84	18,37	8,12	21,64

As médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si na mesma coluna, de acordo com o teste de Scott-knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Do autor (2018).

Resultados similares foram relatados para outras espécies, como exemplo de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (SILVA et al., 2017); *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (SALDANHA et al., 2012); *Juglans regia* L. (HASSANKHAH et al., 2014). Segundo Silva et al. (2008) o aumento da concentração de CO<sub>2</sub> no interior dos frascos durante o crescimento *in vitro* estimula a produção de altas taxas fotossintéticas em plantas cultivadas em condições fotoautotróficas.

O sistema de ventilação natural mantém a concentração de CO<sub>2</sub> dentro do recipiente de cultivo adequada para estimular a fotossíntese (SALDANHA et al., 2012). Resultados semelhantes foram encontrados por Barbosa (2016), cultivando plantas de pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) em frascos com membranas ventiladas, obtiveram melhor crescimento e resposta fotossintética, quando comparadas ao ambiente de cultivo convencional com frascos vedados. De acordo com Zobayed, Armstrong e Armstrong (2001), é importante que ocorra a troca de ar entre ambiente e fresco, pois assim, as plântulas *in vitro* desenvolvem a capacidade de construir seu aparelho fotossintético e também de crescerem independentes de fontes de carbono exógenas.

#### **4 CONCLUSÃO**

O sistema de micropropagação em ventilação natural com 4 membranas, promove melhor crescimento *in vitro* de plantas de *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. e aumenta a produção de pigmentos fotossintéticos, sendo superior ao sistema de vedação convencional.

## REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, C.; SAÉZ, P. S. K.; SA, M. S.-O. D.; RÍOS. Effects of light and ventilation on physiological parameters during in vitro acclimatization of *Gevuina avellana* mol. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, p. 93–101, 2012.
- ARIGITA, L.; CAÑAL, M. J.; TAMÉS, R. S.; GONZÁLEZ, A. CO<sub>2</sub>-enriched microenvironment affects sucrose and macronutrients absorption and promotes autotrophy in the in vitro culture of kiwi (*Actinidia deliciosa* Chev. Liang and Ferguson). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 46, n. 3, p. 312–322, 2010.
- BARREIRO, A. P.; ZUCARELI, V.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Análise de crescimento de plantas de manjeriço tratadas com reguladores vegetais. **Bragantia**, v. 65, n. 4, p. 563–567, 2006.
- BARBOSA, R. R. N. **Cultivo in vitro de pimenta malagueta em frascos com ventilação natural: respostas mixotróficas e fotoautotróficas**. Dissertação (Mestrado em produção vegetal)- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campos dos Goytacazes – RJ, 2016.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: FUNEP, 42p, 2003.
- CHAGAS, J. H.; PINTO, J. E. B.; BERTOLUCCI, S. K. V; COSTA, A. G.; JESUS, H. C. R. de; ALVES, P. B. Produção, teor e composição química do óleo essencial de hortelã-japonesa cultivada sob malhas fotoconversoras. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 297–303, 2013. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-05362013000200020&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362013000200020&lng=pt&tlng=pt)>. Acesso em: 21 out. 2017.
- CHEN, C. In situ measurement of microclimate for the plantlets cultured in vitro. **Biosystems Engineering**, v. 95, n. 3, p. 413–423, 2006.
- COSTA, A. C.; ROSA, M.; MEGGUER, C. A.; SILVA, F. G.; PEREIRA, F. D.; OTONI, W. C. A reliable methodology for assessing the in vitro photosynthetic competence of two Brazilian savanna species: *Hyptis marruboides* and *Hancornia speciosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 117, n. 3, p. 443–454, 2014a.
- COSTA, A. G.; CHAGAS, J. H.; BERTOLUCCI, S. K.; PINTO, J. E. Níveis de sombreamento e tipos de malha no crescimento e produção de óleo essencial de hortelã-pimenta. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 194–199, 2014b. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-05362014000200194&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362014000200194&lng=pt&tlng=pt)>. Acesso em: 30 set. 2017.
- FERREIRA, L. R.; TAVARES-MARTINS, A.C.C.; PALHETA, I. C. Aspectos etnofarmacológicos e fitoquímicos de *Aeollanthus suaveolens* Mart. Ex Spreng. In: ALFARO, A. T. S.; TROJAN, D. G. **Ciências ambientais e o desenvolvimento sustentável na Amazônia**: 2017. Curitiba: Ed. Atena, 2017. p. 77–88.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039–1042, 2011.
- HARLEY, R. M. Checklist and key of genera and species of the Lamiaceae of the Brazilian

Amazon. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 63, n. 1, p. 129-144, jan./mar. 2012.

HASSANKHAH, A.; VAHDATI, K.; LOTFI, M.; MIRMASOUMI, M. Effects of Ventilation and Sucrose Concentrations on the Growth and Plantlet Anatomy of Micropropagated Persian Walnut Plants. **International Journal of Horticultural Science and Technology**, v. 1, n. 2, p. 111–120, 2014.

KOZAI, T. ; XIAO, Y. A commercialized photoautotrophic micropropagation system. In: GUPTA, S.D., IBARAKI, Y. **Plant Tissue Culture Engineering**. Focus on Biotechnology, v. 6. Springer, Dordrecht. p.355–371, 2008.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation-environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of ornamental plants**, Bulgária, v. 10, n. 4 p. 188-204, 2010.

LUPE, F. A. **Estudo da composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da Amazônia**. Dissertação (Mestrado em Química na área de Química Orgânica)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

MOREIRA, A. L. ; A. B. da S. A. S. C. O. dos R. P. R. C. L. *Cattleya walkeriana* growth in different micropropagation systems. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 10, p. 1804-1810, 2013.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

PEIXOTO, C. P.; DA CRUZ, T. V.; PEIXOTO, M. de F. da S. P. Análise Quantitativa do crescimento de plantas. **Enciclopedia Biosfera**, v. 7, n. 13, p. 51–76, 2011.

RODRIGUES, M.; COSTA, T. H. F.; FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; SILVA, L. C.; OTONI, W. C. Effects of flask sealing and growth regulators on in vitro propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 48, n. 1, p. 67–72, 2012.

SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; AZEVEDO, J. L. F.; DIAS, L. L. C.; RÊGO, M. M.; OTONI, W. C. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* ( Spreng .) Pedersen ]. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 110, n. 3, p. 413-422, 2012.

SCALON, M. C.; FRANCO, A. C. Influência dos fatores ambientais na área foliar específica de espécies lenhosas do Cerrado. In: **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**, Caxambu, MG, 2007.

SCHUELTER, A. R.; LUZ, C. L.; SCHERER, A. M.; SOUZA, C. S.; STEFANELLO, S. Disponibilidade de luz, tipo de vedação e de frasco na germinação e crescimento inicial *in vitro* de plântulas de Cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 3, p. 183–190, 2015. Disponível em: <<http://www.bibliotekevirtual.org/index.php/2013-02-07-03-02-35/2013-02-07-03-03-11/868-sap/v14n03/13022-disponibilidade-de-luz-tipo-de-vedacao-e-de-frasco-na-germinacao-e-crescimento-inicial-in-vitro-de-plantulas-de-cubiu-solanum-sessiliflorum-dunal.html>>. Acesso em: 25 nov. 2017.

SIAHSAR, B.; RAHIMI, M.; TAVASSOLI, A.; RAISSI, A. Application of Biotechnology in Production of Medicinal Plants. **American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sc**, v. 11, n. 3, p. 439–444, 2011.

SILVA, A. B.; CORREA, V. R. S.; TOGORO, A. H.; SILVA, J. A. dos S. Efeito da luz e do sistema de ventilação natural em abacaxizeiro (Bromeliaceae) micropropagado. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 2, p. 380–386, 2014.

SILVA, S. T.; BERTOLUCCI, S. K. V.; 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**, v. 129, n. 3, p. 501–510, 2017.

SIMIONATTO, E.; PORTO, C.; STÜKER, C. Z.; DALCOL, I. I.; SILVA, U. F. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Aeolanthus suaveolens* MART. ex Spreng. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1923–1925, 2007.

SOUZA, G. S.; SILVA, J. S.; OLIVEIRA, U. C.; NETO, R. B. S.; SANTOS, A. R. Crescimento vegetativo e produção de óleo essencial de plantas de alecrim cultivadas sob telas coloridas. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 3, p. 232–239, 2014.

VAHDATI, K.; HASSANKHAH, A. Developing a photomixotrophic system for micropropagation of Persian walnut. **Acta Horticulturae**, v. 1050, p. 181–188, 2014.

WELLBURN, A. R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307–313, 1994. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)>. Acesso em: 17 set. 2017.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 105, n. 2, p. 149–158, May 2011.

ZOBAYED, S. M. A.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Leaf anatomy of in vitro tobacco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation. **Plant Science**, v. 161, n. 3, p. 537–548, 2001.