

ELISANDRA DA SILVA SOUSA

PROPAGAÇÃO *in vitro* DE *Pereskia aculeata* MILL.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Wagner Campos Otoni

Coorientadora: Tatiane Dulcineia Silva

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2023

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S725p
2023

Sousa, Elisandra da Silva, 1999-

Propagação *in vitro* de *Pereskia aculeata* Mill. / Elisandra da Silva Sousa. – Viçosa, MG, 2023.

1 dissertação eletrônica (90 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: Wagner Campos Otoni.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Vegetal, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.037>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Ora-pro-nóbis - Propagação *in vitro*. 2. Betalaínas.
I. Otoni, Wagner Campos, 1962-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. III. Título.

CDD 22. ed. 583.56

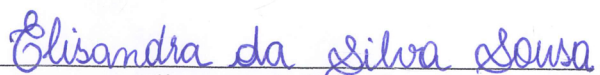
ELISANDRA DA SILVA SOUSA

PROPAGAÇÃO *in vitro* DE *Pereskia aculeata* MILL.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

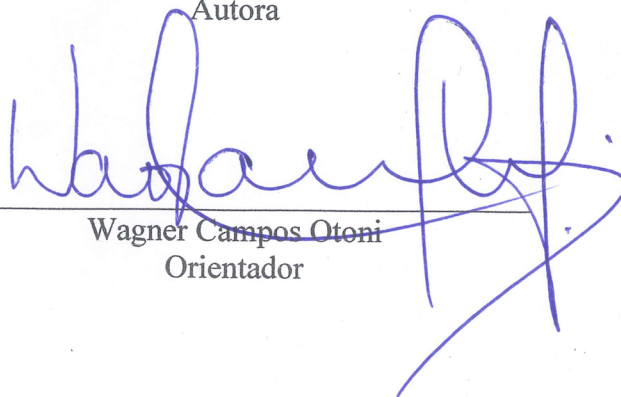
APROVADA: 27 de fevereiro de 2023.

Assentimento:



Elisandra da Silva Sousa

Autora



Wagner Campos Otoni

Orientador

Ao meu amado e querido pai (in memoriam), por ter sido meu companheiro nessa viagem. Esteve comigo durante o decorrer desse curso, me dando força, coragem e esperança. Aqui, realizo mais um sonho sem a sua presença física, no entanto, sinto que está ao meu todos os dias. És minha luz!

Aos meus amados bisavós Rita e Francisco (in memoriam), os quais partiram durante esse curso, e que apesar de nunca terem entendido minha ausência, sempre se alegraram com minhas conquistas.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir viver e realizar meus sonhos, por todo amor, e por sempre estar comigo.

Aos meus pais, Edglê (*in memoriam*) e Sônia, por todo amor, confiança, força, carinho e incentivo me dado durante todos esses anos. Sou grata a Deus por tê-los como pais, e os amo infinitamente, além dessa vida.

Aos meus familiares e amigos, pela ajuda, força, pela torcida, por todo amor, mas principalmente pelas palavras de conforto e incentivo nos momentos difíceis.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela contribuição ao meu crescimento profissional. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida. Às agências financiadoras Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG - Proc. APQ 00772-19) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Programa de Excelência Acadêmica (CAPES/Proex).

Ao meu orientador, Wagner Campos Otoni, por todo apoio a mim prestado desde o início desse curso, pelas palavras de conforto e amizade, oportunidades, confiança, e todos os ensinamentos. Tenho muita admiração pelo profissional e ser humano que és.

À Tatiane Dulcineia Silva, a qual fui agraciada em tê-la além de amiga, como coorientadora. Agradeço por toda ajuda, e por compartilhar seus conhecimentos com tanta calma e sabedoria.

À banca avaliadora, por todas as contribuições para melhoria deste trabalho.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Cultura de Tecidos II, especialmente, Quezia, Michelle, Lázara, Pedro, Jéssica e Lana. Agradeço pela amizade e por toda ajuda prestada durante a realização desse trabalho.

Aos funcionários da Universidade Federal de Viçosa, em especial a Seu Assis, Seu Geraldo e Seu Sabino, pelo auxílio na coleta do material e por toda ajuda!

A todos que de alguma forma contribuíram para minha formação.

Meu muito obrigada!

RESUMO

SOUSA, Elisandra da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2023. **PROPAGAÇÃO *in vitro* DE *Pereskia aculeata* MILL.** Orientador: Wagner Campos Otoni. Coorientadora: Tatiane Dulcineia Silva.

Pereskia aculeata Mill., conhecida popularmente como ora-pro-nóbis, é uma planta alimentícia não convencional, utilizada pela medicina popular no tratamento de queimaduras e inflamações. Apresenta propriedades farmacológicas, como analgésica, antioxidante, anticancerígena e nutracêutica, resultado de uma gama de compostos bioativos produzidos pela espécie, tais como sesquiterpenos, compostos fenólicos e betalaínas. Apesar da sua importância, ainda são escassos os trabalhos que visem estabelecer o cultivo *in vitro* de *P. aculeata*. Notadamente, ainda não há relatos de estudos sobre a influência das trocas gasosas e qualidade da luz no desenvolvimento e produção de compostos bioativos em *P. aculeata* cultivada *in vitro*. A cultura de tecidos vegetais é uma alternativa viável para a multiplicação de espécies medicinais em larga escala, pois é fonte potencial para produção de metabólitos secundários de interesse. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de propagação *in vitro* e avaliar a influência de citocininas, meios de cultura, trocas gasosas, concentrações de sacarose e qualidade da luz na morfofisiologia de plantas de *P. aculeata*. Para isso, foram conduzidos cinco experimentos: I) Estabelecimento de protocolo de desinfestação de *P. aculeata*; II) Avaliação de citocininas no desempenho de explantes nodais no estabelecimento *in vitro* de *P. aculeata*; III) Avaliação de formulações de meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de *P. aculeata*; IV) Efeito das trocas gasosas e concentrações de sacarose na morfofisiologia e anatomia de *P. aculeata* cultivada *in vitro*; V) Influência da qualidade de luz na morfofisiologia e na produção de betalaínas de *P. aculeata* cultivada *in vitro*. Os resultados demonstraram que para estabelecer de forma eficiente segmentos nodais de *P. aculeata in vitro*, faz-se necessário a desinfestação dos explantes em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5% de cloro ativo combinado à adição de 0,2% de *Plant Preservative Mixture* (PPM) ao meio de cultura, e inoculação dos mesmos em meio de cultura Murashige e Skoog (MS) contendo 1 mg L⁻¹ de *meta*-Topolina (*mT*). Além disso, a espécie pode ser cultivada sob o sistema de cultivo hererotrófico, em meio de cultura suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose e frascos vedados com tampas contendo uma membrana que permite taxa de troca de CO₂ de 14 µL L⁻¹ s⁻¹ (TTCO₂ de 14 µL L⁻¹ s⁻¹), e/ou sob o sistema de cultivo fotomixotrófico, em meio suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e frascos vedados com tampas contendo duas membranas que permitem TTCO₂ de 25 µL L⁻¹ s⁻¹. Na propagação *in*

vitro de *P. aculeata*, a combinação dos espectros de luz Vermelho/Branco/Azul Médio (V/B/AM) promoveram maior acúmulo de betacianina. Este trabalho fornece novas perspectivas em relação aos efeitos da manipulação do meio e do ambiente de cultivo sobre o desenvolvimento e o metabolismo secundário de *P. aculeata*, podendo auxiliar na otimização de protocolos de propagação e de produção *in vitro* de betalaínas nessa espécie.

Palavras-chave: Ora-pro-nóbis; Sistemas de cultivo *in vitro*; Cultura de tecidos vegetais; Betalaína.

ABSTRACT

SOUSA, Elisandra da Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2023. ***In vitro* PROPAGATION OF *Pereskia aculeata* MILL.** Advisor: Wagner Campos Otoni. Co-advisor: Tatiane Dulcineia Silva.

Pereskia aculeata Mill., popularly known as ‘ora-pro-nóbis’, is an unconventional food plant used in folk medicine to treat burns and inflammation. It has pharmacological properties, such as analgesic, antioxidant, anticancer and nutraceutical properties, due to a range of bioactive compounds produced by the species, such as sesquiterpenes, phenolic compounds and betalains. Despite its importance, few studies still aim to establish the *in vitro* cultivation of *P. aculeata*. In particular, there are still no reports of studies on the influence of gas exchange and light quality on the development and production of bioactive compounds in *P. aculeata* grown *in vitro*. Plant tissue culture is a viable alternative for the large-scale multiplication of medicinal species, as it is a potential source for producing secondary metabolites of interest. This study aimed to develop an *in vitro* propagation protocol and evaluate the influence of cytokinins, culture media, gas exchange, sucrose concentrations and light quality on the morphophysiology of *P. aculeata* plants. To this end, five experiments were carried out: I) Establishment of a *P. aculeata* disinfection protocol; II) Evaluation of cytokinins on the performance of nodal explants in the *in vitro* establishment of *P. aculeata*; III) Evaluation of culture media formulations in the *in vitro* establishment of *P. aculeata*; IV) Effect of cytokinins on the performance of nodal explants in the *in vitro* establishment of *P. aculeata*; IV) Effect of gas exchange and sucrose concentrations on the morphophysiology and anatomy of *P. aculeata* grown *in vitro*; V) Influence of light quality on the morphophysiology and betalain production of *P. aculeata* grown *in vitro*. The results showed that in order to efficiently establish nodal segments of *P. aculeata in vitro*, it is necessary to disinfect the explants in sodium hypochlorite (NaOCl) at 2.5% active chlorine combined with the addition of 0.2% *Plant Preservative Mixture* (PPM) to the culture medium, and inoculate them in Murashige and Skoog medium (MS) containing 1 mg L⁻¹ of *meta*-Topolin (*mT*). In addition, the species can be grown under the heterotrophic cultivation system, in culture medium supplemented with 15 g L⁻¹ sucrose and sealed flasks with lids containing a membrane that allows a CO₂ exchange rate of 14 µL L⁻¹ s⁻¹ (TTCO₂ of 14 µL L⁻¹ s⁻¹), and/or under the photomixotrophic cultivation system, in medium supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose and sealed flasks with lids containing two membranes that allow a TTCO₂ of 25 µL L⁻¹ s⁻¹. In the *in vitro* propagation of *P. aculeata*, combining the Red/White/Medium Blue (R/W/MB) light

spectra promoted greater betacyanin accumulation. This work provides new insights into the effects of manipulating the growing medium and environment on the development and secondary metabolism of *P. aculeata*, and may help to optimize propagation protocols and *in vitro* production of betalains in this species.

Keywords: ‘Ora-pro-nóbis’; *In vitro* culture systems; Plant tissue culture; Betalain.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	10
REFERÊNCIAS	16
CAPÍTULO I	22
RESUMO	22
ABSTRACT	24
INTRODUÇÃO	26
MATERIAL E MÉTODOS	29
Material vegetal	29
Experimento I: Estabelecimento de protocolo de desinfestação de <i>Pereskia aculeata</i>	29
Experimento II: Avaliação de citocininas no desempenho de explantes nodais no estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>Pereskia aculeata</i>	30
Experimento III: Avaliação de formulações de meios de cultura no estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>Pereskia aculeata</i>	31
Experimento IV: Efeito das trocas gasosas e concentrações de sacarose na morfofisiologia e anatomia de <i>Pereskia aculeata</i> cultivada <i>in vitro</i>	32
Análises	33
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO	41
REFERÊNCIAS	49
APÊNDICE	56
CAPÍTULO II	68
RESUMO	68
ABSTRACT	69
INTRODUÇÃO	70
MATERIAL E MÉTODOS	72
Material vegetal e desinfestação	72
Iniciação da cultura <i>in vitro</i>	72
Qualidade da luz	73
Análises	74
RESULTADOS	77
DISCUSSÃO	78
REFERÊNCIAS	81
APÊNDICE	85
CONCLUSÕES GERAIS	90

INTRODUÇÃO GERAL

Pereskia (Cactaceae) é um gênero nativo da América do Sul e, juntamente com o gênero *Maihuenia*, formam a subfamília Pereskioideae. *Pereskia* é composto por arbustos folhosos e árvores, sendo considerado os representantes mais primitivos da família Cactaceae (Edwards e Donoghue, 2006). A distribuição das espécies desse gênero ocorre principalmente em ambientes méxicos e xéricos (Mauseth, 1999). Dentre as espécies de *Pereskia*, a *Pereskia aculeata* Miller é objeto de muitos trabalhos, por apresentar propriedades de interesses biotecnológico e econômico.

Conhecida como ora-pro-nóbis, lobrobó, groselha-da-américa, trepadeira-limão ou carne-de-pobre, é uma espécie trepadeira, de hábito escandente, chegando a atingir até 10 metros de altura. No Brasil, pode ser encontrada entre os estados da Bahia e Rio Grande do Sul, estando distribuída principalmente ao longo de restingas, clareiras florestais e matas secundárias (Rosa e Souza, 2003; Arbo-Gallas e Verçoza, 2012). É considerada uma planta alimentícia não-convencional (PANC) (Lorenzi e Kinupp, 2014), sendo bastante consumida no interior do Brasil, principalmente no estado de Minas Gerais. Além disso, é amplamente utilizada no tratamento de doenças pela medicina popular.

Como PANC, a *P. aculeata* se destaca por apresentar propriedades nutritivas de interesse, como alto teor de proteínas, carboidratos, fibras, vitaminas C e A, ácido fólico, aminoácidos e sais minerais como ferro, cálcio, potássio, magnésio, manganês e zinco (Takeiti et al., 2009; Almeida et al., 2014; Lorenzi e Kinnup, 2014; Souza et al., 2015; Maciel et al., 2021). A ingestão de *P. aculeata* na alimentação humana, além servir como fonte de nutrientes, produz efeitos fisiológicos e metabólicos no organismo, sendo considerado um alimento funcional (Almeida et al., 2014; Pinto e Scio, 2014; Vieira et al., 2019).

Na medicina popular, *P. aculeata* é utilizada no tratamento de queimaduras e inflamações (Sartor et al., 2010). Estudos fitoquímicos identificaram diferentes carotenoides e compostos fenólicos (Agostini-Costa et al., 2012) e revelaram potencial antioxidante (Ferreira et al., 2013) e atividade analgésica (Pinto et al., 2015) em extratos de folhas de *P. aculeata*. Além disso, suas folhas acumulam óleos essenciais, tendo como principais constituintes a classe dos sesquiterpenos oxigenados como acorona, (Z,Z)-metill-4,6-hexadecadieno, 1-nonadeceno-ol e (5E,9E)-acetona farnesil (Souza et al., 2016), compostos estes de interesse para as indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética (Silva et al., 2017).

Outra classe de compostos presente em plantas de *P. aculeata* são as betalaínas. As betalaínas são pigmentos hidrofílicos responsáveis pela coloração brilhante de flores, frutos,

raízes e folhas de plantas ocorrentes na ordem Caryophyllales (Gandía-Herrero e García-Carmona, 2013). Pertencem ao grupo dos compostos nitrogenados e, sua biossíntese ocorre a partir do aminoácido tirosina por várias etapas químicas enzimáticas e espontâneas (Nakatsuka et al., 2013). Dependendo do ligante nas frações R1-N-R2 podem ser classificadas em dois grupos estruturais: betaxantinas (coloração amarela) e betacianinas (coloração vermelho-violeta) (Delgado-Vargas et al., 2000).

As betaxantinas são derivadas da condensação do ácido betalâmico com diferentes aminas e aminoácidos, enquanto as betacianinas são resultado da condensação do ácido betalâmico com o ciclo dihidroxifenilalanina (ciclo-DOPA) (Gandía-Herrero e García-Carmona, 2013). O ácido betalâmico, estrutura básica de todas as betalaínas, absorve luz no comprimento de onda de 424 nm (Khan e Giridhar, 2015; Rodriguez-Amaya, 2016). As betaxantinas, independente do aminoácido ligado ao radical livre, absorvem no comprimento de onda máximo de 480 nm, ao passo que as betacianinas tem espectro de absorbância centrado no comprimento de onda de 536 nm (Gandía-Herrero e García-Carmona, 2013).

Os pigmentos naturais apresentam menor estabilidade quando comparados aos corantes sintéticos, no entanto, são considerados inofensivos e até mesmo saudáveis, sendo cada vez mais preferidos pela população (Azeredo, 2009). As betalaínas são usadas como corantes alimentares desde o século XX e, em *Beta vulgaris*, além de serem usadas como corantes alimentares naturais, são utilizadas em produtos farmacêuticos e cosméticos. Além da coloração atraente, as betalaínas apresentam fortes atividades antioxidante (Gandía-Herrero et al., 2012) e anticancerígena (Khan et al., 2012). De acordo com Vinha et al. (2018), o uso de pigmentos naturais pode contribuir na composição nutricional do produto industrializado, fornecendo proteínas, fibras, vitaminas, e outros ingredientes alimentares funcionais.

No campo, a produção de metabólitos secundários apresenta várias desvantagens, como baixos rendimentos e flutuações nas concentrações, devido a variações geográficas, sazonais e ambientais (Murthy et al., 2014). Lage (2015) e Lage et al. (2015) descreveram o estabelecimento *in vitro* de *P. aculeata*, a partir de sementes, avaliaram a influência de diferentes concentrações de citocinina e auxina no desenvolvimento e posterior aclimatização; bem ainda, avaliaram a produção de betalaínas a partir de cultura de calos e células em suspensão. Enquanto que, Tirado (2019), estabeleceu a produção de raízes *in vitro* de *P. aculeata*. No entanto, devido ao seu potencial farmacológico e alimentício, faz-se necessário realizar mais trabalhos com esta espécie, notadamente aqueles que visem o estabelecimento de protocolos de propagação *in vitro*, inclusive com vistas à sua propagação massiva.

A biotecnologia é uma ferramenta amplamente utilizada para manipular e produzir metabólitos secundários de alta qualidade, sendo a cultura de tecidos vegetais uma das técnicas mais utilizadas (Sharma et al., 2020). O cultivo *in vitro* possibilita a produção de plantas em larga escala, de materiais geneticamente idênticos à planta mãe e fisiologicamente uniformes, produzidas em curto espaço de tempo e sem restrição das condições atmosféricas (Nowakowska et al., 2022); tudo isso sob condições assépticas e ambiente controlado. Dentro da cultura *in vitro*, vários fatores como temperatura, luz, meio de cultura, reguladores de crescimento e trocas gasosas afetam o crescimento e o desenvolvimento das plantas e podem ser otimizados para induzir a produção de compostos bioativos de interesse (Faria et al., 2019; Phillips e Garda, 2019; Silva et al., 2019; Fortini et al., 2021; Silva et al., 2021; Farrokhzad et al., 2022).

Embora as técnicas de cultura de tecidos de plantas apresentem diversas vantagens, o ambiente *in vitro* é sensível a alguns problemas de ordem ambiental ou biológica. A colonização do meio de cultura e do explante por microrganismos contaminantes incluindo fungos filamentosos, bactérias, vírus, viroides e ácaros, ocorre de forma rápida e o explante acaba morrendo em questão de dias, o resultado disso é uma redução na taxa de explantes viáveis, ocasionando perdas financeiras aos laboratórios de pesquisa e ao setor comercial (Gammoudi et al., 2022).

O sucesso no estabelecimento de uma cultura *in vitro* depende da desinfestação, sendo essa uma etapa crucial. A desinfestação consiste na eliminação de microrganismos contaminantes como fungos e bactérias, epífitos ou endofíticos, que venham a estar contaminando o material vegetal a ser utilizado. A eficiência da desinfestação depende de vários fatores, como o tipo de contaminação, origem do material vegetal, tamanho, idade e tipo do explante, estado fisiológico da planta doadora, temperatura do ambiente de crescimento, tipo e concentração do agente desinfetante e duração da imersão (Silva et al., 2015; Pepe et al., 2021; Gammoudi et al., 2022).

Na etapa de desinfestação *in vitro*, muitos compostos podem ser utilizados, por exemplo, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), cloreto de mercúrio ($HgCl_2$), nitrato de prata ($AgNO_3$), hipoclorito de cálcio ($Ca(ClO)_2$), etanol e hipoclorito de sódio ($NaOCl$) (Cuba-Díaz et al., 2020; Ahmadpoor et al., 2022; Gammoudi et al., 2022). Sendo esse último, o composto mais utilizado. No entanto, a maioria dos tratamentos aplicados resolve apenas o problema das contaminações superficiais e, em plantas lenhosas, a desinfestação superficial apresenta baixa eficiência para desenvolver culturas axênicas (Pence, 2005). A utilização de compostos biocidas na desinfestação de explantes ou sua adição ao meio de cultura, pode ser alternativa

eficiente no controle de microrganismos endofíticos presentes em plantas lenhosas (Orlikowska et al., 2012; Ho et al., 2022). O PPM (*Plant Preservative Mixture*®) é um biocida de amplo espectro empregado no controle de contaminações endofíticas (Kushnarenko et al., 2022). O estabelecimento de um protocolo de desinfestação eficiente que forneça o desenvolvimento de culturas axênicas é ponto chave antes de dar início a estudos que visem a incrementação do conteúdo de metabólitos secundários ou melhor crescimento de plantas cultivadas *in vitro*.

Diferentes formulações de meios de cultura são utilizadas para promover o crescimento e desenvolvimento de plantas *in vitro*. Os meios de cultura são constituídos basicamente por macro e micronutrientes, vitaminas, fonte(s) de carbono, agentes solidificantes e reguladores de crescimento (Ramage e Williams, 2002; Shahzad et al., 2017). As diferentes formulações de meios de cultura diferem na concentração total de sais (força iônica) e no teor de nitrogênio (Carlín et al., 2015). De acordo com Minocha e Jain (2000), a forma e a quantidade de nitrogênio no meio de cultura têm efeitos significativos na taxa de crescimento e morfologia celular, e no potencial de regeneração. Na cultura de tecidos vegetais, o meio de cultura mais utilizado é o MS (Murashige e Skoog, 1962), que é composto por altos níveis de nitrogênio, com uma razão relativamente alta de amônio para nitrato (Phillips e Garda, 2019). Apesar da sua ampla utilização, o meio MS pode não ser o ideal para o desenvolvimento de todas as espécies de plantas, pois estas apresentam diferentes necessidades nutricionais. Assim, o fornecimento de um meio de cultura adequado para determinada espécie pode induzir respostas *in vitro* desejadas.

As respostas de desenvolvimento em plantas cultivadas *in vitro* também são influenciadas pela adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura. Diversos reguladores de crescimento podem ser utilizados na indução de diferentes respostas morfogênicas, como auxinas, citocininas, giberelinas, etileno ou ácido abscísico (Phillips e Garda, 2019). No entanto, as auxinas e citocininas são os reguladores de crescimento mais utilizados (Madzikane-Mlungwana et al., 2017; Smýkalová et al., 2019; Ahmadpoor et al., 2022; Santana et al., 2022). Os reguladores de crescimento são empregados principalmente na regeneração de plantas *in vitro*, sendo as citocininas importantes para a proliferação (Nowakowska et al., 2021). Além disso, apesar dos poucos estudos voltados para essa aplicação, as citocininas também atuam na regulação do metabolismo secundário (Ptak et al., 2013; Khan et al., 2018; Khanam et al., 2020).

Outro fator importante na cultura de tecidos vegetais se refere as trocas gasosas entre o meio interno e externo dos frascos, que é limitado pelo tipo de vedação utilizado. Por

apresentar baixa taxa de trocas gasosas, no sistema de cultivo *in vitro* convencional é observado uma elevada umidade e baixa concentração de CO₂ (Xiao et al., 2011; Nguyen et al., 2020). Consequentemente, as plantas apresentam atividade fotossintética reduzida e são observados distúrbios fisiológicos e anatômicos (Xiao et al., 2011; Vahdati e Hassankhah, 2013; Nguyen et al., 2020). A fim de contornar esses problemas, o emprego de outros sistemas de cultivo como o fotoautotrófico ou fotomixotrófico vem sendo testado em diferentes espécies como *Caesalpinia spinosa* (Núñez-Ramos et al., 2021), *Billbergia zebrina* (Martins et al., 2015), *Pfaffia glomerata* (Corrêa et al., 2015; Silva et al., 2019), *Vernonia condensata* (Fortini et al., 2021), *Prunus domestica* (Gago et al., 2022), dentre outros. O uso de tampas com membranas permeáveis a gases nos diferentes sistemas de cultivo *in vitro* promove o aumento das taxas fotossintéticas e da biomassa, além disso, pode influenciar no metabolismo secundário das plantas (Xiao et al., 2011; Saldanha et al., 2012; Oliveira et al., 2021; Carrari-Santos et al., 2023).

A luz é outro fator que pode ser controlado *in vitro*, sendo possível alterar a sua qualidade, intensidade e duração. O controle desses fatores permite a produção de plantas com características desejadas. A qualidade da luz pode ser alterada utilizando diferentes fontes de iluminação e diferentes espectros luminosos. Nos últimos anos, os diodos emissores de luz (LEDs) têm se destacado em relação aos sistemas de iluminação convencionais, pois possuem vida útil mais longa e menor emissão de calor, resultando assim em menores custos na refrigeração (Dutta Gupta e Agarwal, 2017). Os LEDs permitem a escolha da qualidade espectral correspondente à faixa de comprimento de onda específico (Dutta Gupta e Jatothu, 2013). A combinação de diferentes composições espectrais de LEDs também pode ser interessante, uma vez que ativa diferentes fotorreceptores de luz, resultando em diferentes respostas fotomorfogênicas na planta (Kami et al., 2010). Além disso, a manipulação da qualidade de luz favorece a síntese de compostos de interesse, pois está diretamente envolvida na regulação de rotas de biossíntese de vários metabólitos (Alvarenga et al., 2015; Batista et al., 2016; Batista et al., 2018; Silva et al., 2020; Rocha et al., 2022).

P. aculeata é uma espécie de ampla utilização, seus diferentes metabólitos secundários são de interesse das indústrias nutracêutica, farmacêutica e alimentícia. Apesar da sua importância, ainda são escassos os estudos que visam estabelecer o cultivo de *P. aculeata in vitro*. Até o momento não foram realizados estudos sobre a influência das trocas gasosas e qualidade da luz no desenvolvimento e na produção de betalaínas em plantas de *P. aculeata* cultivadas *in vitro*. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de propagação *in vitro* e avaliar a influência de diferentes citocininas, meios de cultura, trocas

gasosas e concentrações de sacarose, e qualidade da luz na morfofisiologia de plantas de *P. aculeata*.

REFERÊNCIAS

- Agostini-Costa TS, Wondraceck DC, Rocha WS, Silva DB** (2012) Carotenoids profile and total polyphenols in fruits of *Pereskia aculeata* Miller. *Rev Bras Frutic* **34**: 234–238.
- Ahmadpoor F, Zare N, Asghari R, Sheikhzadeh P** (2022) Sterilization protocols and the effect of plant growth regulators on callus induction and secondary metabolites production in *in vitro* cultures *Melia azedarach* L. *AMB Express* **12**: 3.
- Almeida MEF, Junqueira AMB, Simão AA, Corrêa AD** (2014) Caracterização química das hortaliças não-convencionais conhecidas como ora-pro-nobis. *Biosci J (Online)* **30**: 431–439.
- Alvarenga ICA, Pacheco FV, Silva ST, Bertolucci SKV, Pinto JEBP** (2015) *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **122**: 299–308.
- Arbo-Gallas D, Verçoza FC** (2012) A família Cactaceae na Restinga de Grumari, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Rev Eletrônica Biol* **5**: 129–143.
- Azeredo HMC** (2009) Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. *Int J Food Sci Technol* **44**: 2365–2376.
- Batista DS, Castro KM, da Silva AR, Teixeira ML, Sales TA, Soares LI, Cardoso MG, Oliveira Santos M, Viccini LF, Otoni WC** (2016) Light quality affects *in vitro* growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **52**: 276–282.
- Batista DS, Felipe SHS, Silva TD, Castro KM, Mamedes-Rodrigues TC, Miranda NA, Ríos-Ríos AM, Faria DV, Fortini EA, Chagas K, Torres-Silva G, Xavier A, Arencibia AD, Otoni WC** (2018) Light quality in plant tissue culture: does it matter? *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **54**: 195–215.
- Carlín AP, Tafoya F, Alpuche Solís AG, Pérez-Molphe-Balch E** (2015) Effects of different culture media and conditions on biomass production of hairy root cultures in six Mexican cactus species. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **51**: 332–339.
- Carrari-Santos R, Vettorazzi RG, Pinto VB, Sena EOA, Oliveira JG, Campostrini E, Silveira V, Santa-Catarina C** (2023) Microporous membrane and culture medium affect *in vitro* seedling development of *Dalbergia nigra* (Vell.) Ex Benth. (Fabaceae) by modulation of the protein profile and accumulation of ethylene and CO₂. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **153**: 559–576.
- Corrêa JPO, Vital CE, Pinheiro MVM, Batista DS, Azevedo JFL, Saldanha CW, Cruz ACF, DaMatta FM, Otoni WC** (2015) *In vitro* photoautotrophic potential and *ex vitro* photosynthetic competence of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen accessions. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **121**: 289–300.
- Cuba-Díaz M, Rivera-Mora C, Navarrete E, Klagges M** (2020) Advances of native and non-native Antarctic species to *in vitro* conservation: improvement of disinfection protocols. *Sci Rep* **10**: 3845.

Delgado-Vargas F, Jiménez AR, Paredes-López O (2000) Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Crit Rev Food Sci Nutr* **40**: 173–289.

Dutta Gupta S, Agarwal A (2017) Artificial Lighting System for Plant Growth and Development: Chronological Advancement, Working Principles, and Comparative Assessment. In S Dutta Gupta, ed., *Light emitting diodes for agriculture: smart lighting*. Springer, Singapore, pp 1–25.

Dutta Gupta S, Jatothu B (2013) Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. *Plant Biotechnol Rep* **7**: 211–220.

Edwards EJ, Donoghue MJ (2006) *Pereskia* and the origin of the cactus life-form. *Am Nat* **167**: 777–793.

Faria DV, Correia LNF, Souza MVC, Ríos-Ríos AM, Vital CE, Batista DS, Costa MGC, Otoni WC (2019) Irradiance and light quality affect two annatto (*Bixa orellana* L.) cultivars with contrasting bixin production. *J Photochem Photobiol B: Biol* **197**: 111549.

Farrokhzad Y, Babaei A, Yadollahi A, Kashkooli AB, Mokhtassi-Bidgoli A, Hesami S (2022) *In vitro* photomorphogenesis, plant growth regulators, melatonin content, and DNA methylation under various wavelengths of light in *Phalaenopsis amabilis*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **149**: 535–548.

Ferreira W, Ferreira WFL, Locatelli MG, Silva EO, Missau FC (2013) Avaliação do Potencial Antioxidante de *Pereskia aculeata* (Ora Pro Nobis) Frente ao Método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). *Anais Salão Int Ensino Pesq Extensão* **5**.

Fortini EA, Batista DS, Mamedes-Rodrigues TC, Felipe SHS, Correia LNF, Chagas K, Silva PO, Rocha DI, Otoni WC (2021) Gas exchange rates and sucrose concentrations affect plant growth and production of flavonoids in *Vernonia condensata* grown *in vitro*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **144**: 593–605.

Gago D, Sánchez C, Aldrey A, Christie CB, Bernal MÁ, Vidal N (2022) Micropropagation of Plum (*Prunus domestica* L.) in Bioreactors Using Photomixotrophic and Photoautotrophic Conditions. *Horticulturae* **8**: 286.

Gammoudi N, Nagaz K, Ferchichi A (2022) Establishment of optimized *in vitro* disinfection protocol of *Pistacia vera* L. explants mediated a computational approach: multilayer perceptron–multi-objective genetic algorithm. *BMC Plant Biol* **22**: 324.

Gandía-Herrero F, Escribano J, García-Carmona F (2012) Purification and Antiradical Properties of the Structural Unit of Betalains. *J Nat Prod* **75**: 1030–1036.

Gandía-Herrero F, García-Carmona F (2013) Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends Plant Sci* **18**: 334–343.

Ho W-J, Huang Y-K, Huang W-W, Huang Y-C, Chung J-P (2022) Effective *in vitro* culture using dormant bud of nodal sections from a mature *Acacia* tree. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **58**: 437–446.

Kami C, Lorrain S, Hornitschek P, Fankhauser C (2010) Light-regulated plant growth and development. *Curr Top Dev Biol* **91**: 29–66.

Khan MI, Giridhar P (2015) Plant betalains: Chemistry and biochemistry. *Phytochemistry* **117**: 267–295.

Khan MI, Sri Harsha PSC, Giridhar P, Ravishankar GA (2012) Pigment identification, nutritional composition, bioactivity, and *in vitro* cancer cell cytotoxicity of *Rivina humilis* L. berries, potential source of betalains. *LWT* **47**: 315–323.

Khan T, Abbasi BH, Khan MA (2018) The interplay between light, plant growth regulators and elicitors on growth and secondary metabolism in cell cultures of *Fagonia indica*. *J Photochem Photobiol B Biol* **185**: 153–160.

Khanam MN, Javed SB, Anis M, Alatar AA (2020) meta-Topolin induced *in vitro* regeneration and metabolic profiling in *Allamanda cathartica* L. *Ind Crops Prod* **145**: 111944.

Kushnarenko S, Aralbayeva M, Rymkhanova N, Reed BM (2022) Initiation pretreatment with Plant Preservative Mixture™ increases the percentage of aseptic walnut shoots. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* **58**: 964–971.

Lage DA (2015) Desenvolvimento de sistemas *in vitro* visando à produção de plantas, culturas celulares e metabólitos com potencial antioxidante e antineoplásico de *Pereskia aculeata* Mill. Tese (Doutorado em Conservação e Utilização da Biodiversidade) – UERJ, Rio de Janeiro.

Lage DA, Tirado MS, Vanicore SR, Sabino KCC, Albarello N (2015) Production of betalains from callus and cell suspension cultures of *Pereskia aculeata* Miller, an unconventional leafy vegetable. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **122**: 341–350.

Lorenzi H, Kinnup VF (2014) Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum.

Maciel VBV, Bezerra RQ, Chagas EGL, Yoshida CMP, Carvalho RA (2021) Ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller): a potential alternative for iron supplementation and phytochemical compounds. *Braz J Food Technol* **24**: 2020180.

Madzikane-Mlungwana O, Moyo M, Aremu A, Plíhalová L, Doležal K, van Staden J, Finnie J (2017) Differential responses to isoprenoid, N 6-substituted aromatic cytokinins and indole-3-butyric acid in direct plant regeneration of *Eriocephalus africanus*. *Plant Growth Regul* **82**:103–110.

Martins JPR, Verdoodt V, Pasqual M, De Proft M (2015) Impacts of photoautotrophic and photomixotrophic conditions on *in vitro* propagated *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae). *Plant Cell Tiss Org Cult* **123**:121–132.

Mauseth JD (1999) Anatomical Adaptations to Xeric Conditions in *Maihuenia* (Cactaceae), a Relictual, Leaf-Bearing Cactus. *J Plant Res* **112**: 307–315.

Minocha R, Jain SM (2000) Tissue culture of woody plants and its relevance to molecular biology. In: *Molecular Biology of Woody Plants: Volume 1*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp 315-339.

Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with *Tobacco* Tissue Cultures. *Physiol Plant* **15**: 473–497.

Murthy HN, Lee E-J, Paek K-Y (2014) Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **118**: 1–16.

Nakatsuka T, Yamada E, Takahashi H, Imamura T, Suzuki M, Ozeki Y, Tsujimura I, Saito M, Sakamoto Y, Sasaki N, Mishihara M (2013) Genetic engineering of yellow betalain pigments beyond the species barrier. *Sci Rep* **3**: 1970.

Nguyen QT, Xiao Y, Kozai T (2020) Chapter 23 - Photoautotrophic micropropagation. *In* T Kozai, G Niu, M Takagaki, eds, *Plant Factory* (Second Edition). Academic Press, pp 333–346.

Nowakowska K, Pińkowska A, Siedlecka E, Pacholczak A (2022) The effect of cytokinins on shoot proliferation, biochemical changes and genetic stability of *Rhododendron* ‘Kazimierz Odnowiciel’ in the *in vitro* cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **149**: 675–684.

Núñez-Ramos JE, Quiala E, Posada L, Mestanza S, Sarmiento L, Daniels D, Arroyo CR, Naranjo B, Vizuite K, Noceda C, Gómez-Kosky R (2021) Morphological and physiological responses of tara (*Caesalpinia spinosa* (Mol.) O. Kuntz) microshoots to ventilation and sucrose treatments. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **57**: 1–14.

Oliveira T, Balduino MCM, Carvalho AA, Bertolucci SKV, Cossa MC, Coelho AD, Leite JJF, Pinto JEBP (2021) The effect of alternative membrane system, sucrose, and culture methods under photosynthetic photon flux on growth and volatile compounds of mint *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **57**: 529–540.

Orlikowska T, Zawadzka M, Zenkteler E, Sobiczewski P (2012) Influence of the biocides PPM™ and Vitrofur on bacteria isolated from contaminated plant tissue cultures and on plant microshoots grown on various media. *J Hortic Sci Biotechnol* **87**: 223–230.

Pence VC (2005) *In vitro* collecting (IVC). I. The effect of collecting method and antimicrobial agents on contamination in temperate and tropical collections. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **41**: 324–332.

Pepe M, Hesami M, Jones AMP (2021) Machine learning-mediated development and optimization of disinfection protocol and scarification method for improved *in vitro* germination of *Cannabis* seeds. *Plants* (Basel) **10**: 2397.

Phillips GC, Garda M (2019) Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **55**: 242–257.

Pinto NCC, Machado DC, da Silva JM, Conegundes JLM, Gualberto ACM, Gameiro J, Moreira Chedier L, Castañon MCMN, Scio E (2015) *Pereskia aculeata* Miller leaves present *in vivo* topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. *J Ethnopharmacol* **173**: 330–337.

Pinto N de CC, Scio E (2014) The biological activities and chemical composition of *Pereskia* species (Cactaceae) - a review. *Plant Foods Human Nutr* **69**: 189–195.

Ptak A, Simlat M, Kwiecień M, Laurain-Mattar D (2013) *Leucojum aestivum* plants propagated in *in vitro* bioreactor culture and on solid media containing cytokinins. *Engineer Life Sci* **13**: 261–270.

Ramage CM, Williams RR (2002) Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **38**: 116–124.

Rocha TT, Araújo DX, Carvalho AA, Germano CM, Santos MF, Lameira OA, Bertolucci SKV, Pinto JEBP (2022) *In vitro* culture of *Lippia dulcis* (Trev.): light intensity and wavelength effects on growth, antioxidant defense, and volatile compound production. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **58**: 636–652.

Rodriguez-Amaya DB (2016) Natural food pigments and colorants. *Curr Opin Food Sci* **7**: 20–26.

Rosa SM, Souza L (2003) Morphology and anatomy of the fruit (hypanthium, pericarp and seed) development of *Pereskia aculeata* Miller (Cactaceae). *Acta Scient Biol Sci* **25**: 415–428.

Saldanha CW, Otoni CG, Azevedo JLF, Dias LLC, Rêgo MM, Otoni WC (2012) A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *Plant Cell Tiss Org Cult* **110**:413–422.

Santana MJ, Barbosa-Júnior SM, Dias LLL, Silva LAS, da Silva GZ, Fortini EA, Batista DS, Otoni WC, Netto APC, Rocha DI (2022) A novel *in vitro* propagation system for West Indian elm [*Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae)]: a valuable medicinal woody species. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **58**: 865–875.

Sartor CFP, Amaral V, Guimarães HET, Barros KN, Felipe DF, Cortez LER, Veltrini VC (2010) Estudo da Ação Cicatrizante das Folhas de *Pereskia aculeata*. *Revista Saúde e Pesq* **3**: 149-154.

Shahzad A, Sharma S, Parveen S, Saeed T, Shaheen A, Akhtar R, Yadav V, Upadhyay A, Ahmad Z (2017) Historical Perspective and Basic Principles of Plant Tissue Culture. *In* MZ Abdin, U Kiran, Kamaluddin, A Ali, eds, *Plant Biotechnology: Principles and Applications*. Springer, Singapore, pp 1–36.

Sharma S, Sharma S, Kukreja S, Jadon VS, Sharma V (2020) Plant tissue culture methods in secondary metabolite production – A mini review. *Plant Cell Biotechnol Mol Biol* **21**: 144–153.

Silva DO, Seifert M, Nora FR, Bobrowski VL, Freitag RA, Kucera HR, Nora L, Gaikwad NW (2017) Acute Toxicity and Cytotoxicity of *Pereskia aculeata*, a Highly Nutritious Cactaceae Plant. *J Med Food* **20**: 403–409.

Silva JAT, Winarto B, Dobránszki J, Zeng S (2015) Disinfection procedures for *in vitro* propagation of *Anthurium*. *Folia Horticolt* **27**: 3–14.

Silva TD, Batista DS, Castro KM, Fortini EA, Felipe SHS, Fernandes AM, Sousa RMJ, Chagas K, Silva JVS, Correia LNF, Torres-silva G, Farias LM, Otoni WC (2021) Irradiance-driven 20-hydroxyecdysone production and morphophysiological changes in *Pfaffia glomerata* plants grown *in vitro*. *Protoplasma* **258**: 151–167.

Silva TD, Batista DS, Fortini EA, Castro KM, Felipe SHS, Fernandes AM, Sousa RMJ, Chagas K, Silva JVS, Correia LNF, Farias LM, Leite JPV, Rocha DI, Otoni WC (2020) Blue and red light affects morphogenesis and 20-hydroxyecdysone content of *in vitro* *Pfaffia glomerata* accessions. *J Photochem Photobiol B Biol* **203**: 111761.

Silva TD, Chagas K, Batista DS, Felipe SHS, Louback E, Machado LT, Fernandes AM, Buttrós VHT, Koehler AD, Farias LM, Santos AF, Silva PO, Otoni WC (2019) Morphophysiological *in vitro* performance of Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) based on culture medium formulations. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **55**: 454–467.

Smýkalová I, Vrbová M, Cvečková M, Plačková L, Žukauskaitė A, Zatloukal M, Hrdlička J, Plíhalová L, Doležal K, Griga M (2019) The effects of novel synthetic cytokinin derivatives and endogenous cytokinins on the *in vitro* growth responses of hemp (*Cannabis sativa* L.) explants. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **139**: 381–394.

Souza LF, Caputo L, De Barros IBI, Fratianni F, Nazzaro F, De Feo V (2016) *Pereskia aculeata* Muller (Cactaceae) Leaves: Chemical Composition and Biological Activities. *Int J Mol Sci* **17**: 1478.

Souza MSS, Barbalho SM, Guiguer EL, Araújo AC, Bueno PCS, Farinazzi-Machado FMV, Lima LML, Silva BC, Mendes CG (2015) Effects of *Pereskia aculeata* Miller on the Biochemical Profiles and Body Composition of Wistar Rats. *J Biosci Med* **3**: 82–89.

Takeiti CY, Antonio GC, Motta EMP, Collares-Queiroz FP, Park KJ (2009) Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). *Int J Food Sci Nutr* **60 Suppl 1**: 148–160.

Tirado MS (2019) Produção *in vitro* e *in vivo*, análise química e avaliação do potencial antioxidante de raízes de *Pereskia aculeata* Miller (Cactaceae). Dissertação (Mestrado em Conservação e Utilização da Biodiversidade) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Vahdati K, Hassankhah A (2013) Developing a photomixotrophic system for micropropagation of persian walnut. VII International Walnut Symposium 1050, pp 181–187.

Vieira CR, Silva BP, Carmo MAV, Azevedo L, Nogueira DA, Duarte Martino HS, Silva RR (2019) Effect of *Pereskia aculeata* Mill. *in vitro* and in overweight humans: A randomized controlled trial. *J Food Biochem* **43**: 12903.

Vinha AF, Rodrigues F, Nunes MA, Oliveira MBPP (2018) 11 - Natural pigments and colorants in foods and beverages. In CM Galanakis, ed, *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Woodhead Publishing, pp 363–391.

Xiao Y, Niu G, Kozai T (2011) Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **105**: 149–158.

CAPÍTULO I

Estabelecimento *in vitro* de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill. – Cactaceae): avaliação da desinfestação química, citocininas, formulações de meios de cultura, trocas gasosas e sacarose

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi estabelecer um protocolo de propagação *in vitro* por meio da avaliação da desinfestação química, diferentes citocininas, meios de cultura, e da concentração de sacarose e trocas gasosas de *Pereskia aculeata* Mill. Para isso, foram realizados quatro experimentos: I) Estabelecimento de protocolo de desinfestação de *P. aculeata*; II) Avaliação de citocininas no desempenho de explantes nodais no estabelecimento *in vitro* de *P. aculeata*; III) Avaliação de formulações de meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de *P. aculeata*; IV) Efeito das trocas gasosas e concentrações de sacarose na morfofisiologia e anatomia de *P. aculeata* cultivada *in vitro*. A desinfestação dos segmentos nodais de *P. aculeata* em solução de Hipoclorito de Sódio (NaOCl) a 2,5% e a adição de 0,2% de *Plant Preservative Mixture* (PPM) ao meio de cultura proporcionou maior taxa de assepsia dos explantes crescidos *in vitro*. Plantas cultivadas em meio com *meta*-Topolina (*mT*) apresentaram maior acúmulo de biomassa, comprimento do caule e área foliar, enquanto que plantas crescidas em meio com 6-Benzilaminopurina (BAP) apresentaram maior número de folhas e maior atividade da peroxidase (POD), e o maior acúmulo de betaxantina foi observado em plantas cultivadas em meio contendo *mT*, Zeatina (*Zea*) e no controle (meio sem adição de regulador de crescimento). Os diferentes meios de cultura também afetaram o desenvolvimento de *P. aculeata in vitro*. O meio *Murashige e Skoog* (MS) favoreceu o acúmulo de biomassa, enquanto plantas crescidas em meio *Driver e Kuniyuki* (DKW) apresentaram maior comprimento de caule. Folhas e caule de plantas crescidas em meios *Quoirin e Lepoivre* (QL), *Correia et al.* (JADS) e *Lloyd e McCown* (WPM), aparentemente, apresentam maior quantidade de células mucilaginosas. As condições de cultivo heterotrófica e fotomixotrófica proporcionaram maior acúmulo de biomassa e favoreceram a fotossíntese de *P. aculeata in vitro*. As condições de cultivo *in vitro* também causaram modificações anatômicas nas folhas e caule de *P. aculeata*. As folhas crescidas sob menor taxa de troca gasosa (TTCO₂ de 14 µL L⁻¹ s⁻¹) e meio sem sacarose, aparentemente apresentaram células parenquimáticas menos pronunciadas e feixe vascular menos desenvolvido. Aparentemente,

as células mucilaginosas em folhas de *P. aculeata* são mais pronunciadas quanto maior a concentração de sacarose (30 g L^{-1}) adicionada ao meio e maiores taxas de trocas gasosas (TTCO₂ de $25 \mu\text{L L}^{-1} \text{ s}^{-1}$), já no caule, observou-se maior quantidade de células mucilaginosas sob condição de cultivo de menor taxa de troca gasosa, independente da concentração de sacarose (0, 15 ou 30 g L^{-1}). Para o estabelecimento eficiente de segmentos nodais de *P. aculeata in vitro*, é indicado que a desinfestação dos explantes seja realizada em solução de NaOCl a 2,5%, e inoculados em meio de cultura MS, acrescido de 1 mg L^{-1} de *meta*-Topolina e contendo 0,2% de PPM, suplementado com 15 g L^{-1} e os frascos vedados com tampas que permitem TTCO₂ de $14 \mu\text{L L}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ou suplementado com 30 g L^{-1} e os frascos vedados com tampas que permitem TTCO₂ de $25 \mu\text{L L}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Palavras-chave: *Plant Preservative Mixture*; *Meta*-Topolina; Betalaína; Propagação heterotrófica; Propagação fotomixotrófica.

ABSTRACT

This study aimed to establish an *in vitro* propagation protocol by evaluating chemical disinfection, different cytokinins, culture media, sucrose concentration and gas exchange of *Pereskia aculeata* Mill. To this end, four experiments were carried out: I) Establishment of a disinfection protocol for *P. aculeata*; II) Evaluation of cytokinins in the performance of nodal explants in the *in vitro* establishment of *P. aculeata*; III) Evaluation of culture media formulations in the *in vitro* establishment of *P. aculeata*; IV) Effect of gas exchange and sucrose concentrations on the morphophysiology and anatomy of *P. aculeata* grown *in vitro*. Disinfecting the nodal segments of *P. aculeata* in a 2.5% solution of sodium hypochlorite (NaOCl) and adding 0.2% *Plant Preservation Mixture* (PPM) to the culture medium provided a higher rate of asepsis of the explants grown *in vitro*. Plants grown in medium with *meta*-Topolin (*mT*) showed greater accumulation of biomass, stem length and leaf area, while plants grown in medium with 6-Benzylaminopurine (BAP) showed a greater number of leaves and greater peroxidase (POD) activity, and the greatest accumulation of betaxanthin was observed in plants grown in medium containing *mT*, Zeatin (*Zea*) and the control (medium without the addition of a growth regulator). The different culture media also affected the development of *P. aculeata in vitro*. *Murashige and Skoog medium* (MS) favored biomass accumulation, whereas *Driver and Kuniyuki medium* (DKW) plants showed greater stem length. Leaves and stems of plants grown on *Quoirin and Lepoivre medium* (QL), *Correia et al. medium* (JADS) and *Lloyd and McCown medium* (WPM) apparently have a greater amount of mucilage cells. The heterotrophic and photomixotrophic growing conditions provided greater biomass accumulation and favored photosynthesis in *P. aculeata in vitro*. The *in vitro* cultivation conditions also caused anatomical changes in the leaves and stems of *P. aculeata*. Leaves grown under a lower gas exchange rate (TTCO₂ of 14 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$) and medium without sucrose showed less pronounced parenchymatous cells and a less developed vascular bundle. Apparently, the mucilage cells in *P. aculeata* leaves are more pronounced the higher the sucrose concentration (30 g L⁻¹) added to the medium and the higher the gas exchange rates (TTCO₂ of 25 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$), while in the stem, a greater quantity of mucilage cells was observed under cultivation conditions with a lower gas exchange rate, regardless of the sucrose concentration (0, 15 or 30 g L⁻¹). For the efficient establishment of nodal segments of *P. aculeata* nodal segments *in vitro*, it is recommended that the explants be disinfected in a 2.5% NaOCl solution and inoculated in MS culture medium plus 1 mg L⁻¹ of *meta*-Topolin and containing 0.2% PPM, supplemented with 15 g L⁻¹ and the vials sealed with lids that

allow TTCO_2 of $14 \mu\text{L L}^{-1} \text{ s}^{-1}$, or supplemented with 30 g L^{-1} and the vials sealed with lids that allow TTCO_2 of $25 \mu\text{L L}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Keywords: Plant Preservative Mixture; *Meta*-Topolin; Betalain; Heterotrophic propagation; Photomixotrophic propagation.

INTRODUÇÃO

Pereskia aculeata Mill. (Cactaceae) conhecida popularmente como ora-pro-nóbis ou lobrobó, é um arbusto folhoso considerado planta alimentícia não convencional (PANC), bastante consumida no estado de Minas Gerais. Na medicina popular, é utilizada no tratamento de queimaduras e inflamações (Sartor et al., 2010), além de apresentar atividade analgésica (Pinto et al., 2015). Estudos fitoquímicos dessa planta revelaram diferentes carotenóides e compostos fenólicos com atividade antioxidante (Agostini-Costa et al., 2012). Além disso, seus pigmentos são de grande interesse da indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética, pois apresentam cores atrativas, são potencialmente antioxidantes (Gandía-Herrero et al., 2012) e apresentam atividade anticancerígena (Khan et al., 2012).

Visto a importância farmacológica e alimentícia de *P. aculeata*, faz-se necessário realizar estudos que visem a exploração dessa espécie *in vitro*, a fim de estabelecer um protocolo de propagação e desenvolver estratégias para maximizar a produção dos seus compostos de interesse. A etapa de desinfestação dos explantes é um dos principais fatores limitantes no estabelecimento de um protocolo de propagação *in vitro*, sobretudo se o material vegetal utilizado for proveniente de campo. Isso porque, materiais provenientes de campo apresentam alta taxa de contaminação, tanto por fungos quanto por bactérias (Licea-Moreno et al., 2020; Orlikowska et al., 2017), mesmo após a desinfestação. Com isso, o estabelecimento de um protocolo de desinfestação eficiente possibilita o cultivo axênico de plantas.

A contaminação pode acontecer de duas formas, epífita ou endofítica; na primeira, os microrganismos encontram-se habitando a superfície dos explantes, podendo ser resolvida com procedimentos de desinfestação de rotina; enquanto que na segunda, há a ultrapassagem dessa barreira e estes infectam também os tecidos internos dos explantes (Kushnarenko et al., 2022), sendo necessário realizar uma desinfestação mais profunda. Diversos agentes desinfestantes podem ser utilizados nesse processo. A escolha do agente, da concentração e do tempo de exposição vai depender da espécie, da origem do material e do tipo de explante (Kushnarenko et al., 2022), sendo necessário realizar estudos para a adequação e, ou otimização de protocolos a ser seguidos.

O etanol a 70% e o hipoclorito de sódio (NaOCl) são agentes desinfestantes amplamente utilizados na desinfestação *in vitro*. No entanto, o uso de outros compostos, como também a aplicação de antibióticos e biocidas é bastante comum, e a combinação desses agentes pode ser uma alternativa viável. O *Plant Preservative Mixture*® (PPM) é um biocida

de amplo espectro, que tem como alvo enzimas específicas do ciclo de Krebs e da cadeia de transporte de elétrons (Compton e Koch, 2001). Entre os biocidas, se destaca devido sua eficácia na prevenção e controle de contaminações na cultura de tecidos (Leão et al, 2020).

A cultura de tecidos apresenta destacada aplicação na produção de moléculas de interesse farmacêutico em plantas medicinais, pois além de promover a multiplicação massiva de plantas e em curto espaço de tempo (Núñez-Ramos et al., 2019), permite a alteração de diversos fatores que incrementam a produção dessas moléculas. No ambiente *in vitro*, fatores físico-químicos como luz, temperatura, umidade, disponibilidade de água, sais minerais e hormônios afetam o crescimento e desenvolvimento de plantas (Shahzad et al., 2017). No entanto, por ser um ambiente controlado, permite que esses fatores sejam manipulados, a fim de potencializar a produção de metabólitos secundários, seja por meio da otimização do meio ou do ambiente *in vitro*.

Os meios de cultura são compostos por nutrientes inorgânicos (macro e micronutrientes), vitaminas, fonte de carbono, agente solidificante e reguladores de crescimento (Phillips e Garda, 2019; Shahzad et al., 2017). Ao decorrer dos anos, diferentes meios foram elaborados, sendo alguns destes modificados para melhor atender as necessidades nutricionais das diferentes espécies de plantas. Na cultura de tecidos, o meio desenvolvido por Murashige e Skoog (MS) (Murashige e Skoog, 1962) é o mais usual, sendo caracterizado por apresentar alta concentração de nitrato (NO_3^-), potássio (K^+) e amônia (NH_4^+). No entanto, a depender da espécie, diferentes meios de cultura podem ser o mais adequado para induzir respostas *in vitro* desejadas (Phillips e Garda, 2019; Silva et al., 2019).

A adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura é outro ponto chave na modificação do meio, tornando-se essencial em casos em que o explante necessita de um estímulo externo para conseguir se desenvolver, principalmente àqueles de plantas lenhosas. As citocininas desempenham um papel importante no estabelecimento de uma micropropagação bem sucedida (Ivanova e Van Staden, 2008). O 6-benzilaminopurina (BAP) é a citoninina mais utilizada na cultura de tecidos vegetais (Krishna Vrundha, et al., 2021). No entanto, problemas como variação somaclonal são bastante comuns em culturas crescidas em meio contendo BAP (Biswas et al., 2009).

Muitos estudos têm sido realizados a fim de substituir o uso do BAP por outras citocininas. As topolinas são uma alternativa em substituição às citocininas tradicionais, sendo a N6-(3-hidroxilbenzil)adenina (conhecida como *meta*-Topolina ou *mT*) proposta como melhor alternativa (Werbrouck et al., 1996). Estudos com *mT* relatam maior proliferação de brotos, melhor enraizamento e aclimatação (Aremu et al., 2012). Além disso, tem efeito no

alongamento de brotos em espécies como *Cannabis sativa*, *Eriocephalus africanus* e *Mammillaria hernandezii* (Lata et al., 2016; Madzikane-Mlungwana et al., 2017; Lázaro-Castellanos et al., 2018).

A propagação *in vitro* convencional é baseada em um sistema hererotrófico, em que o meio de cultura é suplementado com uma fonte de carbono externa que fornece energia para o desenvolvimento do explante (George et al., 2008; Saldanha et al., 2012), e os recipientes são vedados com tampas que não possuem sistema de ventilação. Nesse sistema, os conteúdos de oxigênio e dióxido de carbono são limitados (Meimand et al., 2021), pois há pouca ou nenhuma troca gasosa entre o ambiente *in vitro* e *ex vitro*. Como resultado, baixa taxa fotossintética, redução no crescimento das plântulas, alta umidade relativa e alta concentração de etileno no interior dos frascos, além de distúrbios anatômicos e fisiológicos, e alta taxa de mortalidade das plantas durante a aclimação são observados (Xiao et al., 2011; Saldanha et al., 2012; Vahdati e Hassankhah, 2014; Nguyen et al., 2020).

As tampas com membranas têm sido amplamente utilizadas, para contornar esses problemas, e seu emprego ocorre em dois sistemas, o fotomixotrófico e o fotoautotrófico. No sistema fotomixotrófico o meio de cultura é suplementado com uma fonte de carbono (açúcar) e os frascos são vedados com tampas com a presença de membranas. Esse sistema permite maiores trocas gasosa, maior taxa de crescimento, melhora os aspectos anatômicos, fisiológicos e a morfologia das plantas, a taxa de transpiração e a sobrevivência de plantas na fase de aclimação (Nepomuceno et al., 2009; Saldanha et al., 2012; Ševčíková et al., 2019). Por outro lado, no sistema fotoautotrófico não há adição de açúcares no meio de cultura, no entanto, há a presença de membranas nas tampas utilizadas para vedar os frascos. Nessas condições, normalmente são produzidas plantas saudáveis e com maiores taxas fotossintéticas (Iarema et al., 2012; Martins et al., 2015; Assis et al., 2016), que se assemelham às plantas crescidas em ambiente *ex vitro*, permitindo assim uma aclimação rápida (Tisarum et al., 2018).

Esse trabalho teve por objetivo estabelecer um protocolo de propagação *in vitro* de *P. aculeata* por meio da avaliação da desinfestação química, adição de diferentes citocininas, meios de cultura, e da concentração de sacarose e trocas gasosas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Estacas herbáceas de planta matriz de *Pereskia aculeata*, mantida sob condições de campo no campus da Universidade Federal de Viçosa (20°45'26.5"S 42°52'11.6"W), foram utilizadas como fonte de material propagativo *in vitro*. Os trabalhos foram executados em concordância com o Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), sob cadastro número A2F2BB8.

Para o estabelecimento *in vitro* o tamanho das estacas foi reduzido (~ 10 cm) e suas folhas foram cortadas à metade, com o auxílio de tesoura de poda. Em seguida, os propágulos foram imersos em água contendo detergente doméstico (Químio Indústria e Comércio LTDA., Muriaé, MG, Brasil) a 10% (v/v) e, posteriormente, enxaguadas em água corrente.

Experimento I: Estabelecimento de protocolo de desinfestação de *Pereskia aculeata*

Visando ao estabelecimento *in vitro*, foram utilizados dois protocolos de desinfestação: Hipoclorito de Sódio (NaOCl) com 2,0 a 2,5% de cloro ativo, ou solução de *Plant Preservation Mixture*® (PPM) a 5% (v/v).

Hipoclorito de Sódio

Inicialmente as estacas foram emergidas em álcool 70% por 2 min, seguido por desinfestação em solução de NaOCl 2,0 a 2,5% de cloro ativo (Super Globo Química, Contagem, MG, Brasil) com 2 gotas de Tween 20® por 20 min e, posteriormente, as estacas foram enxaguadas 4 vezes com água purificada (Elix® 70 Water Purification System, Merck Millipore, Alemanha) e autoclavada (Autoclave Vertical, PHOENIX, Araraquara, SP, Brasil), sob câmara de fluxo laminar.

Plant Preservation Mixture

As estacas (~ 10 cm) foram acondicionadas em recipientes contendo solução de PPM (Plant Cell Technology Inc., Washington, DC, USA) a 5% (v/v) em água purificada e autoclavada, e mantidas sob agitação com auxílio de barra magnética em agitador magnético

por 4 h. Em seguida, foram enxaguadas 4 vezes em água purificada e autoclavada, sob câmara de fluxo laminar.

Preparo do meio e condições de cultivo

Segmentos nodais (~ 1,5 cm de comprimento) contendo uma gema foram utilizados como explantes. Os segmentos nodais foram inoculados em tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) em meio com sais e vitaminas de MS (Murashige e Skoog, 1962) (PhytoTecnology Laboratories®, Kansas, EUA), 100 mg L⁻¹ *mio*-inositol (Sigma Chem. Co. St Louis, EUA), 1 mg L⁻¹ de *mT* (Phytotechnology Lab®), 30 g L⁻¹ de sacarose (Phytotechnology Lab®), 7 g L⁻¹ de Ágar (Plant TC Micropropagation Grade, Phytotechnology Lab®), na presença 0,2% (v/v) ou ausência de PPM. O pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ com 1 N de NaOH, antes da adição de ágar. Os tubos foram tampados com tampa de polipropileno. O meio foi autoclavado a 121 °C e 108 kPa, por 20 min.

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 h, e sob irradiância de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas diodo emissor de luz (LED) branca (SMD 100, 18 W, Vilux®, Vitória, ES, Brazil), quantificada por um radiômetro LI-250A (Li-Cor® Inc., Lincoln, NE, EUA).

As taxas de contaminações fúngica e bacteriana foram avaliadas por meio de observação durante 4 semanas de cultivo. O experimento foi conduzido em fatorial duplo 2x2, (desinfestação dos explantes em solução de NaOCl a 2,0 a 2,5% ou em solução de PPM a 5% (v/v) x Meio de cultura contendo ou não 0,2 % (v/v) de PPM). Foi realizado em triplicata, com 15 explantes em cada tratamento, totalizando 45 repetições.

Experimento II: Avaliação de citocininas no desempenho de explantes nodais no estabelecimento *in vitro* de *Pereskia aculeata*

Desinfestação do material vegetal

A desinfestação do material vegetal foi realizada conforme descrito anteriormente. Inicialmente as estacas foram emergidas em álcool 70% por 2 min, seguido por desinfestação em solução de NaOCl 2,0 a 2,5% de cloro ativo (Super Globo Química, Contagem, MG, Brasil) com 2 gotas de Tween 20® por 20 min e, posteriormente, as estacas foram enxaguadas 4 vezes com água purificada (Elix® 70 Water Purification System, Merck Millipore,

Alemanha) e autoclavada (Autoclave Vertical, PHOENIX, Araraquara, SP, Brasil), sob câmara de fluxo laminar.

Preparo do meio e condições de cultivo

Segmentos nodais (~ 1,5 cm de comprimento) foram utilizados como explantes e inoculados em meio conforme anteriormente descrito, todavia sob cinco diferentes tipos de citocininas ou suas combinações (1 mg L⁻¹ de *meta*-Topolina (*mT*), 1 mg L⁻¹ de 6-Benzilaminopurina (BAP), 1 mg L⁻¹ de Zeatina (*Zea*), 0,5 mg L⁻¹ de BAP + 0,5 mg L⁻¹ de *mT*), além do meio sem a adição de reguladores de crescimento (controle)).

Os frascos com capacidade de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura foram vedados com tampas rígidas de polipropileno com duas membranas PTFE de 0,45 µm de poros (MilliSeal® AVS 045, Air Vent, Tóquio, Japão) para trocas gasosas.

As culturas foram mantidas por 40 dias em sala de crescimento sob irradiância de 50 µmol m⁻² s⁻¹, temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 16 h. Após esse período as plantas foram coletadas para determinação das variáveis de crescimento e análises fisiológicas.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, totalizando cinco tratamentos (*mT*, BAP, *Zea*, BAP + *mT* e controle) com 10 repetições cada. Cada repetição consistiu por um frasco contendo três explantes.

Experimento III: Avaliação de formulações de meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de *Pereskia aculeata*

Desinfestação do material vegetal, preparo do meio de cultura e condições de cultivo

A desinfestação do material vegetal proveniente do campo foi realizada conforme descrito anteriormente.

Nessa etapa, os segmentos nodais (~ 1,5 cm de comprimento) foram inoculados em cinco diferentes formulações de meio nutritivo: DKW (Driver e Kuniyuki, 1984; Sigma-Aldrich®), JADS (Correia et al., 1995; baseado em solução estoque), MS (Murashige e Skoog, 1962; PhytoTechnology Lab®), QL (Quoirin e Lepoivre, 1977; Sigma-Aldrich®) e WPM (Lloyd e McCown, 1980, 1981; Sigma-Aldrich®) (Tabela 1). Todos os meios foram suplementados com vitaminas do meio DKW (1 mg L⁻¹ de ácido nicotínico, 2 mg L⁻¹ de tiamina HCl e 2 mg L⁻¹ de glicina), 30 g L⁻¹ de sacarose (Phytotechnology Lab®), 100 mg L⁻¹ de *mio*-inositol (Sigma Chem. Co.), 1 mg L⁻¹ de *mT* (Phytotechnology Lab®), 0,2% (v/v) de PPM e 7 g L⁻¹ de ágar (Plant TC Micropropagation Grade, Phytotechnology Lab®).

Antes da inclusão do ágar o pH dos meios foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$. Os meios foram vertidos em frascos de vidro de 250 mL de capacidade, contendo 50 mL de meio em cada frasco, em seguida, os frascos foram esterilizados em autoclave a 121°C e 108 kPa por 20 min. Os frascos foram vedados com tampas de polipropileno com duas membranas fluoroporo hidrofóbica (PTFE, MilliSeal AVS-045 Air Vent) de $0,45\ \mu\text{m}$ de poros).

As culturas foram mantidas sob as mesmas condições de ambiente anteriormente descritas. Após esse período as plantas foram coletadas para determinação das variáveis de crescimento, análises morfoanatômicas e fisiológicas.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, totalizando cinco tratamentos (DKW, JADS, MS, QL e WPM) com 10 repetições cada. Cada repetição consistiu por um frasco contendo três explantes.

Experimento IV: Efeito das trocas gasosas e concentrações de sacarose na morfofisiologia e anatomia de *Pereskia aculeata* cultivada *in vitro*

Desinfestação do material vegetal

A desinfestação do material vegetal proveniente do campo foi realizada conforme descrito anteriormente.

Preparo do meio e condições de cultivo

Os segmentos nodais (~ 1,5 cm de comprimento) foram inoculados em meio com sais e vitaminas de MS (Murashige e Skoog, 1962) (PhytoTechnology Laboratories®, Kansas, EUA), 100 mg L⁻¹ mio-inositol (Sigma Chem. Co. St Louis, EUA), 1 mg L⁻¹ de mT (Phytotechnology Lab®), 7 g L⁻¹ de Ágar (Plant TC Micropropagation Grade, Phytotechnology Lab®), 0,2% (v/v) de PPM, e contendo 0, 15 ou 30 g L⁻¹ de sacarose. O pH do meio foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ com 1 N de NaOH, antes da adição de ágar. Os frascos foram vedados com dois diferentes tipos de vedação: tampas rígidas de polipropileno (TRP) sem membrana, que permite taxa de troca de CO₂ (TTCO₂) de 14 µL L⁻¹ s⁻¹ e TRP com dois orifícios de 10 mm cada, cobertos por membranas e TTCO₂ de 25 µL L⁻¹ s⁻¹, conforme Batista et al. (2017).

As culturas foram mantidas sob as mesmas condições de ambiente anteriormente descritas. Após esse período as plantas foram coletadas para determinação das variáveis de crescimento, análises morfoanatômicas e fisiológicas.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 3, sendo dois tipos de taxa de troca de CO₂ (TTCO₂ de 14 µL L⁻¹ s⁻¹ e TTCO₂ de 25 µL L⁻¹ s⁻¹) e três concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L⁻¹), resultando em 6 tratamentos com dez repetições cada. Cada repetição consistiu por um frasco contendo três explantes.

Análises

Variáveis de crescimento

Após 40 dias de cultivo *in vitro*, as plantas foram avaliadas quanto ao comprimento total da parte aérea (cm), massa fresca (g), massa seca (g), número de folhas e área foliar (cm²). Para a determinação da área foliar, as folhas foram destacadas, fixadas em papel branco plastificado, fotografadas com câmera digital, e as imagens processadas no programa ImageJ (Schneider et al., 2012). Para obtenção da massa seca (g), o material vegetal foi seco em estufa a 50 °C por 72 h.

Quantificação de betalaínas

Para obtenção do extrato concentrado de betalaínas utilizou-se o protocolo descrito por Lage (2015). A extração foi realizada em metanol a 80 % durante 30 min, sob agitação constante, em seguida, o material foi centrifugado a 4.000 g por 10 min.

O conteúdo de betacianina e betaxantina foi avaliado em um leitor de microplacas (Leitor de ELISA e Fotômetro de Microplacas Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific Inc.). A absorção de luz a 538 nm foi utilizada para calcular a concentração de betanina (principal betacianina), enquanto a absorção a 476 nm para o conteúdo de vulgaxantina-I (principal betaxantina).

O cálculo da absorção de luz pela betanina e vulgaxantina-I foi realizado de acordo com as seguintes equações:

$$x = 1,095 \cdot (a - c)$$

$$z = a - x$$

$$y = b - z - (x / 3,1)$$

Onde:

a = absorção de luz da amostra a 538 nm

b = absorção de luz da amostra a 476 nm

c = absorção de luz da amostra a 600 nm

x = absorção de luz de betanina sem as impurezas

y = absorção de luz da vulgaxantina-I corrigido pela contribuição da betanina e das impurezas

z = absorção de luz das impurezas

Para a determinação das concentrações de betanina e vulgaxantina-I aplicou-se o valor de absorvidade ($A^{1\%}$) de cada pigmento, que representa o coeficiente de extinção em 1% de solução. Segundo Wyler e Dreiding (1957) e Piattelli e Minale (1964), a absorvidade da betanina corresponde a 1120 e da vulgaxantina-I a 750.

A concentração de betalaínas totais a partir da quantificação de betanina e vulgaxantina-I foi estabelecida a partir da Lei de Beer-Bourguier-Lambert, a qual relaciona a absorvância (A) com a concentração (c) da substância absorvente, de acordo com $A = a \cdot b \cdot c$.

Onde:

a = absorvidade

b = comprimento do percurso óptico (0,5 cm)

c = concentração da substância absorvente (g/L)

Determinação da atividade fotossintética

Para determinação da atividade fotossintética *in vitro*, utilizou-se um sistema de analisador de gás infravermelho (IRGA, model S151; Qubit Systems, ON, Canadá) adaptado, proposto por Costa et al. (2014). Nesse sistema, a fonte de energia luminosa é fornecida por uma combinação de lâmpadas LEDs no espectro vermelho e azul, dispostas no interior das laterais de um recipiente de poliestireno expandido. Antes da análise, as plantas foram mantidas na ausência de luz por um período de 8 horas.

A taxa fotossintética *in vitro* (A) foi dada pela seguinte fórmula:

$$A (\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}) = \frac{\Delta\text{CO}_2}{\text{Mol. Flow}}$$

Onde,

$$\Delta\text{CO}_2(\text{ppm}) = \text{CO}_2 \text{ de referência} - \text{CO}_2 \text{ de análise}$$

$$Mol.Flow = \frac{Taxa\ de\ fluxo\ de\ ar\ (L\ min^{-1})}{\left(\frac{Constante\ dos\ gases\ perfeitos\ (22,4)\ X\ Temperatura\ (K)}{\left(\frac{600000}{\left(\frac{Area\ foliar\ (cm^2)}{600000} \right)} \right)} \right)}$$

Determinação da atividade das enzimas do estresse oxidativo

As enzimas peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT), peroxidase oxidoreductase (POD) e superóxido dismutase (SOD) foram extraídas por homogeneização de 50 mg de material fresco da parte aérea com 1 mL do meio de extração (tampão fosfato de potássio a 0,1 M, pH 6.8; ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 0.1 mM; fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) a 1 mM e PVPP 1% (p/v). O material foi centrifugado a 10000 xg durante 15 min a 4 °C, e o sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático bruto.

Para a determinação da atividade da APX a metodologia proposta por Nakano e Asada (1981) foi utilizada. A leitura dos extratos foi realizada em comprimento de onda de 290 nm e a atividade enzimática foi calculada utilizando um coeficiente de extinção molar igual a 2,8 M⁻¹ cm⁻¹. A atividade da CAT foi determinada conforme descrito por Havir e McHale (1987). A leitura foi realizada no comprimento de onda de 240 nm e para o cálculo da atividade enzimática foi utilizado um coeficiente de extinção molar igual a 36 mM⁻¹ cm⁻¹. A atividade da POD foi determinada conforme descrito por Kar e Mishra (1976). A leitura foi realizada a 470 nm e a atividade enzimática foi calculada utilizando um coeficiente de extinção molar igual a 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance e Maehly, 1955). A atividade da SOD foi determinada como descrito por Del Longo et al. (1993). Antes da leitura de absorbância a 560 nm, as amostras foram mantidas em câmara de reação, iluminada com lâmpadas de 15 W, durante 5 min e a 25°C. A leitura do branco foi realizada nas mesmas condições, no entanto, na ausência de luz. Uma unidade de SOD equivale à quantidade de enzima necessária de SOD para inibir em 50% a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (Beauchamp e Fridovich, 1971). A atividade da SOD foi expressa em U min⁻¹ mg⁻¹ de proteína, enquanto APX, CAT e POD foram expressos como μmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

Caracterização anatômica

Para avaliação anatômica, secções transversais da região mediana do segundo par de folhas e da região mediana do segundo internódio do caule foram coletadas e fixadas em

solução de glutaraldeído (4%). Em seguida, as amostras foram desidratadas em série etílica de concentração crescente e incluídas em historesina acrílica (Historesin, Leica Instruments, Alemanha). Secções transversais de 5 μ m de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., USA). As secções obtidas foram coradas com azul de toluidina (pH 4,7) por 3 minutos (O'Brien et al., 1964). Posteriormente, as lâminas foram montadas em Permount® SP15-500 (Fisher Scientific) e as imagens foram capturadas em microscópio de luz (modelo AX70 TRF, Olympus Optical) com sistema U-photo, acoplado a câmera fotográfica digital (Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.) e microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic.

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GENES (Cruz, 2016). Todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Exceto os dados do Experimento I que, por sua vez, foram submetidos ao teste de Qui-quadrado.

RESULTADOS

Experimento I: Estabelecimento de protocolo de desinfestação de *Pereskia aculeata*

Os diferentes tratamentos de desinfestação química influenciaram significativamente a taxa de contaminação de explantes de *P. aculeata* por bactérias e fungos (Figura 2).

A menor taxa de contaminação foi observada em explantes desinfestados em solução de NaOCl a 2,5% e inoculadas em meio de cultura MS na presença de 0,2% de PPM, com taxa de assepsia dos explantes de 73%, taxa de contaminação fúngica de 22%, bacteriana de 4% e a associação fungo/bactéria não foi observado em plantas desse tratamento. Por outro lado, plantas desinfestadas na mesma solução, mas inoculadas em meio MS sem PPM apresentaram apenas 49% de explantes livres de contaminações; a taxa de contaminação fúngica, bacteriana e associação fungo/bactéria foi de 40, 9 e 2%, respectivamente. Com relação aos explantes inoculados em meio MS com 0,2% de PPM, porém desinfestados em solução de PPM a 5% foram observados 49% de explantes assépticos, e a taxa de contaminação fúngica, bacteriana e a associação fungo/bactéria foi de 24, 20 e 7%, respectivamente. Quando desinfestados em solução de PPM a 5% e inoculados em meio MS na ausência de PPM, observou-se taxa de contaminação fúngica de 49%, bacteriana de 27% e por fungos e bactérias, em associação, de 7% nos explantes; e a porcentagem de explantes assépticos foi a menor dentre todos os tratamentos (18%).

Experimento II: Avaliação de citocininas no desempenho de explantes nodais no estabelecimento *in vitro* de *Pereskia aculeata*

Em relação aos parâmetros de crescimento, houve diferenças significativas para todas as características avaliadas, exceto para massa fresca da folha (Figuras 3B). A maior massa seca da folha foi observada em plantas de *P. aculeata* cultivadas em meio contendo *mT* (Figura 3C). Plantas crescidas em meio suplementado com Zeatina apresentaram menor acúmulo de massa fresca do caule, quando comparada às plantas crescidas sob os demais tratamentos (Figura 3D). Em relação à massa seca do caule, as maiores médias para essa variável foram observadas em plantas crescidas sob meio de cultura suplementando com *mT*, BAP + *mT* ou BAP (Figura 3E). Explantes cultivados em meio suplementado com *mT* ou BAP + *mT* apresentaram maior comprimento de caule (Figura 3F). A maior área foliar foi observada em plantas cultivadas em meio suplementado com *mT* (Figura 3G), e o maior

número de folhas foi encontrado em explantes cultivados em meio com BAP ou BAP + *mT* (Figura 3H).

A atividade da enzima POD aumentou em plantas cultivadas em meio de cultura contendo BAP (Figura 4A). Já para a enzima CAT, sua maior atividade foi observada em plantas cultivadas em meio de cultura sem reguladores de crescimento, enquanto que a atividade da enzima SOD foi maior em plantas cultivadas em meio de cultura sem reguladores de crescimento ou contendo *mT* (Figuras 4B e 4C). Não houve diferença significativa na atividade da APX (Figura 4D).

Plantas de *P. aculeata* cultivadas *in vitro* em meio com BAP apresentaram redução significativa no conteúdo de betaxantina, quando comparadas aos demais tratamentos ($P < 0,05$) (Figura 5A), que não diferiram entre si. Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas para o conteúdo de betacianina e de betalaínas totais em plantas cultivadas sob diferentes citocininas (Figuras 5B e 5C).

Experimento III: Avaliação de formulações de meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de *Pereskia aculeata*

Plantas de *P. aculeata* cultivadas em diferentes meios de cultura apresentaram diferenças significativas para as variáveis massa fresca da folha, massa fresca do caule e comprimento do caule ($P < 0,05$). As plantas crescidas em meio MS e QL apresentaram maiores valores médio de massa fresca da folha (Figura 6B). As maiores médias para massa fresca do caule foram observadas em plantas crescidas em meio MS, QL e DKW (Figura 6D). Enquanto que o menor comprimento do caule foi observado em plantas de *P. aculeata* cultivadas sob meio JADS (Figura 6G). As variáveis massa seca da folha e do caule, área foliar e número de folhas não foram afetadas pelos meios de cultura testados (Figuras 6C, 6E, 6F e 6H, respectivamente).

A atividade fotossintética de plantas de *P. aculeata* cultivadas *in vitro* sob diferentes meios de cultura não apresentou diferença significativa (Figura 7).

Os diferentes meios de cultura influenciaram na organização histológica de folhas e caule de *P. aculeata* cultivada *in vitro*. No geral, as folhas de *P. aculeata* sob os diferentes meios de cultura apresentaram epiderme unisseriada, folhas anfiestomáticas, e o feixe vascular do tipo colateral circundado por parênquima fundamental, e caules com epiderme unisseriada, colênquima subepidérmico e feixe vascular do tipo colateral (Figura 8).

O crescimento secundário foi observado em caules desenvolvidos sob os diferentes meios de cultura, e foi representado pelo câmbio vascular que produz predominantemente xilema secundário, e fibras do floema mais pronunciadas (Figuras 8A, 8E, 8I, 8M e 8Q).

Foi observada a diferenciação do parênquima nas folhas de *P. aculeata in vitro* em parênquima clorofiliano paliádico e o lacunoso. Essas modificações foram mais evidentes no mesófilo de folhas cultivadas sob condições de meio de cultura WPM e MS, sendo caracterizado como dorsiventral (Figuras 8L e 8P).

Em todos os tecidos estudados nesse trabalho, foram encontradas células mucilaginosas. Em caules de *P. aculeata* crescidos em meio QL, JADS e WPM, as células mucilaginosas foram mais pronunciadas, no entanto, em meio JADS, são aparentemente menos desenvolvidas (Figuras 8A, 8E e 8I). Já em folhas de *P. aculeata*, as células mucilaginosas aparentemente são menos desenvolvidas quando crescidas em meio DKW (Figuras 8R).

Experimento IV: Efeito das trocas gasosas na morfofisiologia e anatomia de *Pereskia aculeata* cultivada *in vitro*

Plantas de *P. aculeata* desenvolvidas sob diferentes concentrações de sacarose e níveis de taxa de trocas gasosas, apresentaram interações significativas desses fatores para as variáveis de crescimento massa fresca e seca da folha, massa fresca do caule e número de folhas.

Para a variável massa fresca da folha, as maiores médias foram encontradas em plantas cultivadas em frascos vedados com tampas que permitiam TTCO_2 de $25 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$ e meio sem sacarose, em frascos vedados com tampas que permitiam TTCO_2 de $14 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$ e meio suplementado com 15 g L^{-1} de sacarose, ou em frascos vedados com tampas que permitiam TTCO_2 de $14 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$ ou de $25 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$ e meio suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose (Figura 9B). Plantas crescidas em frascos vedados com tampas que permitiam TTCO_2 de $14 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$ e meio suplementado com 15 g L^{-1} de sacarose, ou em frascos vedados com tampas que permitiam TTCO_2 de $14 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$ ou de $25 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$ e meio suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, apresentaram maiores médias para as características massa seca da folha e massa fresca do caule (Figuras 9C e 9D). Enquanto que, o maior número de folhas foi encontrado em plantas cultivadas em frascos vedados com tampas que permitiam TTCO_2 de $25 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$ e meio sem sacarose, ou em frascos vedados com tampas que permitiam TTCO_2 de $14 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$ e meio suplementado com 15 g L^{-1} de sacarose, ou em frascos vedados com tampas que

permitiam TTCO_2 de $25 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$ e meio suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose (Figura 9G).

Para as variáveis massa seca do caule e área foliar, não foram observadas interações significativas entre os fatores avaliados. Para essas variáveis, apenas o fator concentração de sacarose contribuiu para a diferença entre os tratamentos. Plantas cultivadas em meio suplementado com 15 ou 30 g L^{-1} de sacarose, apresentaram maiores médias para massa seca do caule (Figura 9E). Enquanto que plantas cultivadas em meio suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, apresentaram maiores médias para a variável área foliar (Figuras 9F).

A taxa fotossintética apresentou interações significativas para os fatores testados, concentrações de sacarose e níveis de taxa de trocas gasosas. Nas plantas cultivados em frascos vedados com tampas que permitiam TTCO_2 de $14 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$ e meio de cultura suplementado com 30 g L^{-1} de sacarose, a taxa fotossintética foi significativamente baixa, apresentando valor negativo (Figura 10).

As concentrações de sacarose e níveis de taxa de trocas gasosas afetaram a anatomia de plantas de *P. aculeata in vitro*. De forma geral, as folhas são anfiestomáticas com epiderme unisseriada (Figuras 11). As folhas crescidas em frascos vedados com tampas (TTCO_2 de $14 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$) e meio sem sacarose, apresentaram células parenquimáticas menos pronunciadas (Figura 11A). Sob as condições de cultivo com TTCO_2 de $25 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$ e independente da concentração de sacarose, é possível distinguir a diferenciação do mesófilo em parênquimas paliádico e lacunoso, sendo caracterizada como dorsiventral (Figuras 11L, 11O e 11R). Sob todas as condições de crescimento, exceto sob a condição sem sacarose e TTCO_2 de $14 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$, o feixe vascular das folhas apresenta-se aparentemente mais desenvolvido, circundados por células colenquimatosas e parênquima fundamental.

P. aculeata cultivada *in vitro* sob diferentes sistemas de cultivo apresenta caule com epiderme unisseriada, colênquima subepidérmico e feixe vascular do tipo colateral (Figura 12). O crescimento secundário foi representado pelo câmbio vascular, que produz xilema predominantemente secundário. As plantas cultivadas em frascos vedados com tampas que permitiam TTCO_2 de $14 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$ e em meio com 15 g L^{-1} de sacarose, apresentaram um tecido vascular com sistema vascular aparentemente mais pronunciado (Figura 12A).

A presença de células mucilaginosas foi observada em folhas e caule, sob todas as condições de cultivo. No entanto, estas são mais pronunciadas quanto maior a concentração de sacarose no meio e maiores taxas de trocas gasosas (Figuras 11 e 12). Já no caule, observou-se maior quantidade de células mucilaginosas sob condição de cultivo com TTCO_2 de $14 \mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$, independente da concentração de sacarose (Figuras 12A e 12C).

DISCUSSÃO

Experimento I: Estabelecimento de protocolo de desinfestação de *Pereskia aculeata*

No presente estudo, estabelecemos um protocolo de desinfestação eficiente para a cultura *in vitro* de *P. aculeata*. A utilização de dois agentes de desinfestação diferentes, NaOCl a 2,5% (v/v) e 0,2% (v/v) de PPM, o primeiro usado na desinfestação dos explantes e o segundo adicionado ao meio de cultura, respectivamente, proporcionaram uma taxa de 73% de explantes livres de contaminação, podendo ser utilizado de forma satisfatória no controle das contaminações endofíticas nessa espécie. Os segmentos nodais obtidos de culturas axênicas podem ser usados como fonte de material vegetal na etapa de multiplicação de *P. aculeata*, evitando assim a dependência de material de campo.

As plantas cujos explantes derivam do cultivo em campo, notadamente as lenhosas, estão sujeitas as adversidades do ambiente, principalmente o ataque de pragas e doenças. O estabelecimento dessas culturas *in vitro* é dificultada devido às elevadas taxas de contaminação endofítica por fungos e bactérias. Nesses casos, os protocolos padrões de desinfestação aplicados nos laboratórios de culturas de tecidos não são suficientes para resolver a contaminação endofítica, sendo necessário melhorar os já existentes ou até mesmo estabelecer novos protocolos de desinfestação. Nosso estudo demonstrou que os explantes de *P. aculeata* coletadas do campo e cultivados *in vitro* apresentaram alto nível de contaminação bacteriana e fúngica, dependendo do protocolo de desinfestação aplicado. Licea-Moreno et al. (2020), trabalhando com a espécie *Juglans regia*, e Cuba-Díaz et al. (2020), trabalhando com as espécies *Deschampsia antarctica*, *Colobanthus quitensis* e *Juncus bufonius*, coletadas em campo, também relataram altas taxas de contaminação mesmo após a desinfestação dos explantes.

Os resultados do presente trabalho evidenciaram que a solução de NaOCl a 2,5% (v/v) por 20 min, foi eficiente na desinfestação dos explantes derivados de campo, no entanto, esse resultado só foi observado quando combinado à adição do 0,2% (v/v) de PPM ao meio de cultura. A exposição de explantes a soluções de NaOCl durante 10 a 20 min, é um protocolo de desinfestação amplamente utilizado na cultura de tecidos vegetais. Em *Juncus bufonius*, o uso de NaClO (7,4 mg mL⁻¹ por 20 min) resultou em porcentagem de sobrevivência de 80% dos explantes (Cuba-Díaz et al., 2020). Segmentos de caule de *Pistacia vera* desinfestados em NaOCl a 2,6% (p/v) por 10 min apresentaram cerca de 96% de cultura livres de contaminação

(Benmahiou et al., 2016). Em *Melia azedarach*, a desinfestação em NaOCl a 2% (p/v) por 12 min foi responsável pela menor taxa de contaminação (Ahmadpoor et al., 2022).

Para um estabelecimento bem-sucedido de explantes de *P. aculeata* coletados em campo, faz-se necessário a adição de 0,2 % de PPM ao meio de cultura, pois os protocolos convencionais de desinfestação controlam apenas as contaminações superficiais, não sendo eficientes na assepsia de tecidos internos dos explantes. O controle de microrganismos endofíticos geralmente é feito com a aplicação de biocidas. O PPM tem sido bastante utilizado no estabelecimento de várias culturas lenhosas *in vitro* como *Eucalyptus citriodora* (Donato et al., 2007), *Acacia confusa* (Ho et al., 2022) e *Juglans regia* (Kushnarenko et al., 2022). O PPM é um biocida de amplo espectro, que atua impedindo o crescimento de fungos e bactérias, no entanto, algumas bactérias endofíticas podem apresentar tolerância ao PPM, como as encontradas em tecidos de mamoeiro (Thomas et al., 2017).

Experimento II: Avaliação de citocininas no desempenho de explantes nodais no estabelecimento *in vitro* de *Pereskia aculeata*

P. aculeata apresenta alto potencial farmacológico e medicinal devido os diferentes metabólitos secundários produzidos pela espécie, principalmente as betalainas. Estabelecer condições de cultivo que visem melhorar o crescimento de plantas medicinais e incrementar a produção desses metabólitos de interesse, é ponto chave para conseguir suprir a alta demanda das indústrias farmacêuticas. A micropropagação a partir de segmentos nodais envolve o crescimento de um meristema axilar já existente, o qual necessita de nutrientes e hormônios para quebrar sua dormência e se desenvolver (Hang et al., 2016).

Os reguladores de crescimento de plantas são moléculas sinalizadoras que regulam e controlam diversos processos celulares, como o crescimento e desenvolvimento em várias espécies de plantas. Segundo Gamborg et al. (1976), a incorporação de reguladores de crescimento ou outras substâncias ativas em meios de cultura geralmente determina o sucesso da cultura *in vitro*. Os resultados desse estudo indicaram que o tipo de citocinina influenciou o crescimento e desenvolvimento, a atividade de enzimas do estresse oxidativo e a biossíntese de betalainas em *P. aculeata* cultivadas *in vitro*.

Verificou-se que a adição de 1 mg L⁻¹ de *mT* ao meio de cultura foi responsável pelo maior acúmulo de biomassa e área foliar em plantas de *P. aculeata in vitro*. A *mT* é uma citocinina natural análoga da BAP (6-Benzilaminopurina) e altamente ativa. Estudos com a finalidade de substituir o uso de BAP por *mT* tem sido realizado em várias espécies de

plantas, e seus efeitos são diversos. A *mT* tem sido efetiva no aumento da taxa de proliferação, multiplicação, alongamento ou crescimento de várias espécies, incluindo *Coleonema album* (Fajinmi et al., 2014), *Cannabis sativa* (Lata et al., 2016), *Nardostachys jatamansi* (Bose et al., 2016), *Malaxis wallichii* (Bose et al., 2017), *Eriocephalus africanus* (Madzikane-Mlungwana et al., 2017), *Mammillaria dioxanthocentron* (Lázaro-Castellanos et al., 2018), *Pterocarpus marsupium* (Ahmad e Anis, 2019), *Allamanda cathartica* (Khanam et al., 2020), *Ipomoea batatas* (Bansal et al., 2023), dentre outras.

Nesse estudo, a adição de 1 mg L⁻¹ de BAP ao meio de cultura afetou somente o número de folhas formadas. Esse resultado pode ser explicado devido o tratamento com BAP ter induzido proliferação de brotos nas gemas dos explantes de *P. aculeata*. O BAP é a citocinina mais utilizada para proliferação de brotos em várias espécies de plantas. Espécies como *Melissa officinalis* (Silva et al., 2005) e *Withania somnifera* (Kaur et al., 2021), quando cultivadas em meio contendo BAP apresentaram maior taxa de proliferação de brotos. No entanto, esse resultado varia de espécie para espécie, em *Cannabis sativa* a maior proliferação de brotos foi observada em explantes cultivados em meios contendo *mT* ou BAP9THP [6-benzilamino-9-(tetra-hidroxipiranyl)purina] (Smýkalová et al., 2019); já na espécie *Actinidia chinensis* var. *chinensis*, o maior número e peso de brotos foi encontrado em meio de cultura suplementado com *mT*, em relação às citonininas convencionais (BAP e Zea) (Saeiahagh et al., 2019).

Plantas sob estresse tendem a produzir espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs mais reconhecidas são os radicais superóxido (O₂⁻) e hidroxila (OH[•]), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o oxigênio singlete (¹O₂) (Nosaka e Nosaka, 2017). Para minimizar os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio, as plantas desenvolveram um sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático (Moura et al., 2017). O sistema de defesa enzimático é constituído por várias enzimas. A SOD catalisa a reação de dismutação do radical superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio; sendo considerada a principal enzima contra os danos causados por EROs nas células (Alscher et al., 2002). Enzimas como CAT, APX e POD, são eficientes na remoção de H₂O₂ presente em células sob condições de estresse (Mittler, 2002; Scandalios, 2005), permitindo o equilíbrio de EROs nas células.

No presente estudo, a atividade da POD foi aumentada em plantas cultivadas em meio de cultura contendo BAP. Resultado semelhante foi encontrado em plantas de *Chrysanthemum morifolium* (Kaur e Singh, 2015). As enzimas CAT e SOD apresentaram maior atividade em meio de cultura sem reguladores de crescimento. Já em *Lichia*, a maior atividade de CAT e SOD foram encontradas em plantas tratadas com BAP (Zhang et al.,

2018). Como dito anteriormente, as citocininas estão envolvidas na modulação de vários importantes processos de desenvolvimento. Segundo Nowakowska e Pacholczak (2020), as citocininas estimulam a atividade de enzimas antioxidantes, contribuindo assim para a defesa das plantas contra o estresse oxidativo. Além disso, Brizzolari et al. (2016) descreveram a capacidade antioxidante dessas moléculas. A atividade de enzimas antioxidantes varia de espécie para espécie, do tipo de hormônio utilizado e do ambiente em que as plantas estão submetidas.

Na cultura de tecidos, o aumento da produção de metabólitos secundários é induzido principalmente por meio da modificação do ambiente ou do meio de cultura. O uso de reguladores de crescimento vegetal tem surtido grande efeito no aumento e regulação desses metabólitos, demonstrando eficácia mesmo em baixas concentrações. Em relação ao conteúdo de betalaínas, os diferentes tipos de citocininas influenciaram apenas o conteúdo de betaxantina. A *mT*, Zea ou a ausência de reguladores de crescimento favoreceram o acúmulo de betaxantina em plantas de *P. aculeata in vitro*. Em *Allamanda cathartica* L., o maior teor de flavonoides e quercetina foi encontrado em plantas crescidas em meio contendo *mT* (Khanam et al., 2020). Plantas de *Lippia origanoides* desenvolvidas em meio suplementado com reguladores de crescimento apresentaram mudanças em seu perfil químico, no entanto, os teores de carvacrol e timol foram aumentados sem a adição de reguladores de crescimento (Castilho et al., 2019).

Os resultados do presente estudo sugerem a *mT* como melhor regulador de crescimento para o estabelecimento de plantas de *P. aculeata in vitro*. Esse trabalho é base para o estabelecimento e otimização de protocolos de propagação em larga escala de plantas de *P. aculeata* para a produção de seus compostos de interesse, por exemplo, as betalaínas.

Experimento III: Avaliação de formulações de meios de cultura no estabelecimento *in vitro* de *Pereskia aculeata*

As plantas apresentam diferentes exigências nutricionais. O crescimento e o desenvolvimento são influenciados diretamente pela quantidade de nutrientes disponível para as plantas. Na cultura de tecidos vegetais, os nutrientes são disponibilizados para os explantes através de diferentes formulações de meios de cultura; as quais diferem entre si na concentração total de sais e no teor de nitrogênio (Carlín et al., 2015). Nesse estudo, foi demonstrado que plantas de *P. aculeata* cultivadas em meio MS, apresentaram maior acúmulo de biomassa.

O meio de cultura formulado por Murashige e Skoog (1962), MS, é o mais utilizado para cultura de tecidos de plantas. As modificações do meio MS, como ½ MS (MS meia força), também são amplamente utilizados. O meio MS é eficaz na regeneração de plantas, pois apresenta altos níveis de nitrogênio em sua composição, tanto na forma de nitrato quanto na forma de amônio, com uma razão relativamente alta de amônio para nitrato (Phillips e Garda, 2019). Segundo Minocha e Jain (2000), a forma e a quantidade de nitrogênio no meio de cultura têm efeitos significativos na taxa de crescimento, morfologia celular e no potencial de regeneração. Em clones híbridos de *Eucalyptus globulus*, verificou-se maiores taxas de multiplicação no meio MS (Borges et al., 2011).

Porém, em algumas espécies, o meio MS não é o melhor para o crescimento das plantas, devido à alta concentração de amônio presente em sua composição (Gamborg et al., 1976). Plantas de *Pfaffia glomerata*, cultivadas em meio DKW, QL e OM, apresentaram as maiores médias para comprimento do caule, massa fresca, massa seca e número de folhas, enquanto os meios JADS e WPM resultaram em um menor crescimento dessas plantas (Silva et al., 2019). Santos et al. (2020), cultivando *Psidium guajava* 'Paluma' (cv. GP) e *P. guineense* (espécie silvestre parente), sob diferentes formulações de meio de cultura encontraram maior crescimento de ambas as espécies em meio JADS.

As plantas de *P. aculeata* crescidas em meio DKW apresentaram maior média do comprimento de caule. Em comparação ao meio MS, o meio DKW tem uma proporção de amônio para nitrato semelhante, no entanto, menor quantidade de nitrogênio total, além disso, sua composição é formada por diferentes fontes de sal, resultando em um aumento na concentração de sulfato (Phillips e Garda, 2019). O maior teor de sulfato pode ser benéfico para algumas plantas lenhosas. Em *Pfaffia glomerata* o meio DKW também favoreceu o maior comprimento do caule (Silva et al., 2019).

A atividade fotossintética de plantas de *P. aculeata* cultivadas *in vitro* não foi afetada pelos diferentes meios de cultura. No presente estudo, verificou-se que as variáveis área foliar e número de folhas não foram afetadas pelas diferentes formulações de meios de cultura. O mesófilo é geralmente especializado como um tecido fotossintético (Torre, 2003), sendo considerado o tecido fotossintético mais ativo em plantas superiores (Taiz et al., 2014). As células do mesófilo de plantas de *P. aculeata* cultivadas nos diferentes meios de cultura, aparentemente não apresentaram diferenças significativas em sua estrutura anatômica que pudesse interferir no desempenho fotossintético das plantas.

Em relação aos resultados da anatomia de plantas de *P. aculeata* cultivadas em diferentes meios de cultura, a quantidade de células mucilaginosas, em tecidos de folhas e

caule de plantas cultivadas nos meios QL, JADS e WPM, mais precisamente nos tecidos do caule, foi mais pronunciada. A mucilagem é um composto produzido pelas plantas para regular as diferentes interações com o meio, seja condições abióticas ou agentes bióticos (Barros et al., 2023), e desempenham diferentes funções, como facilitar a fixação de plantas trepadeiras em superfícies verticais, imobilização de insetos em plantas carnívoras, e prolongar a hidratação dos tecidos (Galloway et al., 2020). No entanto, há consenso entre diferentes autores de que a mucilagem parece ter como propriedade comum a absorção e retenção de água (Barros et al., 2023).

No presente estudo, verificou-se que a morfofisiologia de *P. aculeata in vitro* foi influenciada pelas diferentes composições nutricionais dos diferentes meios de cultura. O meio MS forneceu maior acúmulo de biomassa e maior crescimento, sendo indicado para a propagação de plantas de *P. aculeata in vitro*.

Experimento IV: Efeito das trocas gasosas na morfofisiologia e anatomia de *Pereskia aculeata* cultivada *in vitro*

As concentrações de sacarose e níveis de taxa de trocas gasosas afetaram o desenvolvimento, a fotossíntese e a morfoanatomia de *P. aculeata* cultivada *in vitro*. Plantas de *P. aculeata* crescidas sem a adição de fonte externa de sacarose, independentemente do nível de troca gasosa, não desenvolveram caule. Segundo Jo et al. (2009), cultivos *in vitro* sem a adição de sacarose ao meio de cultura, resulta em menor taxa de multiplicação. Quando cultivadas em meio com alta concentração de sacarose e com baixa taxa de trocas gasosas, as plantas apresentaram drástica redução na taxa fotossintética. A alta concentração de sacarose e saís no meio de cultura, assim como o baixo nível de luz e CO₂ no recipiente de cultura, são fatores limitantes que influenciam a fotossíntese de plantas cultivadas *in vitro* (Fujiwara e Kozai, 1995; Jeong et al., 1995).

Os sistemas convencionais de propagação *in vitro* são baseados em um sistema hererotrófico (George et al., 2008), caracterizado por apresentar baixo conteúdo de oxigênio e dióxido de carbono no interior dos frascos (Meimand et al., 2021), já que o nível de trocas gasosas é baixo, e apresenta também alta umidade relativa e alta concentração de etileno no interior dos recipientes. Tudo isso resulta em redução da atividade fotossintética, do crescimento, bem como de distúrbios anatômicos e fisiológicos nas plantas (Xiao et al., 2011; Nguyen et al., 2020). No nosso estudo, as plantas de *P. aculeata* crescidas sob sistema heterotrófico, assim como, as plantas crescidas sob sistema fotomixotrófico, apresentaram

maior acúmulo de biomassa. No entanto, sob sistema heterotrófico e acréscimo do teor da fonte de carbono, foi observada uma redução drástica na atividade fotossintética dessas plantas. Revelando assim, que em sistema de cultivo heterotrófico, *P. aculeata* apresenta melhor desenvolvimento quando cultivada em meio contendo baixas concentrações de sacarose, e apresenta potencial fotomixotrófico quando cultivada em meio com maior concentração de sacarose.

CONCLUSÃO

Para estabelecer, de forma eficiente, segmentos nodais de *P. aculeata in vitro*, é indicado que seja realizada a desinfestação dos explantes em solução de NaOCl a 2,5%, e inoculação em meio de cultura MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, acrescido de 1 mg L⁻¹ de *meta*-Topolina e contendo 0,2% de PPM. Nosso estudo, também revelou que *P. aculeata* possui potencial heterotrófico e potencial fotomixotrófico, sendo indicado o cultivo *in vitro* dessas plantas em meio de cultura suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose e uso de tampas de polipropileno sem membranas (TTCO₂ de 25 µL L⁻¹ s⁻¹), ou o cultivo em meio de cultura suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e vedação dos frascos com tampas de polipropileno contendo duas membranas, as quais permitem taxa de troca de CO₂ de 25 µL L⁻¹ s⁻¹. Essas condições forneceram melhores respostas morfofisiológicas para plantas de *P. aculeata in vitro*.

Este é o primeiro estudo descrevendo um protocolo de propagação *in vitro* de segmentos nodais de *P. aculeata* provenientes de campo, uma espécie com alto potencial biotecnológico para uso na indústria farmacêutica e alimentícia.

REFERÊNCIAS

- Agostini-Costa TS, Wondraceck DC, Rocha WS, Silva DB** (2012) Carotenoids profile and total polyphenols in fruits of *Pereskia aculeata* Miller. *Rev Bras Frutic* **34**: 234–238.
- Ahmad A, Anis M** (2019) Meta-topolin Improves *In Vitro* Morphogenesis, Rhizogenesis and Biochemical Analysis in *Pterocarpus marsupium* Roxb.: A Potential Drug-Yielding Tree. *J Plant Growth Regul* **38**: 1007–1016.
- Ahmadpoor F, Zare N, Asghari R, Sheikhzadeh P** (2022) Sterilization protocols and the effect of plant growth regulators on callus induction and secondary metabolites production in *in vitro* cultures *Melia azedarach* L. *AMB Express* **12**: 3.
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS** (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* **53**: 1331–1341.
- Aremu AO, Bairu MW, Szűčová L, Doležal K, Finnie JF, Van Staden J** (2012) Assessment of the role of meta-topolins on *in vitro* produced phenolics and acclimatization competence of micropropagated ‘Williams’ banana. *Acta Physiol Plant* **34**: 2265–2273.
- Assis ES, Neto AR, Lima LR, Silva FG, Rosa M, Filho SCV, Leite MS** (2016) *In vitro* culture of *Mouriri elliptica* (Mart.) under conditions that stimulate photoautotrophic behavior. *Aust J Crop Sci* **10**: 229–236.
- Bansal S, Sharma MK, Joshi P, Malhotra EV, Malik SK** (2023) Meta-topolin mediated enhanced *in vitro* propagation and genetic integrity assessment in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). *South African Journal of Botany*, **157**: 27-36.
- Barros TC, Leite VG, Pedersoli GD, Leme FM, Marinho CR, Teixeira SP** (2023) Mucilage cells in the flower of Rosales species: reflections on morphological diversity, classification, and functions. *Protoplasma* **260**: 1135–1147.
- Batista DS, de Castro KM, Ribeiro DM, Caixeta ET, de Oliveira Santos M, Viccini LF, Otoni WC** (2017) Ethylene Responses and ACC oxidase Gene Expression in *Lippia alba* (Verbenaceae) Chemotypes with Varying Ploidy Levels. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **53**: 278–284.
- Beauchamp C, Fridovich I** (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* **44**: 276–287.
- Benmahioul B, Kaïd-Harche M, Daguin F** (2016) *In vitro* regeneration of *Pistacia vera* L. from nodal explants. *J Forest Sci* **62**: 198–203.
- Biswas MK, Dutt M, Roy UK, Islam R, Hossain M** (2009) Development and evaluation of *in vitro* somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits. *Sci Hortic* **122**: 409–416.
- Borges SR, Xavier A, Oliveira LS, Lopes AP, Otoni WC** (2011) Multiplicação *in vitro* de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. *Rev Árvore* **35**: 173–182.

Bose B, Kumaria S, Choudhury H, Tandon P (2016) Assessment of genetic homogeneity and analysis of phytomedicinal potential in micropropagated plants of *Nardostachys jatamansi*, a critically endangered, medicinal plant of alpine Himalayas. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **124**: 331–349.

Bose B, Kumaria S, Choudhury H, Tandon P (2017) Insights into nuclear DNA content, hydrogen peroxide and antioxidative enzyme activities during transverse thin cell layer organogenesis and *ex vitro* acclimatization of *Malaxis wallichii*, a threatened medicinal orchid. *Physiol Mol Biol Plants* **23**: 955–968.

Brizzolari A, Marinello C, Carini M, Santaniello E, Biondi PA (2016) Evaluation of the antioxidant activity and capacity of some natural N6-substituted adenine derivatives (cytokinins) by fluorimetric and spectrophotometric assays. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **1019**: 164–168.

Carlín AP, Tafoya F, Solís AGA, Pérez-Molphe-Balch E (2015) Effects of different culture media and conditions on biomass production of hairy root cultures in six Mexican cactus species. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **51**: 332–339.

Castilho CVV, Leitão SG, Silva VD, Miranda CO, Santos MCS, Bizzo HR, Silva NCB (2019) *In vitro* propagation of a carvacrol-producing type of *Lippia origanoides* Kunth: A promising oregano-like herb. *Ind Crops Prod* **130**: 491–498.

Chance B, Maehly AC (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol* **2**: 764–817.

Compton EM, Koch JM (2001) Influence of plant preservative mixture (PPM)TM on adventitious organogenesis in melon, petunia, and tobacco. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **37**: 259–261.

Correia D, Gonçalves AN, Couto H, Ribeiro MC (1995) Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. *IPEF* **48**: 107–116.

Costa AC, Rosa M, Megguer CA, Silva FG, Pereira FD, Otoni WC (2014) A reliable methodology for assessing the *in vitro* photosynthetic competence of two Brazilian savanna species: *Hyptis marrubioides* and *Hancornia speciosa*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **117**: 443–454.

Cruz CD (2016) Genes Software - extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. *Acta Sci Agron* **38**: 547–552.

Cuba-Díaz M, Rivera-Mora C, Navarrete E, Klagges M (2020) Advances of native and non-native Antarctic species to *in vitro* conservation: improvement of disinfection protocols. *Sci Rep* **10**: 3845.

Del Longo OT, González CA, Pastori GM, Trippi VS (1993) Antioxidant Defences under Hyperoxygenic and Hyperosmotic Conditions in Leaves of Two Lines of Maize with Differential Sensitivity to Drought. *Plant Cell Physiol* **34**: 1023–1028.

Donato VMTS, Olivier S, Harand W, Brito JZ, Andrade AG (2007) Utilização do PPM (Plant Preservative Mixture) para controle da contaminação visando o estabelecimento *in vitro* de explantes de *Eucalyptus citriodora* Hook. *Ornam Hortic* **13**: 710–710.

Driver JA, Kuniyuki AH (1984) *In Vitro* Propagation of Paradox Walnut Rootstock. *HortScience* **19**: 507–509.

Fajinmi OO, Amoo SO, Finnie JF, Van Staden J (2014) Optimization of *in vitro* propagation of *Coleonema album*, a highly utilized medicinal and ornamental plant. *South Afr J Bot* **94**: 9–13.

Fujiwara K, Kozai T (1995) Physical microenvironment and its effects. In J Aitken-Christie, T Kozai, MAL Smith, eds, *Automation and environmental control in plant tissue culture*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 319–369.

Galloway AF, Knox P, Krause K (2020) Sticky mucilages and exudates of plants: putative microenvironmental design elements with biotechnological value. *New Phytol* **225**: 1461–1469.

Gamborg OL, Murashige T, Thorpe TA, Vasil IK (1976) Plant tissue culture media. In *Vitro Cell Dev Biol Plant* **12**: 473–478.

Gandía-Herrero F, Escribano J, García-Carmona F (2012) Purification and Antiradical Properties of the Structural Unit of Betalains. *J Nat Prod* **75**: 1030–1036.

George EF, Hall MA, Klerk G-JD (2008) The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems. In EF George, MA Hall, G-JD Klerk, eds, *Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 115–173.

Hang VTT, Thu HTA, Hoa VD (2016) Developing an efficient regeneration protocol for sweetpotato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam., using nodal explants. *Vietnam J Agric Sci* **14**:1491–1501.

Havir EA, McHale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol* **84**: 450–455.

Ho W-J, Huang Y-K, Huang W-W, Huang Y-C, Chung J-P (2022) Effective *in vitro* culture using dormant bud of nodal sections from a mature *Acacia* tree. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **58**: 437–446.

Iarema L, Cruz ACF, Saldanha CW, Dias LLC, Vieira RF, Oliveira EJ, Otoni WC (2012) Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **110**: 227–238.

Ivanova M, Van Staden J (2008) Effect of ammonium ions and cytokinins on hyperhydricity and multiplication rate of *in vitro* regenerated shoots of *Aloe polyphylla*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **92**: 227–231.

Jeong BR, Fujiwara K, Kozai T (1995) Environmental Control and Photoautotrophic Micropropagation. *Horticultural Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 125–172.

Jo E-A, Tewari RK, Hahn E-J, Paek K-Y (2009) *In vitro* sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **96**: 307–315.

Kar M, Mishra D (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol* **57**: 315–319.

Kaur K, Singh P, Kaur K, Bhandawat A, Nogia P, Pati PK (2021) Development of robust *in vitro* culture protocol for the propagation of genetically and phytochemically stable plants of *Withania somnifera* (L.) Dunal (Ashwagandha). *Ind Crops Prod* **166**: 113428.

Kaur P, Singh K (2015) Influence of Growth regulators on Physiology and Senescence of Cut Stems of Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) Var. Thai Ching Queen **2**: 31-41.

Khan MI, Sri Harsha PSC, Giridhar P, Ravishankar GA (2012) Pigment identification, nutritional composition, bioactivity, and *in vitro* cancer cell cytotoxicity of *Rivina humilis* L. berries, potential source of betalains. *LWT* **47**: 315–323.

Khanam MN, Javed SB, Anis M, Alatar AA (2020) *meta*-Topolin induced *in vitro* regeneration and metabolic profiling in *Allamanda cathartica* L. *Ind Crops Prod* **145**: 111944.

Krishna Vrundha CP, Aswathi NV, Thomas TD (2021) The Role of *Meta*-topolin in Plant Morphogenesis *In Vitro*. In N Ahmad, M Strnad, eds, *Meta-topolin: A Growth Regulator for Plant Biotechnology and Agriculture*. Springer, Singapore, pp 93–118.

Kushnarenko S, Aralbayeva M, Rymkhanova N, Reed BM (2022) Initiation pretreatment with Plant Preservative Mixture™ increases the percentage of aseptic walnut shoots. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **58**: 964–971.

Lage DA (2015) Desenvolvimento de sistemas *in vitro* visando à produção de plantas, culturas celulares e metabólitos com potencial antioxidante e antineoplásico de *Pereskia aculeata* Mill. Tese (Doutorado em Conservação e Utilização da Biodiversidade) – UERJ, Rio de Janeiro.

Lata H, Chandra S, Techen N, Khan IA, ElSohly MA (2016) *In vitro* mass propagation of *Cannabis sativa* L.: A protocol refinement using novel aromatic cytokinin *meta*-topolin and the assessment of eco-physiological, biochemical and genetic fidelity of micropropagated plants. *J Appl Res Med Arom Plants* **3**: 18–26.

Lázaro-Castellanos JO, Mata-Rosas M, González D, Arias S, Reverchon F (2018) *In vitro* propagation of endangered *Mammillaria* genus (Cactaceae) species and genetic stability assessment using SSR markers. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **54**: 518–529.

Leão JRA, Raposo A, Silva ACL, Sampaio PTB (2020) Controle de contaminantes no estabelecimento *in vitro* de *Guadua latifolia*. *Pesq Agropec Trop* **50**: e63541.

Licea-Moreno R, Fira A, Chokov G (2020) Micropropagation of valuable walnut genotypes for timber production: new advances and insights. *Ann Silvicult Res* **44**: 5-13.

Lloyd G, McCown B (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proc Int Plant Prop Soc* **30**: 421–427.

Madzikane-Mlungwana O, Moyo M, Aremu A, Plíhalová L, Doležal K, van Staden J, Finnie J (2017) Differential responses to isoprenoid, N 6-substituted aromatic cytokinins and indole-3-butyric acid in direct plant regeneration of *Eriocephalus africanus*. *Plant Growth Regul* **82**: 103–110.

Martins JPR, Verdoodt V, Pasqual M, De Proft M (2015) Impacts of photoautotrophic and photomixotrophic conditions on *in vitro* propagated *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae). *Plant Cell Tiss Organ Cult* **123**: 121–132.

Meimand MJM, Shamshiri MH, Malekzadeh K, Dehghani MR (2021) How photoautotrophy, photomixotrophy, and ventilation affect the stomata and fluorescence emission of pistachios rootstock? *Open Life Sci* **16**: 1151–1163.

Minocha R, Jain SM (2000) Tissue Culture of Woody Plants and Its Relevance to Molecular Biology. In: *Molecular Biology of Woody Plants*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp 315–339.

Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science* **7**: 405–410.

Moura FB, Vieira MRS, Simões AN, Silva SLF, Medeiros DC, Paes RA, Oliveira AAS, Nascimento AHC, Júnior WSE (2017) Participation of cytokinin on gas exchange and antioxidant enzymes activities. *Ind J Plant Physiol* **22**: 16–29.

Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* **15**: 473–497.

Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **22**: 867–880.

Nepomuceno CF, Rios APS, Queiroz SROD, Pelacani CR, Santana JRF (2009) Respostas morfofisiológicas *in vitro* de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. cebil (Griseb) Altschul. *Rev Árvore* **33**: 481–490.

Nguyen QT, Xiao Y, Kozai T (2020) Chapter 23 - Photoautotrophic micropropagation. In T Kozai, G Niu, M Takagaki, eds, *Plant Factory* (Second Edition). Academic Press, pp 333–346.

Nosaka Y, Nosaka AY (2017) Generation and Detection of Reactive Oxygen Species in Photocatalysis. *Chem Rev* **117**: 11302–11336.

Nowakowska K, Pacholczak A (2020) Comparison of the Effect of *Meta*-Topolin and Benzyladenine during *Daphne mezereum* L. Micropropagation. *Agronomy* **10**: 1994.

Núñez-Ramos JE, Quiala E, Posada L, Mestanza S, Sarmiento L, Daniels D, Arroyo CR, Naranjo B, Vizuite K, Noceda C, Gómez-Kosky R (2021) Morphological and physiological responses of tara (*Caesalpinia spinosa* (Mol.) O. Kuntz) microshoots to ventilation and sucrose treatments. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **57**: 1–14.

O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**: 368–373.

Orlikowska T, Nowak K, Reed B (2017) Bacteria in the plant tissue culture environment. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **128**: 487–508.

Phillips GC, Garda M (2019) Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **55**: 242–257.

Piattelli M, Minale L (1964) Pigments of centrospermae—II.: Distribution of betacyanins. *Phytochemistry* **3**: 547–557.

Pinto NCC, Machado DC, Silva JM, Conegundes JLM, Gualberto ACM, Gameiro J, Moreira Chedier L, Castañon MCMN, Scio E (2015) *Pereskia aculeata* Miller leaves present *in vivo* topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. *J Ethnopharmacol* **173**: 330–337.

Quoirin M, Lepoivre P (1977) Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* sp. *Acta Horti* pp 437–442.

Saeiahagh H, Mousavi M, Wiedow C, Bassett HB, Pathirana R (2019) Effect of cytokinins and sucrose concentration on the efficiency of micropropagation of ‘Zes006’ *Actinidia chinensis* var. *chinensis*, a red-fleshed kiwifruit cultivar. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **138**: 1–10.

Saldanha CW, Otoni CG, Azevedo JLF, Dias LLC, Rêgo MM, Otoni WC (2012) A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **110**: 413–422.

Santos MAC, Rêgo MM, Queiróz MA, Caproni DTR, Dietrich OHS, Santos AF, Rocha DI, Batista DS, Otoni WC (2020) *In vitro* growth performance of *Psidium guajava* and *P. guineense* plantlets as affected by culture medium formulations. *Vegetos* **33**: 435–445.

Sartor CFP, Amaral V, Guimarães HET, Barros KN, Felipe DF, Cortez LER, Veltrini VC (2010) Estudo da Ação Cicatrizante das Folhas de *Pereskia aculeata*. *Saúde Pesq* **3**: 149–154.

Scandalios JG (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* **38**: 995–1014.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**: 671–675.

Ševčíková H, Lhotáková Z, Hamet J, Lipavská H (2019) Mixotrophic *in vitro* cultivations: the way to go astray in plant physiology. *Physiol Plant* **167**: 365–377.

Shahzad A, Sharma S, Parveen S, Saeed T, Shaheen A, Akhtar R, Yadav V, Upadhyay A, Ahmad Z (2017) Historical Perspective and Basic Principles of Plant Tissue Culture. In MZ Abdin, U Kiran, Kamaluddin, A Ali, eds, *Plant Biotechnology: Principles and Applications*. Springer, Singapore, pp 1–36.

Silva S, Sato A, Lage CLS, San Gil RAS, Azevedo DA, Esquibel MA (2005) Essential oil composition of *Melissa officinalis* L. *in vitro* produced under the influence of growth regulators. *J Braz Chem Soc* **16**: 1387–1390.

Silva TD, Chagas K, Batista DS, Felipe SHS, Louback E, Machado LT, Fernandes AM, Buttrós VHT, Koehler AD, Farias LM, Santos AF, Silva PO, Otoni WC (2019) Morphophysiological *in vitro* performance of Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) based on culture medium formulations. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **55**: 454–467.

Smýkalová I, Vrbová M, Cvečková M, Plačková L, Žukauskaitė A, Zatloukal M, Hrdlička J, Plíhalová L, Doležal K, Griga M (2019) The effects of novel synthetic cytokinin derivatives and endogenous cytokinins on the *in vitro* growth responses of hemp (*Cannabis sativa* L.) explants. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **139**: 381–394.

Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy A (2014) *Plant Physiology and Development*. Sinauer.

Thomas P, Agrawal M, Bharathkumar CB (2017) Use of Plant Preservative Mixture™ for establishing *in vitro* cultures from field plants: Experience with papaya reveals several PPM™ tolerant endophytic bacteria. *Plant Cell Rep* **36**: 1717–1730.

Tisarum R, Samphumphung T, Theerawitaya C, Prommee W, Cha-um S (2018) *In vitro* photoautotrophic acclimatization, direct transplantation and ex vitro adaptation of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Cell Tiss Organ Cult* **133**: 215–223.

Torre S (2003) Morphology and anatomy | Leaves. In AV Roberts, ed, *Encyclopedia of Rose Science*. Elsevier, Oxford, pp 497–504.

Vahdati K, Hassankhah A (2013) Developing a photomixotrophic system for micropropagation of persian walnut. VII International Walnut Symposium 1050, pp 181–187.

Werbrouck SPO, Strnad M, Van Onckelen HA, Debergh PC (1996) *Meta*-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture? *Physiol Plant* **98**: 291–297.

Wyler H, Dreiding AS (1957) Kristallisiertes Betanin. Vorläufige Mitteilung. *Helvetica Chimica Acta* **40**: 191–192.

Xiao Y, Niu G, Kozai T (2011) Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **105**: 149–158.

Zhang D, Xu X, Zhang Z, Jiang G, Feng L, Duan X, Jiang Y (2018) 6-Benzylaminopurine improves the quality of harvested litchi fruit. *Postharv Biol Technol* **143**: 137–142.

APÊNDICE

Tabela 1. Composição basal de sais dos meios de cultura usados neste estudo. Os componentes do meio de cultura são apresentados nas concentrações finais. Abreviaturas: QL (Quoirin e Lepoivre, 1977), JADS (Correia et al., 1995), WPM (Lloyd e McCown, 1980), MS (Murashige e Skoog, 1962) e DKW (Driver e Kuniyuki, 1984). Tabela adaptada de Silva et al. (2019)

Componente	Fórmula	QL	JADS	WPM	MS	DKW
Macronutrientes (mM)						
Nitrato de amônio	NH ₄ NO ₃	5,00	4,00	5,00	20,61	17,70
Cloreto de cálcio	CaCl ₂			0,65	2,99	1,00
	CaCl ₂ .2H ₂ O					
Nitrato de cálcio	Ca(NO ₃) ₂	5,08		2,35		8,33
	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O		5,00			
Sulfato de Magnésio	MgSO ₄	1,46		1,50	1,50	3,00
	MgSO ₄ .7H ₂ O		3,00			
Nitrato de potássio	KNO ₃	17,80	8,00		18,79	
Sulfato de potássio	K ₂ SO ₄			5,68		8,95
Fosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	1,98	3,00	1,25	1,25	1,95
Micronutrientes (μM)						
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	100,25	50,13	100,27	100,27	77,63
Cloreto de cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,11	1,00		0,11	
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,10	5,00	1,00	0,10	1,00
Sulfato de manganês	MnSO ₄ .H ₂ O	4,50		131,94	100,00	198,20
	MnSO ₄ .4H ₂ O		75,76			
Sulfato de níquel	NiSO ₄ .6H ₂ O					0,02
Iodeto de potássio	KI	0,50			5,00	
Molibdato de sódio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1,00	0,62	1,03	1,03	1,61
Nitrato de zinco	Zn(NO ₃) ₂ .6H ₂ O					57,14
Sulfato de zinco	ZnSO ₄ .7H ₂ O	30,00	15,00	29,91	29,91	
Sódio EDTA	Na ₂ EDTA		200,00	110,27		134,22
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	100,20			100,00	
Sulfato de ferro	FeSO ₄ .7H ₂ O	100,00	200,00	100,00	100,00	121,57

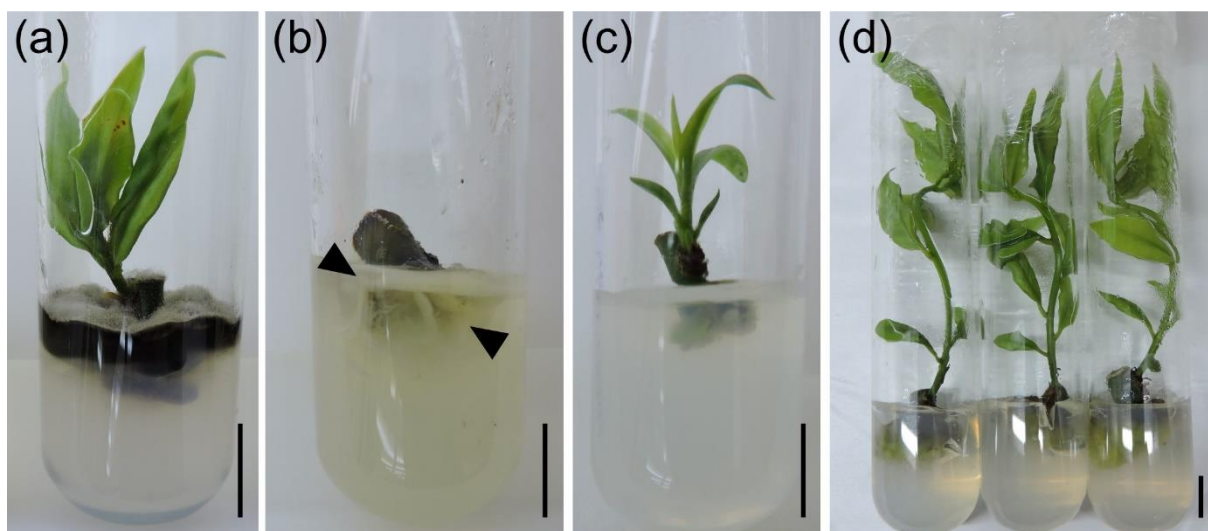


Figura 1. Explantes de *P. aculeata* estabelecidos *in vitro* após tratamento com diferentes protocolos de desinfestação. A - Contaminação fúngica visível no explante e no meio de cultura após 4 semanas de cultivo; B - Contaminação bacteriana visível durante a segunda semana de cultura; C - Desenvolvimento de explante axênico após 2 semanas de cultura; D - Plantas livres de contaminações após 4 semanas de cultura. Barras = 1 cm.

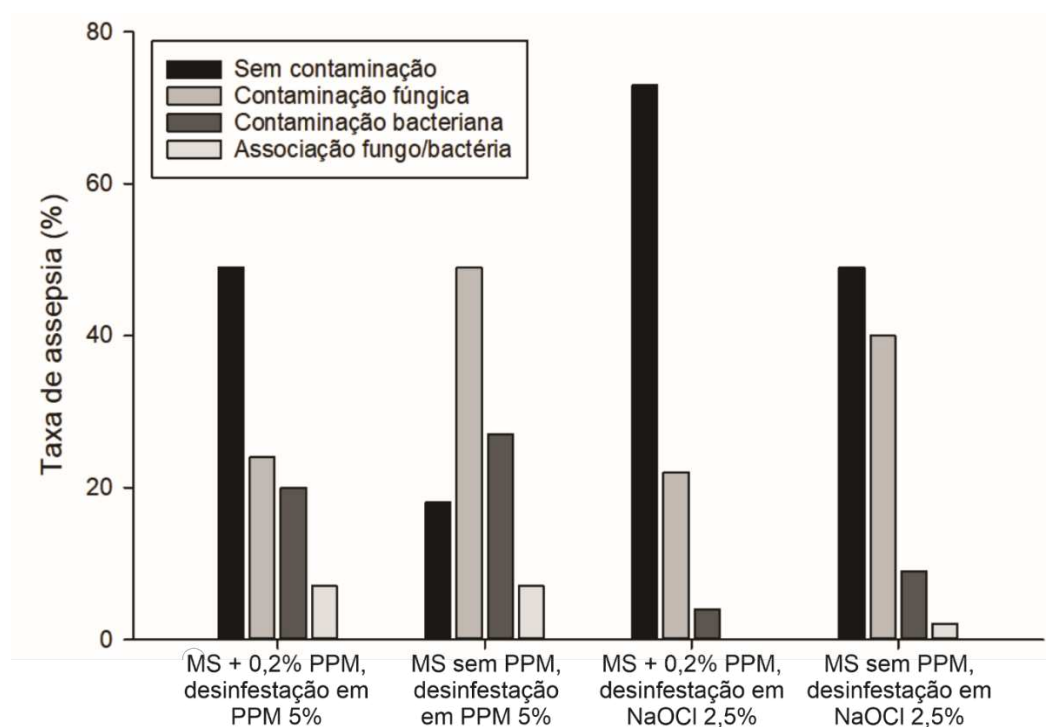


Figura 2. Taxa de contaminação de plantas de *Pereskia aculeata* submetidas a diferentes agentes desinfestantes químicos: Meio MS com 0,2% de PPM, desinfestação de explantes em solução de PPM a 5%; Meio MS sem PPM, desinfestação de explantes em solução de PPM a 5%; Meio MS com 0,2% de PPM, desinfestação de explantes em solução de NaOCl a 2,5%; Meio MS sem PPM, desinfestação de explantes em solução de NaOCl a 2,5%, após 30 dias de cultivo *in vitro*.

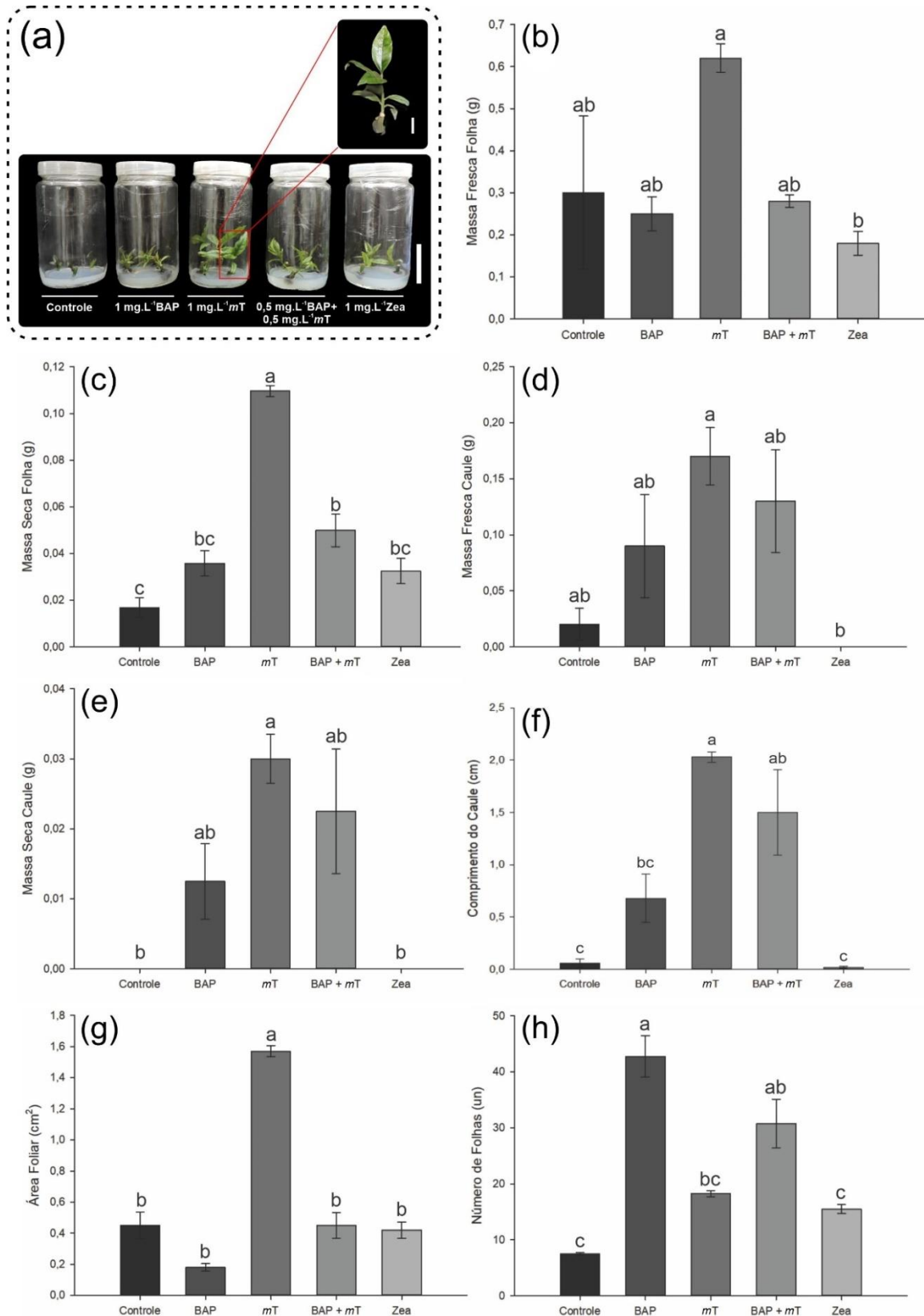


Figura 3. Variáveis de crescimento em *Pereskia aculeata* após 40 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes citocininas: Controle, 6-benzilaminopurina (BAP), *meta*-Topolina (*mT*), combinação de BAP e *mT*, e Zeatina (Zea). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Figura A: Barra menor = 1 cm; Barra maior = 5 cm.

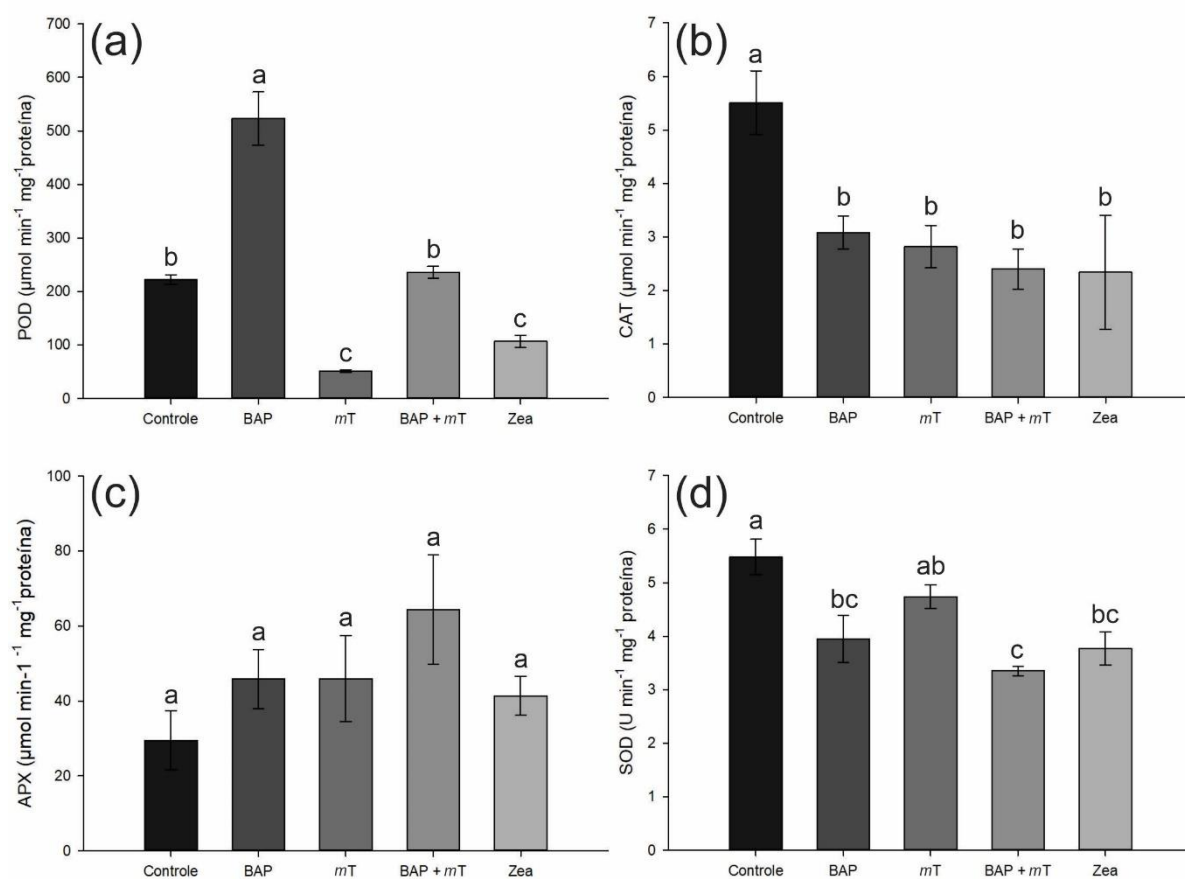


Figura 4. Atividade das enzimas antioxidantes (peroxidase oxidoredutase - POD, catalase - CAT, peroxidase do ascorbato - APX e superóxido dismutase - SOD) em plantas de *Pereskia aculeata* após 40 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes citocininas: Controle, 6-benzilaminopurina (BAP), *meta*-Topolina (*mT*), combinação de BAP e *mT*, e Zeatina (Zea). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

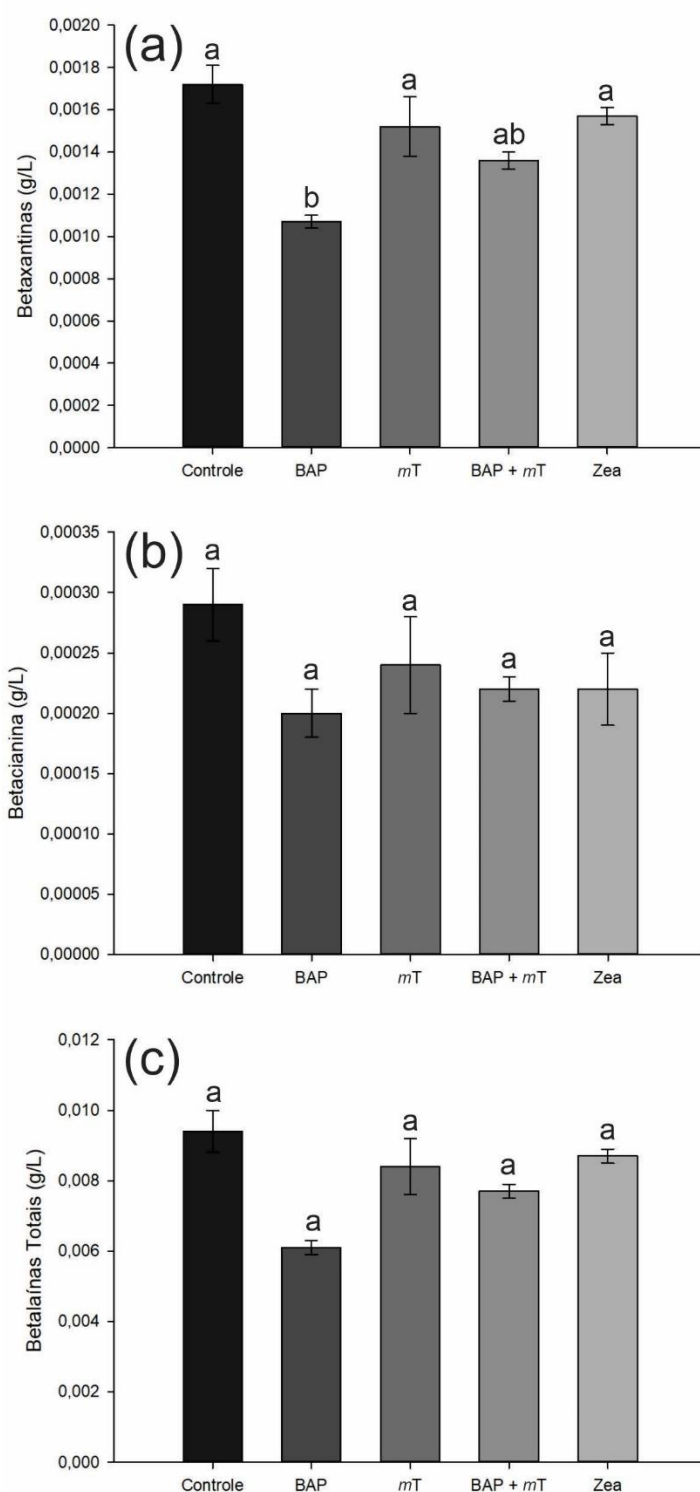


Figura 5. Concentração de betalaínas em plantas de *Pereskia aculeata* após 40 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes citocininas: Controle, 6-benzilaminopurina (BAP), *meta*-Topolina (*mT*) combinação de BAP e *mT*, e Zeatina (Zea). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

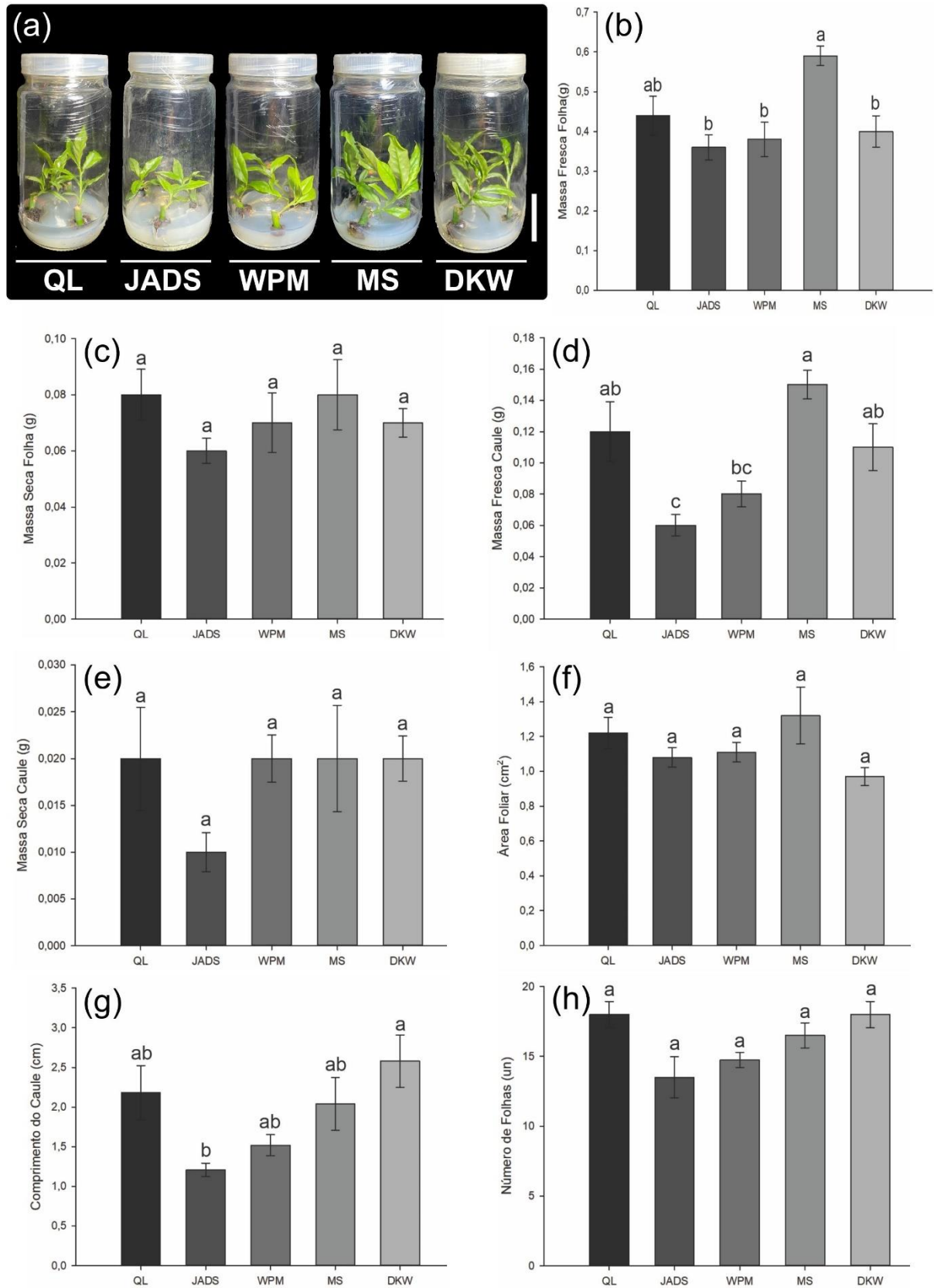


Figura 6. Variáveis de crescimento em *Pereskia aculeata* após 40 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes meios de cultura: QL (Quoirin e Lepoivre, 1977), JADS (Correia et al., 1995), WPM (Lloyd e McCown, 1980, 1981), MS (Murashige e Skoog, 1962) e DKW (Driver e Kuniyuki, 1984). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Figura A: Barra = 5 cm.

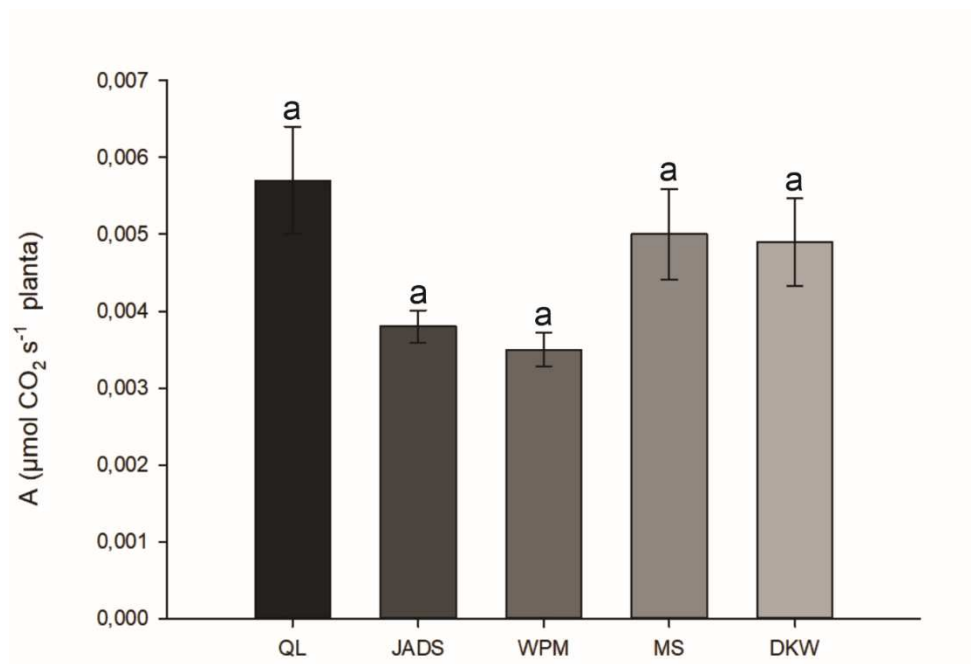


Figura 7. Taxa fotossintética de *Pereskia aculeata* após 40 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes meios de cultura: QL (Quoirin e Lepoivre, 1977), JADS (Correia et al., 1995), WPM (Lloyd e McCown, 1980, 1981), MS (Murashige e Skoog, 1962) e DKW (Driver e Kuniyuki, 1984). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

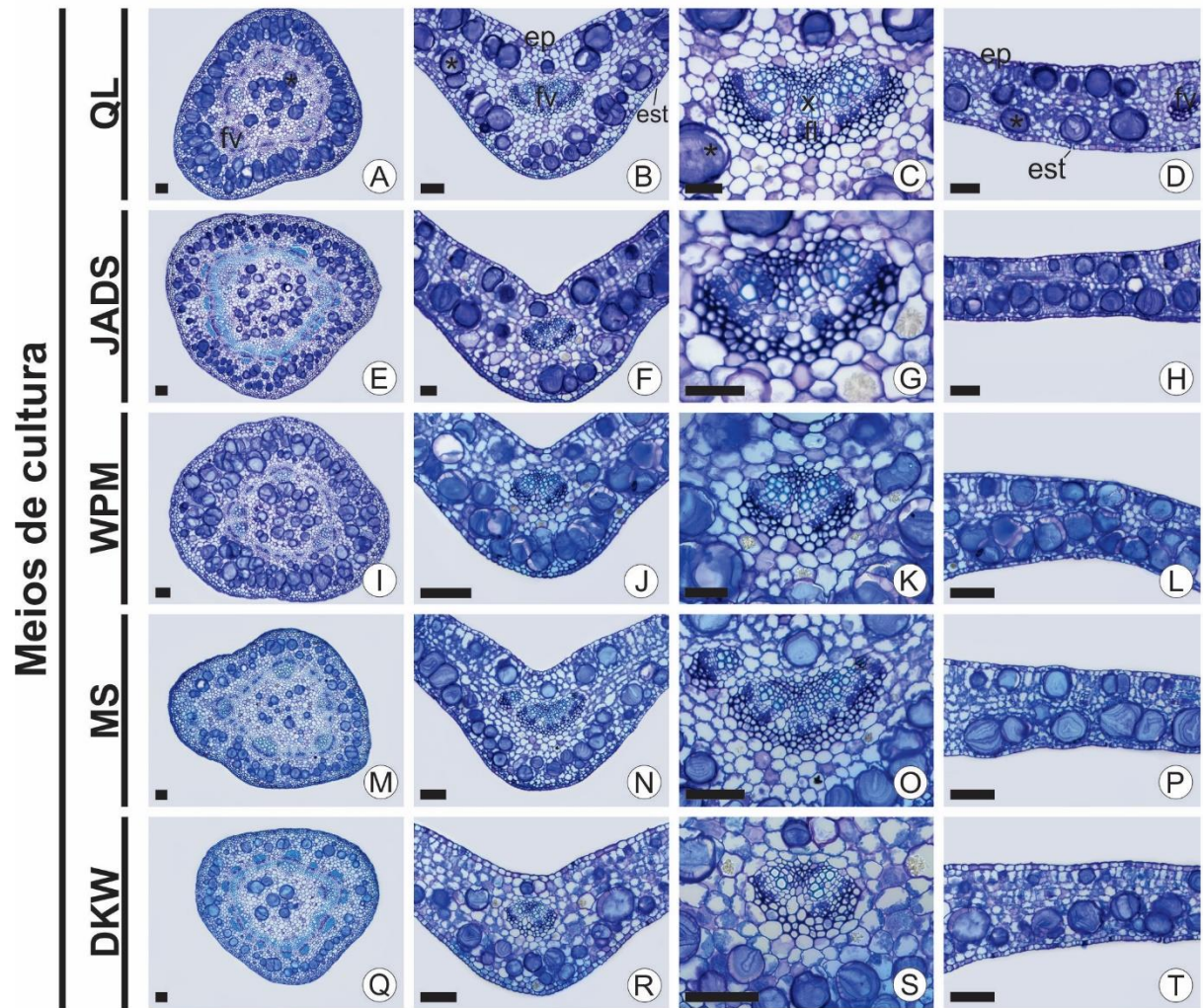


Figura 8. Seções transversais da porção mediana de folha e do caule de plantas de *Pereskia aculeata* após 40 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes meios de cultura (QL, JADS, WPM, MS e DKW). Seções do caule (A, E, I, M, Q), detalhes do feixe vascular principal da porção mediana da folha (B, F, J, N, R), do feixe vascular principal da folha (C, G, K, O, S) e da lâmina foliar (D, H, L, P, T). Abreviações: Asteriscos pretos (*) – Células mucilaginosas; Ep – Epiderme; Est – Estômato; Fl – Floema; FV – Feixe Vascular; X - Xilema. Barras = 100 μm .

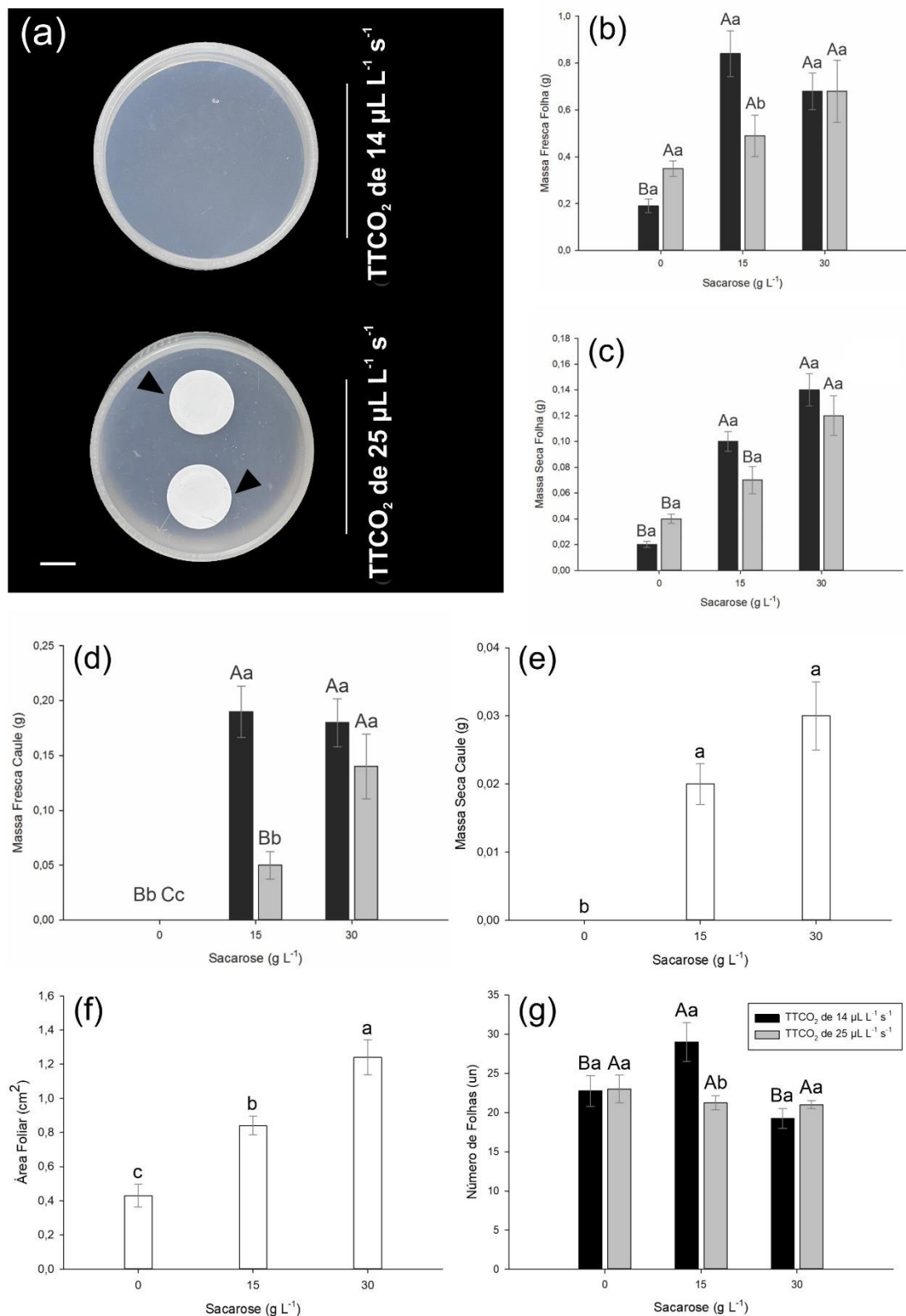


Figura 9. Variáveis de crescimento em *Pereskia aculeata* após 40 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L⁻¹) e níveis de taxa de troca de CO₂ (TTCO₂ de 14 μL L⁻¹ s⁻¹ e TTCO₂ de 25 μL L⁻¹ s⁻¹). Letras maiúsculas comparam médias de diferentes concentrações de sacarose e letras minúsculas comparam médias de diferentes níveis de trocas gasosas (membranas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Figura A: Barra = 1 cm.

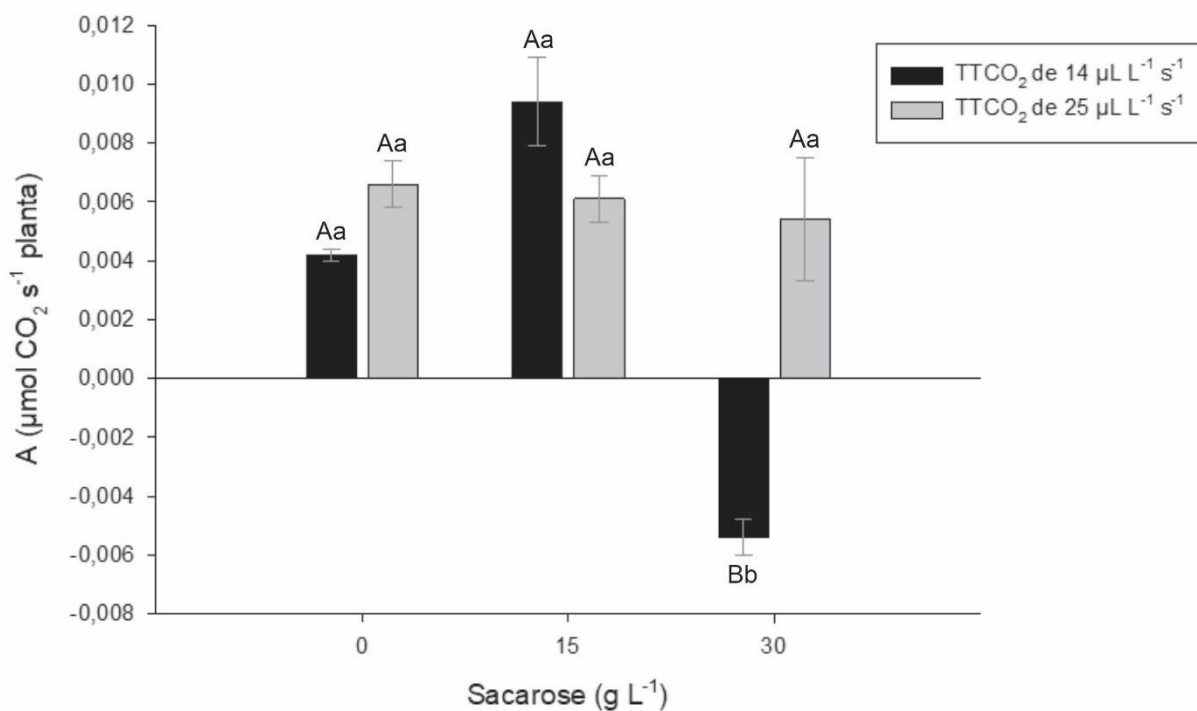


Figura 10. Taxa fotossintética de *Pereskia aculeata* após 40 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L⁻¹) e níveis de taxa de troca de CO₂ (TTCO₂ de 14 μL L⁻¹ s⁻¹ e TTCO₂ de 25 μL L⁻¹ s⁻¹). Letras maiúsculas comparam médias de diferentes concentrações de sacarose e letras minúsculas comparam médias de diferentes níveis de trocas gasosas (membranas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo de Tukey, a 5% de probabilidade.

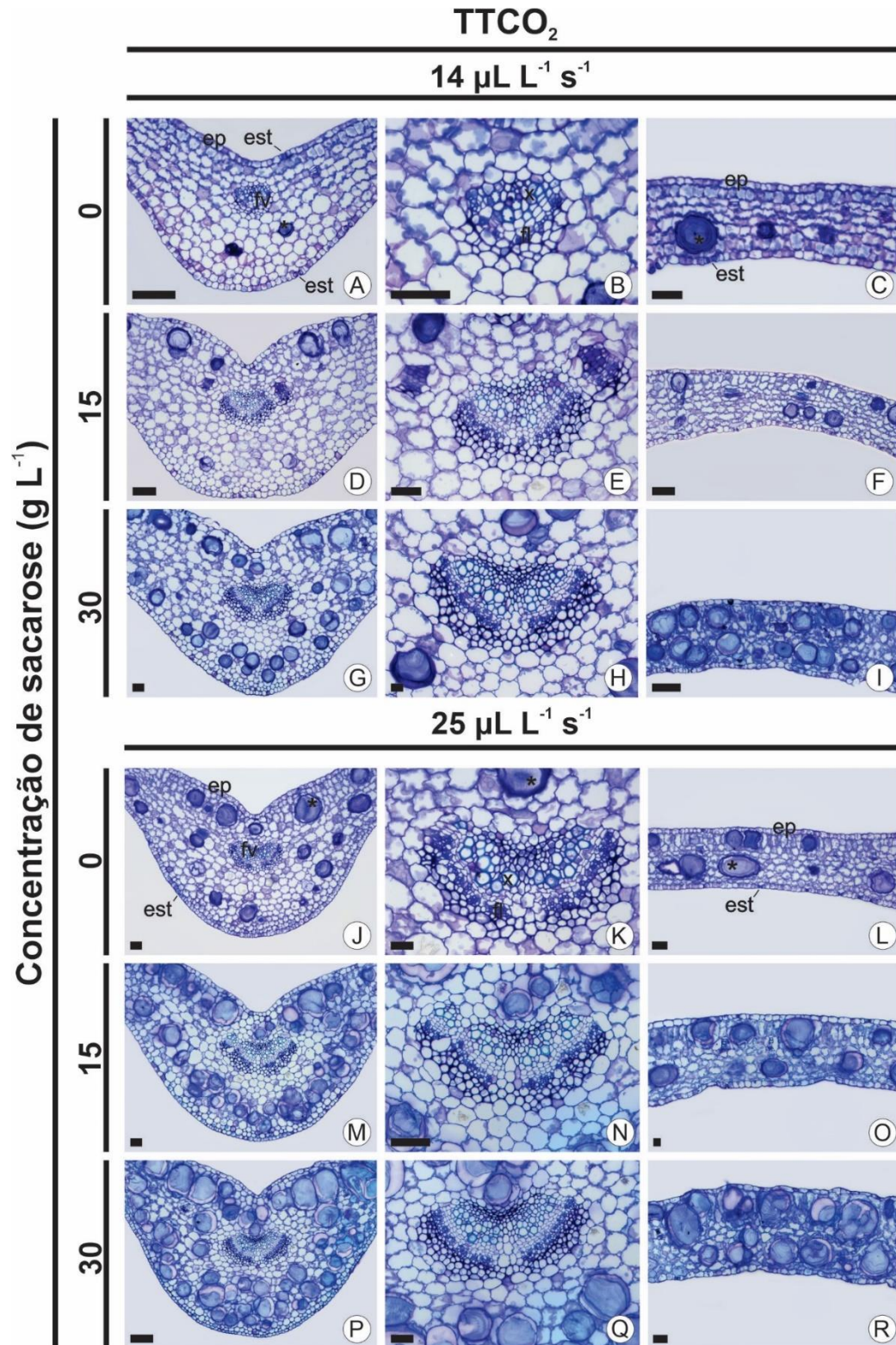


Figura 11. Seções transversais da porção mediana de folha de plantas de *Pereskia aculeata* após 40 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes concentrações de sacarose (0, 15 e 30 g L⁻¹) e níveis de taxa de troca de CO₂ (TTCO₂ de 14 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$ e TTCO₂ de 25 $\mu\text{L L}^{-1} \text{s}^{-1}$). Detalhes do feixe vascular principal da porção mediana da folha (A, D, G, J, M, P), do feixe vascular principal da folha (B, E, H, K, N, Q) e da lâmina foliar (C, F, I, L, O, R). Abreviações: Asteriscos pretos (*) – Células mucilaginosas; Ep – Epiderme; Est – Estômato; Fl – Floema; FV – Feixe Vascular. Barras = Barras = 50 μm .

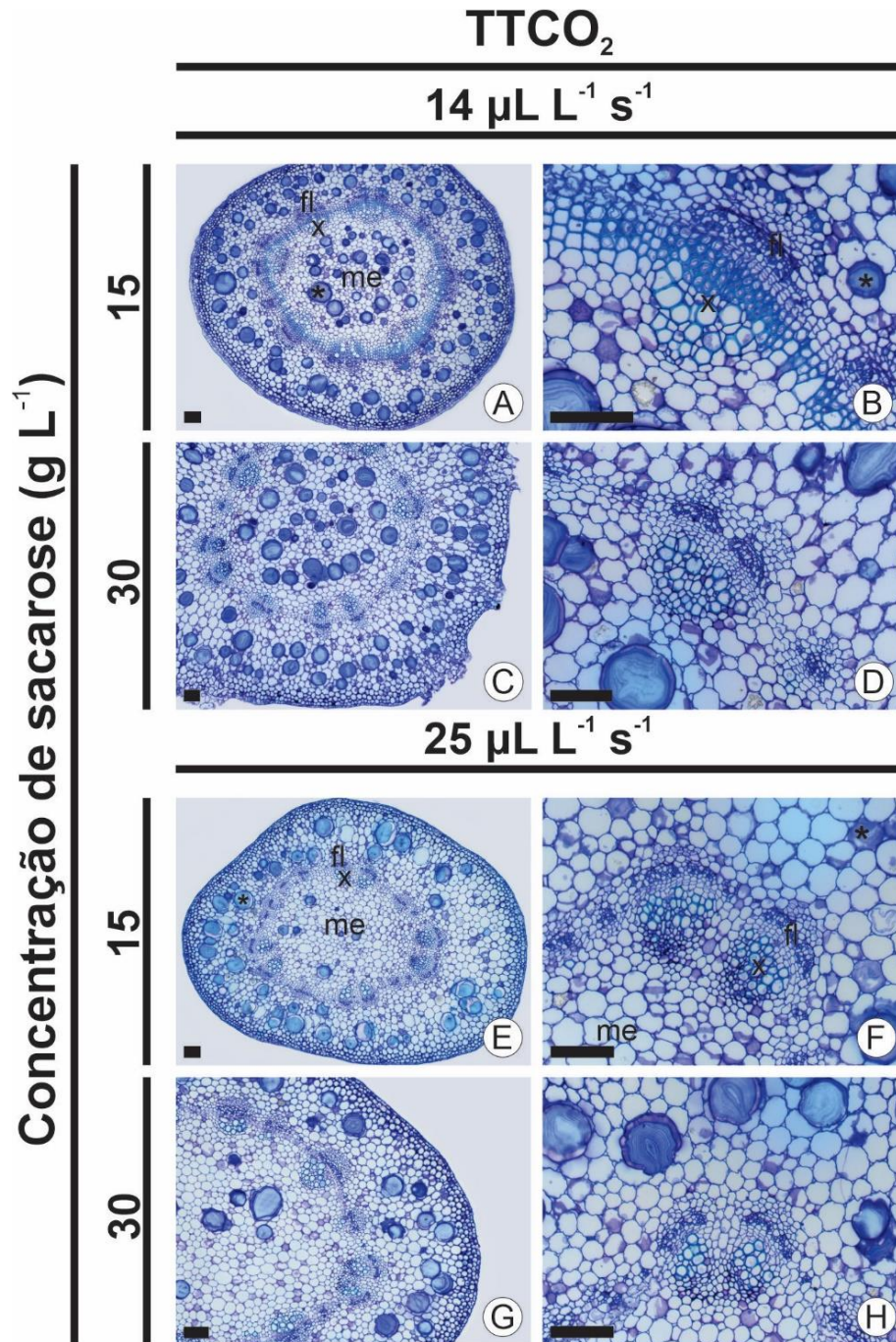


Figura 12. Seções transversais de caules de *Pereskia aculeata* após 40 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes concentrações de sacarose (15 e 30 g L⁻¹) e níveis de taxa de troca de CO₂ (TTCO₂ de 14 μL L⁻¹ s⁻¹ e TTCO₂ de 25 μL L⁻¹ s⁻¹). Seções do caule (A, C, E, G) e detalhes do feixe vascular do caule (B, D, F, H). Abreviações: Asteriscos pretos (*) – Células mucilaginosas; Ep – Epiderme; Est – Estômato; Fl – Floema; Me – Mesofilo; X - Xilema. Barras = 100 μm.

CAPÍTULO II

Influência da qualidade da luz na morfofisiologia e na produção de betalaínas de *Pereskia aculeata* Mill. cultivada *in vitro*

RESUMO

Pereskia aculeata Mill. apresenta diferentes metabólitos secundários com alto potencial farmacológico. Na natureza, a produção de metabólitos secundários é limitada devido a inconstância do ambiente, assim, o cultivo *in vitro* surge como uma alternativa viável, permitindo produção rápida e controlada de metabólitos secundários. No cultivo *in vitro*, o acúmulo de compostos bioativos pode ser afetado por diversos fatores, ambientais ou do meio, sendo a manipulação das condições de luz um dos métodos mais simples para incrementar a produção desses compostos de interesse. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da qualidade de luz no desenvolvimento, morfofisiologia e no metabolismo secundário de *P. aculeata*, cultivada *in vitro*. Para isso, segmentos nodais foram inoculados em meio de cultura constituído por sais e vitaminas MS, contendo 1 mg L⁻¹ de *meta*-Topolina. Após 30 dias, as plantas foram transferidas para meio semelhante, porém sem adição do regulador de crescimento. Todas as culturas foram mantidas a 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h e irradiância de 150 µmol m⁻² s⁻¹, fornecidas por lâmpadas diodo emissor de luz (LED) com os seguintes espectros: Branco (B); Vermelho/Azul (V/A); Branco/Azul Alto (B/AA); Vermelho/Branco/Azul Médio (V/B/AM); Vermelho/Branco/Vermelho Distante/Azul Médio (V/B/VD/AM). A qualidade da luz não influenciou na biomassa ou na atividade fotossintética de plantas de *P. aculeata* cultivadas *in vitro* sob diferentes espectros de luz. No entanto, a combinação dos espectros de luz V/B/AM promoveu um maior acúmulo de betacianina. Também foram observadas alterações na anatomia de folhas sob diferentes qualidades de luz. Sob luz Branca, as plantas de *P. aculeata* apresentaram folhas com menor espessura e feixes vasculares menos desenvolvidos. Assim, para o aumento do conteúdo de betalaínas em plantas *in vitro* de *P. aculeata*, faz-se necessário o uso de lâmpadas LED que apresentem a combinação dos espectros de luz V/B/AM.

Palavras-chave: Ora-pro-nóbis; LEDs; Espectros luminosos; Propagação *in vitro*.

ABSTRACT

Pereskia aculeata Mill. has different secondary metabolites with high pharmacological potential. In nature, the production of secondary metabolites is limited due to the inconstancy of the environment, so *in vitro* cultivation has emerged as a viable alternative, allowing for the rapid and controlled production of secondary metabolites. *In vitro* cultivation, the accumulation of bioactive compounds can be affected by various environmental factors, and manipulating light conditions is one of the simplest methods for increasing the production of these compounds of interest. This study aimed to evaluate the effect of light quality on the development, morphophysiology, and secondary metabolism of *P. aculeata* grown *in vitro*. To do this, nodal segments were inoculated into a culture medium consisting of MS salts and vitamins, containing 1 mg L⁻¹ of *meta*-Topolin. After 30 days, the plants were transferred to a similar medium without adding the growth regulator. All the cultures were maintained at 25 ± 2 °C, a 16-h photoperiod and an irradiance of 150 μmol m⁻² s⁻¹, provided by light-emitting diode (LED) lamps with the following spectra: White (W); Red/Blue (R/B); White/High Blue (W/HB); Red/White/Medium Blue (R/W/MB); Red/White/Distant Red/Medium Blue (R/W/DR/MB). The quality of the light did not influence the biomass or photosynthetic activity of *P. aculeata* plants grown *in vitro* under different light spectra. However, the combination of light spectra R/W/MB promoted a greater betacyanin accumulation. Changes in leaf anatomy were also observed under different light qualities. Under White light, the *P. aculeata* plants showed leaves with less thickness and less developed vascular bundles. Therefore, to increase the betalain content in *P. aculeata* plants *in vitro*, it is necessary to use LED lamps with a combination of V/B/AM light spectra.

Keywords: ‘Ora-pro-nóbis’; LEDs; Light spectra; *In vitro* propagation.

INTRODUÇÃO

A luz é um dos principais fatores que afeta o crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo fonte de energia para reações fotoquímicas da fotossíntese. Nas plantas, mudanças na qualidade, intensidade e duração da luz podem ser percebidas (Li et al., 2021). As respostas às flutuações de luz pelas plantas ocorrem principalmente por meio da percepção, captura e transdução da luz por diferentes fotorreceptores (Zhao et al., 2020). Os fitocromos são responsáveis pela absorção da luz no comprimento de onda vermelho (600–700 nm) e vermelho distante (700–750 nm), enquanto as fototropinas e os criptocromos são responsáveis pela absorção da luz nas regiões que compreendem os espectros de luz UV-A e azul (320–500 nm) (Chen et al., 2004; Banerjee e Batschauer, 2005; Chen e Chory, 2011; Galvão e Fankhauser, 2015).

Dentro da região do espectro de luz visível, a luz azul e vermelha são as que mais influenciam no desenvolvimento e crescimento das plantas (Chen et al., 2017). Diversos trabalhos já foram realizados a fim investigar a influência desses espectros de luz no crescimento de plantas, seja de forma isolada ou em combinação. Saleem et al. (2019), observaram maior ganho em biomassa e aumento no comprimento de plantas de *Corchorus capsularis* desenvolvidas sob os espectros de luz vermelho, quando comparado ao controle (luz branca). Em plantas de *Hyptis marruboides* cultivadas *in vitro*, a luz vermelha induziu o crescimento da planta, o aumento do número de folhas e peso seco (Pedroso et al., 2017).

Silva et al. (2020), trabalhando com diferentes combinações da luz vermelha (V) e azul (A), relataram que a proporção 1V:1A, além de aumentar o acúmulo de biomassa, incrementou o tamanho dos feixes vasculares e de elementos de vasos de *Pfaffia glomerata*, enquanto a proporção 1V:3A foi responsável pelas maiores taxas fotossintéticas. Em *Lycoris longituba*, o maior crescimento, acúmulo de biomassa e maior síntese de pigmentos fotossintéticos foi encontrado em plantas cultivadas sob luz vermelha e azul (1:2) (Li et al., 2021). As respostas fisiológicas nas plantas podem ser específicas e dependentes do comprimento de onda que são expostas, com isso, é necessário realizar estudos para entender como a qualidade de luz afeta o desenvolvimento de cada espécie, bem como sua influência sobre a biossíntese de metabólitos secundários farmacologicamente ativos.

Pereskia aculeata Mill., conhecida popularmente como ora-pro-nóbis ou lobrobó, é uma espécie nativa da América do Sul, e no Brasil sua distribuição ocorre entre os estados da Bahia e do Rio Grande do Sul. É utilizada na medicina tradicional para tratar queimaduras e inflamações, pois apresenta alto potencial antioxidante e atividade analgésica (Ferreira et al.,

2013; Pinto et al., 2015). Devido seu alto teor nutritivo e alto teor de proteínas, é utilizada na alimentação humana, sendo caracterizada como uma PANC (planta alimentícia não convencional) (Lorenzi e Kinupp, 2014), e seu consumo é relatado principalmente no estado de Minas Gerais. Além disso, *P. aculeata* apresenta diferentes compostos bioativos como carotenoides, compostos fenólicos, sesquiterpenos e betalaínas, metabólitos estes de interesse pela indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética (Agostini-Costa et al., 2012; Souza et al., 2016).

Na natureza, a produção de metabólitos secundários pelas plantas é limitada devido fatores regionais e ambientais, limitando assim, a produção comercial desses compostos (Yue et al., 2016). O cultivo *in vitro*, além de permitir rápido crescimento de plantas e maior acúmulo de biomassa, tem sido alternativa eficiente para a produção rápida e controlada de metabólitos secundários (Cui et al., 2010; Chen et al., 2020; Cavallaro et al., 2022). A biossíntese de metabólitos secundários de plantas cultivadas *in vitro* pode ser incrementada pela manipulação de fatores como comprimento de onda e a intensidade da luz, fotoperíodo, temperatura ou a composição do meio de cultura, sendo a manipulação das condições de luz um dos métodos mais simples para aumentar a produção de compostos bioativos importantes (Kubica et al., 2020), estando diretamente associada à expressão gênica de diversas vias metabólicas (Li et al., 2017).

No cultivo *in vitro*, a qualidade da luz pode ser alterada utilizando diferentes tipos de lâmpadas e diferentes espectros luminosos. Em relação às lâmpadas convencionais, nos últimos anos os diodos emissores de luz (LEDs) vêm ganhando destaque, pois apresentam vantagens como baixo custo de energia, alta eficiência energética, durabilidade, tamanho pequeno, baixa emissão de calor e especialmente a capacidade de controlar a composição espectral (Long et al., 2018; Longcore et al., 2018; Monostori et al., 2018; Shukla et al., 2017). A utilização de comprimentos de onda específicos, permitem uma melhor biossíntese de compostos alvo (Tarakanov et al., 2022). Com isso, o objetivo desse trabalho é avaliar o efeito das diferentes qualidades de luz no desenvolvimento, morfofisiologia e no metabolismo secundário de *P. aculeata* cultivada *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e desinfestação

Estacas herbáceas de planta matriz de *P. aculeata*, mantida sob condições de campo no campus da Universidade Federal de Viçosa (20°45'26.5"S 42°52'11.6"W), foram utilizadas como fonte de material propagativo *in vitro*. Os trabalhos foram executados em concordância com o Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), sob cadastro número A2F2BB8.

Para o estabelecimento *in vitro* o tamanho das estacas foi reduzido (~ 10 cm) e suas folhas foram cortadas à metade, com o auxílio de tesoura de poda. Em seguida, os propágulos foram imersos em água contendo detergente doméstico (Químio Indústria e Comércio LTDA., Muriaé, MG, Brasil) a 10% (v/v) e, posteriormente, enxaguadas em água corrente.

A desinfestação dos explantes ocorreu sob condições de fluxo laminar, consistindo da imersão em álcool 70% por 2 min, seguido por imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial – NaOCl (2,0 a 2,5% de cloro ativo; (Super Globo Química, Contagem, MG, Brasil) com 2 gotas de “Tween 20” por 20 min. Posteriormente, as estacas foram enxaguadas 4 vezes com água purificada (Elix® 70 Water Purification System, Merck Millipore, Alemanha) e autoclavada (Autoclave Vertical, PHOENIX, Araraquara, SP, Brasil).

Iniciação da cultura *in vitro*

Os segmentos nodais (~1,5 cm) foram inoculados em meio semissólido, contendo sais e vitaminas MS (Murashige e Skoog, 1962) PhytoTechnology Laboratories®, Kansas, EUA), 30 g L⁻¹ de sacarose (Phytotechnology Lab®), 100 mg L⁻¹ mio-inositol (Sigma Chem. Co. St Louis, EUA), 1 mg L⁻¹ de Meta-Topolina (Phytotechnology Lab®), e solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar (Plant TC Micropropagation Grade, Phytotechnology Lab®). O pH do meio foi ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da inclusão do ágar. O meio de cultura foi autoclavado a 121 °C e 108 kPa por 20 min em frascos de vidro (250 mL de capacidade), contendo 50 mL de meio. Os frascos foram vedados com tampas rígidas de polipropileno com duas membranas fluoroporo hidrofóbica (PTFE) com poros de 0,45 µm (MilliSeal® AVS-045, Air Vent, Tóquio, Japão) para trocas gasosas.

As culturas foram mantidas por 30 dias em sala de crescimento sob irradiância de 50 µmol m⁻² s⁻¹, temperatura de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 16 h. Após esse período, foram

realizados subcultivos. O preparo dos meios foi realizado conforme descrito anteriormente, porém sem a adição de regulador de crescimento, e as culturas foram mantidas sob as mesmas condições de ambiente anteriormente descritas.

Qualidade da luz

Plantas com 5 meses de idade desenvolvidas conforme citado anteriormente foram utilizadas como explante. Segmentos nodais medindo 1,5 cm de comprimento foram inoculados em meio consistindo de sais e vitaminas MS (PhytoTechnology Lab[®]), 30 g L⁻¹ de sacarose (Phytotechnology Lab[®]), 100 mg L⁻¹ *mio*-inositol (Sigma Chem. Co.), 1 mg L⁻¹ de *mT* (Phytotechnology Lab[®]) e solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar (Plant TC Micropropagation Grade, Phytotechnology Lab[®]). O pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$ antes da inclusão do ágar. O meio de cultura foi autoclavado a 121 °C e 108 kPa por 20 min em frascos de vidro (250 mL de capacidade), contendo 50 mL de meio. Os frascos foram vedados com tampas rígidas de polipropileno com duas membranas PTFE de 0,45 µm de poros, para trocas gasosas. Após 30 dias de cultivo, as plantas foram transferidas para meio semelhante como descrito acima, no entanto, sem a adição de reguladores de crescimento.

Como fontes de luz, foram utilizadas lâmpadas diodo emissor de luz (LED) com os seguintes espectros: Branco (SMD 100, 18 W, Vilux[®], Vitória, ES, Brazil); Vermelho/Azul (V/A; LabPAR LL-HR/DB-480, 11.6 W, LabLumens[®], Carapicuíba, SP, Brasil); Branco/Azul alto (B/AA; GreenPower TLED W 20W HB, Philips[®], China); Vermelho/Branco/Azul médio (V/B/AM; GreenPower TLED DR/W 18W MB, Philips[®]) e Vermelho/Branco/Vermelho distante/Azul médio (V/B/VD/AM; GreenPower TLED DR/W/FR 17W MB, Philips[®]) (Figura 1). A irradiância foi padronizada em 150 µmol m⁻² s⁻¹ através de um irradiômetro (LI-250A, LI-COR[®] Inc., Lincoln, NE). Os espectros de absorção foram registrados em uma faixa de comprimento de onda de 200 a 800 nm com um espectrorradiômetro e o software de sistema de aquisição de dados Ocean Optics Spectra-Suite (OceanOptics[®], Dunedin, FL) (Figura 1).

As culturas foram mantidas por 60 dias em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 h, após esse período foram coletadas e analisadas quanto às variáveis de crescimento, morfoanatômicas e fisiológicas.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, totalizando cinco tratamentos (B; V/A; B/AA; V/B/AM; V/B/VD/AM) com 10 repetições cada. Cada repetição consistiu por um frasco contendo três explantes.

Análises

Variáveis de crescimento

Após 60 dias de cultivo *in vitro*, as plantas foram avaliadas quanto a massa fresca (mg), massa seca (mg), número de folhas e área foliar (cm²). Para a determinação da área foliar, as folhas foram destacadas, fixadas em papel branco plastificado, fotografadas com câmera digital, e as imagens processadas no programa ImageJ (Schneider et al., 2012). Para obtenção da massa seca (g), o material vegetal foi seco em estufa a 50 °C por 72 h.

Quantificação de betalaínas

Para obtenção do extrato concentrado de betalaínas utilizou-se o protocolo descrito por Lage (2015). A extração foi realizada em metanol a 80 % durante 30 min, sob agitação constante, em seguida, o material foi centrifugado a 4.000 g por 10 min.

O conteúdo de betacianina e betaxantina foi avaliado em um leitor de microplacas (Leitor de ELISA e Fotômetro de Microplacas Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific Inc.). A absorção de luz a 538 nm foi utilizada para calcular a concentração de betanina (principal betacianina), enquanto a absorção a 476 nm para o conteúdo de vulgaxantina-I (principal betaxantina).

O cálculo da absorção de luz pela betanina e vulgaxantina-I foi realizado de acordo com as seguintes equações:

$$x = 1,095 \cdot (a - c)$$

$$z = a - x$$

$$y = b - z - (x / 3,1)$$

Onde:

a = absorção de luz da amostra a 538 nm

b = absorção de luz da amostra a 476 nm

c = absorção de luz da amostra a 600 nm

x = absorção de luz de betanina sem as impurezas

y = absorção de luz da vulgaxantina-I corrigido pela contribuição da betanina e das impurezas

z = absorção de luz das impurezas

Para a determinação das concentrações de betanina e vulgaxantina-I aplicou-se o valor de absorvância ($A^{1\%}$) de cada pigmento, que representa o coeficiente de extinção em 1% de solução. Segundo Wyler e Dreiding (1957) e Piattelli e Minale (1964), a absorvância da betanina corresponde a 1120 e da vulgaxantina-I a 750.

A concentração de betalainas totais a partir da quantificação de betanina e vulgaxantina-I foi estabelecida a partir da Lei de Beer-Bourguer-Lambert, a qual relaciona a absorvância (A) com a concentração (c) da substância absorvente, de acordo com $A = a \cdot b \cdot c$.

Onde:

a = absorvidade

b = comprimento do percurso óptico (0,5 cm)

c = concentração da substância absorvente (g/L)

Determinação da atividade fotossintética

Para determinação da atividade fotossintética *in vitro*, utilizou-se um sistema de analisador de gás infravermelho (IRGA, model S151; Qubit Systems, ON, Canadá) adaptado, proposto por Costa et al. (2014). Nesse sistema, a fonte de energia luminosa é fornecida por uma combinação de lâmpadas LEDs no espectro vermelho e azul dispostas no interior das laterais de um recipiente de poliestireno expandido. Antes da análise, as plantas foram mantidas na ausência de luz por um período de 8 horas.

A taxa fotossintética *in vitro* (A) foi dada pela seguinte fórmula:

$$A (\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}) = \frac{\Delta\text{CO}_2}{\text{Mol. Flow}}$$

Onde,

$$\Delta\text{CO}_2(\text{ppm}) = \text{CO}_2 \text{ de referência} - \text{CO}_2 \text{ de análise}$$

$$\text{Mol. Flow} = \frac{\text{Taxa de fluxo de ar (L min}^{-1}\text{)}}{\left(\frac{\text{Constante dos gases perfeitos (22,4) X Temperatura (K)}}{\left(\frac{600000}{\text{Área foliar (cm}^2\text{)}} \right)} \right)}$$

Caracterização morfoanatômica

Para avaliação anatômica, secções transversais da região mediana da maior folha foram coletadas e fixadas em solução de glutaraldeído (4%). Em seguida, as amostras foram

desidratadas em série etílica de concentração crescente e incluídas em historesina acrílica (Historesin, Leica Instruments, Alemanha). Secções transversais de 5 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., USA). As secções obtidas foram coradas com azul de toluidina (pH 4,7) por 3 min (O'Brien et al., 1964). Posteriormente, as lâminas foram montadas em Permount® SP15-500 (Fisher Scientific) e observadas em microscópio de luz. As imagens foram capturadas em microscópio de luz (modelo AX70 TRF, Olympus Optical) com sistema U-photo, acoplado a câmara fotográfica digital (Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.) e microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic.

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GENES (Cruz, 2016). Todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

RESULTADOS

Os diferentes espectros de luz testados no nosso estudo não influenciaram, estatisticamente, nas variáveis de crescimento avaliadas, assim como, na atividade fotossintética das plantas de *P. aculeata* (Figuras 2 e 3).

Quando submetidas a diferentes espectros de luz, plantas de *P. aculeata* cultivadas *in vitro* apresentaram diferenças significativas apenas para o conteúdo de betacianina. As maiores médias para o acúmulo de betacianina foram observadas em plantas cultivadas sob a combinação das luzes V/B/AM (Figura 4A). Em relação ao conteúdo de betaxantina e betalaínas totais, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos testados nesse estudo (Figura 4B e 4C).

As folhas de *P. aculeata* cultivadas *in vitro* sob diferentes condições de luz apresentaram epiderme unisseriada, folhas anfiestomáticas, feixe vascular do tipo colateral circundado por parênquima fundamental, e presença de células mucilaginosas (Figura 5). Sob luz branca, aparentemente foi observado folhas menos espessas e com feixe vascular menos pronunciado (Figuras 5A e 5B). Nas folhas de *P. aculeata*, sob todas as condições de qualidade da luz, observou-se a presença de dois tipos de parênquima, o paliádico e o lacunoso (Figuras 5C, 5F, 5I, 5L e 5O). Em todas as condições de luz, exceto sob luz branca, as plantas apresentaram fibras do floema e do xilema mais pronunciadas, resultando em feixes vasculares mais desenvolvidos (Figuras 5E, 5H, 5K e 5N).

Em relação a presença de células mucilaginosas, aparentemente não foram observadas diferenças na sua quantidade.

DISCUSSÃO

A luz regula diversos processos do desenvolvimento das plantas, como o crescimento, fotossíntese e rotas metabólicas (Kami et al., 2010; Wit et al., 2016). Dado a sua importância, vários trabalhos têm sido realizados a fim de compreender melhor as repostas das plantas, principalmente relacionados à influência da qualidade da luz no desenvolvimento e na produção de metabólitos secundários *in vitro* (Kubica et al., 2020; Silva et al., 2020; Klimek-Szczykutowicz et al., 2022; Rocha et al., 2022).

No presente estudo, as plantas de *P. aculeata* foram cultivadas *in vitro* sob diferentes espectros de luz (B; V/A; B/AA; B/V/AM e B/V/VD/AM). No entanto, as condições de luz testadas não causaram diferenças significativas nas características morfofisiológicas avaliadas. Esse resultado pode estar relacionado com a alta irradiância ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) utilizada neste estudo, uma vez que, plantas expostas a alta intensidade lumínica podem sofrer fotoinibição, evento este que causa danos no aparato fotossintético, resultando em menor atividade fotossintética e, conseqüentemente, menor acúmulo de biomassa. Costa et al. (2015), relataram que a alta irradiância promoveu diminuições no rendimento quântico de plantas de *Hymenaea stigonocarpa*, o que reduziu a taxa fotossintética. Plantas de *Vernonia condensata* cultivadas sob diferentes qualidades de luz também não apresentaram diferenças significativas na atividade fotossintética *in vitro* (Fortini, 2017).

A qualidade da luz afetou o conteúdo de betacianina de plantas de *P. aculeata* cultivadas *in vitro*, sendo seu acúmulo favorecido pela combinação de luzes V/B/AM. A utilização de comprimentos de onda específicos, pode induzir maior biossíntese de compostos de interesse (Tarakanov et al., 2022), pois possibilita a ativação de fotorreceptores específicos, resultando na regulação de diferentes repostas fotossintéticas e fotomorfogênicas importantes de plantas cultivadas *in vitro* (Dutta Gupta e Jatothu, 2013). A qualidade da luz tem efeitos significativos na biossíntese de metabólitos secundários em diferentes espécies de plantas. Em *Verbena officinalis* cultivada *in vitro* sob diferentes qualidades de luz, apresentaram maior acúmulo de compostos como verbascosídeos, isoverbascosídeo e ácidos fenólicos (Kubica et al., 2020). A luz vermelha induziu o acúmulo de saponina triterpênica em *Quillaja brasiliensis* (Yendo et al., 2015). A proporção de 1:1 de luz vermelho e azul aumentou a produção de 20-hidroxiecdisona (20E) em *Pfaffia glomerata* (Silva et al., 2020).

A qualidade da luz influenciou na anatomia de *P. aculeata in vitro*. Plantas cultivadas sob condição de luz branca, apresentaram aparentemente folhas menos espessas, e feixe vascular menos pronunciado, características não observadas nas folhas de plantas cultivadas

sob as demais condições de luz utilizadas nesse estudo. Resultado contrário foi encontrado em *Solanum lycopersicum* cultivada sob diferentes espectros luminosos, onde a espessura da lâmina foliar foi maior em plantas cultivadas sob luz branca, quando comparadas às luzes vermelho/verde/azul e vermelho/azul (Arena et al., 2016). Em *V. condensata*, as lâmpadas LED branca forneceram maior organização celular, com células menores e justapostas (Fortini, 2017).

CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que sob condição de luz Vermelho/Branco/Azul Médio, plantas de *P. aculeata* cultivadas *in vitro* apresentaram maior conteúdo de betacianina, confirmando assim, o efeito significativo da qualidade da luz na biossíntese de metabólitos secundários. E que, sob condição de luz Branca, as plantas, aparentemente, apresentaram folhas menos espessas e feixe vascular menos pronunciado.

Este é o primeiro trabalho a relatar os efeitos da qualidade de luz no cultivo *in vitro* de *P. aculeata*, uma espécie com alto potencial biotecnológico para uso na indústria farmacêutica e alimentícia.

REFERÊNCIAS

- Agostini-Costa TS, Wondraceck DC, Rocha WS, Silva DB** (2012) Carotenoids profile and total polyphenols in fruits of *Pereskia aculeata* Miller. *Rev Bras Frutic* **34**: 234–238.
- Arena C, Tsonev T, Doneva D, De Micco V, Michelozzi M, Brunetti C, Centritto M, Fineschi S, Velikova V, Loreto F** (2016) The effect of light quality on growth, photosynthesis, leaf anatomy and volatile isoprenoids of a monoterpene-emitting herbaceous species (*Solanum lycopersicum* L.) and an isoprene-emitting tree (*Platanus orientalis* L.). *Environ Exp Bot* **130**: 122–132.
- Banerjee R, Batschauer A** (2005) Plant blue-light receptors. *Planta* **220**: 498–502.
- Cavallaro V, Pellegrino A, Muleo R, Forgione I** (2022) Light and Plant Growth Regulators on *In Vitro* Proliferation. *Plants* **11**: 844.
- Chen C-C, Lee M-R, Wu C-R, Ke H-J, Xie H-M, Tsay H-S, Agrawal DC, Chang H-C** (2020) LED Lights Affecting Morphogenesis and Isosteroidal Alkaloid Contents in *Fritillaria cirrhosa* D. Don-An Important Chinese Medicinal Herb. *Plants (Basel)* **9**: 1351.
- Chen M, Chory J** (2011) Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development. *Trends Cell Biol* **21**: 664–671.
- Chen M, Chory J, Fankhauser C** (2004) Light Signal Transduction in Higher Plants. *Annu Rev Genet* **38**: 87–117.
- Chen X, Yang Q, Song W, Wang L, Guo W, Xue X** (2017) Growth and nutritional properties of lettuce affected by different alternating intervals of red and blue LED irradiation. *Sci Horticult* **223**: 44–52.
- Costa AC, Rezende-Silva SL, Megguer CA, Moura LMF, Rosa M, Silva AA** (2015) The effect of irradiance and water restriction on photosynthesis in young jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa*) plants. *Photosynthetica* **53**: 118–127.
- Costa AC, Rosa M, Megguer CA, Silva FG, Pereira FD, Otoni WC** (2014) A reliable methodology for assessing the *in vitro* photosynthetic competence of two Brazilian savanna species: *Hyptis marrubioides* and *Hancornia speciosa*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **117**: 443–454.
- Cruz CD** (2016) Genes Software - extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. *Acta Sci, Agron* **38**: 547–552.
- Cui X-H, Chakrabarty D, Lee E-J, Paek K-Y** (2010) Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. *Bioresour Technol* **101**: 4708–4716.
- Dutta Gupta S, Jatothu B** (2013) Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. *Plant Biotechnol Rep* **7**: 211–220.

Ferreira W, Ferreira WFL, Locatelli MG, Silva EO, Missau FC (2013) Avaliação do Potencial Antioxidante de *Pereskia aculeata* (Ora Pro Nobis) Frente ao Método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). Anais Salão Int Ensino Pesq Extensão **5**.

Fortini EA (2017) Potencial fotoautotrófico *in vitro* e influência do espectro de luz e da radiação UV-B sobre o desenvolvimento de vitroplantas de *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae).

Galvão VC, Fankhauser C (2015) Sensing the light environment in plants: photoreceptors and early signaling steps. Curr Opin Neurobiol **34**: 46–53.

Kami C, Lorrain S, Hornitschek P, Fankhauser C (2010) Light-regulated plant growth and development. Curr Top Dev Biol **91**: 29–66.

Klimek-Szczykutowicz M, Prokopiuk B, Dziurka K, Pawłowska B, Ekiert H, Szopa A (2022) The influence of different wavelengths of LED light on the production of glucosinolates and phenolic compounds and the antioxidant potential in *in vitro* cultures of *Nasturtium officinale* (watercress). Plant Cell Tiss Organ Cult **149**: 113–122.

Kubica P, Szopa A, Prokopiuk B, Komsta Ł, Pawłowska B, Ekiert H (2020) The influence of light quality on the production of bioactive metabolites – verbascoside, isoverbascoside and phenolic acids and the content of photosynthetic pigments in biomass of *Verbena officinalis* L. cultured *in vitro*. J Photochem Photobiol B: Biol **203**: 111768.

Lage DA (2015) Desenvolvimento de sistemas *in vitro* visando à produção de plantas, culturas celulares e metabólitos com potencial antioxidante e antineoplásico de *Pereskia aculeata* Mill. Tese (Doutorado em Conservação e Utilização da Biodiversidade) – UERJ, Rio de Janeiro.

Li C-X, Xu Z-G, Dong R-Q, Chang S-X, Wang L-Z, Khalil-Ur-Rehman M, Tao J-M (2017) An RNA-Seq Analysis of Grape Plantlets Grown *in vitro* Reveals Different Responses to Blue, Green, Red LED Light, and White Fluorescent Light. Front Plant Sci **8**: 78.

Li Q, Xu J, Yang L, Sun Y, Zhou X, Zheng Y, Zhang Y, Cai Y (2021) LED light quality affect growth, alkaloids contents, and expressions of amaryllidaceae alkaloids biosynthetic pathway genes in *Lycoris longituba*. J Plant Growth Reg **41**: 257–270.

Long J, Yuan X, Ma C, Du M, Ma X, Wen Z, Ma R, Wang Y, Cao Y (2018) Strongly enhanced luminescence of $\text{Sr}_4\text{Al}_{14}\text{O}_{25}:\text{Mn}^{4+}$ phosphor by co-doping B^{3+} and Na^+ ions with red emission for plant growth LEDs. RSC Adv **8**: 1469–1476.

Longcore T, Rodríguez A, Witherington B, Penniman JF, Herf L, Herf M (2018) Rapid assessment of lamp spectrum to quantify ecological effects of light at night. J Exp Zool A Ecol Integr Physiol **329**: 511–521.

Lorenzi H, Kinnup VF (2014) Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum.

Monostori I, Heilmann M, Kocsy G, Rakszegi M, Ahres M, Altenbach SB, Szalai G, Pál M, Toldi D, Simon-Sarkadi L, Harnos N, Galiba G, Darki E (2018) LED Lighting – Modification of Growth, Metabolism, Yield and Flour Composition in Wheat by Spectral Quality and Intensity. Front Plant Sci **9**: 605.

Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* **15**: 473–497.

O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**: 368–373.

Pedroso RCN, Branquinho NAA, Hara ACBAM, Costa AC, Silva FG, Pimenta LP, Silva MLA, Cunha WR, Pauletti PM, Januario AH (2017) Impact of light quality on flavonoid production and growth of *Hyptis marruboides* seedlings cultivated *in vitro*. *Rev Bras Farmacogn* **27**: 466–470.

Piattelli M, Minale L (1964) Pigments of centrospermae-II: Distribution of betacyanins. *Phytochemistry* **3**: 547–557.

Pinto NCC, Machado DC, Silva JM, Conegundes JLM, Gualberto ACM, Gameiro J, Chedier LM, Castañón MCMN, Scio E (2015) *Pereskia aculeata* Miller leaves present *in vivo* topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. *J Ethnopharmacol* **173**: 330–337.

Rocha TT, Araújo DX, Carvalho AA, Germano CM, Santos MF, Lameira OA, Bertolucci SKV, Pinto JEBP (2022) *In vitro* culture of *Lippia dulcis* (Trev.): light intensity and wavelength effects on growth, antioxidant defense, and volatile compound production. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* **58**: 636–652.

Saleem MH, Rehman M, Zahid M, Imran M, Xiang W, Liu L (2019) Morphological changes and antioxidative capacity of jute (*Corchorus capsularis*, Malvaceae) under different color light-emitting diodes. *Braz J Bot* **42**: 581–590.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**: 671–675.

Shukla MR, Singh AS, Piunno K, Saxena PK, Jones AMP (2017) Application of 3D printing to prototype and develop novel plant tissue culture systems. *Plant Methods* **13**: 6.

Silva TD, Batista DS, Fortini EA, Castro KM, Felipe SHS, Fernandes AM, Sousa RMJ, Chagas K, Silva JVS, Correia LNF, Farias LM, Leite JPV, Rocha DI, Otoni WC (2020) Blue and red light affects morphogenesis and 20-hydroxyecdysone content of *in vitro* *Pfaffia glomerata* accessions. *J Photochem Photobiol B: Biol* **203**: 111761.

Souza LF, Caputo L, De Barros IBI, Fratianni F, Nazzaro F, De Feo V (2016) *Pereskia aculeata* Muller (Cactaceae) Leaves: Chemical Composition and Biological Activities. *Int J Mol Sci* **17**: 1478.

Tarakanov IG, Tovstyko DA, Lomakin MP, Shmakov AS, Sleptsov NN, Shmarev AN, Litvinskiy VA, Ivlev AA (2022) Effects of Light Spectral Quality on Photosynthetic Activity, Biomass Production, and Carbon Isotope Fractionation in Lettuce, *Lactuca sativa* L., Plants. *Plants* **11**: 441.

Wit M, Galvão VC, Fankhauser C (2016) Light-Mediated Hormonal Regulation of Plant Growth and Development. *Ann Rev Plant Biol* **67**: 513–537.

Wyler H, Dreiding AS (1957) Kristallisiertes Betanin. Vorläufige Mitteilung. *Helv Chim Acta* **40**: 191–192.

Yendo ACA, De Costa F, Fleck JD, Gosmann G, Fett-Neto AG (2015) Irradiance-based treatments of *Quillaja brasiliensis* leaves (A. St.-Hil. & Tul.) Mart. as means to improve immunoadjuvant saponin yield. *Ind Crops Prod* **74**: 228–233.

Yue W, Ming Q-L, Lin B, Rahman K, Zheng C-J, Han T, Qin L-P (2016) Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Crit Rev Biotechnol* **36**: 215–232.

Zhao J, Thi LT, Park YG, Jeong BR (2020) Light Quality Affects Growth and Physiology of *Carpesium triste* Maxim. Cultured In Vitro. *Agriculture* **10**: 258.

APÊNDICE

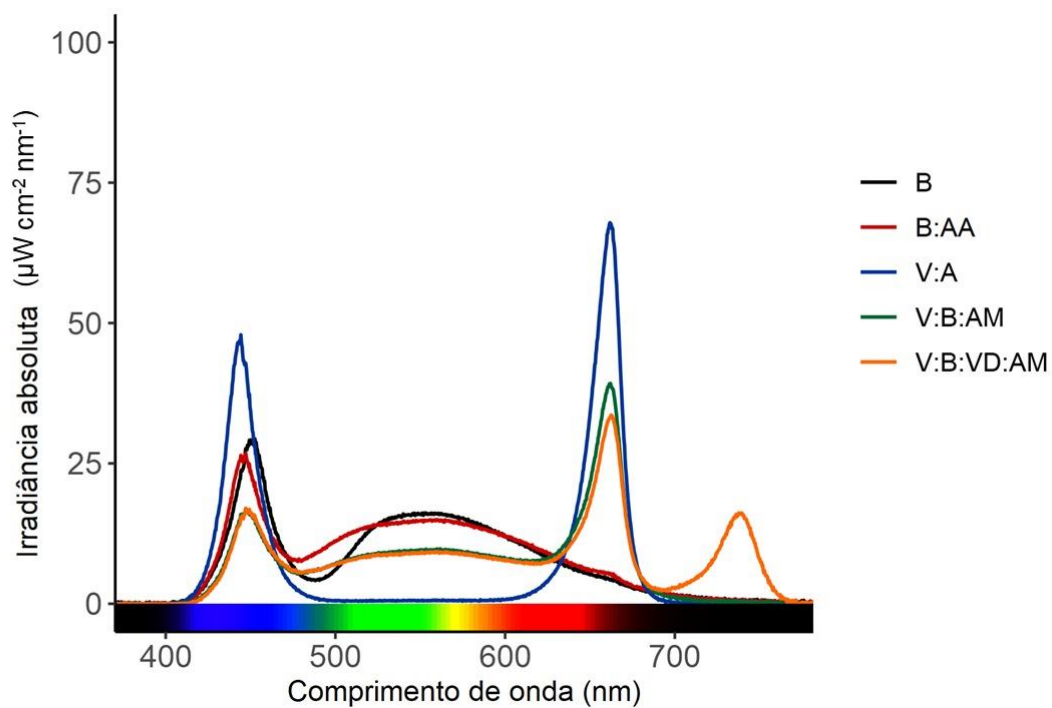


Figura 1. Espectro de luz das diferentes lâmpadas LED utilizadas. Abreviações: B - Branco, V/A - Vermelho/Azul, B:AA - Branco/Azul Alto, V/B:AM - Vermelho/Branco/Azul Médio, V/B:VD:AM - Vermelho/Branco/Vermelho Distante/Azul Médio.

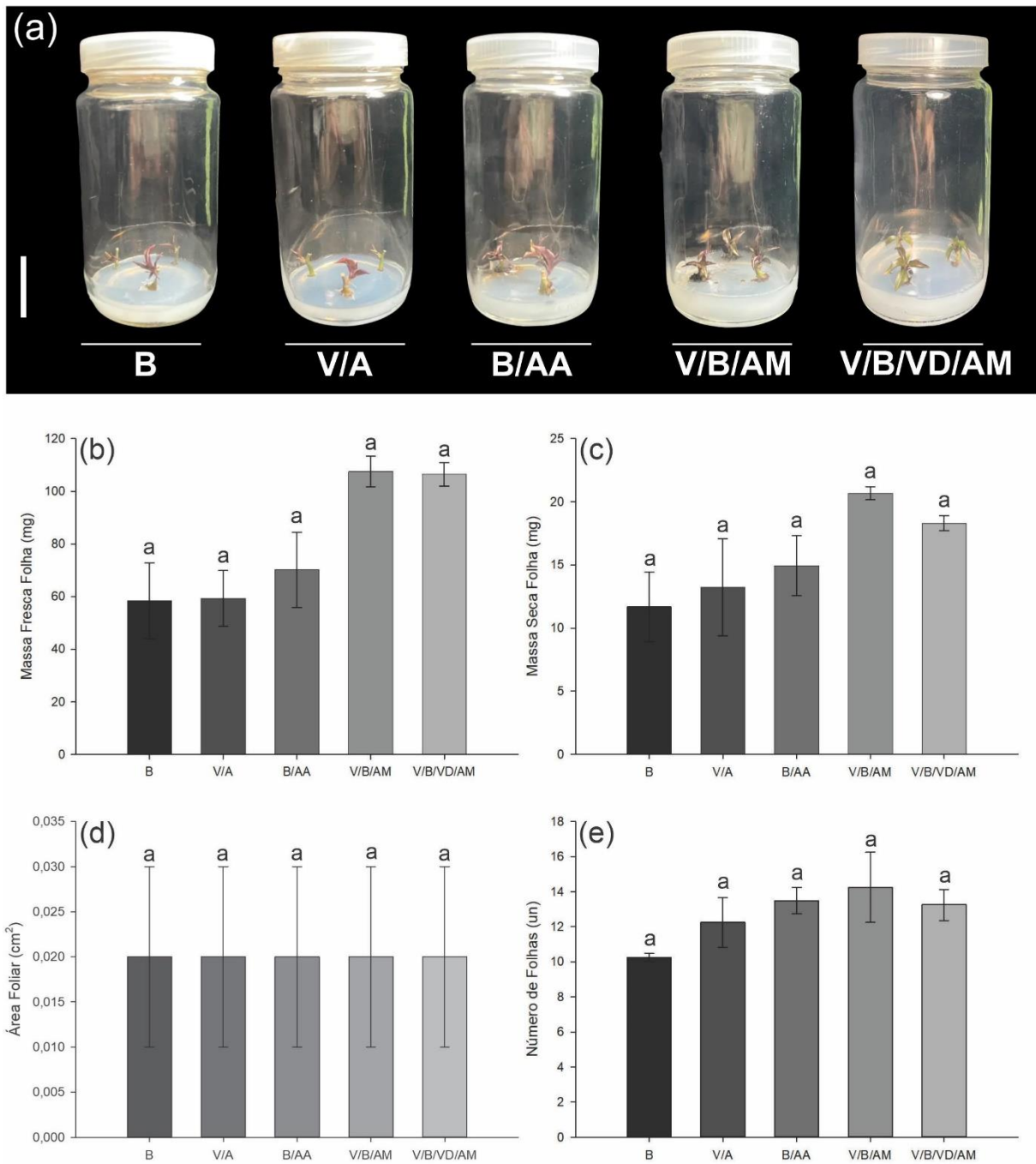


Figura 2. Variáveis de crescimento de *Pereskia aculeata* após 60 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes qualidades de luz: Branco (B), Vermelho/Azul (V/A), Branco/Azul Alto (B/AA), Vermelho/Branco/Azul Médio (V/B/AM), Vermelho/Branco/Vermelho Distante/Azul Médio (V/B/VD/AM). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Figura A: Barra = 5 cm.

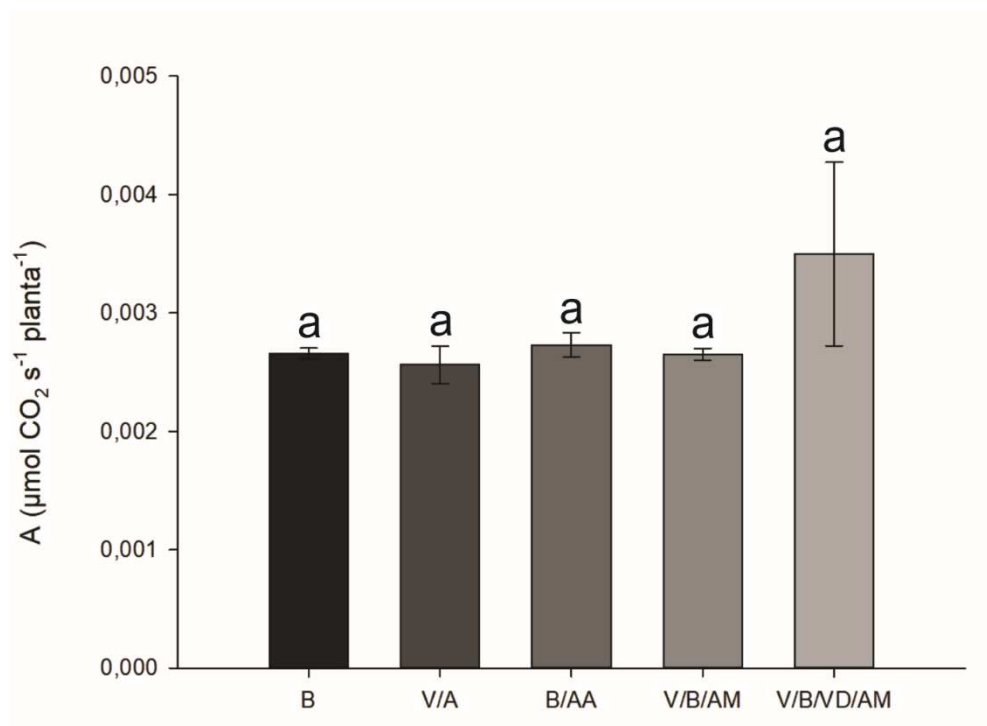


Figura 3. Taxa fotossintética de *Pereskia aculeata* após 60 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes qualidades de luz: Branco (B), Vermelho/Azul (V/A), Branco/Azul Alto (B/AA), Vermelho/Branco/Azul Médio (V/B/AM), Vermelho/Branco/Vermelho Distante/Azul Médio (V/B/VD/AM). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

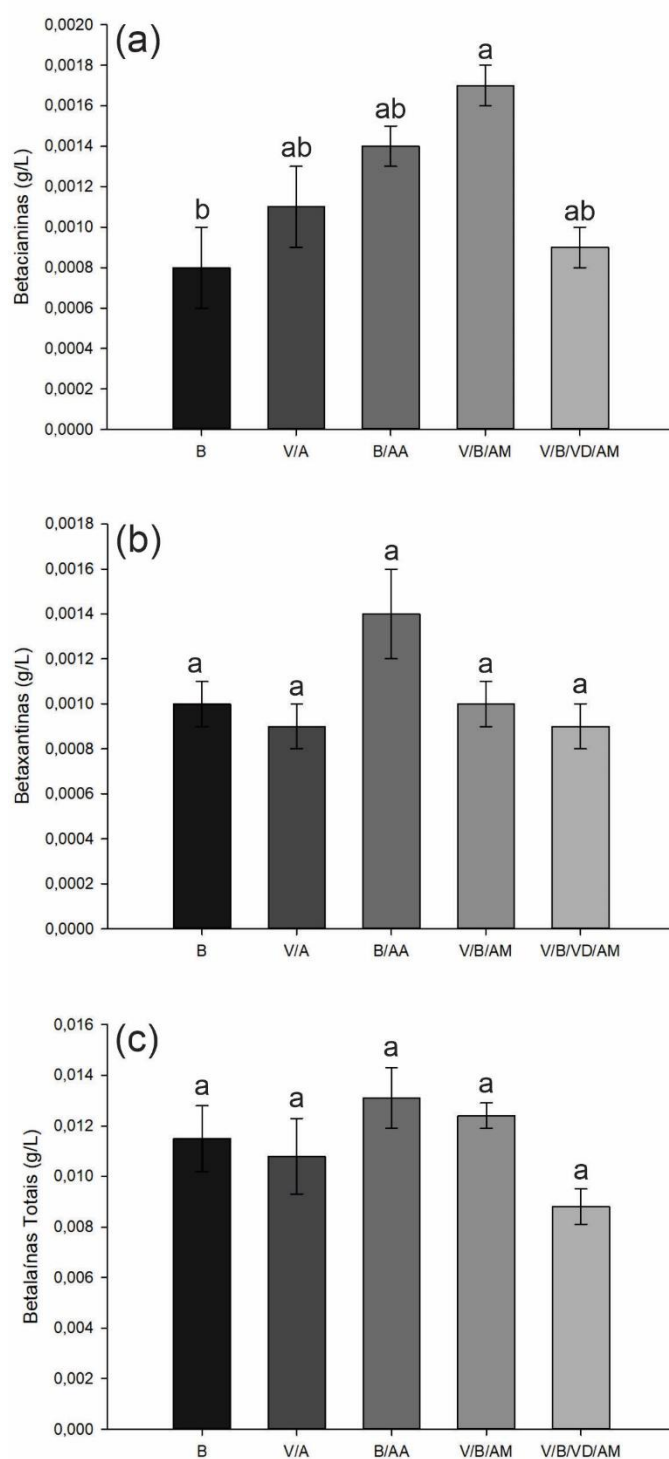


Figura 4. Concentração de betalaínas em plantas de *Pereskia aculeata* após 60 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes qualidades de luz: Branco (B), Vermelho/Azul (V/A), Branco/Azul Alto (B/AA), Vermelho/Branco/Azul Médio (V/B/AM); Vermelho/Branco/Vermelho Distante/Azul Médio (V/B/VD/AM). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

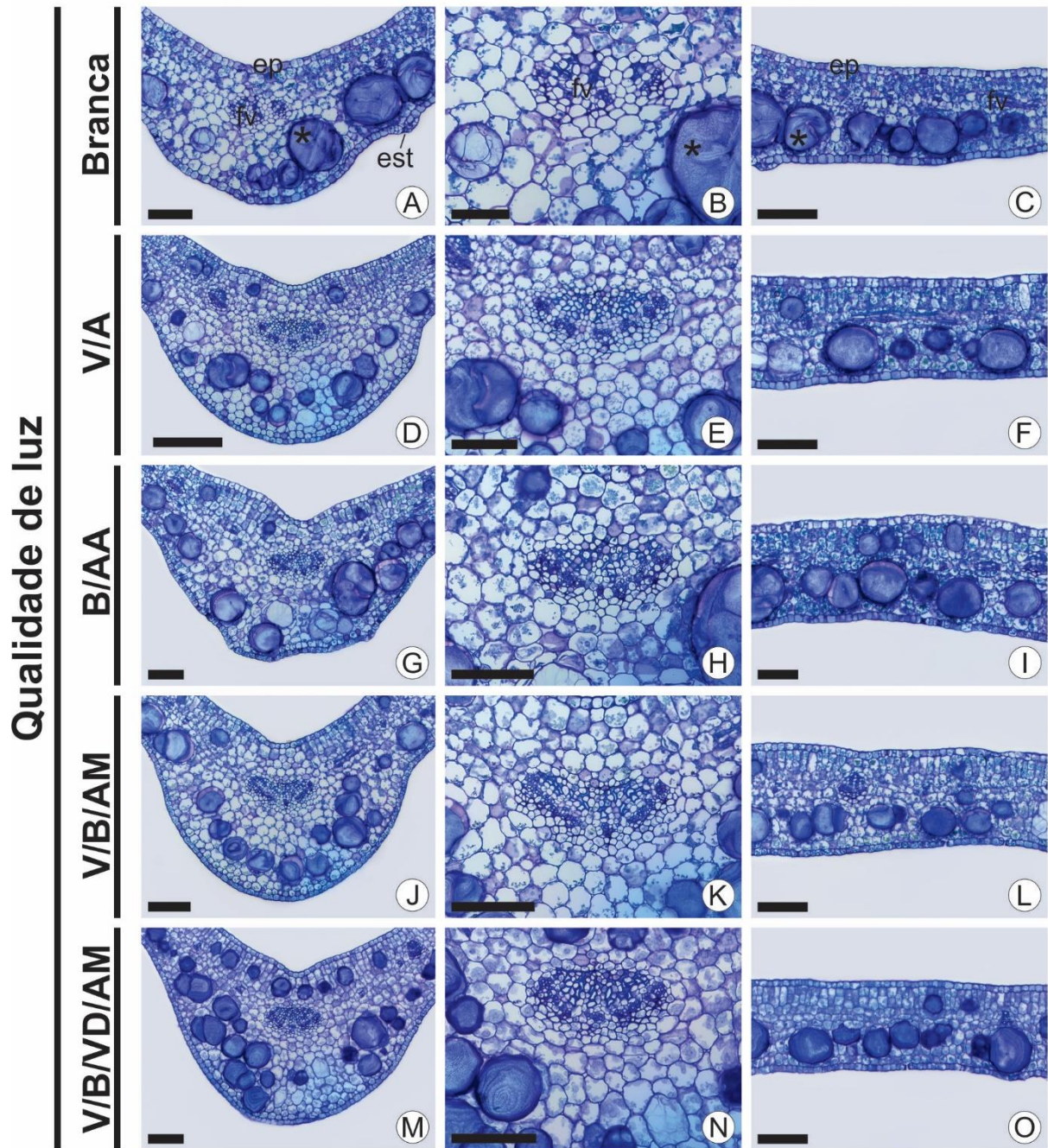


Figura 5. Seções transversais da porção mediana de folhas de plantas de *Pereskia aculeata* após 60 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes qualidades de luz: Branco (B), Vermelho/Azul (V/A), Branco/Azul Alto (B/AA), Vermelho/Branco/Azul Médio (V/B/AM); Vermelho/Branco/Vermelho Distante/Azul Médio (V/B/VD/AM). Detalhes do feixe vascular principal da porção mediana da folha (A, D, G, J, M), do feixe vascular principal da folha (B, E, H, K, N) e da lâmina foliar (C, F, I, L, O). Abreviações: Asteriscos pretos (*) - Células mucilaginosas; Ep – Epiderme; Est – Estômato; FV – Feixe Vascular. Barras = 100 µm.

CONCLUSÕES GERAIS

- A desinfestação em solução de NaOCl a 2,5% de cloro ativo combinado a adição de 0,2% de PPM ao meio de cultura proporcionou maior produção de explantes axênicos;
- As diferentes citocininas influenciam no desenvolvimento, na atividade de enzimas antioxidantes e no conteúdo de betalaínas em *P. aculeata in vitro*. A mT promoveu maior acúmulo de que massa fresca da folha, massa seca do caule, maior comprimento do caule e maior área foliar, sendo indicada para o estabelecimento de *P. aculeata in vitro*;
- O meio de cultura MS proporcionou maior acúmulo de biomassa em *P. aculeata*, podendo ser potencialmente utilizado para a propagação da espécie *in vitro*;
- As plantas de *P. aculeata* apresentam potencial de propagação hererotrófica e fotomixotrófica, com melhores condições de cultivo *in vitro* em 15 g L⁻¹ de sacarose e frascos vedados com tampas sem membrana que permite TTCO₂ de 14 µL L⁻¹ s⁻¹, ou em 30 g L⁻¹ de sacarose e frascos vedados com tampas com duas membranas que permitem TTCO₂ de 25 µL L⁻¹ s⁻¹;
- A qualidade espectral da luz influenciou no acúmulo de betacianina, sendo maior sob condição de luz Vermelho/Branco/Azul Médio (V/B/AM);

Este trabalho fornece novas perspectivas em relação aos efeitos da manipulação do meio e do ambiente de cultivo sob o desenvolvimento e o metabolismo secundário de *P. aculeata*, podendo auxiliar na otimização de protocolos de propagação e de produção de betalaínas dessa espécie *in vitro*.