

FERNANDA RAQUEL SARTOR

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS DO
METABOLISMO PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO DE CREM (*Tropaeolum
pentaphyllum* LAM)**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016

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

T

S251p
2016 Sartor, Fernanda Raquel, 1985-
Propagação *in vitro* e quantificação de compostos do metabolismo primário e secundário de crem (*Tropaeolum pentaphyllum* Lam.) / Fernanda Raquel Sartor. - Viçosa, MG, 2016.
vii, 89f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Marcelo Rogalski.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Plantas - Propagação. 2. Tecidos vegetais - Culturas e meio de cultura. 3. Plantas - Metabolismo. 4. *Tropaeolum pentaphyllum* Lam..
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22 ed. 581

FERNANDA RAQUEL SARTOR

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS DO
METABOLISMO PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO DE CREM (*Tropaeolum
pentaphyllum* LAM.)**

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

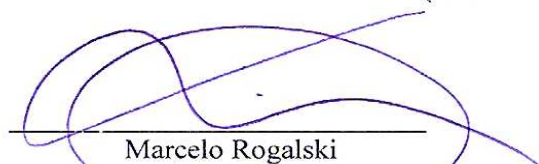
Aprovada: 02 de dezembro de 2016.


Edgard Augusto de Toledo Picoli


Lorena Melo Vieira


Maira Christina Marques Fonseca


Wagner Campos Ottoni
(Coorientador)


Marcelo Rogalski
(Orientador)

Àqueles que amo e que sempre me apoiaram nesta jornada.

Aos meus pais, Ademar e Eliane, e minhas irmãs, Ulliana e Mariane, e meu afilhado Pedro, por todo carinho, dedicação, suporte e incentivo na realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo amor, apoio imensurável e por acreditar nos meus sonhos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela excelência dos estudos oferecidos.

À CAPES, FAPEMIG e ao CNPq, pelo financiamento do doutorado.

Ao professor Marcelo Rogalski, pela orientação e ao professor Wagner Campos Otoni pela coorientação, a amizade de vocês, o auxílio, e conselhos foram fundamentais em todas as etapas para a obtenção deste título.

Ao professor Edgard Augusto de Toledo Picoli à Dra. Maira Christina Marques Fonseca e à Dra. Lorena Melo Vieira, por terem gentilmente aceitado o convite para participar da arguição oral da tese.

Aos professores e funcionários do curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, que participaram ativamente para a obtenção desse título.

Ao professor Lyderson Facio Viccini da Universidade Federal de Juiz de Fora pela realização das análises de citometria de fluxo

Aos meus queridos amigos de curso, em especial aos integrantes do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas e do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II (LCT II), pela alegria, acolhimento, carinho e cumplicidade. Em especial aos amigos: Carla, Gutenberg, Maiana, Karla, Kelly, Ana Carla, Giuliana, Túlio, Mireli, Amanda, Daniele, Maria Antônia, Odione, Gélia, Juliene, Emanuel, Camilo, Leiri, Naine, Acácio, Vitor, Dona Elci, Elyabe, Diego, Perácio, Andréa, Ana Cláudia, Tatiane e Priscila.

Ao meu namorado Amaro Afonso Campos de Azeredo, por estar sempre ao meu lado sendo meu amigo e companheiro, e me dando forças para não desistir.

Além do conhecimento científico, aprendi durante esses quatro anos, lições de vida, companheirismo e amizade. A cada dia é preciso ouvir conselhos, receber apoio, sorrisos e ajudas. Sou muito grata a todos que de alguma forma, contribuíram para que este trabalho pudesse ser finalizado.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 A espécie: <i>Tropaeolum pentaphyllum</i> Lam	1
1.2 Cultivo in vitro	1
1.3 Trocas gasosas.....	2
1.4 Luz.....	3
1.5 Compostos secundários	4
REFERÊNCIAS	5
CAPÍTULO 1	9
RESUMO	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	13
2. MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1 Material vegetal.....	19
2.2 Estabelecimento in vitro de plantas de crem	19
2.3 Crescimento de explantes de crem cultivados em meio MS sob condições fotoautotróficas e fotomixotróficas	20
2.4 Indução de brotações in vitro	20
2.5 Estabelecimento do crem em diferentes meios de cultura sob condições heterotróficas	21
2.6 Cultivo de crem em diferentes meios de cultura MS e DKW sob condições fotoautotróficas e fotomixotróficas	21
2.7 Efeito de diferentes tipos e concentrações de citocininas na emissão de brotações in vitro em meio DKW	22
2.8 Influência da condição lumínica na emissão de novas brotações.....	22
2.9 Indução de brotações em explantes cultivados em meio de cultura líquido sob agitação.....	23
2.10 Efeito do AIB no enraizamento in vitro de explantes caulinares de crem	23
2.11 Influência do tamanho da planta e do tipo de auxina no enraizamento ex vitro	24
2.12 Aclimatização de plantas de crem.....	24
2.13 Diafanização.....	25
2.14 Estimativa do conteúdo de DNA nuclear de plantas de crem	25
2.15 Análises estatísticas.....	25
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
3.1 Estabelecimento in vitro de plantas de crem	26

3.2 Análise do crescimento de crem cultivado em meio MS sob condições fotoautotróficas e fotomixotróficas	29
3.3 Indução de brotações in vitro	31
3.4 Análise do cultivo do crem em diferentes meios de cultura sob condições heterotróficas ...	32
3.5 Avaliação do crescimento e desenvolvimento in vitro de explantes cultivados em meio de cultura MS ou DKW sob condições fotoautotróficas e fotomixotróficas	34
3.6 Efeito de diferentes tipos e concentrações de citocininas na emissão de brotações in vitro .	37
3.7 Influência da condição lumínica na emissão de novas brotações.....	39
3.8 Indução de brotações em explantes cultivados em meio de cultura líquido sob agitação.....	40
3.9 Efeito do AIB no enraizamento in vitro de explantes caulinares de crem	41
3.10 Enraizamento ex vitro	42
3.11 Aclimatização.....	43
3.12 Diafanização.....	43
3.13 Estimativa do conteúdo de DNA nuclear	44
4. CONCLUSÕES.....	46
5. REFERÊNCIAS	48
CAPÍTULO 2	61
RESUMO	61
ABSTRACT.....	63
1. INTRODUÇÃO	65
2. MATERIAL E MÉTODOS	69
2.1 Material vegetal e condições de cultivo	69
2.2 Caracterização dos tratamentos e delineamento experimental	69
2.3 Extração e determinação de clorofilas, carotenoides e antocianinas.....	70
2.4 Determinação de proteínas, açúcares, amido e aminoácidos	71
2.5 Quantificação de flavonoides: quercetina e campeferol.....	71
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
3.1 Teores de pigmentos.....	72
3.2 Análise de metabólitos primários	74
3.3 Quantificação de metabólitos secundários	77
4. CONCLUSÕES.....	80
5. REFERÊNCIAS	81
CONCLUSÕES GERAIS	88
ANEXO.....	89

RESUMO

SARTOR, Fernanda Raquel, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2016. **Propagação *in vitro* e quantificação de compostos do metabolismo primário e secundário de crem (*Tropaeolum pentaphyllum* LAM).** Orientador: Marcelo Rogalski. Coorientador: Wagner Campos Otoni.

O crem (*Tropaeolum pentaphyllum* Lam.) tem ocorrência natural na América do Sul com maior incidência nos estados da Região Sul do Brasil, compondo ambiente de florestas e margens de rios. Os tubérculos da planta são apreciados na culinária tradicional na forma de conservas, suas folhas e flores também são consumidas como hortaliças. O crem também é considerado planta medicinal, atuando na redução do colesterol, apresentado atividades antimicrobiana e antiescorbútica, entre outras. A espécie está na lista das Espécies Ameaçadas de Extinção do Rio Grande do Sul decorrente da ameaça das populações naturais pela grande expansão das atividades agrossilvopastoris e ao extrativismo descontrolado dos tubérculos. Tradicionalmente, sua propagação é feita com o plantio de tubérculos semente que apresentam dormência, dificuldades na propagação e ramificação desuniformes. O presente estudo propõe estabelecer um sistema de propagação *in vitro* via meristemas pré-existentes, visando à propagação massiva. Para tal, buscou-se a otimização de alguns fatores como a combinação de reguladores de crescimento, as trocas gasosas (por ventilação natural dos frascos), a irradiância e qualidade espectral das fontes luminosas. Também objetivou-se identificar e quantificar potenciais compostos secundários de interesse medicinal, bem como caracterizar os principais metabólitos do metabolismo primário. Os resultados obtidos permitiram conhecimentos sobre o comportamento morfofisiológico *in vitro* e proporcionaram um protocolo eficiente na obtenção de mudas em quantidade e de qualidade fitossanitária, de modo a minimizar os danos negativos do extrativismo acelerado às populações de ocorrência natural.

ABSTRACT

SARTOR, Fernanda Raquel, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2016. **Micropropagation as a preservation strategy for crem (*Tropaeolum pentaphyllum* Lam.), A native species threatened with extinction.** Adviser: Marcelo Rogalski. Co-adviser: Wagner Campos Otoni.

The crem (*Tropaeolum pentaphyllum* Lam.) Has a natural occurrence in South America with a higher incidence in the southern Brazilian states, composing the environment of forests and riverbanks. The tubers of the plant are appreciated in traditional cooking in the form of preserves, its leaves and flowers are also consumed as greenery. Crem is also considered medicinal plant, acting in the reduction of cholesterol, antimicrobial and antiscorbous activities, among others. The species is in the list of Threatened Species of Extinction of Rio Grande do Sul due to the threat of the natural populations in the great expansion of agrosilvopastoral activities and to the uncontrolled extractivism of the tubers. Traditionally, its propagation is done by planting tubers without that numbness, difficulties in propagation and branching uneven. The present study proposes to establish a system of in vitro propagation through pre-existing meristems, aiming at massive propagation. To do so, look for an optimization of some factors such as a combination of growth regulators such as gas exchange, irradiance and spectral quality of light sources. It was also aimed to identify and quantify potential secondary compounds of medicinal interest, as well as to characterize the main metabolites of the primary metabolism. The results obtained allowed the knowledge about the in vitro morphophysiological behavior and provided an efficient treatment in the obtaining of seedlings in quantity and phytosanitary quality, in order to minimize the negative damages of the accelerated extractivism to the populations of natural occurrence.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 A espécie: *Tropaeolum pentaphyllum* Lam

O crem, *Tropaeolum pentaphyllum* Lam., família Tropaeolaceae, é uma espécie trepadeira que fixa-se a suportes pela torção dos pecíolos. A parte aérea é anual, e a planta produz tubérculos que rebrotam na estação seguinte (perenes). Encontra-se amplamente distribuída na América do Sul, podendo ser encontrada até o sul do México. No Brasil, tem maior incidência na região Sul, nos estados do Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) e Paraná (PR) (Coradin et al., 2011) e ocorre em florestas de galerias e margens de rios (Sparre, 1972).

Destaca-se que, apesar da ampla ocorrência, *T. pentaphyllum* faz parte da lista das espécies ameaçadas de extinção do RS, estando na categoria vulnerável (Coradin et al., 2011). As principais ameaças estão relacionadas à expansão das atividades agrossilvopastoris, ao extrativismo descontrolado dos tubérculos para o consumo, pequenos plantios em hortas e comercialização (Coradin et al., 2011).

O crem tem indicação popular como alimento e planta medicinal. Os tubérculos são consumidos na forma de conservas como condimentos em sopas e acompanhando carnes (Kinupp, 2007, Coradin et al., 2011).

Várias pesquisas comprovam que seu consumo frequente favorece a redução do colesterol. Além disso, os tubérculos da planta produzem compostos secundários com atividade antimicrobiana, antiescorbútica e depurativas (Mors et al., 2000). Estudos indicam a presença de glicosídeos cardiotônicos de núcleo terpênico no extrato bruto de tubérculos de crem, os quais possuem ação cardioativas, podendo ser utilizados em tratamentos de insuficiência cardíaca (Ceolin et al., 2012).

A propagação do crem é feita tradicionalmente por meio do plantio do tubérculo, o qual não tem padrão de tamanho, apresenta dormência e tem dificuldade de rebrotamento, influenciando negativamente na propagação. Além disso o número de brotos é variável com ramas desuniformes e lançadas relativamente distantes do tubérculo (Coradin et al., 2011).

1.2 Cultivo *in vitro*

A cultura de tecidos é um conjunto de técnicas da biotecnologia vegetal que vem sendo empregada em diversas espécies com várias finalidades proporcionando benefícios

como rápida propagação clonal, regeneração e multiplicação de plantas manipuladas geneticamente além de ser ferramenta para a produção de metabólitos secundários e produção numerosa de plântulas em espaço e tempo reduzido, auxilia na preservação, conservação e multiplicação de plantas ameaçadas de extinção (Walia et al., 2007; Ozdemir et al., 2014; Gashi et al., 2015).

Um protocolo eficiente de micropropagação é essencial para obtenção de plântulas saudáveis e bem desenvolvidas, devendo ser considerado o estado físico do meio de cultura, reguladores de crescimento e concentrações, condições de temperatura e luminosidade da sala de crescimento (Hussain et al., 2012; Naing et al., 2014; Waikhom e Louis, 2014).

A micropropagação inicia-se com a seleção de explantes a partir de uma boa planta matriz, proporcionando condições ideais para o seu estabelecimento a fim de evitar contaminação da cultura com micro-organismos e manter as características desejáveis da planta mãe nos clones que serão obtidos (Murashige, 1974; Cassells e Doyle, 2005; Waikhom e Louis, 2014).

O desenvolvimento completo de um protocolo de micropropagação pode ser resumido em seis etapas: desinfestação (limpeza dos explantes na tentativa de eliminar micro-organismos), estabelecimento (obter a cultura *in vitro* sem contaminação), multiplicação (aumento do número de brotos por explante cultivado, utiliza-se de reguladores de crescimento), alongamento, enraizamento (indução de raízes *in vitro*) e aclimatização (Chandra et al., 2010; Raomai et al., 2013; Waikhom e Loius, 2014; da Silva et al., 2015).

1.3 Trocas gasosas

Trocas gasosas também são estudadas no cultivo *in vitro*, atmosferas enriquecidas com CO₂ e a ventilação natural do ambiente de cultivo estão sendo exploradas com o intuito de melhorar o desempenho fotossintético da planta, acúmulo de assimilados e também o seu crescimento e desenvolvimento (Cha-um et al., 2011; Xiao et al., 2011; Iarema et al., 2012; Norikane et al., 2013; Saldanha et al., 2013).

Condições de cultivo heterotróficas, podem causar, a depender da espécie, restrições na disponibilidade de água, nas trocas gasosas entre o ambiente de cultivo e o ambiente exterior. A má aeração leva à baixa multiplicação dos explantes que ocorre devido a altas concentrações de etileno e CO₂ dentro do frasco de cultivo e também a

ocorrência de culturas hiperhídricas, fazendo com que o controle do microambiente se torne essencial para reduzir distúrbios morfológicos e fisiológicos (Marino e Berardi, 2004; Park et al., 2004).

Estudos explorando ambientes fotoautotróficos e/ou fotomixotróficos vêm sendo utilizados em diversas culturas, demonstrando que as trocas gasosas durante o cultivo *in vitro* beneficiam o vigor do explante multiplicado e, principalmente, melhoram o desenvolvimento da plântula na etapa de aclimatização, pois as trocas gasosas estão diretamente envolvidas na quantidade e na eficiência estomática da planta, além de pigmentos de acúmulo de metabólitos (Sha Valli et al., 2003; Tsay et al., 2006; Mohamed e Alsadon, 2010; Iarema et al., 2012).

1.4 Luz

Todos os organismos fotossintetizantes necessitam de luz para síntese de compostos orgânicos, germinação, fototropismo, floração, desenvolvimento de cloroplastos, movimentos foliares e principalmente para a fotossíntese, esta influenciada diretamente pela concentração de pigmentos fotossintéticos que são sintetizados em função da energia luminosa (Karpinski et al, 2013).

A luz pode ser manipulada facilmente em salas de crescimento e é tida como um dos fatores externos mais importantes no crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro* (Karpinski et al., 2013). Com importante papel na regulação do crescimento da planta, fotossíntese e respostas morfogênicas, a luz também têm atividade sobre o crescimento e regeneração de novos brotos e aumento da área foliar. A combinação de luz vermelha e azul atua positivamente na fotossíntese em virtude da absorção dos fótons pelas clorofilas *a* e *b* nesses comprimentos de onda, otimizando a produção de assimilados que contribuirão para o crescimento da planta (Johkan et al., 2010; Park e Kim, 2010).

Diferentes fontes de luz artificiais vêm sendo utilizadas em salas de crescimento de plantas, os diodos emissores de luz (LEDs) apresentam vantagens sobre as outras fontes artificiais pois permitem distribuição uniforme da energia e possibilidade de modificar o comprimento de onda, proporcionando a condição ideal de luz para o desenvolvimento de cada espécie em condições *in vitro* (Hogewoning et al., 2007).

Estudos realizados em diversas espécies utilizando luz azul e vermelha demonstraram a ocorrência de aumento no número de novas brotações durante a etapa de multiplicação, maior alongamento dos brotos, aumento massa fresca e também

incremento na área foliar, esses resultados podem ser associados às condições de luminosidade, as folhas maiores permitiram ampla interceptação luminosa e isso levou ao aumento de biomassa (Park e Kim, 2010; Link et al., 2013; Silva et al., 2014; Ani et al., 2015; Know et al., 2015).

1.5 Compostos secundários

As plantas da família Tropaeolaceae são conhecidas amplamente devido as suas propriedades farmacológicas diuréticas, purgativas, antimicrobiana, anti-inflamatória e antiescorbútica, digestiva entre outras funções (Ceolin et al., 2012; Gasparotto Junior et al., 2011). O crem pertencendo a esta família e amplamente utilizado na medicina popular carece de estudos fitoquímicos com fins de identificar novos compostos e quantificar os já apontados com potencial medicinal.

Os tubérculos de crem possuem glicosídeos cardiotônicos de núcleo terpênico, que apresentam atividade vinculada a ações no miocárdio, tratamento para insuficiência cardíaca e anti-câncer. Há também compostos secundários importantes como a isoquercitrina e o kaempferol identificados em espécie do mesmo gênero do crem (Ceolin et al., 2012; Gasparotto Junior et al., 2011).

Os glicosídeos cardiotônicos são divididos em dois grupos: cardenolidos e bufadienolidos. No primeiro grupo estão os compostos com maior atividade terapêutica em tratamentos para congestão cardíaca, arritmia e fibrilação atrial, tem ação em células cancerígenas do pulmão e no combate ao câncer de mama em mulheres (Stenkvist et al., 1982; Newman et al., 2008; Wang et al., 2012). Enquanto que os flavonoides isoquercitrina e kaempferol apresentam efeitos hipotensores e anti-hipertensivos, atuam no controle da diabetes, aliviando reações alérgicas além de ter propriedades anti-câncer, anti-inflamatórias, antioxidante e diuréticas (Gasparotto Junior et al., 2011; Devi et al., 2015).

Dada a importância dos compostos já identificados no crem e em espécies do mesmo gênero, são necessárias análises qualitativas e quantitativas desses compostos na espécie de interesse pois esta poderá se tornar fonte para obtenção de metabólitos a serem utilizados na fabricação de medicamentos.

REFERÊNCIAS

- ANI, N. N.; HARUN, A. N.; FARHAN, S.; SAMSURI, M.; AHMAD, R. (2015) **Effect of Red and Blue Lights on Photomorphogenesis in *Brassica chinensis***. The Malaysia-Japan Model on Technology Partnership pp. 48 – 58.
- CASSELLS, A.C.; DOYLE, B.M. (2005) **Pathogen and biological contamination management: the road ahead**. In: Loyola-Vargas, V.M., Vázquez-Flota, F, editors. Plant Cell Culture Protocols, Humana Press. New York, USA: 35 – 50.
- CEOLIN, T.; ALTENHOFEN, D.; GIACOMELLI, S.R; CEZAROTTO, V.S; LINARES C.E.B. **Análise dos constituintes químicos e ação farmacológica de *Tropaeolum pentaphyllum* Lam.** In: Anais XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Bento Gonçalves, 2012.
- CHA-UM, S.; CHANSEETIS, C.; CHINTAKOVID, W.; PICHAKUM, A.; SUPAIBULWATANA, K. (2011) **Promoting root induction and growth of *in vitro* macadamia (*Macadamia tetraphylla* L. ‘Keau’) plantlets using CO₂-enriched photoautotrophic conditions**. Plant Cell Tiss Org Cult 106:435 – 444.
- CHANDRA, S.; BANDOPADHYAY, R.; KUMAR, V.; CHANDRA, R. (2010) **Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land**. Biotechnol Lett 32(9):1199 – 1205.
- CORADIN, L.; RIMINSKI, A.; REIS, A. (2011) **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico atual ou Potencial, Plantas para o Futuro – Região Sul**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília – DF.
- DEVI, P. K.; MALAR, D. S.; NABAVI, S. F.; SUREDAC, A.; XIAO, J.; NABAVI, S. M.; DAGLIA, M. (2015) **Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine**. Pharmacological Research doi:10.1016/j.phrs.2015.05.002
- GASHI, B.; ABDULLAI, K.L SOTA, V.; KONGJIKA, E. (2015) **Micropropagation and *in vitro* conservation of the rare and threatened plant *Ramonda serbica* and *Ramonda nathaliae***. Physiol Mol Bio Plants 21(1):123 – 136.
- GASPAROTTO JUNIOR, A.; GASPAROTTO, F. M.; LOURENC, E. L. B.; CRESTANI, S.; STEFANELLO, M. E. A.; SALVADOR, M. J. S.; SILVA-SANTOS, E.; MARQUES, M. C. A.; KASSUYA, C. A. L. (2011) **Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: Evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme**. J Ethnoph 134:363 – 372.
- HOGEWONING, S. W.; TROUWBORST, G.; ENGBERS, G. J.; HARBINSON, J.; VAN IEPEREN, W.; RUIJSCH, J.; SCHAPENDONK, A. H. C. M.; POT, S. C.; VAN KOOTEN, O. (2007) **Plant physiological acclimation to irradiation by light emitting diodes (LEDs)**. Acta Hort 761:183 – 191.
- HUSSAIN, A.; QARSHI, I.A.; NAZIR, H.; ULLAH, I. (2012) **Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities**. In: Recent avances in plant in vitro culture. InTech, pp. 1 – 28.

IAREMA, L. CRUZ, A. C. F.; SALDANHA, C. W.; DIAS, L. L. C.; VIEIRA, R. F.; OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C. (2012) **Photoautotrophic propagation of Brazilian gingseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]**. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 110:227 – 238.

JOHKAN, M.; SHOJI, K.; GOTO, F.; HASHIDA, S.; YOSHIHARA, T. (2010) **Blue light-emitting diode light irradiation of seedlings improves seedling quality and growth after transplanting in red leaf lettuce**. *HortScience* 45:1809 – 1814.

KARPINSKI, S.; SZECHYNSKA-HEBDA, M.; WITUSZYNSKA, W.; BURDIK, P. (2013) **Light acclimation, retrograde signaling, cell death and immune defenses in plants**. *Plant Cell Environ* 36:736 – 744.

KINUPP, V.F. **Plantas alimentícias não-convencionais da região metropolitana de Porto Alegre**, RS. 2007. 562 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Disponível em <http://lume.ufrgs.br/handle/10183/12870>. Acesso em: 14 jan. 2015.

KNOW, A. R.; CUI, H. Y.; LEE, H.; SHIN, H.; KANG, K. S.; PARK, S. Y. (2015) **Light quality affects shoot regeneration, cell division, and wood formation in elite clone of *Populus euramericana***. *Acta Physiol Plant* março/2015 pp.37 – 65.

LINK, K. H.; HUANG, M. Y.; HUANG, W. D.; HSUC, M. H.; YANG, Z. W.; YANG, C. M. (2013) **The effects of red, blue and White light-emitting diodes on the growth development and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var. capitata)**. *Sci Horticult* 150:86 – 91.

MARINO, G.; BERARDI, G. (2004) **Different sealing materials for petri dishes strongly affect shoot regeneration and development from leaf explants of quince ‘BA29’**. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 40:384 – 388.

MOHAMED, M. A. H.; ALSADON, A. A. (2010) **Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets**. *Sci Hort.* 123:295 – 300.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N.A. **Medicinal plants of Brazil**. Algonac: Reference Publications, 2000. 501p.

MURASHIGE, T. (1974) **Plant propagation through tissue culture**. *Ann Rev Plant Physiol* 25:135.

NAING, A. H.; JEON, S. M.; HAN, J.; LIM, S. H.; LIM, K. B.; KIM, C. K. (2014) **Factors influencing *in vitro* shoot regeneration from leaf segments of *Chrysanthemum***. *Comptes Rendus Biologies* 337(6):383 – 390.

NEWMAN, R. S.; YANG, P.; PAWLUS, A. D.; BLOCK, K. I. (2008) **Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents**. *Mol Interv* 8 (1):36 – 49.

NORIKANE, A.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; TANAKA, M. (2013) **Growth of *in vitro* *Oncidesa* plantlets cultured under cold cathode fluorescent lamps with super-elevated CO₂ enrichment**. *AoB Plant* 5:44 – 53.

- OZDEMIR, F. A.; YILDIRIM, M.; KAHRIZ, M. P. (2014) **Efficiente micropropagation of highly economic, medicinal and ornamental plant *Lallemantia iberica* (Bieb.) Fisch, and C. A. Mey.** BioMed Research International vol. 2014, article ID 476346.
- PARK, S. W.; JEON, J. H.; KIM, H. S.; PARLK, Y. M.; ASWATH, C.; JOUNG, H. (2004) **Effect of sealed and vented gaseous microenviroments on hyperhydricity of potato shoots *in vitro*.** Sci. Hort. 99:199 – 205.
- PARK, S. Y.; KIM, M. J. (2010) **Development of zygotic embryos and seedlings is affected by radiation spectral compositions from light emitting diode (LED) system in Chestnut (*Castanea crenata* S. et S.).** J Korean Soc 99:750 – 754.
- RAOMAI, S.; KUMARIA, S.; TANDON, P. (2013) ***In vitro* propagation of *Homalomena aromatica* Schott, an endangered aromatic medicinal herb of Northeast India.** Physiol Mol Biol Plants 19(2):297 – 300.
- SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; NOTINI, M. M.; KUKI, K. N.; da CRUZ, A. C. F.; RUBIO NETO, A.; DIAS, L. L. C.; OTONI, W. C. (2013) **A CO₂-enriched atmosphere improves *in vitro* growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen].** In vitro Cel Devel Biol – Plant 49(4):433 – 444.
- SHA VALLI, K. P. S.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. (2003) **Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions.** Biol Plant 46:161 – 166.
- SILVA, M. M. A.; OLIVEIRA, A. L. B.; OLIVEIRA-FILHO, R. A.; GOUVEIA-NETO, A. S.; CAMARA, T. J. R.; WILLADINO, L. G. (2014) **Effect of blue/red LED light combinationi on growth and morphogenesis of *Saccharum officinarum* plantlets *in vitro*.** Proc SPIE 8947:89471X.
- da SILVA, J. A.; CARDOSO, J. C.; DOBRÁNSZKI, J.; ZENG, S. (2015) ***Dendrobium* micropropagariom: a review.** Plant Cell Rep. 34 (5): 671 – 7104.
- SPARRE, B. Tropeoláceas. In: REITZ, R. (ed.) **Flora Ilustrada catarinense.** Itajaí, SC: Herbário Barbosa Rodrigues (HBR), 1972. 26p.
- STENKVIST, B.; PENGTTSSON, E.; DAHLWYIST, B.; ERICKSSON, O.; JARKRANS, T.; NORDIN, B. (1982) **Cardiac glycosides and breast cancer, revisited.** N Engl J Med 25:306 – 484.
- TSAY, H.; LEE, C.; AGRAWAL, D. C.; BASKRE, S. (2006) **Influence of ventilation closure, gelling agente and explant type on shoot bud proliferation and hyperhydricity in *Scrophularia yoshimurae* – a medicinal plant.** In vitro Cell Dev Biol 42:445 – 449.
- WAIKHOM, S. D.; LOUIS, B. (2014) **Na effective protocol for micropropagation of edible bamboo species (*Bambusa tulda* and *Melocanna bacífera*) through nodal culture.** Sci Word J vol. 2014:345794.

WALIA, N.; KAUR, A.; BABBAR, S. B. (2007) **An efficient, *in vitro* cyclic production of shoots forms adult trees of *Crataeva nurvala* Buch. Ham.** Plant Cell Rep 26:277 – 284.

WANG, Y.; QIU, Q.; SHEN, J.; LI, D.; JIANG, X.; SI, S.; SHAO, R.; WANG, Z. (2012) **Cardiac glycosides induce autophagy in human non-small cell lung cancer cells through regulation of dual signaling pathways.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 44:1813 – 1824.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. (2011) **Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system.** Plant Cell Tissue Organ Cul105:149 – 158.

CAPÍTULO 1

Micropropagação como estratégia de preservação para o crem (*Tropaeolum pentaphyllum* Lam.), uma espécie nativa ameaçada de extinção

RESUMO

SARTOR, Fernanda Raquel, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2016. **Micropropagação como estratégia de preservação para o crem (*Tropaeolum pentaphyllum* Lam.), uma espécie nativa ameaçada de extinção.** Orientador: Marcelo Rogalski. Coorientador: Wagner Campos Otoni.

Tropaeolum pentaphyllum Lam. (Tropaeolaceae) é uma planta nativa da região Sul do Brasil ameaçada de extinção. Esta espécie adquiriu importância significativa na região devido às suas propriedades medicinais, características ornamentais e como fonte alimentícia. Ultimamente, encontra-se sob pressão antrópica grave devido à urbanização e atividades agrícolas que ocorrem em seu habitat natural. O objetivo do presente estudo foi estabelecer um protocolo de propagação *in vitro* por meio da proliferação de gemas axilares utilizando explantes nodais, como técnica auxiliar para a propagação clonal e conservação desta espécie. Foram avaliados sete diferentes meios de cultivo: MS, WPM, Rugini, DKW, DKW/J, JADS e QL, suplementados de vitaminas, sacarose (1,5%) e geleificados com Phytigel® (0,25%). O material vegetal permaneceu acondicionado em sala de crescimento por quatro semanas. O meio de cultura DKW apresentou os melhores resultados sendo significativamente superior ($P > 0,01$) no número de gemas, folhas e comprimento da plântula. Também foi estudado o comportamento do crem em condições heterotróficas, fotomixotróficas e fotoautotróficas utilizando-se três tipos de vedações: 1. tampa rígida de polipropileno; 2. tampa rígida de polipropileno associada à uma membrana porosa; e 3. tampa rígida de polipropileno associada à duas membranas porosas, juntamente com três concentrações de sacarose (0,0; 1,5 e 3%). A vedação do frasco com a presença de duas membranas associada à presença de 1,5% de sacarose, foi a condição de cultivo que influenciou significativamente ($P > 0,01$) aumentando as variáveis estudadas, número de gemas e comprimento da plântula. Diferentes citocininas (BAP, 2ip, ZEA e KIN) foram utilizadas a fim de estimular a multiplicação das brotações. Após quatro semanas de cultivo, não foi observado indução de brotos, pois ocorreu a formação de explantes hiperhídricos, deformação e interrupção do desenvolvimento da lâmina foliar e também formação

calogênica na região basal dos explantes. A inexistência de novos brotos se deve provavelmente à intensa dominância apical demonstrada pela espécie em estudo, assim como as citocininas podem ter auxiliado no desenvolvimento de explantes hiperhídricos bem como à formação calogênica basal. A multiplicação *in vitro* também foi avaliada utilizando meio de cultura líquido juntamente com a presença de diferentes tipos e concentrações de citocininas, anteriormente citadas. Ao final de quatro semanas de cultivo, 100% dos explantes demonstraram-se hiperhídricos, em decorrência da alta umidade no ambiente de cultivo e a presença de citocininas. A utilização de diferentes fontes de luz (lâmpada fluorescente, LED branco, LED azul e vermelho) também foi testada a fim de promover a multiplicação do crem. Os diferentes comprimentos de onda utilizados não influenciaram de maneira significativa na formação de novas brotações, mas foi possível visualizar melhor vigor da planta e expansão da lâmina foliar nos tratamentos submetidos à iluminação por LED. As diferentes concentrações de AIB utilizadas para promover o enraizamento *in vitro* não resultaram na formação do sistema radicular. O sistema de enraizamento *ex vitro* foi efetivo para o protocolo de clonagem de crem. Dois tamanhos de planta (10 ou 20 cm) foram expostos por 5 min à diferentes auxinas (AIB, AIA e ANA) na concentração de 100 mg L⁻¹. A etapa de aclimatização das plantas foi eficiente, com 73,75% de sobrevivência após 5 semanas de cultivo em condições *ex vitro*. Os dados observados se devem à rustificação da cultura nas etapas *in vitro* por meio da presença das membranas que facilitaram as trocas gasosas. A interação desses dois fatores demonstrou ser significativa ($P > 0,05$) para as variáveis número de raízes e comprimento da planta após cinco semanas de cultivo em casa de vegetação. Ao analisar as médias obtidas, verificou-se que tratamentos sem auxina, com AIA ou AIB demonstraram-se superiores na formação do sistema radicular em plantas com 20 cm de comprimento e não diferiram entre si. Ao estudar quantidade de DNA nuclear, concluiu-se que o crem possui aproximadamente 3 pg de DNA nuclear e os tratamentos adotados no protocolo de micropropagação não promoveram alterações no nível de ploidia da espécie.

CHAPTER 1

Micropropagation as a preservation strategy for crem (*Tropaeolum pentaphyllum* Lam.), A native species threatened with extinction

ABSTRACT

SARTOR, Fernanda Raquel, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2016. **Micropropagation as a preservation strategy for crem (*Tropaeolum pentaphyllum* Lam.), A native species threatened with extinction.** Adviser: Marcelo Rogalski. Co-adviser: Wagner Campos Otoni.

Tropaeolum pentaphyllum Lam. (Tropaeolaceae) is a plant native to southern Brazil threatened with extinction. This species has acquired significant importance in the region due to its medicinal properties, ornamental features and as a food source. Lately, it has been under severe anthropogenic pressure due to urbanization and agricultural activities that occur in its natural habitat. The objective of the present study was to establish an in vitro propagation protocol through the proliferation of axillary buds using nodal explants as an auxiliary technique for clonal propagation and conservation of this species. Seven different culture media were evaluated: MS, WPM, Rugini, DKW, DKW / J, JADS and QL, supplemented with vitamins, sucrose (0.15%) and gelled with Phytigel® (0.25%). The plant material remained conditioned in the growth room for four weeks. The DKW culture medium presented the best results being significantly higher ($P > 0.01$) in the number of buds, leaves and length of the seedling. It was also studied the behavior of crem under heterotrophic, photomixotrophic and photoautotrophic conditions using three types of fences: 1. rigid polypropylene cap; 2. rigid polypropylene lid attached to a porous membrane; And 3. rigid lid and polypropylene associated with two porous membranes together with three concentrations of sucrose (0.0, 0.15 and 0.30%). The vial of the flask with the presence of two membranes associated to the presence of 0.15% of sucrose was the condition of culture that influenced significantly ($P > 0.01$) increasing the studied variables, number of buds and length of the seedling. Different cytokinins (BAP, 2ip, ZEA and KIN) were used in order to stimulate the multiplication of shoots. After four weeks of cultivation, no induction of shoots was observed, since the induction of hyperhydric explants, deformation and interruption of leaf blade development and calogenic formation occurred in the basal region of the explants. The absence of new shoots is probably due to the intense apical dominance demonstrated by the species under

study, as well as the cytokinins may have aided in the development of hyperhydric explants as well as the basal calogenic formation. In vitro multiplication was also evaluated using liquid culture medium together with the presence of different types and concentrations of cytokinins, previously cited. At the end of four weeks of culture, 100% of the explants were hyperhydric, due to the high humidity in the culture environment and the presence of cytokinins. The use of different light sources (fluorescent lamp, white LED, blue and red LED) has also been tested in order to promote crem multiplication. The different wavelengths used did not significantly influence the formation of new shoots, but it was possible to visualize better plant vigor and leaf blade expansion in treatments submitted to LED lighting. The different concentrations of IBA used to promote in vitro rooting did not result in the formation of the root system. The difficulty in rooting may be associated with the presence of anthocyanins and flavonoids that participate in the regulation of auxin transport in the plant. The acclimatization stage of the plants was efficient, with 73.75% survival after 5 weeks of cultivation under ex vitro conditions. The observed data are due to the rustification of the culture in the in vitro stages by means of the presence of the membranes that facilitated the gas exchanges. The ex vitro rooting system was effective for the finalization of the crem cloning protocol. Two plant sizes (10 or 20 cm) were exposed for 5 min to the different auxins (AIB, AIA and ANA) at the concentration of 100 mg L⁻¹. The interaction of these two factors was found to be significant ($P > 0.05$) for the number of roots and plant length after five weeks of greenhouse cultivation. When analyzing the obtained means, it was verified that treatments without auxin, with AIA or IBA were superior in the formation of the root system in plants with 20 cm of length and did not differ among them. When studying nuclear DNA, it was concluded that crem has approximately 3 pg of nuclear DNA and the treatments adopted in the micropropagation protocol did not promote changes in the ploidy level of the species.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Tropaeolum pentaphyllum* Lam. pertence à família Tropaeolaceae sendo popularmente conhecida por crem, chagas-miúda, sapatinho-de-iaia, raiz forte, entre outros. Está amplamente distribuída na América do Sul, e particularmente, no Brasil tem maior incidência na região Sul em áreas de florestas de galerias e margens de rios (Seger e Hartz, 2014; López, 2003; Sparre, 1972).

O crem é uma espécie anual, trepadeira que se fixa a suportes pela torção dos pecíolos e seus tubérculos rebrotam na estação seguinte (Sparre, 1972; Guerra et al., 2015). Em condições de cultivo e domesticação é propagada tradicionalmente a partir de tubérculos, esses apresentam dormência das gemas, dificultando a rebrota, o que influencia negativamente na eficiência da taxa de brotação bem como no número de brotos, e como consequência, são variáveis, desuniformes e podem ser lançados distantes dos tubérculos (Otalakoski et al., 2014; Donazzolo et al., 2013; Teixeira et al., 2013; Coradin et al., 2011).

O crem tem indicação popular como alimento e planta medicinal. Os tubérculos são consumidos na forma de conservas há décadas. Na medicina popular as principais propriedades ativas da espécie são: controle da pressão arterial e redução do colesterol (Bolson et al., 2015; Coradin et al., 2011; Kinupp, 2007).

Destaca-se que atividades antrópicas como o extrativismo descontrolado dos tubérculos para o consumo e a expansão das atividades agrossilvopastoris, contribuíram para o crem estar na lista das espécies ameaçadas de extinção do Estado do Rio Grande do Sul (Coradin et al., 2011), sugerindo a necessidade de estudos para a conservação desta espécie como análise genética de populações naturais e dos acessos utilizados para o cultivo visando consumo alimentício da planta, bem como novas estratégias para a domesticação e a produção clonal da espécie.

Nesse contexto, a propagação clonal *in vitro* de acessos de crem constitui uma alternativa promissora para o suprimento constante e homogêneo de material vegetal, com elevada qualidade fitossanitária em um curto espaço de tempo (Melyan et al., 2015; Silva et al., 2014). Esta técnica é aplicada há décadas em diversas espécies (Pacheco et al., 2016; Teixeira da Silva et al., 2015; Ahmad et al., 2015; Mazri e Meziani, 2015). Para o crem a obtenção de clones auxiliará na produção de mudas e consequentemente aumento na produção de tubérculos para o consumo humano.

O estabelecimento de protocolos e sistemas regenerativos *in vitro* podem ser aplicados tanto para a conservação, através da criação de bancos de germoplasma *in vitro* (Gashi et al., 2015), quanto para a propagação em larga escala. A organogênese é a rota de regeneração *in vitro* mais amplamente utilizada e aplicada à diversas espécies, principalmente espécies silvestres. Ocorre organogênese direta quando há formação de uma nova brotação a partir de um meristema pré-existente e quando as células ou tecidos são induzidos a sofrer mudanças originando novas brotações ou quando o processo de regeneração de gemas é precedido pela formação de calos (organogênese indireta) (Snyman et al., 2011).

As respostas morfogênicas estão relacionadas aos fatores endógenos e exógenos. Fatores endógenos correspondem ao material vegetal, como o tipo, a idade do explante e metabolismo. Enquanto que os fatores exógenos estão associados ao meio de cultura e ao ambiente físico (Hussain et al., 2012). Os estímulos às células por meio de reguladores de crescimento, podem torná-las competentes, determinando uma rota morfogênica específica a ser seguida (Ikeuchi et al., 2016; Motte et al., 2014). Fatores exógenos como concentração de nutrientes e a fonte dos sais, o estado físico do meio de cultura, reguladores de crescimento, trocas gasosas no ambiente de cultivo, as condições de temperatura e luminosidade da sala de crescimento podem ser ajustadas *in vitro* para melhor adaptação, crescimento e desenvolvimento da espécie de interesse (Naing et al., 2014; Waikhom e Loius, 2014; Hussain et al., 2012).

Os componentes minerais dos meios de cultura utilizados na micropropagação de plantas dispõem de complexas interações químicas, no entanto, as fontes e concentrações de sais podem ser manipuladas, de acordo com as necessidades da espécie de interesse. Essa manipulação na maioria das vezes ocorre devido às dificuldades no crescimento e desenvolvimento da planta, buscando sempre uma condição nutritiva adequada para cada espécie. Os nutrientes podem ser manipulados por meio da alteração da sua concentração bem como pela fonte proveniente, pois é a condição nutritiva que regula as atividades enzimáticas, constituição da parede celular por meio da manutenção da quantidade de água disponível nos tecidos, além de estarem relacionados às atividades fotossintéticas e respiratórias, como o mecanismo de abertura e fechamento estomático. As adaptações nutritivas ocorrem com maior frequência nos níveis de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e o magnésio (Mengel e Kirkby, 1987; Duke e Reisenauer, 1986; Bielecki e Ferguson, 1983; Koch e Mengel, 1977).

Além da adequação dos nutrientes, a concentração da fonte de carbono deve ser analisada. Nos cultivos heterotróficos a fonte orgânica de açúcar é a responsável pela energia utilizada no crescimento e desenvolvimento da planta (Yaseen et al., 2013). Entretanto, a fonte de açúcar pode não ser ideal para a espécie de interesse. Algumas espécies demonstram baixa taxa multiplicação do explantes, plantas hiperhídricas que condicionam à desordens morfofisiológicas decorrentes do elevado teor de água no interior de seus tecidos, demonstram aspecto translúcido, órgãos menos verdes e facilmente quebráveis, hipertrofia do mesófilo, córtex do caule e das células, maiores espaços intercelulares, falta de cera cuticular, folhas grossas, frágeis, com alterações na densidade e distribuição dos estômatos, nas células-guarda, no número e espessura das camadas da epiderme e do tecido parenquimático, além de desorganização dos tilacoides e baixo número de granas, menor número de cloroplastos e quantidade de clorofila, dentre outros problemas não desejáveis quando se objetiva a obtenção de clones (Marino e Berardi, 2004; Park et al., 2004).

No cultivo heterotrófico há baixos níveis de CO₂ no *hadspace*, produção e acúmulo de etileno, e conseqüentemente, inibição das enzimas do Ciclo de Calvin, em virtude da adição de uma fonte de carbono orgânico ao meio de cultura. Esses fatores podem interferir diretamente nas plantas cultivadas *in vitro*, afetando significativamente a taxa de multiplicação e a sobrevivência das plantas durante o processo de aclimatização em condições *ex vitro* (Aragón et al., 2010; Tanaka et al., 2005a).

A redução da concentração de açúcar no meio de cultura com estímulo às trocas gasosas entre frascos e ambiente externo, por meio de tampas com membranas permeáveis, têm demonstrado resultados promissores em diversas espécies (Sáez et al., 2015; Schmidt et al., 2015; Hassankhah et al., 2014; Vahdati e Hassankhah, 2014; Iarema et al., 2012; Tsay et al., 2006). Essa condição de cultivo reduz a umidade relativa no interior do frasco de cultura, o que faz aumentar a transpiração e absorção de água e nutrientes pela planta (Xiao et al., 2011; Kozai, 2010). Condições fotoautotróficas e/ ou fotomixotróficas ativam a maquinaria fotossintética, estimulam as trocas gasosas entre o ambiente de cultivo e o meio externo, tornando a planta mais rústica e a prepara para a aclimatização em condições *ex vitro* (Norikane et al., 2013; Saldanha et al., 2013; Iarema et al., 2012; Cha-um et al., 2011; Xiao et al., 2011; Sha Valli et al., 2003). A ativação da maquinaria fotossintética e o controle da transpiração são fatores essenciais para a sobrevivência na aclimatização, a qual é uma das etapas mais decisivas para a obtenção de mudas (Cha-um et al., 2010; Mohamed e Alsadon, 2010; Tsay et al., 2006).

Outro fator do cultivo *in vitro* que pode ser alterado é a consistência do meio de cultura. A presença de agente geleificante influencia no potencial mátrico do meio de cultivo, as concentrações ótimas de sais em meio semissólido em geral são mais elevadas quando comparadas ao meio líquido, devido às restrições na velocidade de difusão dos nutrientes impostas pela solidificação. A utilização de meios de cultura semissólidos ameniza a formação de plantas hiperhídricas, porém, em algumas espécies reduz a taxa de multiplicação (Yang et al., 2015). O sistema de propagação utilizando meio de cultura líquido com agitação proporciona maior contato dos explantes com o meio, podendo aumentar a absorção de água e nutrientes quando comparado ao meio semissólido, essa condição favorece a taxa de assimilação de nutrientes, altura e multiplicação dos brotos e ainda no acúmulo de massa seca (Benamar, 2013; Thorpe, 2007). Indesejavelmente pode ocorrer a formação de plantas hiperhídricas (Hvoslef-Eide et al., 2003). Sistemas de propagação *in vitro* utilizando meio de cultura líquido são descritos como bem-sucedidos em bromélias, batata, orquídeas entre outros (Malik et al., 2016; Sandra e Maira, 2013).

As plantas são capazes de perceber a luz, por isso emitem respostas diferentes aos estímulos luminosos. A presença de uma variada gama de pigmentos permite a absorção da energia luminosa ao longo de toda a região da luz visível (Pedmale et al., 2016). A dependência das plantas à luz envolve a ação combinada dos sistemas fotorreceptores, responsáveis por controlar diversos estádios de desenvolvimento vegetal por meio da transdução de sinais (Shahak, 2005). Três classes de fotorreceptores são consideradas principais: criptocromos e fototropinas, que absorvem luz na região do azul (390 – 500 nm) e ultravioleta (320 – 390 nm) e os fitocromos, que absorvem na região do vermelho (600 – 700 nm) e vermelho distante (700 – 750 nm) do espectro (Saitou et al., 2004).

As salas de crescimento *in vitro* em geral são equipadas com lâmpadas fluorescentes, que emitem luz branca com amplo espectro luminoso. Esse tipo de luz produz grande quantidade de calor, e não emite comprimentos de ondas específicos, fatores que podem comprometer o desenvolvimento da planta (Stutte, 2015; Hogewoning et al., 2007). Em vista disso, sistemas de iluminação utilizando Diodos Emissores de Luz (LEDs) tem sido adotado na cultura de tecidos, principalmente pela sua especificidade de comprimento de onda com a saída linear de fótons (Alvarenga et al., 2015; Folta et al., 2005).

A luz vermelha influencia o desenvolvimento das plantas, principalmente pelas alterações nas razões vermelho/ vermelho distante (V:VD), absorvidas pelas formas interconversíveis do fitocromo. Altas razões V:VD estimulam as respostas de alongamento do caule, florescimento e alterações na condutância estomática (Park e Kim,

2010; Smith, 1982). Enquanto que baixas razões V:VD estimulam o florescimento precoce (Almeida e Mundstock, 2001). A dominância apical também é influenciada pelas razões V:VD, alguns autores sugerem que o fitocromo regula o transporte de reguladores de crescimento, incluindo auxinas (Craig e Runkle, 2016; Niemi et al., 2005; Tian e Reed, 2001). O alongamento da parte aérea e a dominância apical, são respostas comuns à luz vermelha, esse processo é mediado pelo fitocromo por meio de controle enzimático, tanto que, as auxinas são conservadas na presença de luz vermelha, mas podem ser degradadas na luz azul (Jeong e Sivanesan, 2015; Marks e Simpson, 1999).

A luz azul atua na quebra da dominância apical pois degrada as auxinas nessa faixa de espectro, proporcionando maior número de brotações laterais (Alvarenga et al., 2015). Também participa dos processos de síntese de pigmentos, abertura e fechamento estomático, ativação do ritmo circadiano da fotossíntese, além de muitos processos fotomorfogênicos (do Nascimento Veira et al., 2015; Johkan et al., 2010; Eckert e Koldenhoff, 2000).

A manipulação do crescimento *in vitro* de diversas espécies pode ser feita por meio da variação da qualidade espectral associada a outros fatores externos, que em conjunto desempenham papéis em respostas morfogênicas, relacionados com a regeneração de brotos, expansão foliar, síntese de pigmentos, otimização do metabolismo primário e também na produção de compostos especializados (Hernández e Kubota, 2016; Karpinski et al., 2013).

A suplementação do meio de cultura MS com 2,0 mg L⁻¹ de BAP (6-benzilaminopurina) e 1,0 mg L⁻¹ de ANA (ácido naftalenoacético) sob iluminação LED vermelho proporcionou maior crescimento da parte aérea e incremento no número de folhas de *Scrophularia takesimensis* no cultivo *in vitro* (Jeong e Sivanesan, 2015), comprovando que a qualidade da luz juntamente com outros fatores, são responsáveis por melhores respostas da planta quando cultivada *in vitro*. Outros estudos utilizando diferentes espectros de LED também demonstraram melhorias para diversas espécies micropropagadas, dentre elas: aumento no número de novas brotações durante a etapa de multiplicação, maior alongamento das brotações, agregação de massa fresca e também expansão da área foliar (Ani et al., 2015; Kwon et al., 2015; Silva et al., 2014; Link et al., 2013; Park e Kim, 2010). Esses resultados podem ser relacionados devido a absorção dos comprimentos de ondas específicos emitidos pelos LEDs por meio dos pigmentos que utilizam desta energia para a síntese de metabólitos essenciais à planta.

Os reguladores de crescimento utilizados na otimização dos meios de cultura também são fatores importantes e que devem ser considerados para o melhor desempenho e obtenção de plantas *in vitro*. Os reguladores vegetais são substâncias orgânicas que quando utilizados em pequenas quantidades, promovem, inibem ou modificam os processos morfológicos e fisiológicos das plantas (Wuyts et al., 2015; Us-Camas et al., 2014; Castro e Vieira, 2001).

As respostas aos reguladores vegetais podem variar de acordo com a espécie, variedade, idade da planta, condições ambientais, estados fisiológicos e nutricionais, estágio de desenvolvimento e balanço hormonal endógeno (Schäfer et al., 2015; Us-Camas et al., 2014; Santoro et al., 2013; Castro e Vieira, 2001). Os reguladores de crescimento são divididos em classes. As citocininas e as auxinas são as mais utilizadas na cultura de tecidos vegetais.

As citocininas estão relacionadas com a divisão e o alongamento celular, promovendo efeitos fisiológicos sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas (Bielach et al, 2012), têm biossíntese no meristema radicular e posteriormente são transportadas, provavelmente pelo xilema, para os outros órgãos (Taiz e Zeiger, 2013). Além disso desempenham importante atividade no desenvolvimento do aparelho fotossintético, com ação no desenvolvimento dos cloroplastos, demonstram ter correlação na recepção da luz e influência no transporte de elétrons, no acúmulo de clorofila e na síntese da rubisco (Dobrąnszki e Mendler-Drienyovsski, 2014; Huang et al., 2014; Nyitrai, 1997). As citocininas também ativam a síntese de proteínas codificadoras do cloroplasto por meio de ambos os genomas, nuclear e plastidial, aumentando a produção de pigmentos fotossintéticos e estimulando a diferenciação dos cloroplastos estruturais (Yamori e Shikanai, 2016; Nyitrai, 1997).

No cultivo *in vitro*, as auxinas são utilizadas a fim de promover a divisão, expansão e diferenciação celular, bem como a formação do sistema radicular, eventos importantes para a obtenção de mudas clonadas bem desenvolvidas (Marhavý et al, 2013; Nandagopal e Ranjitha, 2007; Stefancic et al., 2006; Berleth e Sachs, 2001).

O presente estudo teve como objetivo estabelecer um protocolo de propagação clonal *in vitro* via organogênese de meristemas pré-estabelecidos com o intuito de verificar a influência do meio de cultivo e demais fatores exógenos que potencialmente afetem o desempenho e a morfofisiologia da espécie, proporcionando a obtenção de mudas saudáveis e com capacidade de produzir tubérculos que podem ser comercializados e/ ou utilizados para o consumo da população.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido junto ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II (Bioagro), Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas, Laboratório de Anatomia Vegetal e casa de vegetação da Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG e Laboratório de Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, MG.

2.1 Material vegetal

As plantas matrizes foram cultivadas na casa de vegetação da Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) do Departamento de Biologia Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa, em vasos plásticos de 3 L contendo a mistura de substrato para hortaliças e húmus de minhoca na proporção de 3:1, os quais foram mantidos em condições semi-controladas com temperatura média de 26 ± 3 °C. A irrigação das plantas foi realizada a cada três dias e a cada duas semanas foram feitas suplementações nutritivas com adição de 50 mL de solução de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950) por vaso.

Como explantes para os experimentos *in vitro* foram utilizados meristemas apicais e laterais pré-existent excisados das plantas matrizes.

2.2 Estabelecimento *in vitro* de plantas de crem

O material vegetal foi excisado com o auxílio de bisturi e imerso em água destilada para evitar desidratação e lavagem preliminar. Posteriormente, foi lavado com água corrente por 5 min com posterior imersão em álcool 70% (v/v) por 1 min, desinfestado em solução de hipoclorito de sódio 1,5% de cloro ativo adicionado de Tween 20, e por fim, o excesso de cloro foi retirado do material vegetal por meio de 4 lavagens com água destilada autoclavada.

O material vegetal foi obtido a partir de 8 tubérculos adquiridos comercialmente na Feira da Agricultura e Agroindústria Familiar do município de Três de Maio - RS, os quais foram classificados como 8 diferentes acessos. Os explantes foram categorizados de acordo com a posição na planta matriz: meristema apical, região mediana (região mais próxima da região meristemática) e região basal e posteriormente introduzidos *in vitro* em tubos de ensaio contendo meio de cultura composto de sais e vitaminas do meio MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com sacarose 3% (p/v) e solidificado com 0,25% de Phytigel®. O pH foi ajustado para $5,7 \pm 1$ antes da autoclavagem a 121° C por 20 min. O material vegetal foi mantido em sala de crescimento com

temperatura de 25 ± 2 °C na condição de luz com fotoperíodo de 16h e irradiância de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) utilizando 8 acessos e 3 diferentes explantes, totalizando 24 tratamentos com 6 repetições e cada unidade experimental sendo representada por 6 tubos de ensaio com um explante. Após períodos de 2 e 4 semanas de cultivo foram avaliados parâmetros como porcentagem de contaminação, oxidação, sobrevivência, altura das brotações e número de folhas.

2.3 Crescimento de explantes de crem cultivados em meio MS sob condições fotoautotróficas e fotomixotróficas

Gemas laterais de plantas cultivadas *in vitro* foram utilizadas como explantes para avaliar o desenvolvimento das plântulas de crem sob diferentes condições de trocas gasosas. Para este experimento foi selecionado o acesso e a posição do explante na planta matriz que demonstrou melhor desenvolvimento e menor contaminação no experimento anterior.

O material vegetal foi cultivado em meio composto de sais e vitaminas MS, suplementado com sacarose (0; 1,5 ou 3%) (p/v) e solidificado com 0,25% de Phytigel[®], o pH foi ajustado para $5,7 \pm 1$ antes da autoclavagem a 121 °C por 20 min. Em adição à variação da quantidade de carbono, foram testados três sistemas de vedação do frasco de cultivo: 1. tampa rígida de polipropileno (TP); 2. tampa rígida de polipropileno com um orifício de ventilação (10 mm) coberto com um disco de membrana permeável; 3. tampa rígida de polipropileno com dois orifícios de ventilação (10 mm) cobertos com dois discos de membrana. As culturas foram incubadas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C sob luz branca fluorescente com irradiância de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado utilizando 3 concentrações de sacarose e 3 tipos de vedação do frasco de cultivo, totalizando 9 tratamentos com 6 repetições e cada unidade experimental contendo 5 explantes. Após 4 semanas de cultivo foram avaliados os parâmetros altura das brotações, número de brotações por explantes e número de folhas por explante.

2.4 Indução de brotações *in vitro*

Explantes caulinares obtidos na etapa de estabelecimento contendo duas gemas foram utilizados para verificar o efeito de diferentes citocininas na multiplicação *in vitro*. O material vegetal foi transferido para o meio de cultura MS, sais e vitaminas, com 1,5%

de sacarose e vedado com tampa de polipropileno com dois orifícios de ventilação cobertos com discos de membrana permeável a gás (melhor condição de cultivo obtida no experimento anterior) e suplementado com diferentes concentrações (0,0; 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹) de reguladores de crescimento BAP (6-benzilaminopurina), KIN (cinetina), ZEA (zeatina) e 2ip (isopenteniladenina) independentemente. O material foi incubado em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C sob luz branca fluorescente com irradiância de 60 μmol m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo de 16 h.

O delineamento experimental foi o DIC utilizando 4 tipos de citocininas, 5 concentrações mais o tratamento controle, totalizando 21 tratamentos com 6 repetições contendo 5 explantes. Após 4 semanas de cultivo foram avaliados parâmetros como presença de hiperhidricidade, número de brotações, brotos maiores que 2 cm, comprimento dos brotos formados e número de folhas.

2.5 Estabelecimento do crem em diferentes meios de cultura sob condições heterotróficas

Foram utilizados explantes caulinares com duas gemas laterais e introduzidos em frascos de cultivo contendo 50 mL de meio de cultura: WPM (Lloyd e McCown, 1981), QL (Quoirin e Lepoivre, 1977), DKW (Driver e Kuniyuki, 1984), Rugini (Rugini, 1984), MS (Murashige e Skoog, 1962) ou JADS (Correia, 1993) suplementados com vitaminas padronizadas na mesma concentração para todos os meios de cultura (tabela 1 do anexo - composição dos meios de cultura), sacarose 3% (p/v) e solidificado com 0,25% de Phytigel[®] o pH foi ajustado para 5,7 ± 1 antes da autoclavagem a 121 °C por 20 min. O material vegetal foi mantido em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C na condição de luz com fotoperíodo de 16h e irradiância de 60 μmol m⁻² s⁻¹.

O delineamento experimental foi o DIC utilizando 6 tratamentos (tipos de meio de cultura), com 6 repetições contendo 5 explantes. Após 4 semanas de cultivo foram avaliados os parâmetros como presença de hiperhidricidade, número e comprimento das brotações e brotos maiores que 2 cm.

2.6 Cultivo de crem em diferentes meios de cultura MS e DKW sob condições fotoautotróficas e fotomixotróficas

Explantes caulinares contendo duas gemas laterais, oriundos de plântulas cultivadas *in vitro*, foram utilizados para verificar o estabelecimento de crem sob diferentes condições de trocas gasosas. O material foi cultivado em meio MS ou DKW

suplementado com vitaminas padronizadas, sacarose (0; 1,5 ou 3%) (p/v) e solidificado com 0,25% de Phytigel[®], o pH foi ajustado para $5,7 \pm 1$ antes da autoclavagem a 121 °C por 20 min.

Em conjunto com a variação da quantidade de carbono, foram testados três sistemas de vedação da tampa do frasco de cultivo: 1. tampa rígida de polipropileno; 2. tampa de polipropileno com um orifício de ventilação (10 mm) coberto com disco de membrana permeável a gás (0,45 µm de tamanho do poro); 3. tampa de polipropileno com dois orifícios de ventilação (10 mm) cobertos com discos de membrana permeável a gás (0,45 µm de tamanho do poro). As culturas foram incubadas em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$ na condição de luz com fotoperíodo de 16h e irradiância de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

O delineamento experimental foi o DIC utilizando 2 tipos de meio de cultura, 3 concentrações de sacarose e 3 tipos de vedação do frasco de cultivo, totalizando 18 tratamentos com 6 repetições contendo 5 explantes. Após 4 semanas de cultivo foram avaliados os parâmetros como tamanho dos explantes e explantes maiores que 2 cm a fim de identificar o meio de cultura e concentração de sacarose ideal, bem como o melhor tipo de vedação do frasco de cultivo.

2.7 Efeito de diferentes tipos e concentrações de citocininas na emissão de brotações *in vitro* em meio DKW

Explantes caulinares contendo duas gemas laterais, oriundos de plântulas cultivadas *in vitro*, foram utilizados para verificar o efeito de diferentes citocininas na emissão de brotações. O material vegetal foi transferido para o meio de cultura DKW, sais e vitaminas, com 1,5% de sacarose e vedado com tampa de polipropileno com dois orifícios de ventilação cobertos com dois discos de membrana (melhor condição de cultivo obtida no experimento anterior) e suplementado com diferentes concentrações (0,1; 0,5; 1,0 e 1,5 mg L⁻¹) de reguladores de crescimento (BAP, KIN, ZEA e 2ip) independentemente. O material foi incubado em sala de crescimento com temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$ na condição de luz com fotoperíodo de 16h e irradiância de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

O delineamento experimental foi o DIC utilizando 4 tipos de citocininas, 4 concentrações mais o tratamento controle, totalizando 17 tratamentos com 6 repetições contendo 5 explantes. Após 4 semanas de cultivo foram avaliados parâmetros como presença de hiperhidricidade, número de brotações, brotos maiores que 2 cm e comprimento dos brotos formados.

2.8 Influência da condição lumínica na emissão de novas brotações

Explantes caulinares contendo duas gemas laterais, oriundos de plântulas cultivadas *in vitro*, foram utilizados para verificar o efeito de diferentes condições

lumínicas (luz fluorescente, LED branco, LED azul e vermelho) na multiplicação *in vitro*. O material vegetal foi cultivado em meio de cultura DKW, sais e vitaminas, com 1,5% de sacarose e vedado com tampa de polipropileno contendo dois orifícios de ventilação cobertos com discos de membrana permeável (melhor condição de cultivo obtida no experimento anterior) e suplementado com diferentes concentrações (0,1; 0,5; 1,0 e 1,5 mg L⁻¹) de 2ip. O material foi incubado em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C na condição de luz com fotoperíodo de 16h e irradiância de 60 μmol m⁻² s⁻¹.

O delineamento experimental foi o DIC utilizando 3 tipos de iluminação, 4 concentrações do regulador de crescimento mais o tratamento controle, totalizando 13 tratamentos com 6 repetições contendo 5 explantes. Após 4 semanas de cultivo foram avaliados parâmetros como número de brotações, brotos maiores que 2 cm, comprimento dos brotos formados e número de folhas.

2.9 Indução de brotações em explantes cultivados em meio de cultura líquido sob agitação

Explantes caulinares contendo duas gemas laterais, oriundos de plântulas cultivadas *in vitro*, foram utilizados para verificar o efeito de diferentes citocininas na multiplicação *in vitro* em camada fina de meio de cultura líquido sob agitação. O material vegetal foi cultivado em 10 mL de meio de cultura DKW líquido, sais e vitaminas, com 1,5% de sacarose e suplementado com diferentes concentrações (0,1; 0,5; 1,0 e 1,5 mg L⁻¹) de reguladores de crescimento (BAP, KIN, ZEA e 2ip) independentemente. O material foi incubado sob agitação de 70 rpm, em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C na condição de luz com fotoperíodo de 16h e irradiância de 60 μmol m⁻² s⁻¹.

O delineamento experimental foi o DIC utilizando 4 tipos de citocininas, 4 concentrações mais o tratamento controle, totalizando 17 tratamentos com 6 repetições contendo 5 explantes. Após 4 semanas de cultivo foram avaliados parâmetros como presença de hiperhidricidade, número de brotações, brotos maiores que 2 cm, comprimento dos brotos formados e número de folhas.

2.10 Efeito do AIB no enraizamento *in vitro* de explantes caulinares de crem

Explantes caulinares contendo 4 gemas foram utilizados para verificar o efeito de diferentes concentrações da auxina AIB (ácido indolil-3-butírico) no enraizamento *in vitro*. O material vegetal foi cultivado em meio de cultura DKW semissólido, sais e vitaminas, com 1,5% de sacarose e vedado com tampa de polipropileno com dois orifícios de ventilação cobertos com discos de membrana permeável (melhor condição de cultivo obtida no

experimento anterior) e suplementado com concentrações (0,1; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg L⁻¹) de AIB. O material foi incubado em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C na condição de luz com fotoperíodo de 16h e irradiância de 60 μmol m⁻² s⁻¹.

O delineamento experimental foi o DIC utilizando 5 concentrações de AIB mais o tratamento controle, totalizando 6 tratamentos com 6 repetições contendo 5 explantes. Após 4 semanas de cultivo foram avaliados parâmetros como número e comprimento das raízes.

2.11 Influência do tamanho da planta e do tipo de auxina no enraizamento *ex vitro*

Plantas obtidas *in vitro* com 10 ou 20 cm foram utilizadas para induzir o enraizamento *ex vitro*. As plantas foram submetidas à imersão por 5 min em soluções de 100 mg L⁻¹ de diferentes tipos de auxinas: AIB, AIA (ácido indolilacético) e ANA (ácido naftalenoacético), separadamente.

Após os tratamentos, foram cultivadas em copos de polipropileno cristal com capacidade de 300 mL contendo substrato para hortaliças e húmus de minhoca na proporção 3:1, cobertos com saco de polipropileno, a fim de manter alta umidade do ambiente e mantidas em estante de crescimento com fotoperíodo de 12h e irradiância de 100 μmol m⁻² s⁻¹, por um período de duas semanas com irrigação diária. Posteriormente o material vegetal foi transferido para a casa de vegetação da UCP e em condições semi-controladas de temperatura (26 ± 3 °C) foram cultivadas por mais 3 semanas, quando realizou-se avaliações referentes ao número e comprimento das raízes emitidas por planta.

O delineamento experimental foi o DIC utilizando 2 tamanhos de plantas e 3 tipos de auxinas mais o tratamento controle, totalizando 8 tratamentos com 6 repetições e cada unidade experimental sendo representada por 5 copos de polipropileno contendo um explante, que foram avaliados com 5 semanas de cultivo quanto ao número e comprimento das raízes.

2.12 Aclimatização de plantas de crem

Plantas de 10 ou 20 cm de comprimento, obtidas *in vitro* e enraizadas *ex vitro* foram utilizadas para verificar a porcentagem de sobrevivência na aclimatização. O cultivo se deu em copos de polipropileno cristal com capacidade de 300 mL contendo substrato para hortaliças e húmus de minhoca na proporção 3:1. O material vegetal foi mantido em casa de vegetação da UCP com condições semi-controladas de temperatura (26 ± 3 °C) por um período de 8 semanas.

O delineamento experimental foi o DIC utilizando 2 tamanhos de plantas e 6 repetições compostas por 5 plantas cultivadas individualmente em copos de polipropileno, que foram avaliadas quanto a porcentagem de sobrevivência.

2.13 Diafanização

Para executar as análises de diafanização foi adotada a técnica proposta por Arnott (1959), com modificações. Foram coletadas 5 folhas da mesma planta cultivada durante 4 semanas, referente ao experimento do cultivo do crem em diferentes meios de cultura e condições fotoautotróficas e fotomixotróficas.

Cada folha diafanizada foi montada em lâminas de vidro temporárias. As lâminas foram secas em temperatura ambiente por aproximadamente 5 dias e posteriormente fotografadas digitalmente utilizando Foto microscópio Olympus – AX70 com sistema de captura de imagem acoplado AxionCam HRc – Zeiss. Nas fotos das posições abaxial e adaxial das folhas foi verificado a quantidade, índice e densidade estomática de cada região.

2.14 Estimativa do conteúdo de DNA nuclear de plantas de crem

Para determinar o conteúdo de DNA de crem, foram macerados aproximadamente 25 mg de folhas juntamente com a espécie controle *Pisum sativum* L. cv. “Ctirad”, 2C DNA = 9.09 pg (Doležel et al. 2007). As amostras foram maceradas em placas de Petri contendo 1 mL de tampão LB01 gelado usando lâmina de bisturi para liberação dos núcleos na suspensão (Doležel et al. 1989). Os núcleos foram filtrados em membrana de nylon com mesh de 50 µm e corados usando 30 µL de uma solução de iodeto de propídio (PI, Sigma, USA) preparado 1 mg mL⁻¹ em cada amostra. As análises foram feitas no citômetro de fluxo FACSCantoII™ (Becton, Dickinson and Company, USA). Os histogramas e as avaliações estatísticas foram obtidos utilizando o *software* Flowing, versão 2.5.1. Foram analisadas três amostras por indivíduo para avaliar a variação do conteúdo de DNA entre as amostras das plantas obtidas por meio do cultivo *in vitro* e as plantas matrizes.

2.15 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), os dados foram submetidos a ANOVA e as médias analisadas pelo teste de Tukey com 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estabelecimento *in vitro* de plantas de crem

Explantes com 1-2 cm de comprimento, correspondentes às regiões apical, mediana (mais próxima da região meristemática) e basal de 8 acessos de crem, cultivados em casa de vegetação foram desinfestados, estabelecidos e avaliados quanto à contaminação, oxidação, comprimento das brotações e número de gemas em condições *in vitro*.

O material cultivado não apresentou ocorrência de oxidação. A análise de variância para a contaminação fúngica e bacteriana, não demonstrou diferenças estatísticas entre os fatores testados. Ao analisar as médias obtidas, verificou-se que a contaminação fúngica foi inferior a 10% em cada acesso e região do explante. Salienta-se que não ocorreu contaminação por microrganismos em explantes da região apical do acesso 4 e mediana do acesso 5 (Figura 1).

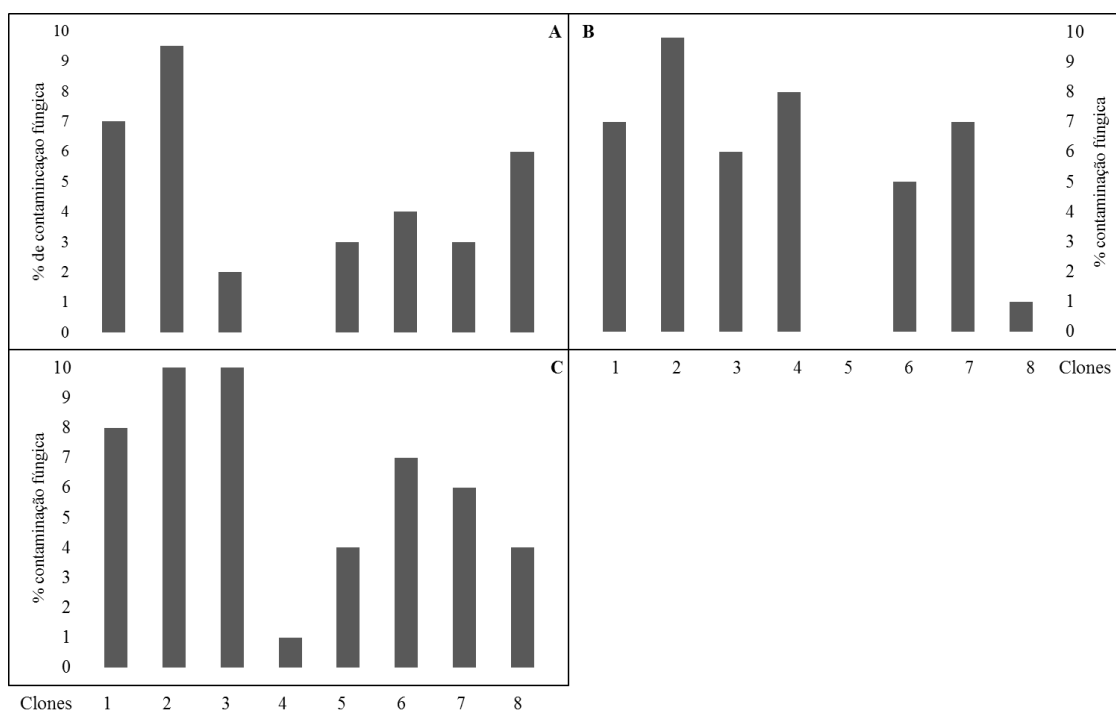


Figura 1. Porcentagem de contaminação fúngica no estabelecimento *in vitro* de 8 acessos de crem com duas semanas de cultivo. A. região apical; B. região mediana; C. região basal.

A baixa incidência de contaminação demonstra que o processo de desinfestação foi efetivo. O acesso e a região do explante não influenciaram na variável contaminação, e pode-se afirmar que todo o material testado tem condições de ser utilizado no cultivo *in vitro* desta espécie.

Acessos de crem foram cultivados no mesmo ambiente e avaliados quanto à emissão de novas gemas e crescimento das brotações a fim de verificar o desenvolvimento *in vitro* e identificar o mais promissor para ser utilizado durante o protocolo de clonagem.

O número de gemas e comprimento das brotações foram significativamente afetados pelo acesso e pela interação acesso x região do explante. Os acessos apresentaram diferentes respostas para o número de gemas com relação as regiões dos explantes utilizados. Os acessos 4 e 5 foram superiores na região apical do explante (7,39) e na região basal do acesso 5 (8,47), na região mediana, o acesso 2 mostrou-se superior aos demais (9,28) seguidos pela região apical do acesso 1 (7,11) (Tabela 1).

Tabela 1. Número de gemas emitidas *in vitro* por 8 acessos de crem, referente à três regiões do explante, avaliados após 4 semanas de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS

Acessos	Número de gemas			
	Região do explante			Média
	Apical	Mediana	Basal	
1	7,11 a	6,78 ab	5,86 ab	6,58 AB
2	0,78 c	9,28 a	1,81 c	3,95 CDE
3	3,00 bc	4,42 bcd	1,64 c	3,02 DE
4	7,39 a	6,36 ab	7,56 ab	7,10 A
5	7,39 a	5,72 abc	8,47 a	7,19 A
6	2,06 bc	1,57 d	3,70 bc	2,44 E
7	5,53 ab	2,31 cd	8,06 a	5,30 BC
8	3,75 bc	3,58 bcd	6,06 ab	4,46 CD
Média	4,62 a	5,00 a	5,40 a	5,00
CV (%)				45,41
F (Acesso)				60,94**
F (Região do explante)				7,07 ^{ns}
F (Acesso x Região do explante)				31,28**

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna (fator acesso), minúscula na linha (fator região do explante) e na interação entre os fatores não diferem significativamente pelo teste de Tukey (5%).

Referente à variável altura média das brotações, o acesso 5 demonstrou-se superior no cultivo da região basal (4,26) do explante, apresentando a maior média, seguido pela região mediana do clone 2 (4,02) e apical do clone 1 (2,89) (Tabela 2).

Tabela 2. Altura média das brotações *in vitro* de 8 acessos de crem, referente à três regiões de explantes, avaliados após 4 semanas de cultivo *in vitro* em meio de cultura MS

Altura média das brotações (cm)				
Acessos	Região do explante			Média
	Apical	Mediana	Basal	
1	2,89 a	3,06 ab	2,24 bcd	2,73 AB
2	0,29 b	4,02 a	0,96 cd	1,75 ABC
3	1,14 ab	1,48 bcd	0,55 d	1,06 BC
4	2,63 a	2,42 abc	2,59 abc	2,55 ABC
5	2,86 a	2,22 abcd	4,26 a	3,11 A
6	0,78 b	0,50 d	1,23 bcd	0,84 C
7	1,99 ab	0,87 cd	2,94 ab	1,93 ABC
8	1,17 ab	1,14 cd	1,88 bcd	1,40 ABC
Média	1,72 a	1,96 a	2,08 a	1,92
CV (%)				54
F (Acesso)				11,79**
F (Região do explante)				1,49 ^{ns}
F (Acesso x Região do explante)				5,52**

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna (fator clone), minúscula na linha (fator região do explante) e na interação entre os fatores não diferem significativamente pelo teste de Tukey (5%).

A ocorrência do bom desempenho de um clone em uma região do explante específica e não em todas as regiões, demonstra que além das características genéticas se faz necessário selecionar o tipo de explante utilizado, considerando o desenvolvimento, idade e localização na planta, além de fatores externos que são determinantes para o desenvolvimento da cultura *in vitro* (Siddique, 2015; Cheng et al., 2013; Collado et al., 2013).

A carência de informações a respeito do cultivo *in vitro* de crem (Binda, 2013) exigiu que diferentes materiais vegetais fossem testados em condições de cultivo padrão, o meio de cultura MS, sem a suplementação de reguladores de crescimento. Esta avaliação foi essencial para conhecer e analisar o crescimento e desenvolvimento da espécie e posteriormente identificar se há ou não a necessidade de adequação de meios de cultura, pois no decorrer dos subcultivos as brotações podem demonstrar sintomas de deficiência ou intoxicação por algum nutriente. É importante ressaltar que para um grande número de espécies além da adequação do meio nutritivo se faz necessária a suplementação com reguladores de crescimento para obtenção do alongamento das plantas (Cosic et al., 2015).

Verificou-se que os clones apresentaram respostas variáveis às regiões dos explantes cultivados quanto à emissão de gemas e crescimento médio das brotações.

Desta forma, o clone 5 foi selecionado para prosseguir com o protocolo de clonagem pois demonstrou o melhor desempenho quanto ao número de gemas e altura média das brotações.

3.2 Análise do crescimento de crem cultivado em meio MS sob condições fotoautotróficas e fotomixotróficas

As gemas laterais de crem cultivadas *in vitro* em condições de trocas gasosas e variação na concentração de sacarose demonstrou diferenças significativas. A formação de novas gemas e o comprimento das brotações foram significativamente afetados pela concentração de sacarose, tipo de vedação e pela interação dos fatores (Tabela 3).

Tabela 3. Número de gemas e altura média das brotações cultivadas durante 4 semanas em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura MS e variação no tipo de vedação do frasco de cultivo

Concentração de sacarose (%)	Número de Gemas			
	Tipo de vedação			Média
	TP	1 membrana	2 membranas	
0	0,76 a	1,88 b	1,28 b	1,31 C
1,5	1,76 a	1,36 b	8,84 a	3,99 A
3	1,92 a	4,48 a	0,40 b	2,27 B
Média	1,88 b	2,57 ab	3,51 a	2,52
CV (%)	78,85			
F (Concentração de sacarose)	33,06**			
F (Tipo de vedação)	116,98**			
F (Concentração de sacarose x Tipo de vedação)	31,49**			
Concentração de sacarose (%)	Comprimento da brotação (cm)			
	Tipo de vedação			Média
	TP	1 membrana	2 membranas	
0	0,24 a	0,56 b	1,07 b	0,62 B
1,5	0,64 a	2,98 a	8,66 a	4,09 A
3	0,81 a	0,74 b	1,00 b	0,85 B
Média	0,56 b	1,42 b	3,57 a	1,85
CV (%)	87,75			
F (Concentração de sacarose)	26,26**			
F (Tipo de vedação)	69,01**			
F (Concentração de sacarose x Tipo de vedação)	26,28**			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna (fator concentração de sacarose), minúscula na linha (fator tipo de vedação) e na interação entre os fatores não diferem significativamente pelo teste de Tukey (5%).

Recipientes de cultivo vedados com duas membranas e a suplementação do meio de cultura com 1,5% de sacarose foi superior para a formação de novas gemas (8,84) bem como proporcionou maior comprimento da brotação (8,66) (Tabela 3). Verificou-se também que nesta condição de cultivo ocorreu maior expansão foliar. O material cultivado em ambiente desprovido de trocas gasosas (TP) e fonte de carbono suplementar foi o que demonstrou o pior desempenho quanto às variáveis observadas (Tabela).

As plantas cultivadas em ambiente sem trocas gasosas e desprovido de fonte de carbono no meio de cultura demonstraram aparência hiperhídrica, fator que impede o desenvolvimento dos explantes e favorece a má formação dos órgãos. Essas características estão relacionadas à elevada umidade relativa retida no interior do frasco de cultivo, que ocasiona restrição na disponibilidade de nutrientes, também no acúmulo de gases (Assis et al., 2016). Resultados semelhantes aos obtidos com crem foram observados durante a propagação *in vitro* de jabuticaba amarela do campo (*Mouriri elliptica*) (Assis et al., 2016) e com *Pfaffia glomerata* (Saldanha et al., 2013).

Com base nos resultados obtidos, é possível afirmar que a presença das membranas proporcionou maiores trocas gasosas entre o ambiente de cultivo e o ambiente externo, eliminando com eficiência o acúmulo de gases prejudiciais ao desenvolvimento da planta *in vitro*.

As membranas porosas também auxiliam na diminuição da umidade relativa do ambiente de cultivo, e com isso melhora a assimilação dos nutrientes essenciais, como o cálcio, que está relacionado com a estrutura, abertura e fechamento estomático (Tanaka et al., 2005b).

O ambiente de cultivo ventilado está relacionado com o incremento no teor de clorofila, densidade estomática, alterações na massa fresca e seca, aumento da área foliar e no comprimento da parte aérea, além da melhoria em diversos aspectos morfofisiológicos, pois as condições de rustificação favorecem a maturidade do material vegetal e funcionamento da maquinaria fotossintética, a fim de metabolizar compostos essenciais para o crescimento e desenvolvimento vegetal (Nguyen et al., 2001).

A utilização de sistemas de cultivo *in vitro* em condições fotoautotróficas e fotomixotróficas, foi utilizada na otimização da cultura de tecidos vegetais de diversas espécies. Fernandes et al. (2013) trabalhando com *Tectona grandis*, Samosir e Adkiins (2014) em estudos com *Cocos nucifera*, experimentos realizados por Martins e colaboradores (2015a,b) com *Billbergia zebrina*, Corrêa et al. (2015), Saldanha et al.

(2013) e Iarema et al. (2012) em estudos com *Pfaffia glomerata*, Pérez et al. (2015) em estudos com *Carica papaya*.

3.3 Indução de brotações *in vitro*

O cultivo dos explantes em meio MS em condições fotomixotróficas (meio de cultura contendo 1,5% de sacarose e trocas gasosas proporcionadas por 2 membranas) e suplementado com diferentes citocininas e em diferentes concentrações não demonstrou diferenças significativas para os fatores e suas interações nas variáveis estudadas (Tabela 4).

Tabela 4. Análise de variância para os fatores de variação e interações nas variáveis número de brotos, brotos maiores que 2 cm e comprimento das brotações cultivadas durante 4 semanas em meio de cultura suplementado por diferentes tipos e concentrações de citocininas, 1,5% de sacarose e duas membranas para ventilação na tampa

Fatores de variação	GL	Nº brotos	Brotos > 2 cm	Comprimento (cm)
Citocinina (C)	3	1.80 ^{ns}	0.02 ^{ns}	1.85 ^{ns}
Concentração (cc)	3	1.51 ^{ns}	0.02 ^{ns}	1.81 ^{ns}
cc X C	9	0.50 ^{ns}	0.03 ^{ns}	1.21 ^{ns}
Controle x fatorial	1	2.67 ^{ns}	0.09 ^{ns}	5.57 ^{ns}
Resíduo	85	0.49	0.02	0.55
CV%		95.89	218.34	108.99

**; * e^{ns}, significativo a 1% e a 5% de probabilidade e não significativo, respectivamente.

A ausência de diferença significativa entre os tratamentos para as variáveis avaliadas pode estar relacionada à ocorrência de hiperhidricidade nos explantes, originada pela elevada umidade relativa contida no interior do frasco além de outros fatores.

A presença de citocininas e/ ou a concentração de sais do meio de cultura contribuiu na formação de explantes hiperhídricos, visto que esta característica também foi verificada nos tratamentos sem a presença de reguladores de crescimento (Figura 2a). Constatou-se que no decorrer do período de cultivo, os tecidos da região apical dos explantes apresentaram-se amarelados, cloróticos e necrosaram gradativamente (Figura 2b), além de formação de calos basais em todos os explantes (Figuras 2a e b)

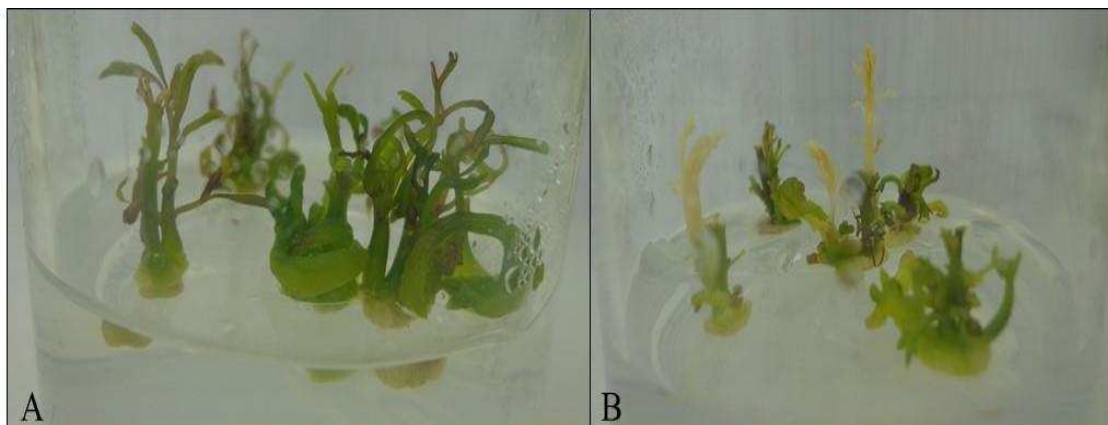


Figura 2. Explantes cultivados *in vitro* na etapa de multiplicação utilizando meio de cultura MS suplementado com 1,5% de sacarose, com variações de citocininas e concentrações, e com duas membranas de ventilação na tampa. A) presença de hiperhidricidade, em todos os tratamentos. B) clorose na região apical e gradativa morte dos explantes, em todos os tratamentos.

Os macronutrientes são essenciais e requeridos em maiores quantidades na nutrição das plantas. Sintomas como amarelecimento e clorose têm relação direta com as concentrações e fontes de nitrogênio e cálcio. A deficiência e toxicidade de nitrogênio resulta em clorose, queda das folhas e inibição do crescimento, enquanto que a deficiência de cálcio causa necrose de regiões meristemáticas apicais e a má formação das paredes celulares (Sale, 2010; Arruda et al., 2000).

Baseado na tabela 1 do anexo, verifica-se que as fontes de nitrogênio do meio MS foram baseadas em altas concentrações de nitrato de amônio e nitrato de potássio o que pode ter causado toxicidade ao explante, ocasionando desenvolvimento desordenado das células e tecidos. A fonte de cálcio foi o cloreto de cálcio em concentração relativamente baixa o que pode estar relacionado à deficiência deste nutriente que causa necrose celular.

3.4 Análise do cultivo do crem em diferentes meios de cultura sob condições heterotróficas

Diferentes composições salinas de meios de cultivo foram avaliadas a fim de verificar o comportamento da planta no cultivo *in vitro*. O número de gemas, comprimento das brotações e o número de folhas foram significativamente afetados pelo tipo de meio de cultura. O cultivo em meio de cultura DKW foi superior em todas as variáveis avaliadas, esses resultados se devem à composição do meio de cultivo relacionado à fonte e concentração dos macro e micronutrientes. Quando comparados ao meio de cultura MS, os principais nutrientes, nitrogênio, cálcio e magnésio, presentes no meio DKW, demonstram diferenças relacionadas à fonte e concentração, além de

desempenhar funções essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta. O nitrogênio está em menor concentração no meio DKW e é oriundo de nitrato de amônio, o nutriente cálcio que possui duas fontes, o cloreto e o nitrato de cálcio, constitui o meio DKW com elevadas concentrações, assim como o magnésio, com quase o dobro da concentração no meio DKW quando comparado ao MS (Tabela 5).

Tabela 5. Número de gemas, comprimento das brotações e número de folhas de explantes cultivados durante 4 semanas em diferentes meios de cultura acrescido de 1,5% de sacarose e duas membranas de ventilação na tampa

Meios de cultura	Nº gemas	Comprimento da brotação (cm)	Nº Folhas
QL	2.9 de	1.3 c	3.1 de
WPM	3.45 cde	1.58 c	3.8 de
DKW	11.4 a	10.28 a	12.8 a
Rugini	7.55 b	6.25 b	8.45 b
JADS	4.4 cd	2.41 c	5.0 cd
MS	2.15 e	1.19 c	2.5 e
CV %	40.2	63.82	36.93
F (Meios de cultura)	51.84**	56.91**	65.60**

Médias seguidas de letras iguais, minúsculas na vertical, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

O cultivo em meio MS foi inferior em todas as variáveis avaliadas, e causou 80,47% de mortalidade dos explantes. Os resultados obtidos provavelmente estão associados à composição do meio de cultura, principalmente a concentração e fontes dos macronutrientes, nitrogênio, cálcio, magnésio, potássio e fosfato.

Analisando a composição dos meios de cultura (Tabela 1 anexo), pode-se verificar que no DKW a fonte de nitrogênio é o amônio (NH^{4+}), disponível em concentração baixa, quando comparada ao meio MS. Enquanto que no meio MS, as fontes de nitrogênio são o amônio e nitrato (NO^{3-}) disponíveis em concentrações altas e semelhantes. A elevada disponibilidade de nitrogênio do meio MS, pode ter causado toxicidade aos explantes, favorecendo e má formação dos órgãos.

O amônio é facilmente assimilado pelas plantas, enquanto que para a assimilação do nitrato é necessária uma reação de redução para posteriormente ele ser metabolizado na forma de amônio (Schonehrr, 2002). Ressalta-se que a presença de elevadas concentrações de amônio pode intoxicar às plantas, interferindo na absorção dos demais nutrientes como o potássio, cálcio e o magnésio (Furtini Neto et al., 2001).

Nas plantas os macronutrientes precisam estar presentes em maiores quantidades pois são essenciais no desempenho das atividades metabólicas. O nitrogênio contribui na

formação de proteínas, moléculas de clorofila, nucleotídeos dos ácidos nucleicos, vitaminas e coenzimas, bem como na formação de gemas (Loreti et al., 1988).

O desenvolvimento de cada espécie vegetal pode variar de acordo com a fonte de nitrogênio disponível e assimilada. Algumas espécies demonstram maior afinidade com amônio, outras com nitrato, e, para muitas, a fonte de nitrogênio não interfere no crescimento e desenvolvimento. Nestes casos os fatores determinantes são o pH do meio de cultura, pois a disponibilidade dos nutrientes é determinada pela faixa de pH atribuída e pelo desempenho metabólico da planta (Epstein e Bloom, 2005).

Ao analisar a tabela 1 do anexo, correspondente à composição dos meios de cultura, verifica-se que o cálcio existente no meio DKW tem origem a partir do cloreto e do nitrato de cálcio. A quantidade desse macronutriente é três vezes superior da existente no MS, que tem como única fonte o cloreto de cálcio. O nutriente magnésio é duas vezes superior no meio DKW, sendo essencial na fotossíntese e em processos metabólicos como a formação de ATP nos cloroplastos. Os sintomas de clorose em explantes cultivados em meio MS podem ser associados à baixa concentração deste nutriente, que afeta as funções metabólicas e estruturais da planta como níveis de clorofila, fotossíntese e síntese proteica (Cole et al., 2016; Verbruggen e Hermans, 2013).

Os dados obtidos neste estudo para as variáveis relacionadas à estrutura das plantas provavelmente estão relacionados à concentração e disponibilidade de cálcio. Este nutriente desempenha função estrutural e no desenvolvimento dos tecidos condutores, participa da ativação do potássio na regulação da abertura e fechamento estomático (Arruda et al., 2000), além de estar diretamente associado à morfogênese, com maior atividade nas regiões de intensa diferenciação celular (Marschner, 1995).

Ressalta-se a importância das fontes e concentrações dos macronutrientes para que ocorra uniformidade na disponibilidade nutritiva, pois estão diretamente associadas ao crescimento e desenvolvimento das plantas.

3.5 Avaliação do crescimento e desenvolvimento *in vitro* de explantes cultivados em meio de cultura MS ou DKW sob condições fotoautotróficas e fotomixotróficas

Avaliando o desenvolvimento *in vitro* de explantes de crem sob diferentes condições de cultivo, observou-se que ocorreram diferenças significativas nos fatores concentração de sacarose, tipo de vedação do frasco de cultivo e meio de cultura para as variáveis emissão de novas gemas e comprimento das brotações.

A interação dos fatores tipo de vedação e concentração de sacarose, bem como meio de cultura e tipo de vedação não demonstraram efeito significativo para as variáveis estudadas.

Com base nos dados da tabela 6, conclui-se que a suplementação com 1,5% de sacarose no meio DKW e vedação do frasco com a presença de duas membranas permeáveis foi a condição de cultivo que resultou em melhor desempenho dos explantes nas variáveis emissão de novas gemas e comprimento das brotações.

Tabela 6. Número de gemas e comprimento do explante de plântulas cultivadas durante 4 semanas em diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura MS ou DKW e com variação no tipo de vedação do frasco de cultivo

Tipo de Vedação	Nº de gemas				Comprimento (cm)			
	Concentração de sacarose (%)							
	0	1,5	3	Média	0	1,5	3	Média
TP	0,93 b	0,08 a	1,48 b	0,83 B	0,67 b	0,76 a	0,06 b	3,12 B
1M	5,13 a	3,93 a	2,18 a	3,75 A	3,59 ab	3,55 a	1,75 b	2,96 B
2M	3,65 ab	7,83 a	3,53 b	5,00 A	5,09 a	8,09 a	3,23 a	5,47 A
Média	3,24 ab	3,95 a	2,40 b	3,19	3,12 ab	4,13 a	1,68 b	3,85
CV (%)			116,18				123,51	
F1 (Tipo de vedação)			172,92**				185,29**	
F2 (Concentração de sacarose)			36,9*				45,47*	
F1 x F2			7,33 ^{ns}				13,50 ^{ns}	
Meio de Cultura	Concentração de sacarose (%)							
	0	1,5	3	Média	0	1,5	3	Média
	MS	0,67 b	5,10 a	0,98 b	2,25 B	0,49 b	4,71 a	0,51 b
DKW	3,71 a	2,50 a	6,15 a	4,12 A	3,42 a	2,51 a	6,23 a	4,05 A
Média	2,19 b	3,8 a	3,56 ab	3,10	1,96 b	3,61 a	3,37 ab	2,98
CV (%)			118,25				127,85	
F1 (Meio de cultura)			79,34*				103,8**	
F2 (Concentração de sacarose)			16,67*				23,8*	
F1 x F2			126,8**				121,2**	
Meio de Cultura	Tipos de Vedação							
	TP	1M	2M	Média	TP	1M	2M	Média
	MS	0,48 b	1,25 b	1,08 b	0,94 B	0,28 a	1,14 b	0,99 b
DKW	3,03 a	5,98 a	7,30 a	5,44 A	2,38 a	5,95 a	7,13 a	7,73 A
Média	1,75 b	3,58 a	4,55 a	3,21	1,33 b	3,55 a	4,02 a	4,47
CV (%)			105,85				115,62	
F1 (Meio de cultura)			455,6**				425,7**	
F2 (Tipo de vedação)			48,53*				63,04**	
F1 x F2			25,51 ^{ns}				31,83 ^{ns}	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna, minúscula na linha e na interação entre os fatores não diferem significativamente pelo teste de Tukey (5%).

Plantas cultivadas via cultura de tecidos não possuem teores de clorofila adequados para sintetizar metabólitos essenciais ao crescimento (Deccetti, 2004). Desta forma, a sacarose atua como fonte de carbono fornecendo energia para o crescimento da planta. A oferta exógena de sacarose também pode desencadear no baixo desenvolvimento da maquinaria fotossintética, dificultando a transição de *in vitro* para *ex vitro*, podendo aumentar as taxas de mortalidade das plantas durante a etapa de aclimatização (Vahdati e Hassankhah, 2014).

Plantas cultivadas sem suplementação de sacarose e sem membranas para trocas gasosas foram as que demonstraram o pior desempenho para as variáveis avaliadas, além da presença de hiperhidricidade nos explantes.

Os bons resultados obtidos pelo cultivo em condições fotomixotróficas estão relacionados à concentração reduzida de sacarose associada às trocas gasosas no ambiente, o que permitiu à planta rustificação, além de proporcionar o funcionamento adiantado da maquinaria fotossintética, promovendo a entrada de CO₂, que é utilizado no processo de síntese de carboidratos por meio da fotossíntese e não apenas a utilizando da fonte exógena de carbono para suprir as necessidades energéticas. A presença de membranas porosas também auxiliou na eliminação de gases indesejáveis ao crescimento da planta evitando a formação de brotos hiperhídricos (Fazal et al., 2016).

As trocas gasosas no ambiente *in vitro* podem aumentar a qualidade das plantas produzidas, assim como influenciar positivamente em sistemas de cultura de raízes, suspensões celulares e calos indiferenciados, além de diminuir a clorose, a senescência foliar e a hiperhidricidade (Vahdati e Hassankhah, 2014).

Resultados semelhantes aos obtidos neste estudo foram observados com noqueira (*Persian walnut*), o meio de cultura DKW associado com 1,5% de sacarose e trocas gasosas proporcionadas por membranas foi a melhor condição de cultivo para a obtenção de plantas vigorosas (Hassankhah et al., 2014).

Plantas cultivadas no meio de cultura DKW demonstraram diferenças significativas para as variáveis estudadas quando comparadas ao cultivo dos explantes em meio MS. O meio DKW proporcionou plantas mais vigorosas (Figura 3) e promoveu melhor desenvolvimento das brotações e expansão da lâmina foliar, o que possibilitou maior absorção de fótons que são utilizados nas reações metabólicas.

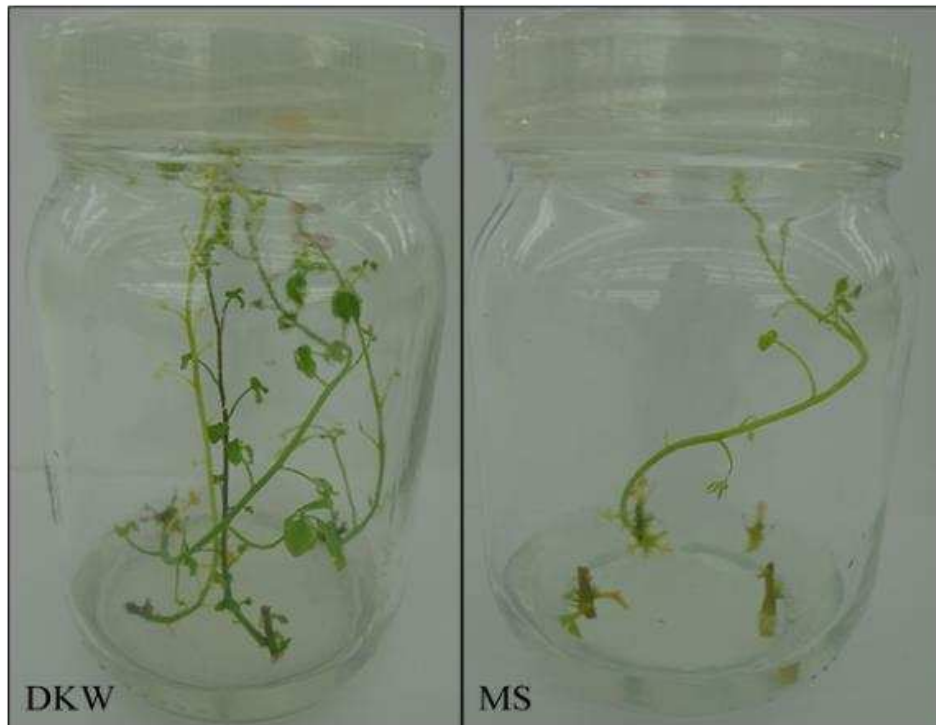


Figura 3. Plantas com 4 semanas de cultivo *in vitro*. A) meio de cultura DKW suplementado do 1,5% de sacarose associado à duas membranas permeáveis. B) meio de cultura MS suplementado do 1,5% de sacarose associado à duas membranas permeáveis.

Não houve mortalidade dos explantes cultivados em meio DKW, provavelmente esta característica têm relação ao balanço e disponibilidade de nutrientes, bem como pelas trocas gasosas que favorecem a diminuição da umidade dentro do ambiente de cultivo, facilitando a disponibilidade de diversos nutrientes, como o cálcio. Enquanto que para as brotações cultivadas em meio MS ocorreu mortalidade, aparência atrofiada e necrótica, baixo número de folhas e pouca expansão da lâmina foliar, com rápida senescência. Essas características podem estar associadas à baixa concentração de nitrogênio e à fonte de cálcio.

3.6 Efeito de diferentes tipos e concentrações de citocininas na emissão de brotações *in vitro*

Os fatores de variação tipo e concentração de citocininas não exerceram diferenças significativas sob explantes de crem cultivados em condições fotomixotróficas para as variáveis: número de brotos, brotos maiores que 2 cm e comprimento.

As citocininas e concentrações testadas não promoveram a emissão de novas brotações, provavelmente este evento está relacionado à intensa dominância apical, que é muito evidente nas plantas matrizes, em que as gemas laterais não se desenvolvem. Outro

fator que pode ter impedido a multiplicação do crem é a existência de elevadas concentrações endógenas de auxinas, impedindo a proliferação de novos brotos e também o desenvolvimento das gemas laterais.

Plantas cultivadas em meio de cultura suplementado com BAP demonstraram-se hiperhídricas. A presença de calos na base do explante e a falta de expansão da lâmina foliar foi verificada em culturas enriquecidas com BAP, ZEA e KIN. Resultados similares também foram obtidos por Oliveira et al. (2007) em estudos com *Annona glabra*.

O efeito da retenção foliar também pode estar relacionado com a formação calogênica no explante, além das citocininas. Os calos podem ter atuado como uma barreira ao fluxo de nutrientes, impedindo a distribuição para toda a planta.

Nos tratamentos em que o meio foi suplementado com 2ip, independente da concentração, as plantas mostraram-se vigorosas, com expansão da lâmina foliar e não ocorreu formação calogênica, porém, o crescimento permaneceu por meio do meristema apical, sem o desenvolvimento de novas brotações (Figura 4).

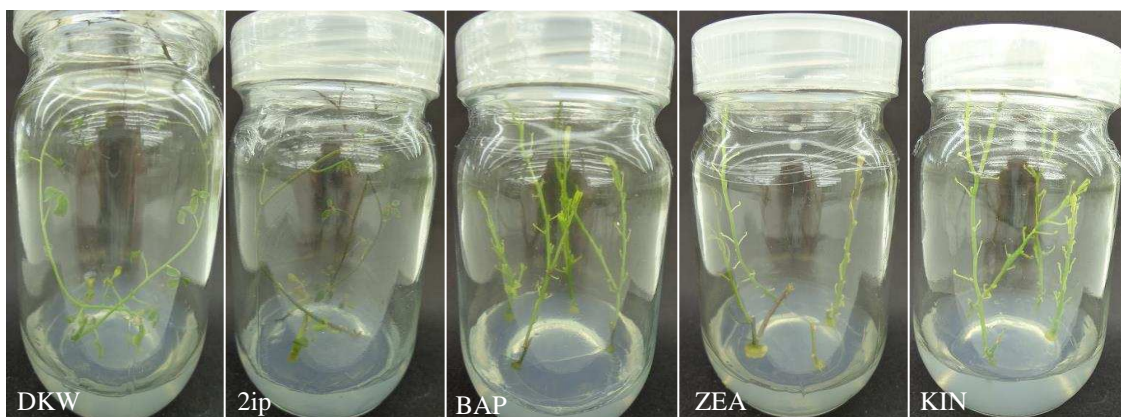


Figura 4. Plantas com 4 semanas de cultivo *in vitro* em meio de cultura DKW suplementado do 1,5% de sacarose associado à duas membranas permeáveis e variação do tipo de citocinina.

A utilização de citocininas no meio de cultura é um fator que contribui para a ocorrência da hiperhidricidade e está relacionado com a concentração utilizada (Oliveira et al., 2010). Algumas espécies demonstram maior sensibilidade a esta alteração fisiológica e mesmo quando cultivadas em meio semissólido com baixa concentração de citocininas a hiperhidricidade ocorre (Carvalho et al., 2013). Resultados semelhantes aos obtidos neste estudo foram identificados em *Lavandula angustifolia*, em que a presença de BAP favoreceu o desenvolvimento de explantes hiperhídricos (Machado et al., 2014).

A hiperhidricidade e consequente má formação de órgãos está associada a agentes causadores de estresses que induzem a baixa ou inexistente atividade de enzimas essenciais em processos bioquímicos relacionados à divisão e crescimento celular, em decorrência da presença de hormônios (Debiasi et al., 2007).

O problema da hiperhidricidade pode ser amenizado com a modificação da concentração de cálcio e magnésio no meio de cultura. Esse elemento desempenha atividades junto à estruturação das membranas celulares impedindo a formação de explantes hiperhídricos quando em concentrações mais elevadas (Machado et al., 2010).

3.7 Influência da condição lumínica na emissão de novas brotações

Os diferentes fatores, condições de luz e concentrações de 2ip avaliados neste experimento, não demonstraram diferenças significativas para as variáveis número de brotações, brotações maiores que 2 cm e comprimento total das brotações (Tabela 7).

Tabela 7: Análise de variância para os fatores de variação e interações quanto ao número de brotos, brotos maiores que 2 cm e comprimento total das brotações de explantes cultivados durante 4 semanas em diferentes comprimentos de onda e concentrações de 2ip no meio de cultura DKW com 1,5% de sacarose e 2 orifícios de ventilação na tampa

Fontes de Variação	GL	Nº brotações	Brotações > 2 cm	Comprimento (cm)
Tipo de luz	2	0,005 ^{ns}	5,19 ^{ns}	29,74 ^{ns}
[Hormônio]	4	0,017 ^{ns}	6,06 ^{ns}	20,37 ^{ns}
Luz x [Hormônio]	8	0,014 ^{ns}	9,87 ^{ns}	25,32 ^{ns}
Resíduo	60	0,015	6,030	14,62
Média		1,02	0,7	7,74
CV (%)		12,3	349,14	49,37

**; * e ^{ns}, significativo a 1% e a 5% de probabilidade e não significativo, respectivamente.

O crescimento das brotações deu-se apenas por meio do meristema apical, o desenvolvimento de novas brotações não ocorreu, independente da concentração de citocininas no meio de cultura e dos comprimentos de onda utilizados. Analisando qualitativamente, as folhas das brotações cultivadas sob lâmpadas LED apresentaram maior expansão da lâmina foliar.

A luz é um fator essencial na regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal, não somente a presença ou ausência luminosa, mas também a variação do comprimento de onda (Batista et al., 2016). A qualidade espectral influencia diretamente no balanço hormonal endógeno da planta, bem como na eficiência dos reguladores de

crescimento adicionados ao meio de cultura (Azmi et al., 2015; Gupta e Jatothu, 2013; Morini e Muleo, 2003).

Os fotorreceptores presentes nas plantas otimizam a captação da energia luminosa a ser empregada na fotossíntese, regulam o crescimento e desenvolvimento do vegetal em relação à presença, quantidade, direção, duração e qualidade da radiação luminosa (Morini e Muleo, 2003).

Para diversas espécies a condição lumínica, em comprimentos de onda próximos ao vermelho e azul, foram determinantes na otimização do crescimento e multiplicação de brotações (Bello-Bello et al., 2016; Azmi et al., 2015; Ma et al., 2015; Nathiva et al., 2013; Gupta e Jatothu, 2013), no cultivo do crem, observou-se brotações mais vigorosas nesses espectros de luz, porém não houve indução de novas brotações.

Os dados obtidos neste estudo sugerem que o crescimento da planta em relação a qualidade da luz é uma característica variável para cada espécie. Para o crem são necessários mais estudos a fim de encontrar um comprimento de onda que proporcione ganhos, em multiplicação da planta, acúmulo de compostos ou até mesmo biomassa.

3.8 Indução de brotações em explantes cultivados em meio de cultura líquido sob agitação

A tentativa de induzir novas brotações cultivando explantes de crem em meio de cultura líquido sob agitação, enriquecido com diferentes citocininas e concentrações resultou na presença de hiperhidricidade em 100% do material cultivado. Esta característica impediu o crescimento e desenvolvimento das brotações, ocasionou deformação das folhas e demais órgãos, além de aparência encharcada e quebradiça dos tecidos (Figura 5).

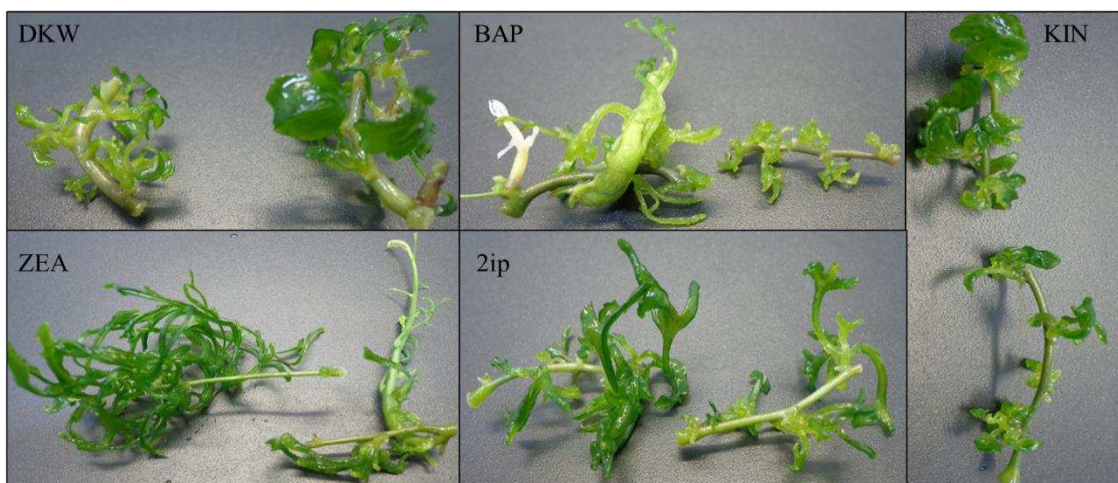


Figura 5. Plantas com 4 semanas de cultivo *in vitro* em meio de cultura DKW líquido suplementado com 1,5% de sacarose e variação do tipo de citocinina.

Para diversas espécies o cultivo em meio de cultura líquido auxilia no crescimento e multiplicação (Badr-Elden et al., 2012; Barakat e El-Sammak, 2011; Maheshwari e Kovalchuk, 2011). O sistema líquido proporciona maior disponibilidade de nutrientes devido a maior superfície de contato entre o meio de cultura e o explante, também há melhor intercâmbio de fases atmosféricas como O₂ e CO₂ em recipientes que ficam sob agitação constante do meio (Guerra et al., 1999).

A hiperhidricidade é classificada como um distúrbio metabólico da planta, podendo ocorrer em diferentes níveis de severidade (Kharrazi et al., 2011) devido à alta umidade relativa, elevando o estresse oxidativo e também está relacionada à presença de citocininas (Trivedi, 2016; Mazri, 2015; Sarethy et al., 2014). A formação de um explante hiperhídrico decorre da elevada difusão passiva da água para dentro dos tecidos, é considerada uma anomalia morfológica e anatômica, desencadeando uma série de deformações que tornam o explante inviável (Kevers et al., 2004; Franck et al., 2001) por ter efeitos sobre os cloroplastos, impede a deposição de cera epicuticular, reduz a produção de lignina e celulose ocasionando baixa resistência da parede celular (Chakrabarty et al., 2006; Franck et al., 2004; Picoli et al., 2001; Debergh et al., 1992).

3.9 Efeito do AIB no enraizamento *in vitro* de explantes caulinares de crem

Ao avaliar o efeito do AIB no enraizamento *in vitro*, constatou-se que não ocorreu diferença significativa entre as concentrações testadas.

O AIB não induziu raízes nas brotações durante o cultivo *in vitro* de crem. Ocorreu formação de calos na base dos explantes cultivados em concentrações superiores a 1,0 mg L⁻¹, e os tratamentos utilizados não demonstraram diferenças significativas para o crescimento das brotações.

Haissig (1974) sugeriu que a formação de primórdios radiculares está associada à necessidade de conjugados de AIA-fenóis, sintetizados com a participação de enzimas, como peroxidases, desta forma a adição de compostos fenólicos seria uma alternativa para contornar à dificuldade no enraizamento *in vitro* de algumas culturas. Em macieira (*Malus domestica*), a suplementação do meio de cultura por floroglucinol acelerou o enraizamento e também impediu a formação calogênica (Zanol et al., 1997).

Entende-se que o enraizamento *in vitro* é uma etapa importante de um protocolo de micropropagação, em especial para espécies tuberosas, pois a obtenção dos tubérculos é totalmente dependente do sistema radicular. Porém, o sistema radicular obtido *ex vitro*

é mais resistente e para diversas espécies ocorre em maior porcentagem (Aina et al., 2015; Patel et al., 2014; Phulwaria et al., 2013; Ranaweera et al., 2013).

3.10 Enraizamento *ex vitro*

Ocorreu a formação do sistema radicular em 81,24% das plantas cultivadas. O tamanho da planta e o tipo de auxina não demonstraram diferenças estatísticas significativas para as variáveis número de raiz e comprimento da raiz, enquanto que a interação dos fatores foi significativa ao nível de 1% para a variável número de raiz. Os fatores, tipo de auxina e tamanho inicial da planta afetaram significativamente o comprimento final da planta. Plantas com tamanho inicial de 20 cm, submetidas às auxinas AIA (26,45), seguidas do AIB (23,87) ou foram superiores para esta variável após cinco semanas de cultivo *ex vitro* (Tabela 8).

Tabela 8: Número e comprimento das raízes e das plantas de crem expostas à diferentes citocininas cultivadas durante 5 semanas em substrato em condições de casa de vegetação

Auxina	Nº raízes			Comprimento das raízes (cm)			Comprimento da planta (cm)		
	Tamanho (cm)								
	10	20	Média	10	20	Média	10	20	Média
Sem auxina	0,57 Ab	1,03 Aa	0,8 A	0,59 Aa	0,92 Aa	0,76 A	13,42 Ab	23,83 Aa	13,62 B
AIA	1,03 Aab	0,47 Aa	0,75 A	1,09 Aa	0,41 Aa	0,75 A	15,55 Ab	26,45 Aa	14,40 B
AIB	0,60 Aab	0,73 Aa	0,67 A	0,53 Aa	0,53 Aa	0,53 A	13,82 Ab	23,87 Aa	23,85 A
ANA	1,37 Aa	0,53 Ba	0,95 A	1,03 Aa	0,34 Aa	0,69 A	13,25 Bb	22,92 Ba	24,69 A
Média	0,89 a	0,69 a	0,72	0,81 a	0,55 a	0,68	14,01 b	24,26 a	19,14
CV (%)			63,07			91,2			9,92
F (Auxina)			0,17 ^{ns}			0,13 ^{ns}			423,40 ^{**}
F (Tamanho da planta)			0,48 ^{ns}			0,82 ^{ns}			21,92 [*]
F (Auxina x Tamanho da planta)			1,09 ^{**}			0,77 ^{ns}			10,62 [*]

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna, minúscula na linha e na interação entre os fatores não diferem significativamente pelo teste de Tukey (5%).

Com base nos resultados obtidos, constatou-se que o enraizamento *ex vitro* demonstrou eficiência para o crem, porém não ocorreram diferenças significativas para o número e comprimento das raízes dentre os tratamentos testados.

As raízes obtidas em condições *ex vitro* são mais eficientes em diversas espécies. Elas mostram-se funcionais devido a firmeza, presença de pelos radiculares, conexões vasculares e desenvolvimento das raízes secundárias (Huang et al., 2011; Annapurna e Rathore, 2010; Liu et al, 2010; Saiju, 2005; George, 1993). O enraizamento *ex vitro* torna-se uma alternativa para espécies de difícil enraizamento *in vitro*, oferecendo condições

para melhorar a eficiência na micropropagação (Singh e Agarwal, 2016; Mohammed et al., 2015; Lodha et al., 2015; Rathore et al., 2015, 2013; Borkowska, 2001).

3.11 Aclimatização

A porcentagem de plantas aclimatizadas após 8 semanas de cultivo em casa de vegetação foi de 73,75%.

Acredita-se que a alta sobrevivência das plantas esteja relacionada ao desenvolvimento do sistema radicular durante o enraizamento *ex vitro* e às condições fotomixotróficas utilizadas nas etapas *in vitro*. A condição de trocas gasosas proporcionadas pelas membranas favorece a rustificação e maturação do material vegetal, auxiliando na melhor adaptação durante a aclimatização (Assis et al., 2016).

Observou-se também que após oito semanas de cultivo o sistema radicular apresentou-se bem desenvolvido o que favoreceu a formação de pequenos tubérculos em diversas plantas, independente do tratamento com auxina na etapa de enraizamento.

Os dados obtidos mostram que a indução do enraizamento *ex vitro*, concomitante com a fase de aclimatização, pode ser favorável à produção de mudas de crem. A principal vantagem desse processo é a superação das limitações impostas pelo enraizamento *in vitro*, pois as raízes produzidas raramente são funcionais após sua transferência para a casa de vegetação.

3.12 Diafanização

A diafanização foi realizada a fim de classificar a espécie em estudo quanto a posição e quantidade de estômatos, bem como verificar se a condição de cultivo interfere na quantidade de células estomáticas.

A principal característica desta espécie é a pequena quantidade de estômatos, independente da condição de cultivo da planta. Os estômatos estão presentes em ambas as faces, com maior incidência na face abaxial (folhas anfihipoestomáticas). A classificação como anfihipoestomática também foi designada à uma espécie do mesmo gênero do crem, *Tropaelum majus* (capuchinha), em estudo realizado por Zanetti et al. (2004).

Plantas cultivadas em casa de vegetação apresentaram maior média para número de estômatos (13,33 estômatos na face abaxial), seguida do tratamento composto por meio de cultura DKW, enriquecido com 3% de sacarose e com a presença de duas membranas

(13 estômatos na face abaxial). Pode-se relacionar esses resultados à presença de trocas gasosas, que exige maior número de estômatos que captam CO₂ para ser metabolizado.

Os tratamentos em condições heterotróficas demonstraram-se inferiores quanto à incidência de células estomáticas nas folhas, sendo inferiores às condições de cultivo fotomixotróficas na face abaxial e não existindo estômatos na face adaxial. Pode-se inferir que a presença de membranas que proporcionam trocas gasosas e permitem maior entrada de CO₂ no ambiente de cultivo, principal substrato para a fotossíntese (Sun et al., 2011), auxiliou na formação de estômatos e com isso induziu a rustificação das brotações promovendo o funcionamento da maquinaria fotossintética.

A maior densidade estomática na face abaxial das folhas ocorre para promover a manutenção do balanço hídrico da planta e também a fixação de carbono. Na face abaxial, os estômatos quando abertos, proporcionam menor perda de água, pois a lâmina foliar está menos exposta (Assmann e Jegla, 2016).

3.13 Estimativa do conteúdo de DNA nuclear

Por meio da citometria de fluxo foi determinado os valores relativos à quantidade de DNA nuclear, gerando histogramas que diferenciaram as fases G₀/G₁ e G₂. Somente um histograma entre o padrão utilizado e os tratamentos está apresentado (Figura 6), uma vez que as repetições apresentaram perfis semelhante.

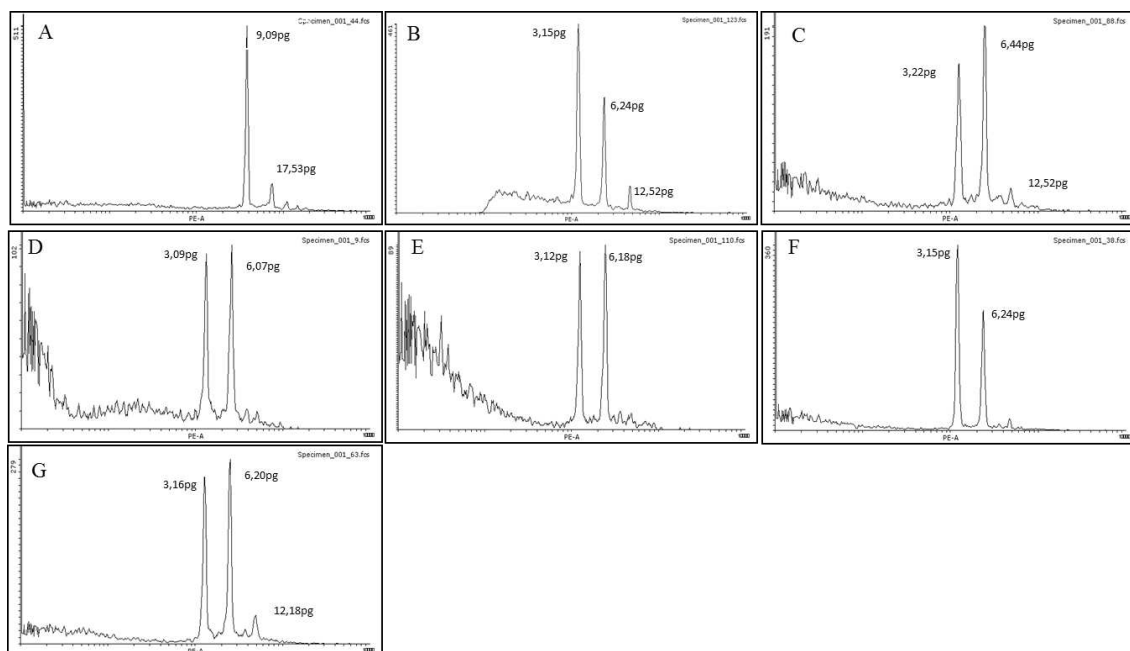


Figura 6. Histogramas do conteúdo relativo de DNA nuclear obtidos após coloração com iodeto de propídio: A) *Pisum sativum*; B) Planta matriz de *T. pentaphyllum* cultivada em casa de vegetação; C) *T. pentaphyllum* obtida *in vitro* sem adição de reguladores de

crescimento; D) *T. pentaphyllum* enraizada sem tratamento com auxinas; E) *T. pentaphyllum* enraizada com tratamento por AIA; F) *T. pentaphyllum* enraizada com tratamento por AIB; G) *T. pentaphyllum* enraizada com tratamento por ANA.

Os histogramas gerados apresentaram um pico maior correspondente aos núcleos da fase G₀/G₁ do ciclo celular, um pico menor correspondente à fase G₂ e uma região entre os dois picos referente aos núcleos em fase S.

O maior coeficiente de variação (CV) entre as análises foi de 3,46%. Coeficiente de variação menores que 5% são considerados de alto nível de resolução (Doležel, 1997) e indicaram que os procedimentos de extração e coloração das suspensões nucleares possibilitaram a obtenção de núcleos intactos e corados uniformemente (Yanpaisan et al., 1999).

Pelos valores de leitura dos picos referentes à fase G₀/G₁ calculou-se os valores absolutos em picogramas (pg) de DNA/2C de *Tropaeolum pentaphyllum* ao longo do protocolo de micropropagação. A análise determinou a quantidade de DNA nuclear na planta, aproximadamente 3,10 pg de DNA nuclear, informação importante pois até o momento não há caracterização genética sobre a espécie em estudo. Salienta-se que as plantas que foram obtidas por meio do cultivo *in vitro* não apresentaram variações quando comparadas às plantas matrizes.

4. CONCLUSÕES

O meio de cultura DKW é o mais indicado para o cultivo *in vitro* de crem pois proporcionou melhor crescimento e vigor das brotações e também ausência de explantes hiperhídricos.

Condições de cultivo fotomixotróficas: 1,5% de sacarose associado com a presença de duas membranas porosas, otimizaram o crescimento e desenvolvimento das plantas, devido às trocas gasosas proporcionadas pelas membranas que favoreceram a rustificação do material vegetal e induziram a produção autotrófica de açúcares.

Tipos e concentrações de citocininas e meio de cultura não foram efetivos e causaram a hiperhidricidade dos explantes.

O cultivo de crem em meio de cultura líquido causou hiperhidricidade em 100% do material cultivado, este resultado pode ser associação à condição física do meio de cultura, que proporcionou maior superfície de contato com a brotação e permitiu excessiva entrada de água nos tecidos, dando aspecto encharcado e vítreo.

Diferentes condições lumínicas proporcionaram maior vigor às plantas, expansão da lâmina foliar e provavelmente auxiliaram na sobrevivência e manutenção, porém não foi fator determinante na emissão de novas brotações.

As plantas enraizadas *ex vitro* desenvolveram sistema radicular, independente da utilização de auxinas. No sistema de enraizamento *in vitro* a presença de auxina não demonstrou diferença significativa, os tratamentos testados não foram eficientes na formação do sistema radicular.

O sistema de aclimatização foi efetivo e proporcionou a sobrevivência de aproximadamente 75% das plantas obtidas por meio do cultivo *in vitro* e enraizadas *ex vitro*.

O crem pode ser classificado como uma espécie anfihipoestomática, devido à pouca quantidade e localização dos estômatos na face abaxial das folhas. O sistema de cultivo fotomixotrófico auxiliou na formação dos estômatos o que também favoreceu a posterior aclimatização das plantas.

Com a análise de citometria de fluxo determinou-se a quantidade de DNA nuclear da espécie estudada, em torno de 3,10 pg, e constatou-se que as plantas obtidas *in vitro* não demonstraram alteração na ploidia.

5. REFERÊNCIAS

- AHMAD, N.; SHAHID, A.; JAVED, S. B.; KHAN, M. I.; ANIS, M. (2015) **Micropropagation of *Vitex* spp. through *in vitro* manipulation: Current status and future prospectives.** Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 2(4):114-123.
- AINA, O. O.; QUESENBERRY, K. H.; GALLO, M. (2015) **Culture vessel and auxin treatments affect *in vitro* rooting and *ex vitro* survival of six *Arachis paraguariensis* genotypes.** Sci Hortic. 183:167–171.
- ALMEIDA, M. L.; MUNDSTOCK, C. M. (2001) **O afilhamento da aveia afetado pela qualidade de luz em plantas sob competição.** Ciência Rural, 31(3):393-400.
- ALVARENGA, I. C. A.; PACHECO, F. V.; SILVA, S. T.; BERTOLUCCI, A. K. V.; PINTO, J. E. B. P. (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(2):299-308.
- ANI, N. N.; HARUN, A. N.; FARHAN, S.; SAMSURI, M.; AHMAD, R. (2015) **Effect of Red and Blue Lights on Photomorphogenesis in *Brassica chinensis*.** The Malaysia-Japan Model on Technology Partnership pp.48–58.
- ANNAPURNA, D.; RATHORE, T. S. (2010) **Direct adventitious shoot induction and plant regeneration of *Embelia ribes* Burm F.** Plant Cell Tiss Organ Cult. 101:269–277.
- ARAGÓN, C.; CARVALHO, L.; GONZÁLEZ, J.; ESCALONA, M.; AMÂNCIO, M.; (2010) ***Ex vitro* acclimatization of plantain plantlets micropropagated in temporary immersion bioreactor.** Biologia Plantarum, 54:237-244.
- ARNOTT, H. J. (1959) **Leaf clearings.** Turtox News. 37 (8):192–194.
- ARRUDA, S. C. C.; SOUZA, G. M.; ALMEIDA, M.; GONÇALVES, A. N. (2000) **Anatomical and biochemical characterization of the calcium effect on *Eucalyptus urophylla* callus morphogenesis *in vitro*.** Plant Cell Tiss Organ Cult. 63(2):143–154.
- ASSIS, E. S. de; RUBIO, A. N.; RIGONATO, L. L. de; SILVA, F. G.; ROSA, M.; FILHO, S. C. V.; SILVA LEITE, M. (2016) **“*In vitro*” culture of “*Mouriri elliptica*” (Mart.) under conditions that stimulate photoautotrophic behavior.** Aus J Crop Sci. 10(2):229–236.
- ASSMANN, S. M.; JEGLA, T. (2016) **Guard cell sensory systems: recent insights on stomatal responses to light, abscisic acid, and CO₂.** Current Opinion in Plant Biology. 33:157-167.
- AZMI, N. S.; AHMAD, R.; LBRAHIM, R. (2015) **Effect of LED lights, plant growth regulator and photoperiod on shoot production of *in vitro* propagated *Rosa* spp.** ICSSA. 161–165.
- BADR-ELDEN, A. M.; NOWER, A. A.; IBRAHIM, I. A.; EBRAHIM, M. K. H.; ABDELAZIEM, T. M. (2012) **Minimizing the hyperhydricity associated with *in vitro* growth and development of watermelon by modifying the culture conditions.** Afr J Biotechnol. 11:8705–8717.

- BARAKAT, M. N.; EL-SAMMAK, H. (2011) ***In vitro* culture and plant regeneration from shoot tip and lateral bud explant of *Gypsophila paniculata* L.** J Med Plant Res. 5:3351–3358.
- BATISTA, D. S.; CASRO, K. M.; SILVA, A. R.; TEIXEIRA, M. L.; SALES, T. A.; SOARES, L. I.; CARDOSO, M. G. DAS; SANTOS, M. O.; VICCINI, L. F.; OTONI, W. G. (2016) **Light quality affects *in vitro* growth and essential oil profile in *Lippia alva* (Verbenaceae).** In Vitro Cell. Dev. Biol., Plant. 52(3): 276-282.
- BELLO-BELLO, J. J.; MARTÍNEZ-ESTRADA, E.; CAAMAL-VALÁZQUEZ, J. H.; MORALES-RAMOS, V. (2016) **Effect of LED light quality on *in vitro* shoot proliferation and growth of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews).** Afr J Biotechnol. 15(8):272–277.
- BENAMAR, A.; PIERART, A.; BAECKER, V.; AVELANGE-MACHEREL. M. H.; ROLLAND, A.; GAUDICHON, S.; GIOIA, L. di; MACHEREL, D. (2013) **Simple system using natural mineral water for high-throughput phenotyping of *Arabidopsis thaliana* seedlings in liquid culture.** Int J High Throughput Screen 4:1–15.
- BERLETH, T.; SACHS, T. (2001) **The morphogenesis: long distance coordination and local patterning.** Current Opinion in Plant Biology, 4:57-62.
- BIELACH, A.; PODLEŠÁKOVÁ, K.; MARHAVÝ, P.; DUCLERCQ, J.; CUESTA, C.; MÜLLER, B.; GRUNEWALD, W.; TARKOWSKI, P.; BENKOVÁ, E. (2012). **Spatiotemporal regulation of lateral root organogenesis in *Arabidopsis* by cytokinin.** Plant Cell, 24:3967–3981.
- BIELESKI, R. L.; FERGUSON, I. B. Physiology and metabolism of phosphate and its compounds. In: **Inorganic plant nutrition.** Springer Berlin Heidelberg, 1983. 422-449p.
- BINDA, C.S **Quantificação de inulina em diferentes estádios de desenvolvimento de crem (*Tropaeolum pentaphyllum*) cultivados em campo e micropropagados.** 2013. 57f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS.
- BOLSON, M.; HEFLER, S. R.; CHAVES, E. I. D.; GASPAROTTO JUNIOR, A.; CARDOZO JUNIOR, E. L. (2015) **Ethno-medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil.** J. Ethnopharm. 161:1–10.
- BORKOWSKA, B. (2001) **Morphological and physiological characteristics of micropropagated strawberry rooted *in vitro* or *ex vitro*.** SciHort. 89:195–206.
- CARVALHO, D. C.; LOPES DA SILCA, A. L.; SCHUCK, M. R.; PURCINO, M.; TANNO, G. N.; BIASI, L. A. (2013) **Fox grape cv. Bordô (*Vitis labrusca* L.) and grapevine cv. Chardonnay (*Vitis vinífera* L.) cultivated *in vitro* under different carbohydrates, amino acids and 6-benzylaminopurine levels.** Braz Arch Biol Technol. 56:191–201.
- CASTRO, P. R. C.; VIEIRA, E. L. (2001) **Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical.** Guaíba: Agropecuária, 132 p.
- CHAKRABARTY, D. S.; PARK, Y.; ALI, M. B.; SHIN, K. S.; PACK, K. Y. (2006) **Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects.** Tree Physiol. 26:377– 388.

- CHA-UM, S.; CHANSEETIS, C.; CHINTAKOVID, W.; PICCHAKUM, A.; SUPAIBULWATANA, K. (2011) **Promoting root induction and growth of *in vitro* macadamia (*Macadamia tetraphylla* L. 'Keau') plantlets using CO₂-enriched photoautotrophic conditions.** *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 106:435–444.
- CHA-UM, S.; ULZIIBAT, B.; KIRDAMANEE, C. (2010) **Effects of temperature and relative humidity during *in vitro* acclimatization, on physiological changes and growth charcteres of Phalaenopsis adapted to *in vivo*.** *Australian Journal of Crop Science*, 4:750-756.
- CHENG, Y.; MA, R.; JIAO, Y.; QIAO, N.; LI, T. (2013) **Impact of genotype, plant regulators and activated charcoal on embryogenesis induction in microspe culture of pepper (*Capsicum annum* L.)** *S Af J Bot.* 88:306–309.
- COLE, J. C.; SMITH, M. W.; PENN, C. J.; CHEARY, B. S.; CONAGHAN, K. J. (2016) **Nitrogen, phosphorus, calcium, and magnesium applied individually or as a slow release or controlled release fertilizer increase growth and yield and affect macronutrient and micronutrient concentration and content of field-grown tomato plants.** *Sci. Hort.* 211: 420-430.
- COLLADO, R.; VEITÍA, N.; BERMÚDEZ-CARABALLOSO, I.; GARCÍA, L. R.; TORRES, D.; ROMERO, C.; RODRÍGUEZ LORENZO, J. L.; ANGENON, G. (2013) **Efficient *in vitro* plant regeneration via indirect organogenesis for different common bean cultivars.** *Sci Hort* 153:109–116.
- CORADIN, L.; RIMINSKI, A.; REIS, A. (2011) **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico atual ou Potencial, Plantas para o Futuro – Região Sul.** Ministério do Meio Ambiente, Brasília – DF.
- CORRÊA, J. P. O.; VITAL, C. E.; PINHEIRO, M. V. M.; BATISTA, D. S.; AZEVEDO, J. F. L.; SALDANHA, C. W.; CRUZ, A. C. F. da; DAMATTA, F. M.; OTONI, W. C. (2015) ***In vitro* photoautotrophic potential and *ex vitro* photosynthetic competence do *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen accessions.** *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 121 (2):289–300.
- CORREIA, D. **Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de *Eucalyptus* spp. em meio de cultura líquido e sólido.** 1993. 113 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- COSIC, T.; MOTYKA, V.; RASPOR, M.; SAVIÉ, J.; CINGEL, A.; VINTERHALTER, B.; VINTERHALTER, D.; TRÁVNÍCKOVÁ, A.; DOBREV, P. IL BOHANEC, B.; NINKOVIC, S. (2015) ***In vitro* shoot organogenesis and comparative analysis of endogenous phytohormones in kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*): effects of genotype, explant type and applied cytokinins.** *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 121 (3):741-760.
- CRAIG, D. S.; RUNKLE, E. S. (2016) **An intermediate phytochrome photoequilibrio from night-interruption lighting optimally promotes flowering of several long-day plants.** *Environmental and Experimental Botany*, 121:132-138.
- DEBERGH, P.; AITKEN-CHISTIE, J.; COHEN, D.; GROUT, B.; VN ARNOLD, S.; ZIMMERMANN, T. W.; ZIV, M. (1992) **Reconsideration of the term vitrification as used in micropropagation.** *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 30:135–140.

- DEBIASI, C.; FRAGUAS, C. B.; LIMA, G. P. P. (2007) **Estudo das poliaminas na morfogênese *in vitro* de *Hemerocallis* sp.** *Ciência Rural*. 37(4):1014-1020.
- DEC CETTI, S. F. C. **Ambiente de cultivo e respostas morfofisiológicas durante o processo de micropropagação de *Annona glabra* L.** 2004. 93 p. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- DOBRÁNSZKI, J.; MENDLER-DRIENYOVSZKI, N. (2014) **Cytokinin-induced changes in the chlorophyll content and fluorescence of *in vitro* apple leaves.** *Journal of Plant Physiology*, 171(16):1472-1478.
- DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Flow cytometry with plants: an overview. In: Dolezel J, Greilhuber J, Suda J (eds) **Flow cytometry with plant cells.** Wiley, Weinheim, 2007. 41–65p.
- DOLEŽEL, J. (1997) **Applications of flow cytometry for study of plants genomes.** *J Appl Genet*. 38: 285 – 302.
- DOLEŽEL, J.; BINAROVA, P.; LUCRETTI, S. (1989) **Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry.** *Biol Plant*. 31:113–120.
- DONAZZOLO, J.; FELIPPI, M.; RIVEIRO, R. J.; SILVA, M. D. da; DALLA COSTA, D. H. E. (2013) **Avaliação da brotação de tubérculos-semente de *Tropaeolum pentaphyllum* Lam. Cultivados a campo.** *Cadernos de Agroecologia*. 8(2): 1–5.
- DRIVER, J. A.; JUNIYUKI, A. H. (1984) ***In vitro* propagation of paradox walnut rootstock.** *HortScience*. 19:507–509.
- DUKE, S. H.; REISENAUER, H. M.; TABATABAÍ, M. A. (1986) **Roles and requirements of sulfur in plant nutrition.** *Sulfur in agriculture*, 123–168p.
- ECKERT, M.; KAENHOFF, R. (2000) **Light-induced stomatal movement of selected *Arabidopsis thaliana* mutants.** *Journal of Experimental Botany*, 51(349):1435-1442.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. (2005) **Mineral nutrition of plants: principles and perspectives.** 2.ed. Sunderland: Sinauer, 2005. 380 p.
- FAZAL, H.; ABBASI, B. H.; AHMAD, N.; ALI, M.; ALI, M. (2016) **Sucrose induced osmotic stress and photoperiod regimes enhanced the biomass and production of antioxidant secondary metabolites in shake-flask suspension cultures of *Prunella vulgaris* L.** *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 124(3):573-581.
- FERNANDES, D. A.; AZEVEDO, P. H. de; COSTA, E. B. da; BRONDANI, G. E. (2013) **Tipos de vedação e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Tectona grandis* L.f.** *Revista de Agricultura*. 88(3):218–228.
- FOLTA, K. M.; KOSS, L. L.; MCMORROW, R.; KIM, H. H.; KENITZ, J. D.; WHEELER, R.; SAGER, J. C. (2005) **Design and fabrication of adjustable red-green-blue LED light arrays for plant research.** *BMC Plant Biol*, 23:5–17.
- FRANCK, T., KEVERS, C., GASPAR, T., DOMMES, J., DEBY, C., GREIMERS, R., DEBY-DUPONT, G. (2004). **Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots cultured on gelrite: a controlled stress response.** *Plant Physiology and Biochemistry*. 42(6), 519-527.

- FRANCK, T.; GASPAR, T.; KERVERS, C.; PENEL, C.; DOMMES, J.; HAUSMAN, J. F. (2001) **Are hyperhydric shoots of *Prunus avium* L. energy deficient?** Plant Sci. 160(6):1145–1151.
- FURTINI NETO, A.E.; VALE, F.R.; RESENDE, A.V.; GUILHERME, L.R.G.; GUEDES, G.A.A. **Fertilidade do solo**. Lavras: Editora da FAEPE, 2001. 252p.
- GAMBORG, O. L. Plant cell cultures: nutrition and media. In: VASIL, I. K. (ed). **Cell culture and somatic cell genetics of plants**. Gainesville, Flórida, 1984. 20-21p.
- GASHI, B.; ABDULLAI, K.; SOTA, V.; KONGJIKA, E. (2015) **Micropropagation and *in vitro* conservation the rare and threatened plants *Ramonda serbica* and *Ramonda nathaliae***. Physiology and Molecular Biology of Plants, 21(1):123-136.
- GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 2. Exegetic: Edington, 1993. 574p.
- GUERRA, E.; STREHER, N. S.; LÜDTKES, R. (2015) **Plantas trepadeiras do Horto Botânico Irmão Teodoro Luis, sul do Rio Grande do Sul, Brasil**. R. bras. Bioci. 13(4): 201–209.
- GUERRA, M.P.; DAL VESCO, L. L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A. R.; NODARI, R. O. (1999) **Estabelecimento de um protocolo para a micropropagação do abacaxizeiro**. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 34(9):1557-1563.
- GUPTA, S. D.; JATOTHU, B. (2013) **Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis**. Plant Biotechnol Rep. 7:211–220.
- HAISSIG, B. E. (1974) **Influences of auxins and auxin synergists on adventitious root primordium initiation and development**. New Zealand Journal of Forestry Science. (2): 311-323.
- HASSANKHAH, A.; VAHDATI, K.; LOTFI, M.; MIRMASOUMI, M.; PREECE, J.; ASSAREH, M. (2014) **Effects of ventilation and sucrose concentrations on the growth and plantlet anatomy of micropropagated *Persian walnut* Plants**. Inter J H S and Technol. 1(2):111–120.
- HERNÁNDEZ, R.; KUBOTA, C. (2016) **Physiological responses of cucumber seedlings under different blue and red photon flux ratios using LEDs**. Environmental and Experimental Botany, 121:66-74.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. (1950) **The water culture method for growing plants without soil**. California Agricultural Experiment Station (2nd edit). 347:1–38.
- HOGEWONING, S. W.; TROUWBORST, G.; ENGBERS, G. J.; HARBINSON, J.; VAN IEPEREN, W.; RUIJSCH, J.; SCHAPENDONK, A. H. C. M.; POT, S. C.; VAN KOOTEN, O. (2007) **Plant physiological acclimation to irradiation by light emitting diodes (LEDs)**. Acta Horti 761:183–191.
- HUANG, X., CHEN, J., BAO, Y., LIU, L., JIANG, H., AN, X., WANG, B.; PENG, D. (2014) **Transcript profiling reveals auxin and cytokinin signaling pathways and transcription regulation during *in vitro* organogenesis of ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaud)**. PloS one, 9(11): e113768.
- HUANG, P. L.; LIAO, L. J.; TSAI, C. C.; LIU, Z. H. (2011) **Micropropagation of bromeliad *Aechmea fasciata* via floral organ segments and effects of acclimatization on plantlet growth**. Plant Cell Tiss Organ Cult. 105:73–78.

- HUSSAIN, A.; QARSHI, I.A.; NAZIR, H.; ULLAH, I. (2012) **Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities**. In: Recent advances in plant in vitro culture. InTech, pp. 1–28.
- HVOSLEF-EIDE, A. K.; MUNSTER, C.; HEYERDAHL, P. H.; LYNQVED, R.; OLSEN, O. A. S. (2003) **Liquid Culture Systems for Plant Propagation**. In: HAMMERSCHLAG, F. A.; SAXENA, P. (Eds) Proc. XXVI IHC – Biotechnology in Hort. Crop Improvement. Acta Horticulturae, 625:173-185.
- IAREMA, L. CRUZ, A. C. F.; SALDANHA, C. W.; DIAS, L. L. C.; VIEIRA, R. F.; OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C. (2012) **Photoautotrophic propagation of Brazilian gingseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]**. Plant Cell Tiss Organ Cult. 110:227–238.
- IKEUCHI, M.; OGAWA, Y.; IWASE, A.; SUGIMOTO, K. (2016) **Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms**. Development, 143:1442-1451.
- JEONG, B. R.; SIVANESAN, I. (2015) **Direct adventitious shoot regeneration, *in vitro* flowering, fruiting, secondary metabolite content and antioxidant activity of *Scrophularia takesimensis* Nakai**. Plant Cell Tiss Organ Cult. 123 (3):607-618.
- JOHKAN, M.; SHOJI, K.; GOTO, F.; HASHIDA, S.; YOSHIHARA, T. (2010) **Blue light-emitting diode light irradiation of seedlings improves seedling quality and growth after transplanting in red leaf lettuce**. HortScience 45:1809–1814.
- KARPINSKI, S.; SZECHYNSKA-HEBDA, M.; WITUSZYNSKA, W.; BURDIK, P. (2013) **Light acclimation, retrograde signaling, cell death and immune defenses in plants**. Plant Cell Environ 36:736–744.
- KEVERS, C.; FRANCK, T.; STRASSER, R. J.; DOMMES, J.; GASPAR, T. (2004) **Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state**. Plant Cell Tiss Organ Cult. 77(2):181-191.
- KHARRAZI, M.; NEMATI, H.; TEHRANIFAR, A.; BAGHERI, A.; SHARIFI, A. (2011) ***In vitro* culture of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) focusing on the problem of vitrification**. J Biol Environ. 5(13):1–6.
- KINUPP, V.F. **Plantas alimentícias não-convencionais da região metropolitana de Porto Alegre**, RS. 2007. 562 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Disponível em <http://lume.ufrgs.br/handle/10183/12870>. Acesso em: 14 jan. 2015.
- KOCH, K.; MENGEL, K. (1977) **Effect of K on N utilization by spring wheat during grain protein formation**. Agron J. 69(3):477-480.
- KOZAI, T. (2010) **Photoautotrophic micropropagation - Environmental control for promoting photosynthesis**. Propagation of Ornamental Plants, 10:188-204.
- KWON, A. R.; CUI, H. Y.; LEE, H.; SHIN, H.; KANG, K. S.; PARK, S. Y. (2015) **Light quality affects shoot regeneration, cell division, and wood formation in elite clones of *Populus euramericana***. Acta Physiologiae Plantarum. 37(3):1-9.
- LINK, K. H.; HUANG, M. Y.; HUANGC, W. D.; HSUC, M. H.; YANGD, Z. W.; YANG, C. M. (2013) **The effects of red, blue and White light-emitting diodes on the**

growth development and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*). *Sci Hortic* 150:86–91.

LIU, C.; CALLOW, P.; HANCOCK, J. F.; SONG, G. (2010) **Adventitious shoot regeneration from leaf explants of southern highbush blueberry cultivars.** *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 103:137–144.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. (1981) **Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture.** *Int Plant Prop Soc Proc.* 30:421–427.

LODHA, D.; PATEL, A. K.; SHEKHAWAT, N. S. (2015) **A high-frequency *in vitro* multiplication, micromorphological studies and *ex vitro* rooting of *Cadaba fruticosa* (L.) Druce (Bahuguni): a multipurpose endangered medicinal shrub.** *Physiol Mol Biol Plants.* 21:407–415.

LÓPEZ, R. P. (2003) **Diversidad florística y endemismo de los valles secos bolivianos.** *Ecología e Bolivia.* 38(1): 27–60. *Cadernos de Agroecología.*

LORETI, F.; MORINI, S.; CONCETTI, S. (1988) **Effect of potassium and nitrogen concentration on growth of peach shoots cultured *in vitro*.** *Acta Hortic.* 227(1):311–317.

MA, Z.; WANG, Y.; MENGXI, L.; XU, J.; ZHIGANG, X. (2015) **Effects of green and red lights on the growth and morphogenesis do potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets *in vitro*.** *Sci Hortic.* 190:104–109.

MACHADO, M. P.; SILVA, A. L. L. da; BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C.; BESPALHOK FILHO, J. C.; ZANETTE, F. (2014) **Influence of calcium content of tissue on hyperhydricity and shoot-tip necrosis of *in vitro* regenerated shoots of *Lavandula angustifolia* Mill.** *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 57(5):636–643.

MACHADO, M. P.; BIASI, L. A.; REINHART, C. SANTOS, G. G. (2010) **Redução da necrose apical e hiperhidricidade de plantas de *Lavandula angustifolia* Mill. cultivadas *in vitro*.** *Plant Cell Cult Microp.* 6:18–25.

MAHESHWARI, P.; KOVALCHUCK, I. (2011) **Efficient shoot regeneration from internodal expants of *Populus angustifolia*, *Populus balsamifera* and *Populus deltoids*.** *New Biotechnol.* 28:778–787.

MALIK, S.L SHARMA, M.L AHUJA, P. S. (2016) **An efficient and economic method for *in vitro* propagation of *Arnebia euchroma* using liquid culture system.** *Am J Biotech Med Res.* 1(1):19-25.

MARHAVÝ, P., VANSTRAELEN, M., DE RYBEL, B., ZHAOJUN, D., BENNETT, M. J., BEECKMAN, T.; BENKOVÁ, E. (2013). **Auxin reflux between the endodermis and pericycle promotes lateral root initiation.** *EMBO J.*, 32:149–158.

MARINO, G.; BERARDI, G. (2004) **Different sealing materials for petri dishes strongly affect shoot regeneration and development from leaf explants of quince ‘BA29’.** *In vitro Cell Dev Biol Plant* 40:384–388.

MARKS, T. R.; SIMPSON, S. E. (1999) **Effect of irradiance on shoot development *in vitro*.** *Plant Growth Regulation,* 28(2):133-142.

- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic, 1995. 888p.
- MARTINS, J. P. R.; PASQUAL, M.; MARTINIS, A. D.; RIVEIRA, S. F. (2015a) **Effects of salts and sucrose concentrations on *in vitro* propagation of *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Bromeliaceae)**. Aus J Crop Sci. 9(1):85–91.
- MARTINS, J. P. R.; VERDOODT, V.; PASQUAL, M.; PROFT, M. de (2015b) **Impacts of photoautotrophic and photomixotrophic conditions on *in vitro* propagated *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae)**. Plant Cell Tiss Organ Cult. 123(1):121–132.
- MAZRI, M. A. (2015) **Role of cytokinins and physical state of the culture medium to improve *in vitro* shoot multiplication, root and acclimatization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Boufeggous**. J Plant Bioch Biotechnol. 24(3):268–275.
- MAZRI, M. A.; MEZIANI, R. (2015) **Micropropagation of Date Palm: A Review**. Cell & Developmental Biology, 4(3):2-6.
- MELYAN, G.; SAHAKYAN, A.; HARUTYUNYAN, A. (2015) **Micropropagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) seedless cultivar “Parvana” through lateral bud development**. Vitis. 54:253-255.
- MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. (1987) **Copper, further elements of importance**. Principles of Plant Nutrition. 4:537-588.
- MOHAMMED, A.; CHIRUVELLA, K. K.; NAMSA, N. D.; GHANA, R. G. (2015) **An efficient *in vitro* shoot regeneration from leaf petiolar explants and *ex vitro* rooting of *Biba orellana* L. – A dye yielding plant**. Physiol Mol Biol Plants. 21:417–424.
- MOHAMED, M. A. H.; ALSADON, A. A. (2010) **Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets**. Sci Hort. 123:295–300.
- MORINI, S.; MULEO, R. **Effects of light quality on micropropagation of woody species**. In: JAIN, S.M.; ISHII, K. **Micropropagation of woody trees and fruits**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 2003.p.3-35.
- MOTTE, H.; VEREECKE, D.; GEELLEN, D.; WERBROUCK, S. (2014) **The molecular path to *in vitro* shoot regeneration**. Biotechnology Advances, 32(1):107-121.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962) **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures**. Plant Physiol, 15:473-497.
- NAING, A. H.; JEON, S. M.; HAN, J.; LIM, S. H.; LIM, K. B.; KIM, C. K. (2014) **Factors influencing *in vitro* shoot regeneration from leaf segments of *Chrysanthemum***. Comptes Rendus Biol 337(6):383–390.
- NANDAGOPAL, S.; RANJITHA, B.D.K. (2007) **Effectiveness of auxin induce *in vitro* root culture in chicory**. Journal of Central European Agriculture, 8:73-80.
- do NASCIMENTO VIEIRA, L.; FRAGA, H. P. F. de; ANJOS, K. G. dos; PUTTKAMMER, C. C.; SCHERER, R. F.; SILVA, D. A. da; GUERRA, M. P. (2015) **Light-emitting diodes (LED) increase the stomata formation and chlorophyll content in *Musa acuminata* (AAA) 'Nanicão Corupá' *in vitro* plantlets**. Theoretical and Experimental Plant Physiology. 27 (2):91-98.
- NATHIVA, S.; PRADEEPA, D.; DEVASENA, R.; SENTHIL, K. (2013) **Studies on the effect of sucrose, light and hormones on micropropagation and *in vitro* flowering of**

- Withania somnifera* Var. Jawhar-20.** The Journal of Animal & Plant Sciences. 23(5):1391–1397.
- NIEMI, K.; JULKUNEN-TIITO, R.; TEGELBERG, R.; HAGGMAN, H. (2005) **Light sources with different spectra affect root and mycorrhiza formation in Scotpine *in vitro*.** Tree Physiology, 25(1):123-128.
- NORIKANE, A.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; TANAKA, M. (2013) **Growth of *in vitro* *Oncidesa* plantlets cultured under cold cathode fluorescent lamps with super-elevated CO₂ enrichment.** AoB Plant 5:44–53.
- NGUYEN, Q. T.; KOZAI, T.; HEO, J.; THAI, D. X. (2001) **Photoautotrophic growth response of *in vitro* cultured coffee plantlets to ventilation methods and photosynthetic photon fluxes under carbon dioxide enriched condition.** Plant Cell Tiss Organ Cult. 66:217–225.
- NYITRAI, P. **Development of functional thylakoid membranes: regulation light and hormones.** In: PESSARAKLI, M. Handbook of plant and crop physiology. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 391-403.
- OLIVEIRA, L. M. de; PAIVA, R.; SANTANA, J. R. F. de; NOGUEIRA, R. C.; SOARES, F. P.; SILVA, L. C. (2007) **Efeito de citocininas na senescência e abscisão foliar durante o cultivo *in vitro* de *Annona glabra* L.** Rev Bras Fruticultura. 29(1):25–30.
- OLIVEIRA, Y.; PINTO, F.; SILVA, A. L. L.; GUEDES, I.; BIASI, L. A.; QUOIRIN, M. (2010) **An eficiente protocol for micropropagation of *Melaleuca alternifolia* Cheel.** In Vitro Cell Dev Biol Plant. 46:192–197.
- OTALAKOSKI, J.; DONAZZOLO, J.; FELIPPI, M. (2014) **Avaliação da produção de tubérculos de *Tropaeolum pentaphyllum* Lam. (Tropaeolaceae) sob cultivo orgânico.** Cadernos de Agroecologia. 9(1):42-47.
- PACHECO, G.; SIMÃO, M. J.; VIANNA, M. G.; GARCIA, R. O.; VIEIRA, M. L. C.; MANSUR, E. (2016) ***In vitro* conservation of *Passiflora* - A review.** Scientia Horticulturae, 211:305-311.
- PARK, S. Y.; KIM, M. J. (2010) **Development of zygotic embryos and seedlings is affected by radiation spectral compositions from light emitting diode (LED) system in Chestnut (*Castanea crenata* S. et S.).** J Korean Soc 99:750–754.
- PARK, S. W.; JEON, J. H.; KIM, H. S.; PARLK, Y. M.; ASWATH, C.; JOUNG, H. (2004) **Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on hyperhydricity of potato shoots *in vitro*.** Sci. Hort. 99:199 – 205.
- PATEL, A. K.; PHULWARIA, M.; RAI, M. K.; GUPTA, A. K.; SHEKHAWAT, S.; SHEKHAWAT, N. S. (2014) ***In vitro* propagation and *ex vitro* rooting of *Caralluma edulis* (Edgew.) Benth. & Hook. F.: An endemic and endangered edible plant species of the Thar Desert.** Sci Hortic. 165:175–180.
- PEDMALE, U. V.; HUANG, A. C.; ZANDER, M.; COLE, B. J.; HETZEL, J.; LJUNG, K.; REIS, P. A. B.; SRIDEVI, P.; NITO, K.; NERY, J. R.; ECKER, J. R.; CHORY, J. (2016) **Cryptochromes interact directly with PIFs to control plant growth in limiting blue light.** Cell, 164(1-2):233-245.

- PEREIRA, J. E. S.; FORTES, G. R. L. **Protocolo para produção de material propagativo de batata em meio líquido**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 38, n. 9, p. 1035-1043, 2003.
- PÉREZ, L. P.; MONTESINOS, Y. P.; OLMEDO, J. G.; SÁNCHEZ, R. R.; MONTENEGRO, O. N.; RODRIGUEZ, R. B.; RIBALTA, O. H.; ESCRIBA, R. C. R.; DANIELS, D.; GÓMEZ-KOSKY, R. (2015) **Effects of diferente culture conditions (photoautotrophic, photomixotrophic) and the auxin índole-butyric acid on the *in vitro* acclimatization of papaia (*Carica papaya* L. var. Red Maradol) plants using zeolite as support**. Af J Biotechnol. 14(35):2622–2635.
- PHULWARIA, M.; SHEKHAWAT, N. S.; RATHORE, J. S.; SINGH, R. P. (2013) **An efficient *in vitro* regeneration and *ex vitro* rooting of *Ceropegia bulbosa* Roxb. – A threatened and pharmaceutical important plant of Indian Thar Desert**. Ind Crops Prod. 42:25–29.
- PICOLI, E. A., OTONI, W. C., FIGUEIRA, M. L., CAROLINO, S. M., ALMEIDA, R. S., SILVA, E. A., FONTES, E. P. (2001). **Hyperhydricity in *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein)**. Plant Science. 160(5): 857-868.
- QUOIRIN, M.; LEPOIVRE, P. (1977) **Estude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de Prunus**. Acta Hortic. 78:437-442.
- RANAWEERA, K. K.; GUNASEKARA, M. T. K. EESWARA, J. P. (2013) ***Ex vitro* rooting: A low cost micropropagation techniques for Tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz) hybrids**. Scientia Hortic. 155:8–14.
- RATHORE, J. S.; PHULWARIA, M.; RAI, M. K.; SHEKHAWAT, S.; SHEKHAWAT, N. S. (2015) **Use of liquid culture medium and *ex vitro* rooting for micropropagation of *Acacia nilotica* (L.) Del. Ssp. *Cupressiformis***. Ind J Plant Physiol. 20:172–176.
- RATHORE, J. S.; RAI, M. K.; PHULWARIA, M.; SHEKHAWAT, N. S. (2013) **A liquid culture system for improved micropropagation of mature *Acacia nilotica* (L.) Del. Ssp. *Indica* and *ex vitro* rooting**. Proc Natl Acad Sci India, Sect B Biol Sci. 84:193–200.
- RUGINI, E. (1984) ***In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea* var. *sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos**. Sci Hort. 24:123-134.
- SÁEZ, P. L.; BRAVO, L. A.; LATSAGUE, M. I.; TONEATTI, M. J.; COOPMAN, R. E.; ÁLVAREZ, C. E.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; RIOS, D. G. (2015) **Influence of *in vitro* growth conditions on the photosynthesis and survival of *Castanea sativa* pantlets during *ex vitro* transfer**. Plant Growth Regulation. 75 (3): 625-639.
- SAIJU, H. K. (2005) **Tree tissue culture and *ex vitro* sand rooting for reforestation**. In: Suzuki K, Ishii K, Sakurai S, Sasaki S (eds) Plantation technology in tropical forest science. Springer, Berlin, pp 151–154.
- SAITOU, T.; HASHIDUME, A.; TOKUTOMI, S.; KAMADA, H. (2004) **Reduction of phytochrome level and light-induced formation of adventitious shoots by introduction of antisense genes for phytochrome *a* in horseraish hairy roots**. Plant Cell Tiss Organ Cul, 76(1):45-51.

- SALDANHA, C. W.; OTONI, C. G.; NOTINI, M. M.; KUKI, K. N.; da CRUZ, A. C. F.; RUBIO NETO, A.; DIAS, L. L. C.; OTONI, W. C. (2013) **A CO₂-enriched atmosphere improves *in vitro* growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen].** *In Vitro Cell Dev Biol – Plant* 49(4):433–444.
- SALE, P. (2010). **The use of nutrients in crop plants.** *Ann. Bot.*, 105(1), x–xi. <http://doi.org/10.1093/aob/mcp227>
- SAMOSIR, Y. M. S.; ADKINS, S. (2014) **Improving acclimatization through the photoautotrophic culture of coconut (*Cocos nucifera*) seedlings: an *in vitro* system for the efficient exchange of germoplasm.** *In vitro Cell Dev Biol Plant*. 50 (4) 493-501.
- SANDRA, A. T.; MAIRA, O. (2013) **Effect of culture medium consistence and silver nitrate on micropropagation of two potato (*Solanum tuberosum*) cultivars.** *Rev. Colomb. Biotechnol.* 15 (2):55-62.
- SANTORO, M. V.; NIEVAS, F.; ZYGADLO, J.; GIORDANO, W.; BANCHIO, E. (2013) **Effects of growth regulators on biomass and the production of secondary metabolites in peppermint (*Mentha piperita*) micropropagated *in vitro*.** *American Journal of Plant Sciences*, 4(5):49-55.
- SARETHY, I. P.; KASHYAP, A.; BAHAL, U.; SEJWAL, N.; GABRANI, R. (2014) **Study of liquid culture system for micropropagation of the medicinal plant *Solanum nigrum* L. and its effect on antioxidant property.** *Acta Physiol Plant*. 36(11):2863–2870.
- SCHÄFER, M.; BRÜTTING, C.; MEZA-CANALES, I.; GROBKINSKY, D. K.; VANKOVA, R.; BALDWIN, I. T.; MELDAU, S. (2015) **The role of *cis*-zeatin-type cytokinins in plant growth regulation and mediating responses to environmental interactions.** *Journal of Experimental Botany*, 66(16):4873-4884.
- SCHMIDT, O.; NETTO, A. T.; SCHMIDT, E. R.; CARVALHO, V. S.; OTONI, W. C.; CAMPOSTRINI, E. (2015) **Photosynthetic capacity, growth and water relations in 'Golden' papaya cultivated *in vitro* with modifications in light quality, sucrose, concentration and ventilation.** *Theor. Exp. Plant Physiol*. 27 (1): 7-18.
- SCHONEHRR, J. (2002) **Foliar nutrition inorganic salts: laws of cuticular penetration.** *Acta Horticulture*. 594:77-84.
- SEGER, G. D. dos; HARTZ, S. M. (2014) **Checklist of climbing plants in an Araucaria of Rio Grande do Sul State, Brazil.** *Biota Neotropica*. 14(4): e20140062
- SHA VALLI, K. P. S.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. (2003) **Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions.** *Biol Plant* 46:161–166.
- SHAHAK, Y. (2005) **Colored shade nets a new agro-technology.** *Current Research in Ornamental*. Disponível em: <http://www.horticom.com/pd/imagenes/55/146/55146.pdf>. Acesso em: 10 set. 2016.
- SIDDIQUE, R. (2015) **Impact of different media and genotypes in improving anther culture response in rice (*Oryza sativa*) in Bangladesh.** *European Scientific Journal*. 11 (6):164–169.
- SILVA, A. L. L.; COSTA, J. L.; GOLLO, A. L.; SANTOS, J. D.; FORNECK, H. R.; BAISI, L. A.; SOCCOL, V. T.; CARVALHO, J. C.; SOCCOL, C. R. (2014)

Development of a vinasse culture medium for plant tissue culture. Pak. J. Bot. 46(6): 2195-2202.

SILVA, M. M. A.; OLIVEIRA, A. L. B.; OLIVEIRA-FILHO, R. A.; GOUVEIA-NETO, A. S.; CAMARA, T. J. R.; WILLADINO, L. G. (2014) **Effect of blue/red LED light combination on growth and morphogenesis of *Saccharum officinarum* plantlets in vitro.** Proc SPIE 8947:89471X.

SINGH, A.; AGARWAL, P. K. (2016) **Enhanced micropropagation protocol of ex vitro rooting of a commercially important crop plant *Simmondsia chinensis* (Link) Schneider.** J Forest Sci. 62(3):107–115.

SMITH, H. (1982) **Light quality, photoperception, and plant strategy.** Annual Review of Plant Physiology, 33:481-518.

SNYMAN, S. J.; MEYER, G. M.; KOCH, A. C.; BANASIAK, M.; WATT, M. P. (2011) **Applications for in vitro systems for commercial sugarcane production and improvement.** In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 47(2):234-249.

SPARRE, B. Tropeolaceas. In: REITZ, R. (ed.) **Flora Ilustrada catarinense.** Itajaí, SC: Herbário Barbosa Rodrigues (HBR), 1972. 26p.

STEFANCIC, M.; STAMPAR, F.; OSTERC, G. (2006) **Influence of endogenous IAA levels and exogenous IBA on rooting and quality of leafy cuttings of Prunus ‘GiSela5’.** Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 81:508-512.

STUTTE, G. W. (2015). **Commercial Transition to LEDs: A Pathway to High-value Products.** HortScience, 50(9):1297-1300.

SUN, Z. P.; LI, T. L.; LIU, Y. L. (2011) **Effects of elevated CO₂ applied to potato roots on the anatomy and ultrastructure of leaves.** Biologia Plantarum. 55(4):675-680.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal** 5ed. Porto Alegre: Artmed p.918, 2013.

TANAKA, M.; GIANG, D. T. T.; MURAKAMI, A. (2005a) **Application of a novel disposable film culture system to photoautotrophic micropropagation of *Eucalyptus uro-grandis* (urophylla x grandis).** In Vitro Cell Dev Biol Plant. 41:173–180.

TANAKA, Y.; SANO, T.; TAMAOKI, M.; NAKAJIMA, N.; KONDO, N.; HASEZAWA, S. (2005b) **Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*.** Plant Physiology, 138:2337-2343.

TEIXEIRA, C. dos S.; BOFF, P.; BOFF, M. I. C.; VOLPATO, C. (2013) **Ocorrência e multiplicação do crem (*Tropaeolum pentaphyllum* Lam.) na Serra Gaúcha e Planalto Sul Catarinense.** Cadernos de Agroecologia. 8(2): 2 –26.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A. (2015) **Alterations to Plbs and plantlets of hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae) in response to plant growth regulators.** J Plant Develop. 22:41–46.

THORPE, T. (2007) **History of plant tissue culture.** J Mol Microb Biotechnol. 37:169–180.

TIAN, Q.; REED, J. W. (2001) **Molecular links between light and auxin signaling pathways.** Journal of Plant Growth and Regulation, 20(1):274-280.

- TRIVEDI, R. (2016) **Effect of different factors during *in vitro* growth and multiplication in Groundnut cultivar” JL-24”**. Proc Natl Acad Sci, India, Sect B Biol Sci. 86:131–137.
- TSAY, H.; LEE, C.; AGRAWAL, D. C.; BASKRE, S. (2006) **Influence of ventilation closure, gelling agent and explant type on shoot bud proliferation and hyperhydricity in *Scrophularia yoshimurae* – a medicinal plant**. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 42:445–449.
- US-CAMAS, R.; RIVERA-SOLIS, G.; DUARTE-AKÉ, F.; DE-LA-PEÑA, C. (2014) ***In vitro* culture: an epigenetic challenge for plants**. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 118(2):187-201.
- VAHDATI, K.; HASSANKHAH, A. (2014) **Developing a photomixotrophic system for micropropagation of *Persin walnut***. *Acta Hortic.* 1050:181–187.
- VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. (2013) **Physiological and molecular responses to magnesium nutritional imbalance in plants**. *Plant Soil.* 368 (1): 87-99.
- XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. (2011) **Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system**. *Plant Cell Tiss Organ Cul* 105:149–158.
- ZANETTI, G. D.; MANFRON, M. P.; HOELZEL, S. C. S. M. (2004) **Análise morfo-anatômica de *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae)**. *Sér Bot.* 59:173-178.
- ZANOL, G. C.; FORTES, G. de L.; SILVA, J. B. da; CAMPOS, A. D. CENTELLAS, A. Q.; MULLER N. T.; GOTTINARI, R. A. (1997) **Escuro e ácido indolbutírico no enraizamento *in vitro* e atividade da peroxidase de porta-enxerto de macieira Cv. Murabakaido (*Malu prunifolia*)** *Rev Bras de Agrociência.* 3(1):23-30.
- WAIKHOM, S. D.; LOUIS, B. (2014) **An effective protocol for micropropagation of edible bamboo species (*Bambusa tulda* and *Melocanna bacífera*) through nodal culture**. *Sci Word J* vol. 2014:345794.
- WUYTS, N.; DHONDT, S.; INZÉ, D. (2015) **Measurement of plant growth in view of an integrative analysis of regulatory networks**. *Current Opinion in Plant Biology*, 25:90-97.
- YAMORI, W.; SHIKANAI, T. (2016) **Physiological functions of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis and plant growth**. *Annual Review of Plant Biology*, 67:81-106
- YANG, F.; WEI, N.; PIAO, X.; LIAN, M. (2015) **Effect of several medium factors on polysaccharide and alkaloid accumulation in protocorm-like bodies of *Dendrobium candidum* during bioreactor culture**. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37:94.
- YANPAISAN, W., KING, N. J. C., DORAN, P. M. (1999) **Flow cytometry of plant cells with applications in large-scale bioprocessing**. *Biotechnol Adv.* 17:3–2.
- YASEEN, M.; AHMAD, T.; SABLOK, G.; STANDARDI, A.; HAFIZ, I. A. (2013) **Review: role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development**. *Molecular Biology Reports.* 40 (4):2837-2849.

CAPÍTULO 2

Efeito das diferentes condições de luminosidade no metabolismo primário e secundário de plantas de crem (*Tropaeolum pentaphyllum*).

RESUMO

SARTOR, Fernanda Raquel, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2016. **Efeito das diferentes condições de luminosidade no metabolismo primário e secundário de plantas de crem (*Tropaeolum pentaphyllum*).** Orientador: Marcelo Rogalski. Coorientador: Wagner Campos Otoni.

Diversas espécies do gênero *Tropaeolum* são valorizadas por sua importância alimentar e possuem indicação medicinal no combate ao colesterol, hipertensão entre outras doenças. O crem é uma das espécies contempladas como planta do futuro pelo Ministério do Meio Ambiente e também está sob risco de extinção. O objetivo deste trabalho foi caracterizar as respostas à diferentes condições lumínicas no cultivo *in vitro* e *ex vitro* de crem quanto ao acúmulo de pigmentos, proteínas, açúcares, amido, aminoácidos e dois compostos do metabolismo secundário: quercetina e campeferol. Folhas +3 de plantas de crem cultivadas por 4 semanas *in vitro* em diferentes condições de luz (fluorescente, LED branco e LED azul e vermelho) e *ex vitro* em condições de casa de vegetação foram coletadas, armazenadas e utilizadas na obtenção dos extratos para os ensaios bioquímicos. Plantas cultivadas sob luz natural e LED azul e vermelho demonstraram acúmulo de clorofila *a* significativamente superior aos demais tratamentos, enquanto que a maior concentração de clorofila *b* foi observada em plantas cultivadas sob LED branco. As plantas mantidas sob LED azul e vermelho e luz natural, demonstraram quantidades de carotenoides e antocianinas, respectivamente, superiores às demais. Ao quantificar metabólitos primários, somente a glicose e o amido demonstraram diferenças significativas entre os quantificados, os quais observados em plantas cultivadas sob LED branco e luz natural, respectivamente. A qualidade espectral na síntese de pigmentos de plantas *in vitro* demonstram resultados favoráveis aos sistemas de iluminação LED, sendo mais adequados e proporcionando melhores condições, juntamente com o meio de cultivo, para o crescimento, desenvolvimento a alocação de metabólitos que o sistema tradicional de luz fluorescente. Houve investimento de carbono no metabolismo secundário. A concentração do metabólito secundário quercetina no tubérculo de plantas cultivadas em casa de vegetação foi significativamente superior quando comparada às

folhas, independente da condição lumínica utilizada no cultivo da planta. Para o campeferol, folhas de plantas cultivadas *in vitro* sob LED branco demonstraram concentrações mais elevadas diferindo significativamente das demais. Desta forma, conclui-se que a manipulação dos fatores abióticos favorece a promoção do acúmulo dos metabólitos secundários aqui analisados.

CHAPTER 2

Effect of different light conditions on primary and secondary metabolism of cremates (*Tropaeolum pentaphyllum*).

ABSTRACT

SARTOR, Fernanda Raquel, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2016. **Effect of different light conditions on the primary and secondary metabolism of crema plants (*Tropaeolum pentaphyllum*).** Adviser: Marcelo Rogalski. Co-adviser: Wagner Campos Otoni.

Several species of the genus *Tropaeolum* are valued for their food value and have medicinal indication in the fight against cholesterol, hypertension among other diseases. The crem is one of the species contemplated as plant of the future by the Ministry of the Environment and also is in danger of extinction. The objective of this work was to characterize the responses to the different light conditions in the in vitro and ex vitro cultivation of crem for the accumulation of pigments, proteins, sugars, starch, amino acids and two compounds of the secondary metabolism: quercetin and kaempferol. +3 leaves of crem plants cultured for 4 weeks in vitro in different light conditions (fluorescent, white LED and blue and red LED) and ex vitro under greenhouse conditions were collected, stored and used to obtain the extracts for the Biochemical tests. Plants grown under natural light and blue and red LEDs showed chlorophyll accumulation to be significantly superior to the other treatments, while the highest concentration of chlorophyll b was observed in plants grown under white LED. The plants kept under blue and red LEDs and natural light showed quantities of carotenoids and anthocyanins, respectively, higher than the others. When quantifying primary metabolites, only glucose and starch showed significant differences between the primary quantified metabolites, which were observed in plants grown under white LED and natural light, respectively. The spectral quality in the synthesis of in vitro plant pigments demonstrates favorable results for LED lighting systems, being more suitable and providing better conditions, together with the culture medium, for the growth, development and metabolic allocation that the traditional light system fluorescent. There was investment of carbon in the secondary metabolism. The concentration of the secondary metabolite quercetin in the tuber of greenhouse grown plants was significantly superior when compared to the leaves, regardless of the light condition used in the plant cultivation. For kaempferol, leaves of plants grown in vitro

under white LED showed higher concentrations differing significantly from the others. In this way, it is concluded that the manipulation of the abiotic factors favors the promotion of the accumulation of the secondary metabolites analyzed here.

1. INTRODUÇÃO

Plantas do gênero *Tropaeolum* são valorizadas por seu valor alimentar e medicinal, como por exemplo a capuchinha (*Tropaeolum majus* L.). O crem, *Tropaeolum pentaphyllum*, além de ser utilizado como alimento, possui indicações populares como planta medicinal no combate ao colesterol, hipertensão e ação antiinflamatória. É uma espécie contemplada como uma das plantas do futuro pelo Ministério do Meio Ambiente, e, devido a ações antrópicas, faz parte da lista de espécies com risco de extinção (Coradin et al., 2011).

As plantas produzem uma enorme variedade de metabólitos que são classificados como primários e secundários, os quais são influenciados por fatores ambientais. Metabólitos primários são aqueles considerados imprescindíveis à viabilidade celular, exercendo papéis essenciais, e estão associados à fotossíntese, respiração, crescimento e desenvolvimento. Já o metabolismo secundário origina compostos que são estruturalmente diferentes, são distribuídos diferencialmente entre um número limitado de espécies, pois não são necessários para a viabilidade celular (Crozier et al., 2006).

Sendo fonte de energia predominante para a fotossíntese da planta, a luz é um sinal essencial para o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Lee et al., 2007). Os fotorreceptores como a fototropinas, criptocromos e fitocromos, absorvem a luz e estimulam vias de sinalização, que influenciam intimamente a fisiologia da planta (Rao, 2015). Por meio dos fotorreceptores as plantas podem captar as variações na quantidade e qualidade de luz, adaptando seu desenvolvimento às condições a que estão expostas. A luz afeta o crescimento e o desenvolvimento da planta porque induz uma série de genes envolvidos diretamente na fotossíntese e também na biossíntese de carboidratos e metabólitos secundários (Staneloni et al., 2008; Reis et al., 2015).

As reações fotossintéticas ocorrem principalmente nas folhas, mais especificamente no mesofilo, região onde há maior atividade devido à presença de grande número de cloroplastos (Ferri, 1985). É nessa organela que se encontram as membranas dos tilacoides, um sistema de membranas internas no cloroplasto onde estão as clorofilas, pigmentos acessórios e os complexos proteicos (Granot, 2008), local onde ocorre a transformação da energia luminosa em energia química necessária para os metabolismos primário e secundário.

O fotorreceptor fitocromo é quem detecta a relação entre a luz vermelha e a vermelha distante, codificando um sinal celular e a excitação causada pela luz, o que

altera o metabolismo celular e influencia no desenvolvimento das plantas (Galvão e Fankhauser, 2015; Li et al., 2015; Kong e Okajima, 2016). A luz vermelha é importante para o desenvolvimento da estrutura fotossintética, podendo aumentar o acúmulo de amido em diversas espécies. O amido é sintetizado nos cloroplastos, parâmetros como o comprimento de onda, intensidade, direção e duração da luz podem alterar a quantidade de carbono fixado no ciclo de 24 horas da planta (Gibon et al., 2004a; Li e Mathews, 2016; Yang et al., 2016). As plantas podem armazenar diferentes quantidades de amido em suas folhas, dependendo de sua estratégia e/ ou mecanismos para sobreviver no período de escuro.

Outra resposta é correspondente à luz azul, a qual permite às plantas alterarem o seu crescimento, desenvolvimento e aclimatização em relação às condições ambientais. As plantas apresentam alta plasticidade fisiológica, incluindo o fototropismo, movimentos estomáticos, morfologia celular, ativação e/ ou silenciamento de genes, biossíntese de pigmentos dentre outros mecanismos que influenciam direta e indiretamente na biossíntese e assimilação de diversos compostos dentro da célula (Litthauer et al., 2015).

Os pigmentos, clorofilas e carotenoides, estão presentes em toda a estrutura dos vegetais. São capazes de absorver a radiação visível e com isso desencadeiam as reações fotoquímicas da fotossíntese, onde são metabolizados compostos essenciais para a sobrevivência das plantas (Cho et al., 2016; Mirkovic et al., 2016). O tipo, quantidade e incorporação de pigmentos dentro do aparato fotossintético dependem da qualidade e quantidade de luz (Macmahon et al., 1991). Diferentes faixas espectrais são absorvidas a fim de desencadear o processo fotossintético, a depender do pigmento. A clorofila *a* tem absorção máxima na faixa do azul e vermelho (Rossini et al., 2015), onde está o espectro de ação para a fotossíntese, já os pigmentos acessórios juntamente com a clorofila *b*, absorvem na faixa do azul e ultravioleta (Johkan et al., 2010; Park e Kim, 2010; Petroustos et al., 2016).

As antocianinas são uma classe dos flavonoides responsáveis por uma gama de cores em diversos órgãos das plantas. A biossíntese de antocianinas responde diretamente à luz, mas também está influenciada pelos níveis endógenos de açúcares e hormônios (Zoratti et al., 2014; Guan et al., 2016). No entanto, o transporte de antocianinas do seu local de síntese (citosol) para o vacúolo onde é armazenada, apresenta sensibilidade à luz, porém ainda não foi investigada (Guan et al., 2016).

A luz, além de estar relacionada com a biossíntese de diversos compostos do metabolismo primário, também participa ativamente na produção de metabólitos secundários (Ballaré, 2014; Estell et al., 2016). Os vários compostos do metabolismo secundário despertam interesse nos diversos campos da ciência que visam neles uma promissora fonte de moléculas potencialmente úteis ao homem por meio de substâncias farmacologicamente ativas, nos setores da indústria alimentícia, agrônômica e cosmética (Murthy et al, 2014; Davies e Deroles, 2014; Yue et al., 2016).

Os metabólitos secundários facilitam a interação das plantas com ambientes hostis, incluindo o papel essencial na defesa química contra herbívoros e patógenos. Esses compostos nas plantas são um grupo diversificado que inclui mais de 200 mil compostos, e a sua composição, bem como a concentração pode ser variável a nível de células, tecidos, órgãos e indivíduos, assim como também em diferentes estádios de desenvolvimento (Hartmann, 2007; Rubió et al., 2012; Wolfender et al., 2015).

Os metabólitos secundários são classificados em três grandes grupos: compostos fenólicos, terpenos e alcaloides (Dudareva et al., 2013). Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico e ácido mevalônico (Cheynier et al., 2013). Os terpenos são produzidos a partir do ácido mevalônico (no citosol) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (nos cloroplastos) (Oldfield e Lin, 2012; Schmelz et al., 2014). Enquanto que os alcaloides são provenientes de aminoácidos aromáticos, os quais são derivados do ácido chiquímico (Maeda e Dudareva, 2012). Os flavonoides, taninos e ligninas fazem parte dos compostos fenólicos como terpenos, saponinas e carotenoides (Peres, 2004; Agati et al., 2012; Brunetti et al., 2013).

Neste estudo foram investigados dois metabólitos, quercetina e campeferol, classificados como flavonoides. Ambos já foram identificados em outras espécies do gênero *Tropaeolum*. Nas plantas os flavonoides têm origem basicamente por duas vias bioquímicas diferentes, a primeira do ácido chiquímico e a segunda do acetato, via do ácido mevalônico (Quideau et al., 2011; Saito et al., 2013). A via do chiquimato é iniciada com a condensação de fosfoenolpiruvato (PEP) e eritrose-4-fosfato, para a formação do ácido chiquímico, que posteriormente formará corismato, molécula precursora dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano, pela ação da enzima fenilalanina amônio-liase (PAL) convertendo a fenilalanina em ácido trans-cinâmico. Nas reações enzimáticas subsequentes são originados esqueletos fenilpropanoides que servirão de substrato para a biossíntese de cumarinas, ligninas, flavonas, antocianinas e outros compostos fenólicos (Herrmann, 1995; Saito et al., 2013; Mouradov e Spangenberg, 2014).

A ampla importância e atuação dos metabólitos nas plantas mostra a necessidade e a relevância de seu conhecimento. Compreender o metabolismo possibilita entender a fisiologia, o crescimento e o desenvolvimento da espécie. Além disso, é ferramenta essencial para a produção de metabólitos de interesse medicinal que possa auxiliar na cura e tratamento de doenças.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido junto ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais II (Bioagro), Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas, Laboratório de Metabolismo de Plantas e casa de vegetação da Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG.

2.1 Material vegetal e condições de cultivo

As plantas matrizes foram obtidas através do brotamento de tubérculos e mantidas em vasos plásticos de 3 L contendo substrato para hortaliças e húmus de minhoca (3:1) e cultivados em condições semi-controladas de casa de vegetação com temperatura média de 26 ± 3 °C. A irrigação das plantas matrizes foi realizada a cada três dias a fim de manter a umidade do substrato nos vasos próxima à capacidade de campo e a cada duas semanas foi feita a suplementação nutritiva com 50 mL de solução de Hoagland e Arnon (1950).

As plantas cultivadas *in vitro* foram obtidas por meio de meristemas apicais e laterais das plantas de crem cultivadas em casa de vegetação. O cultivo *in vitro* se deu pela utilização do meio de cultura DKW, suplementado com 1,5% de sacarose e solidificado com 0,25% de Phytigel[®], o pH ajustado para $5,7 \pm 1$ antes da autoclavagem a 121° C por 20 min. O frasco de cultivo foi vedado com tampa de polipropileno com a presença de duas membranas porosas. O material vegetal foi mantido em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e diferentes condições lumínicas (luz fluorescente, LED branco, LED azul e vermelho) com fotoperíodo de 16h e irradiância de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.2 Caracterização dos tratamentos e delineamento experimental

As plantas matrizes de crem foram cultivadas em casa de vegetação, sob luminosidade natural. As plantas *in vitro* foram cultivadas durante 4 semanas, nas diferentes condições lumínicas citadas anteriormente. Foram coletadas as folhas +3 (terceira folha completamente expandida a partir do ápice) entre o horário de 12:00 e 13:00 horas. As folhas +3 foram escolhidas para as análises pois se tratavam de folhas totalmente desenvolvidas e expandidas.

As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente liofilizadas, pulverizadas com o auxílio de esferas metálicas em um disruptor celular do tipo *Mini Beadbeater 96* (Biospec Productc, Bartlesville, OK, Estados Unidos) e armazenadas em dessecador, até o início dos ensaios bioquímicos. Para a análise de metabólitos secundários, além do material correspondente às folhas submetidas a

tratamentos de luminosidade, também foram utilizadas amostras de tubérculos, que foram maceradas em nitrogênio líquido com almofariz e pistilo, e posteriormente, armazenadas a -80 °C.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC). Para as plantas cultivadas em casa de vegetação, foram coletadas amostras de 5 plantas, agrupando o material vegetal para 3 repetições. Nas plantas cultivadas *in vitro* a unidade experimental foi constituída de um frasco com quatro plantas e com 3 repetições para cada tratamento (condição de luminosidade).

2.3 Extração e determinação de clorofilas, carotenoides e antocianinas

Foi realizada extração etanólica por meio de série alcoólica (98%, 80% e 50% EtOH) e centrifugações. O extrato resultante foi analisado em leitor de ELISA (OptiMax Tunable Microplate Reader, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) nos comprimentos de onda 645 nm e 665 nm para os teores de clorofilas *a* e *b* e no comprimento de onda 470 nm para determinação dos carotenoides, estimados conforme Lichtenthaler (1987).

O teor de antocianinas totais foi determinado pelo método do pH diferencial (Giusti, 2007) com base na propriedade dos pigmentos de antocianina mudarem de cor com a alteração do pH. Foram preparadas duas diluições da mesma amostra, a primeira em tampão de cloreto de potássio (0,025 M, pH 1,0), e a segunda em tampão de acetato de sódio (0,4 M, pH 4,5), sendo o pH ajustado com HCl 0,2 N. A absorbância das duas diluições foi lida em leitor de ELISA a 510 nm e 700 nm. As antocianinas totais foram calculadas como segue:

$$\frac{\%w}{w} = \frac{A}{\varepsilon L} MWDF \frac{V}{W_t} 100 \quad (1)$$

$$A = (A_{510nm} - A_{700nm})_{pH1} - (A_{510nm} - A_{700nm})_{pH4.5} \quad (2)$$

Em que:

% w/w: porcentagem e peso/peso (mg/g)

A: absorbância

ε : coeficiente molar (26900 L/mol cm)

L: caminho ótico

MW: peso molecular (449,2 g/mol para cianidina 3-glicosídeo)

DF: fator de diluição

V: volume

Wt: peso da amostra

2.4 Determinação de proteínas, açúcares, amido e aminoácidos

O extrato etanólico também foi utilizado para quantificação de glicose, frutose e sacarose (Fernie et al., 2001). O precipitado da extração foi utilizado para quantificação de proteínas solúveis, pelo método de Bradford (1976), e para a quantificação de amido, seguindo a metodologia de Gibon et al. (2004b).

Para a quantificação dos açúcares, foram adicionados 20 μL do extrato a 280 μL do tampão de reação constituído de 100 mM imidazol, pH 6,9, 5 mM MgCl_2 , 2 mM NAD^+ , 2mM ATP e 2 U μL^{-1} da enzima desidrogenase glicose-6-fosfato. A reação foi continuamente registrada em um leitor de ELISA (OptiMax Tunable Microplate Reader, Sunnyvale, CA, Estados Unidos), a 340 nm. Adicionou-se 1 U reação⁻¹ de hexocinase para a determinação de glicose. Após a estabilização das leituras, adicionou-se 1 U reação⁻¹ de fosfoglicoisomerase, para a determinação de frutose. Por fim, após a estabilização dessa reação, adicionou-se 1 U reação⁻¹ de invertase, para a quantificação de sacarose.

Para quantificação de aminoácidos solúveis totais foi utilizado extrato etanólico, pelo método da ninidrina (Gibon et al., 2004b) e posteriormente lidas em leitor de ELISA nos comprimentos de onda 550 nm e 570 nm.

2.5 Quantificação de flavonoides: quercetina e campeferol

A quantificação de metabólitos secundários foi realizada em HPLC como descrito em Keinänen et al. (2001), com modificações. Utilizou-se 40 mg de massa seca de amostra que foi submetido à extração etanólica.

O sobrenadante foi purificado em filtro Millipore de 0,2 μm e amostras de 50 μl foram injetadas no HPLC com detector UV a 210, 254, 320 e 365 nm. O gradiente de eluição foi composto de: Fase A – 0,25% de H_3PO_4 em H_2O ultrapura (pH 2,2), Fase B – acetonitrila 100% e a programação de corrida: 0 – 6 min (0 – 12% B), 6 – 10 min (12 – 18% B) e 10 – 30 min (18 – 58% B) com fluxo de 1 ml min⁻¹ em coluna C18 (150 mm; 3,5 μm).

A identificação e concentração dos metabólitos foram estimadas pela comparação com o tempo de retenção e a curva de calibração contendo a mistura dos padrões para cada composto.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teores de pigmentos

Após quatro semanas de cultivo em diferentes condições ambiente foram realizadas análises bioquímicas de folhas.

Os valores apresentados pela Figura 1 referem-se aos teores de pigmentos foliares analisados para as quatro condições lumínicas: luz natural, fluorescente branca, LED branco e LED azul e vermelho.

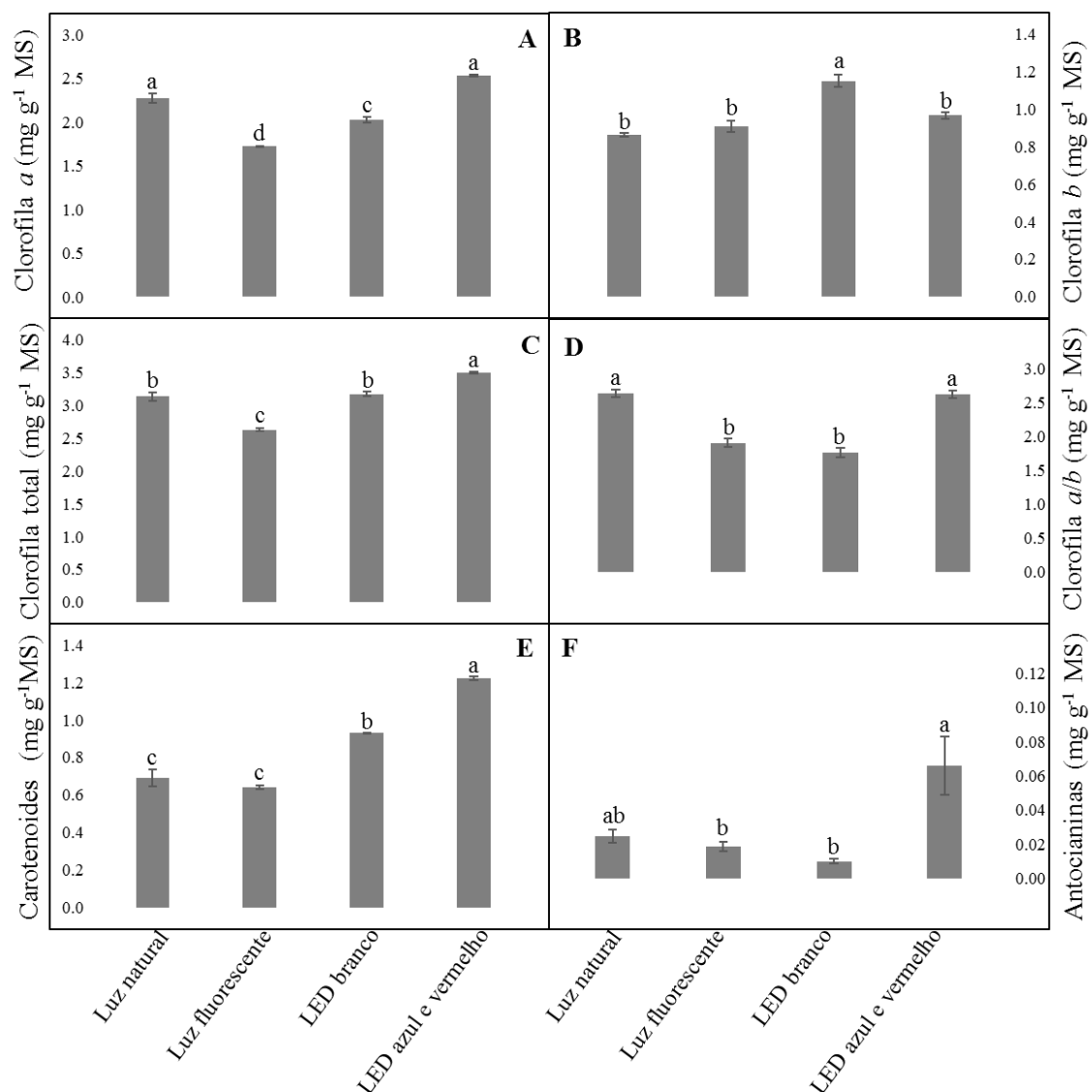


Figura 1. Teor de pigmentos em folhas de crem após quatro semanas de cultivo *ex vitro* e *in vitro* em diferentes condições lumínicas. A, clorofila a; B, clorofila b. C; clorofilas totais. D; a/b; E, carotenoides; F, antocianinas. Valores representam a média ± erro padrão e as letras indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (p < 0,05). MS: massa seca.

A plantas cultivadas sob luz natural em casa de vegetação e as cultivadas *in vitro* sob LED azul e vermelho, acumularam maiores teores de clorofila *a* (2,28 e 2,53 mg g⁻¹ de massa seca, respectivamente) e não demonstraram diferenças significativas (Figura 1A). Ao analisar os teores de clorofila *b*, plantas cultivadas *in vitro* sob iluminação com LED branco, foram as que mais acumularam (Figura 1B). Como consequência, as clorofilas totais (Figura 1C) e a razão clorofila *a/b* (Figura 1D) foram superiores nas plantas cultivadas em casa de vegetação com luminosidade natural e *in vitro* sob LED azul e vermelho.

Na determinação de carotenoides e antocianinas, verificou-se que as maiores médias foram obtidas por plantas cultivadas *in vitro* sob iluminação de LED azul e vermelho (Figura 1E, F).

Os pigmentos presentes nos vegetais absorvem a radiação visível, desencadeando reações fotoquímicas da fotossíntese, processo essencial para a sobrevivência das plantas, componente do metabolismo primário. Após absorção da luz pelos pigmentos, ocorre a transferência da energia luminosa, desencadeando eventos químicos da fotossíntese, como fixação do CO₂ e produção de carboidratos que são utilizados nos processos celulares das plantas e como fonte de energia (Johkan et al., 2010).

De acordo com o pigmento, a faixa espectral absorvida para desencadear o processo fotossintético é altamente específica (Fu et al., 2012). A máxima absorção de clorofila *a* e *b* estão no vermelho (663 – 642 nm, respectivamente) e as regiões azuis (430 – 453 nm, respectivamente) do espectro visível (Farnham e Kopsell, 2009), corroborando com os dados obtidos para o crem, ocorreu maior acúmulo de clorofilas *a* e *b* quando cultivados sob essa faixa espectral. Resultados similares foram obtidos por diferentes autores em outras espécies (Kopsell e Sams, 2013; Kuo et al., 2012).

Os dados obtidos neste estudo apontam maior quantidade de clorofilas em plantas cultivadas sob luz LED do que a iluminação por lâmpadas fluorescentes, comumente utilizadas em salas de crescimento *in vitro*. As lâmpadas fluorescentes emitem diversos comprimentos de ondas que são desnecessários e de baixa qualidade para a síntese de pigmentos e consequente promoção do crescimento da planta, além da elevada quantidade de calor que podem causar efeito foto estressante (Gupta e Jatohu, 2013).

A iluminação por LED apresenta dois diferenciais importantes, especificidade de comprimento de onda e superfície emissora fria. O primeiro fator auxilia na promoção da síntese de pigmentos, proporcionando otimização no metabolismo (Kim et al., 2004) além de respostas morfológicas associadas à diferenciação celular, e ao crescimento e

desenvolvimento dos tecidos (Nhut e Nam 2010; Yeh e Chung 2009; Kurilcik et al., 2008; Brown et al., 1995), enquanto que a não distribuição de calor pela superfície emissora diminui danos causados por estresse de temperatura (Gupta e Jatohu, 2013).

Pode-se afirmar que a intensidade luminosa a qual as plantas foram cultivadas foi suficiente para o seu pleno desenvolvimento. As concentrações de clorofila *b* obtidas neste estudo foram adequadas. Elevadas concentrações de clorofila *b* indicam plantas cultivadas sob sombreamento, ou em faixa espectral inferior ao ideal para determinada espécie (Zhu et al., 2008; Drozak e Romanowska, 2006).

A clorofila *b* juntamente com os demais pigmentos atuam como acessórios na captação e transferência de energia de outros comprimentos de onda para a molécula de clorofila *a*, que efetivamente participa das reações fotoquímicas da fotossíntese (Buchanan et al., 2015).

A razão clorofilas *a/b* das plantas cultivadas *in vitro* sob LED azul e vermelho não demonstrou diferença significativa quando comparada à condição de luz natural no cultivo em casa de vegetação (Figura 1D), por proporcionar comprimentos de onda semelhantes. Em situações que a razão clorofilas *a/b* nas condições de cultivo com iluminação por fluorescente ou LED branco (faixas espectrais não ideais para síntese de clorofila *a*) é superior, haveria significativa mudança estequiométrica dos fotossistemas que alterariam a eficiência do processo fotossintético (Victório et al., 2007).

As antocianinas tiveram maior síntese nas condições de luz artificial, com destaque para o cultivo sob LED azul e vermelho, que apresentou acúmulo três vezes superior ao das plantas cultivadas sob iluminação natural (Figura 1F). Resultados semelhantes foram identificados por Shoji et al. (2010), em estudos com alface e por Rodyoung et al., (2016) com videira, em que a irradiação pela luz azul promoveu maior síntese de antocianinas.

Diversos estudos vêm sendo realizados nas últimas décadas relacionados à qualidade espectral na síntese de pigmentos e desenvolvimento de plantas *in vitro* demonstrando resultados favoráveis aos sistemas de iluminação LED, mais benéficos e adequados que as lâmpadas fluorescentes.

3.2 Análise de metabólitos primários

Dentre as respostas da planta frente às diferentes condições lumínicas durante o cultivo, é provável que ocorram alterações no metabolismo primário. Foi realizada a quantificação de alguns metabólitos primários a fim de verificar as alterações que os

diferentes comprimentos de onda causam em sua síntese. Nas condições experimentais, não foram observadas diferenças estatísticas no acúmulo de proteínas (Figura 2 A), aminoácidos (Figura 2 B), frutose (Figura 2 D), sacarose (Figura 2 E) sob as diferentes condições lumínicas.

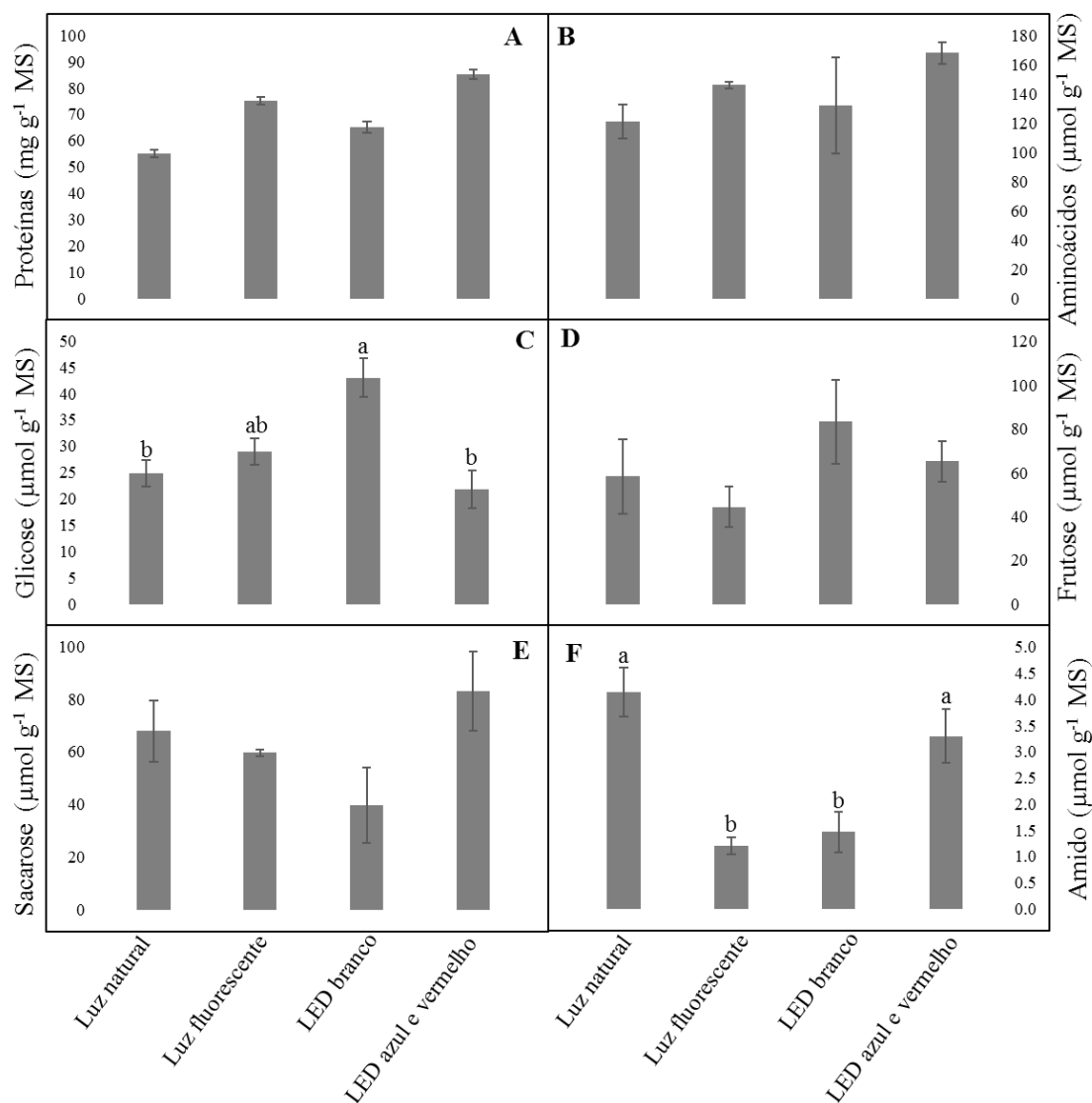


Figura 2. Teor de metabólitos primários em plantas de crem (*T. pentaphyllum*) após quatro semanas de cultivo *ex vitro* e *in vitro* em diferentes condições lumínicas. A, proteínas; B, aminoácidos; C, glicose; D, frutose; E, sacarose; F, amido. Valores representam a média \pm erro padrão e as letras indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). MS: massa seca.

Quanto ao amido, as plantas cultivadas *in vitro* sob condições lumínicas LED azul e vermelho não apresentaram diferenças significativas quando comparadas às plantas cultivadas *ex vitro* sob irradiação natural (3,30 e 4,14 mg g⁻¹ de massa seca, respectivamente). As demais condições lumínicas utilizadas no cultivo *in vitro*,

demonstraram quantidades inferiores de amido. As maiores concentrações de glicose foram verificadas nas plantas cultivadas *in vitro* sob irradiância LED branco e luz fluorescente (42, 95 e 28, 98 mg g⁻¹ de massa seca, respectivamente).

O amido presente nas folhas de plantas cultivadas sob irradiâncias nas regiões do vermelho e azul, que são as de maior absorção das clorofilas *a* e *b*, está intimamente relacionada à concentração desses pigmentos que atuam durante o processo de fotossíntese. Plantas de crem cultivadas nesses espectros luminosos, demonstraram maiores concentrações destes pigmentos.

O acúmulo de amido ocorre durante o dia em virtude dos fotoassimilados produzidos nas folhas por meio da fotossíntese. A quantidade produzida é maior do que a translocada pelo floema, fazendo com que a concentração de amido nas folhas seja maior neste período (Stitt e Zeeman, 2012).

Em folhas fotossinteticamente ativas, além da presença de luz, a síntese dos grãos de amido também é dependente da atividade enzimática. Nos cloroplastos a biossíntese de amido aumenta por meio da ativação da ADP-glicose pirofosfatase, por mecanismos dependentes da tiorredoxina. Com a tiorredoxina livre, a ADP-glicose pirofosfatase, é regulada primariamente pela luz via ferredoxina e ferredoxina-tiorredoxina redutase. Alternativamente, a NADP-tiorredoxina redutase C complementa o sistema ferredoxina-tiorredoxina na ativação redox da enzima na luz (Taiz e Zeiger, 2013).

Durante a noite o amido dos cloroplastos é degradado por meio de duas vias: a hidrolítica em que é degradado liberando glucose, mediante a ação das enzimas amilase, β -amilase, enzima desramificadora e a α -1,4-glucosidase; e a via fosforolítica, em que é degradado liberando glicose 1-fosfato, pela ação da enzima fosforilase do amido (Silver et al., 2014). Esse amido degradado é utilizado na etapa inicial da respiração, a glicólise, que ocorre no citosol. Desta forma o produto da degradação do amido atravessa a membrana do plastídio, por meio de carreadores específicos, para então ter acesso à maquinaria respiratória mitocondrial (Buchanan et al., 2015).

Os dados obtidos neste estudo para a síntese de amido e glicose traduzem os processos metabólicos de fotossíntese e respiração. No primeiro processo são formados os carboidratos por meio da luz, CO₂ e água, e o produto desta reação é degradado a fim de formar moléculas energéticas utilizadas no processo de respiração que ocorre com maior intensidade no período noturno ou em irradiâncias luminosas menores.

As moléculas de amido sintetizadas nas folhas além de servirem para obtenção de açúcares utilizados na respiração, poderão seguir com o metabolismo da sacarose e serem

sintetizadas novamente, ficando armazenadas na forma de amido secundário, nos tubérculos das plantas de crem.

3.3 Quantificação de metabólitos secundários

As variações lumínicas podem interferir no metabolismo especializado das plantas. Neste estudo foi realizada a quantificação dos flavonoides, quercetina e campeferol, em dois órgãos de plantas de crem: tubérculo e folhas oriundas de plantas cultivadas em casa de vegetação sob luz natural e folhas de plantas *in vitro* em diferentes comprimentos de onda (Figura 3).

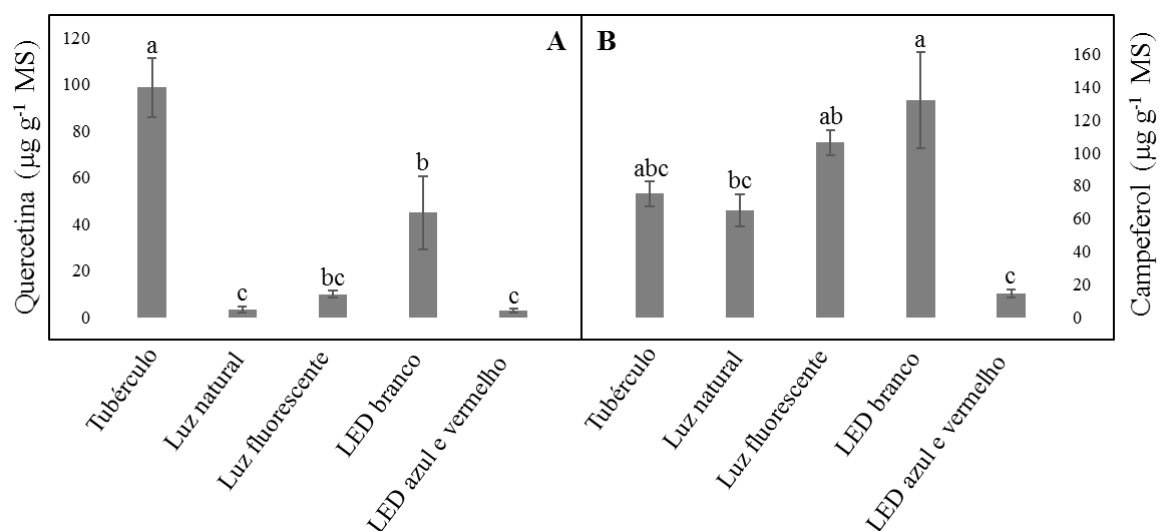


Figura 3. Teor de metabólitos secundários em tubérculos e plantas de crem (*T. pentaphyllum*) cultivados em diferentes condições de cultivo. A, quercetina; B, campeferol. Valores representam a média \pm erro padrão e as letras indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). MS: massa seca.

O metabólito quercetina (Figura 3 A) demonstrou maior concentração no tubérculo ($98,67 \mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca) enquanto que nas folhas a maior quantidade identificada foi metade ($9,84 \mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca) em plantas cultivadas sob LED branco. A condição de cultivo *ex vitro* sob luz natural demonstrou baixa concentração deste metabólito ($3,29 \mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca).

Enquanto que para o campeferol (Figura 3 B), as maiores concentrações foram identificadas nas folhas. A condição que proporcionou maior acúmulo ocorreu em plantas *in vitro* sob iluminação LED branco ($131,74 \mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca). A presença deste metabólito no tubérculo, não diferiu significativamente da melhor condição, porém a quantidade identificada foi aproximadamente 40% inferior ($75,05 \mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca).

As vias de biossíntese que sintetizam metabólitos primários também fornecem moléculas que são utilizadas como precursoras na síntese de metabólitos secundários. A concentração diferenciada dos metabólitos analisados nos tubérculos pode estar associada à realocação de carbono para um órgão de reserva, e pela maior disponibilidade de carboidratos que além de serem utilizados no Ciclo de Calvin durante o processo de respiração, seguem para as vias de biossíntese de flavonoides (acetato e ácido chiquímico) e outros metabólitos secundários (Zhong, 2001).

A concentração de metabólitos de reserva em tubérculos estimula a expressão de genes que estão envolvidos na biossíntese de moléculas especializadas. A expressão desses genes também passa por variações durante o desenvolvimento do órgão em razão das diferentes concentrações de açúcares disponíveis (Solfanelli et al., 2006; Appeldoorn et al., 1999).

De acordo com Maffei (2010), os metabólitos secundários são a maneira que as plantas utilizam para se comunicarem ou responderem a estímulos externos. A principal função desses compostos é facilitar a interação da planta com o ambiente por meio do estabelecimento de um mecanismo de defesa às condições hostis (Verpoorte et al., 2002; Degenhardt, 2008). Cada espécie desempenha um singular conjunto de mecanismos para regulação da biossíntese, que está relacionada à evolução e principalmente aos fatores genéticos e abióticos (Pavarini et al., 2012).

Os flavonoides se acumulam na epiderme das folhas, atuando como antioxidantes que protegem as células de danos causados por espécies reativas de oxigênio (Fu et al., 2016), desempenhando importante papel biológico na adaptação das plantas no ambiente e resistência a estresses (Ravaglia et al., 2013).

Sistemas de cultivo *in vitro* são utilizados para produção e melhor extração de metabólitos como a quercetina e o campeferol em diversas espécies. Metabólitos secundários, entre eles a quercetina são extraídos da espécie *Glycyrrhiza glabra*, que por não ser cultivada comercialmente sofreu extrativismo descontrolado em virtude de suas propriedades medicinais. O cultivo *in vitro* é uma alternativa para a obtenção de material vegetal que possa ser utilizado na obtenção de metabólitos secundários utilizados no tratamento de diversas doenças, entre elas o câncer (Khan et al., 2016). Estudos demonstraram que o cultivo *in vitro* associado ao tipo de meio de cultura e/ou condições lumínicas aumentaram a produção de quercetina em *Larrea divaricata* (Palacio et al., 2012), *Maytenus emarginata* (Mathur e Goswami, 2012), *Terminalia arjuna* (Sharma, 2014), *Opuntia megacantha* (Roblez-Martínez et al., 2016) e para o campeferol em

Malus spp. (Lu et al., 2015), *Silybum marianum L.* (Khan et al., 2105) *Kalanchoe pinnata* (Neves et al., 2016) entre outras.

Há diversos estudos sugerindo que a manipulação da luz auxilia no acúmulo de metabólitos secundários (Murthy et al., 2014; Bartwal et al., 2013; Yu et al., 2005). Para os dois metabólitos avaliados nas folhas, pode-se verificar que houve maior acúmulo nas plantas cultivadas sob iluminação de cor branca (LED ou fluorescente), faixa de espectro visível.

De acordo com os dados relatados anteriormente sobre os teores de pigmentos, nessas faixas espectrais, ocorreram as concentrações mais baixas de clorofilas *a* e *b*, o que provavelmente influencia na fotossíntese e em consequência no crescimento e desenvolvimento da planta. Desta forma, entende-se que essa faixa espectral estimulou a planta, e por isso ocorreu a formação de maiores quantidades de metabólitos especializados, que atuam como forma de defesa.

A regulação da biossíntese de flavonoides está associada com a intensidade da luz, fitocromos e histonas (Tessadori et al., 2009). A relação entre vermelho e vermelho distante e ultravioleta são os fatores mais estudados a respeito do efeito da qualidade da luz na produção dessa classe de metabólitos. Os dados obtidos nas análises realizadas com crem não corroboram com alguns encontrados na literatura. Jaakola et al. (2004) afirmam que elevada razão vermelho e vermelho distante facilita a síntese de flavonoides (Alokam et al., 2002). Também há estudos demonstrando os efeitos da luz azul no acúmulo de flavonoides (Kadomura-Ishikawa et al., 2015; Xu et al., 2014; Zoratti et al., 2014).

A manipulação dos fatores abióticos atua com o intuito de promover o acúmulo desses compostos de interesse, porém os fatores que influenciam com maior expressividade na formação desses compostos são as características genéticas, idade, maturação e o período de coleta do material vegetal que será analisado.

4. CONCLUSÕES

O acúmulo de clorofila *a* e *b*, assim como teores de amido e glicose em plantas cultivadas em casa de vegetação sob luminosidade natural e plantas cultivadas *in vitro* sob LED azul e vermelho mostraram-se similares. Enquanto que a síntese de metabólitos primários como proteínas, aminoácidos, sacarose e frutose não diferiram entre as condições de cultivo avaliadas.

Pigmentos como carotenoides e antocianinas demonstraram maior expressividade em folhas de plantas cultivadas *in vitro* sob iluminação LED azul e vermelho em comparação com plantas cultivadas sob LED branco ou lâmpadas fluorescentes.

Os tubérculos alocaram maiores concentrações de quercetina. O campeferol acumulou de maneira similar em folhas e tubérculos. A luz LED branca promoveu o acúmulo destes metabólitos secundários em folhas de crem diferindo significativamente das outras condições de cultivo.

5. REFERÊNCIAS

- AGATI, G.; AZZARELLO, E.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. (2012) **Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance**. Trends Plant Sci., 196:67-76.
- ALOKAM, S.; CHINNAPPA, C.; REID, D. M. (2002) **Red/far-red light mediated stem elongation and anthocyanin accumulation in *Stellaria longipes*: differential response of alpine and prairie ecotypes**. Can. J. Bot., 80:72-81.
- APPELDOORN, N. J. G.; BRUIJN, S. M. D.; KOOT-GRONSVELD, E. A. M.; VISSER, R. G. F.; VREUGDENHIL, D.; PLAS, L. H. W. V. D. (1999) **Developmental changes in enzymes involved in the conversion of hexose phosphate and its subsequent metabolites during early tuberization of potato**. Plant Cell Environ., 22:1085-1096.
- BALLARÉ, C. L. (2014) **Light regulation of plant defense**. Annu Rev Plant Biol, 53:335-363.
- BARTWAL, A.; MALL, R.; LOHANI, P.; GURU, S. K.; ARORA, S. (2013) **Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stress**. J. Plant Growth Regul., 32(1):216-232.
- BRADFORD, M. M. (1976). **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Anal. Biochem., 72(1-2):248-254.
- BROWN, C. S.; SCHUERGER, A. C.; SAGER, J. C. (1995) **Growth and photomorphogenesis of pepper under red light-emitting diodes with supplemental blue or far-red lighting**. J Am Soc Hortic Sci., 120:808–813.
- BRUNETTI, C.; DI FERDINANDO, M.; FINI, A.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. (2013) **Flavonoids as antioxidants and developmental regulators: relative significance in plants and humans**. Int. J. Mol. Sci., 14(2):3540-3555.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. John Wiley & Sons, 2015.
- CHEYNIER, V.; COMTE, G.; DAVIES, K. M.; LATTANZIO, V.; MARTENS, S. (2013) **Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology**. Plant Physiol. Biochem., 72:1-20.
- CHO, E-A.; LEE, J-Y.; LEE, S-G.; JANG, G-S. (2016) **Relating light reflectance of a leaf to light absorbance by foliar chlorophyll as a preliminary approach to detection of forest condition by remote sensing**. J Anim Plant Sci, 26(4):963-976.
- CORADIN, L.; RIMINSKI, A.; REIS, A. (2011) **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico atual ou Potencial, Plantas para o Futuro – Região Sul**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília – DF.
- CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. In: CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. **Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet**. Ames, Iowa –EUA. Blackwell Publishing, 2006.

- DAVIES, K.; DEROLE, S. C. (2014) **Prospects for the use of plant cell cultures in food biotechnology**. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 26:133-140.
- DEGENHARDT, J. (2008) **Ecological roles of vegetative terpene volatiles**. In: Andreas, J., Schaller (Eds.), *Induced Plant Resistance to Herbivory*. Stuttgart, Germany.
- DROZAK, A.; ROMANOWSKA, E. (2006) **Acclimation of mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize to different irradiances during growth**. *Biochem Biophys Res Commun*, 1757:1539–1546.
- DUDAREVA, N.; KLEMPIEN, A.; MUHLEMANN, J. K.; KAPLAN, I. (2013) **Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds**. *New Phytol.*, 198(1):16-32.
- ESTELL, R. E.; FREDRISCKSON, E. L.; JAMES, D. K. (2016) **Effect of light intensity and wavelength on concentration of plant secondary metabolites in the leaves of *Flourensia cernua***. *Biochem. Syst. Ecol.*, 65:108-114.
- FARNHAM, M. W., KOPSELL, D. A. (2009) **Importance of genotype on carotenoid and chlorophyll levels in broccoli heads**. *HortScience* 44(5):1248-1253.
- FERNIE, A. R.; ROSCHER, A.; RATCLIFFE, R. G.; KRUGER, N. J. (2001) **Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells**. *Planta*, 212:250–263.
- FERRI, M. G. **Fisiologia Vegetal**. São Paulo: EPV p. 181-209, 1985.
- FU, W.; LI, P.; WU, Y. (2012). **Effects of different light intensities on chlorophyll fluorescence characteristics and yield in lettuce**. *Sci. Hortic.*, 135:45–51.
- GALVÃO, V. C.; FANKHAUSER, C. (2015). **Sensing the light environment in plants: photoreceptors and early signaling steps**. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 34:46-53.
- GIBON, Y.; BLÄSING, O. E.; PALACIOS-ROJAS, N.; PANKOVIC, D.; HENDRIKS, J. H.; FISAHN, J.; HÖHNE, M.; GUNTHER, M.; STITT, M. (2004a) **Adjustment of diurnal starch turnover to short days, depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the following light period**. *Plant J.*, 39:847-862.
- GIBON, Y.; BLAESING, O. E.; HANNEMANN, J.; CARILLO, P.; HÖHNE, M.; HENDRIKS, J. H.; PALACIOS, N.; CROSS, J.; SELBIG, J.; STITT, M. (2004b) **A Robot-Based Platform to Measure Multiple Enzyme Activities in *Arabidopsis* Using a Set of Cycling Assays: Comparison of Changes of Enzyme Activities and Transcript Levels during Diurnal Cycles and in Prolonged Darkness**. *Plant Cell*, 16:3304–3325.
- GIUSTI, M. M. **Analysis of anthocyanins**, In: **Food Colorants Chemical and Functional Properties**. CRC Press. p. 429-547, 2007.

- GRANOT, D. (2008) **Putting plant hexokinases in their proper place**. *Phytochemistry*, 69:2649–2654.
- GUAN, L.; DAI, Z.; WU, B.; WU, J.; MERLIN, I.; HILBERT, G.; RENAUD, C.; GOMES, E.; EDWARDS, E.; HUA-LI, S.; DELROT, S. (2016) **Anthocyanin biosynthesis is differentially regulated by light in the skin and flesh of white-fleshed and teinturier grape berries**. *Planta*, 243(1):23-41.
- GUPTA, S. D.; JATOHU, B. (2013) **Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in in vitro plant growth and morphogenesis**. *Plant Biotechnol Rep.*, 7:211–220.
- HARTMANN, T. (2007) **From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism**. *Phytochemistry*, 68:2831–2846.
- HERRMANN, K. M. (1995) **The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism**. *Plant Physiol*, 107(1):7-12.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. (1950) **The water culture method for growing plants without soil**. California Agricultural Experiment Station (2nd edit). 347:1–38.
- JAAKOLA, L.; MÄÄTTÄ-RIIHINEN, K.; KÄRENLAMPI, S.; HOHTOLA, A. (2004) **Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves**. *Planta* 218:721–728.
- JOHKAN, M.; SHOJI, K.; GOTO, F.; HASHIDA, S.; YOSHIHARA, T. (2010) **Blue light-emitting diode light irradiation of seedlings improves seedling quality and growth after transplanting in red leaf lettuce**. *HortScience* 45:1809-1814.
- KADOMURA-ISHIKAWA, Y., MIYAWAKI, K., TAKAHASHI, A., MASUDA, T.; NOJI, S. (2015) **Light and abscisic acid independently regulated FaMYB10 in *Fragaria* × *ananassa* fruit**. *Planta*, 241:953-965.
- KEINÄNEN, M., OLDHAM, N. J. & BALDWIN, I. T. (2001). **Rapid HPLC screening of jasmonate-induced increases in tobacco alkaloids, phenolics, and diterpene glycosides in *Nicotiana attenuata***. *J Agric Food Chem*, 49:3553-3558.
- KHAN, S.; PANDOTRA, P.; MANZOOR, M. M.; KUSCHWAHA, M.; SHARMA, R.; JAIN, S.; AHUJA, A.; AMANCHA, V.; BHUSHAN, S.; GURU, S. K.; GUPTA, A. P.; VISHWAKARMA, R.; GUPTA, S. (2016) **Terpenoid and flavonoid spectrum of in vitro cultures of *Glycyrrhiza glabra* revealed high chemical heterogeneity: platform to understand biosynthesis**. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 124(3):507-516.
- KHAN, M. A.; ABBASI, B. H.; SHAH, N. A.; YÜCESAN, B.; ALI, H. (2015) **Analysis of metabolic variations throughout growth and development of adventitious roots in *Silybum marianum* L. (Milk thistle), a medicinal plant**. *Plant Cell Tiss Organ cult*, 123(3):501-510.
- KIM, H. H.; GOINS, G. D.; WHEELER, R. M.; SAGER, J. C. (2004) **Stomatal conductance of lettuce grown under or exposed to different light qualities**. *Ann Bot.*, 94:691–697.
- KONG, S-G.; OKAJIMA, K. (2016) **Diverse photoreceptors and light responses in plants**. *J. Plant Res.*, 129(2):111-114.

- KOPSELL, D. A.; SAMS, C. E. (2013) **Increases in shoot tissue pigments, glucosinolates, and mineral elements in Sprouting Broccoli after exposure to short-duration blue light from light emitting diodes.** J Am Soc Hortic Sci, 138(1):31-37.
- KUO, F., CHIEN, Y.; CHEN, C. (2012) **Effect of light sources on growth and carotenoid content of photosynthetic bacterial *Rhodospseudomonas palustris*.** Bioresour. Technol., 113:315-318.
- KURILCIK, A.; CANOVA, M. R.; DAPKUNIENE, S.; ZILINSKAITE, S.; KURILCIK, G.; TAMULAITI, S. G.; DUCHOVSKIS, P.; ZUKAUSKAS, A. (2008) ***In vitro* culture of Chrysanthemum plantlets using light emitting diodes.** Cent Eur J Biol., 3:161-167.
- LEE, S. H.; TEWARI, R. K.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. (2007) **Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania somnifera* (L.) Dunal. plantlet.** Plant Cell Tiss Organ Cult., 90(2):141-151.
- LI, F-W.; MATHEWS, S. (2016) **Evolutionary aspects of plant photoreceptors.** J. Plant Res., 129(2):115-122.
- LI, F-W.; MELKONIAN, M.; ROTHFLES, C. J.; VILLARREAL, J. C.; STEVENSON, D. W.; GRAHAM, S. W.; WONG, G. K-S.; PRYER, K. M.; MATHEWS, S. (2015) **Phytochrome diversity in green plants and the origin of canonical plant phytochromes.** Nat Commun, 6:7852. DOI: 10.1038/ncomms8852
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In: **Methods in Enzymology.** Academic Press, pp 350–382,1987.
- LITTHAUER, S.; BATTLE, M. W.; LAWSON, T., JONES, M. A. (2015) **Phototropins maintain robust circadian oscillation of PSII operating efficiency under blue light.** Plant J, 83(6):1034-1045.
- LU, Y.; CHANG, M.; MENG, X.; WAN, H.; ZHANG, J.; TIAN, J.; HAO, S.; JIN, K.; YAO, Y. (2015) **Photoperiod and shading regulate coloration and anthocyanin accumulation in the leaves of malus crabapples.** Plant Cell Tiss Organ Cult, 121(3):619-632.
- MACMAHON, M. J.; KELLY, J. W.; DECOTEAU, D. R.; YOUNG, R.E.; POLLOCK, R.K. (1991) **Growth of *Dendranthema x Grandiflorum* (Ramat.) Kitamura under various spectral filters.** J Am Soc Hortic Sci, 116: 950-954.
- MAEDA, H.; DUDAREVA, N. (2012) **The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants.** Annu Rev Plant Biol, 63:73-105.
- MAFFEI, M. E. (2010) **Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles.** S. Afr. J. Bot., 76:612-631.
- MATHUR, S.; GOSWAMI, A. (2012) **Production, isolation and estimation of *Maytenus emarginata* flavonoids in vivo and in vitro.** IJSR, 3(5):339-342.
- MIRKOVIC, T.; OSTROUMOV, E. E.; ANNA, J. M.; GRONDELLE, R. V.; SCHOLE, G. D. (2016) **Light absorption and energy transfer in the antenna complexes of photosynthetic organisms.** Chem. Rev., DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00002.

- MOURADOV, A.; SPANGENBERG, G. (2014) **Flavonoids: a metabolic network mediating plants adaptation to their real state**. *Front Plant Sci*, 5: doi: 10.3389/fpls.2014.00620
- MURTHY, H. N.; LEE, E.; PAEK, K. (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):1-16.
- NEVES, C. R. S. S.; PROCÓPIO, M. C.; PENNA, T. C. V. (2016) **Micropropagation photoautotrophic *Kalanchoe pinnata* in water and humus with use of natural light, and determination of total flavonoids: A review**. *IJSRST*, 2(4):01-13.
- NHUT, D. T.; NAM, N. B. (2010) **Light emitting diodes (LEDs): an artificial lighting source for biological studies**. In: Proceedings of the 3rd international conference of the development of BME in Vietnam, 37:134-139.
- OLDFIELD, E.; LIN, F-Y. (2012) **Terpene Biosynthesis: Modularity rules**. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 51(5):1124-1137.
- PALACIO, L.; CANTERO, J. L.; CUSIDÓ, R. M.; GOLENIOWSKI, M. E. (2012) **Phenolic compound production in relation in to differentiation in cell and tissue cultures of *Larrea divaricata* (Cav.)**. *Trends Plant Sci.*, 193-194:1-7.
- PARK, S. Y.; KIM, M. J. (2010) **Development of zygotic embryos and seedlings is affected by radiation spectral compositions from light emitting diode (LED) system in Chestnut (*Castanea crenata* S. et S.)**. *J Korean Soc.*, 99:750-754.
- PAVARINI, S. P.; PAVARINI, S. P.; NIEHUES, N. P. L. (2012) **Exogenous influences on plant secondary metabolite levels**. *Anim Feed Sci Technol*, 176:5-16.
- PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/Universidade de São Paulo, p. 1-10, 2004.
- PETROUTSOS, D.; TOKUTSU, R.; MARUYAMA, S.; FLORI, S.; GREINER, A.; MAGNESCHI, L.; CUSANT, L.; KOTTKE, T.; MITTAG, M.; HEGEMANN, P.; FINAZZI, G.; MINAGAWA, J. (2016) **A blue-light photoreceptor mediated the feedback regulation of photosynthesis**. *Nature*, 537:563-566.
- QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSEGU, L. (2011) **Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis**. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 50(3):586-621.
- RAO, A. Q. (2015) **An overview of phytochrome: an important light switch and photo-sensory antenna for regulation of vital functioning of plants**. *Biologia*, 70(10):1273–128.
- RAVAGLIA, D.; ESPLEY, R. V.; HENRY-KIRK, R. A.; ANDREOTTI, C.; ZIOSI, V.; HELLENS, R. P.; COSTA, G.; ALLAN, A.C. (2013) **Transcriptional regulation of flavonoid biosynthesis in nectarine (*Prunus persica*) by a set of R2R3 MYB transcription factors**. *BMC Plant Biol.* 13:13-68.
- REIS, A.; KLEINOWSKI, A. M.; KLEIN, F. R. S.; TELLES, R. T.; DO AMARANTE, L.; BRAGA, E. J. B. (2015) **Light quality on the in vitro growth and production of pigments in the genus *Alternanthera***. *J Crop Sci Biotechnol.*, 18(5):349–357.

- ROBLES-MATÍNEZ, M.; BARBA-DE LA ROSA, A. P.; GUÉRAUD, F.; NEGRE-SALVAYRE, A.; ROSSIGNOL, M.; SANTOS-DIAZ, M. S. (2016) **Establishment of callus and cell suspensions of wild and domesticated *Opuntia* species: study on their potential as a source of metabolite production.** *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 124(1):181-189.
- RODYOUNG, A.; MASUDA, Y.; TOMIVANA, H.; SAITO, T.; OKAWA, K.; OHARA, H.; KONDO, S. (2016) **Effects of light emitting diode irradiation at night on abscisic acid metabolism and anthocyanin synthesis in grapes in different growing seasons.** *J. Plant Growth Regul.*, 79(1):39-46.
- ROSSINI, M.; NEDBAL, L.; GUANTES, L.; Ač, A.; ALONSO, L.; BURKART, A.; COGLIATI, S.; COLOMBO, R.; DAMM, A.; DRUSCH, M.; HANUS, J.; JANOUTOVA, R.; JULITTA, T.; KOKKALIS, P.; MORENO, J.; NOVOTNY, J.; PANIGADA, C.; PINTO, F.; SCHICKLING, A.; SCHÜTTEMMEYER, D.; ZEMEK, F.; RASCHER, U. (2015) **Red and far red sun induced chlorophyll fluorescence as a measure of plant photosynthesis.** *Geophys Res Lett*, 42(6):1632-1639.
- RUBIÓ, L.; MOTILVA, M-J.; ROMERO, M-P. (2012) **Recent advances in biologically active compounds in herbs and spices: A review of the most effective antioxidant and anti-inflammatory active principles.** *CRC Crit Rev Food Sci Nutr*, 53(9):943-953.
- SAITO, K.; YONEJURA-SAKAKIBARA, K.; NAKABAYASHI, R.; HIGASHI, Y.; YAMAZAKI, M.; TOHGE, T.; FERNIE, A. R. (2013) **The flavonoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*: structural and genetic diversity.** *Plant Physiol. Biochem.*, 72:21-34.
- SCHMELZ, E. A.; HUFFAKER, A.; SIS, J. W.; CHRISTENSEN, S. A.; LU, X.; OKADA, K.; PETERES, R. J. (2014) **Biosynthesis, elicitation and roles of monoterpene phytoalexins.** *Plant J.*, 79(4):659-678.
- SHARMA, P. (2014) **Production of flavonoids from *Terminalia arjuna* (ROXB.) in vivo and in vitro tissue cultures.** *Int. J. ChemTech Res.*, 6(2):881-885.
- SHOJI, K.; GOTO, E.; HASHIDA, S.; GOTO, F.; YOSHIHARA, T. (2010) **Effect of red light and blue light on the anthocyanin accumulation and expression of anthocyanin biosynthesis genes in red-leaf lettuce.** *J. SHITA*, 22(2):107-113.
- SILVER, D. M.; KÖTTING, O.; MOORHEAD, G. B. G. (2014) **Phosphoglucan phosphatase function sheds light on starch degradation.** *Trends in Plant Sci.*, 19(7):471-478.
- SOLFANELLI, C.; POGGI, A.; LORETI, E.; ALPI, A.; PERATA, P. (2006) **Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*.** *Plant Physiol.*, 140:637-646.
- STANELONI, R. J.; RODRIGUEZ-BATILLER, M. J.; CASAL, J. J. (2008) **Abscisic acid, high-light, and oxidative stress down-regulate a photosynthetic gene via a promoter motif not involved in phytochrome-mediated transcriptional regulation.** *Mol Plant.*, 1(1):75-83.
- STITT, M.; ZEEMAN, S. C. (2012) **Starch turnover: pathways, regulation and role in growth.** *Curr. Opin. Plant Biol.*, 15:282-292.

- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal** 5ed. Porto Alegre: Artmed p.918, 2013.
- TESSADORI, F.; VAN ZANTEN, M.; PAVLOVA, P.; CLIFTON, R.; PONTVIANNE, F.; SNOEK, L. B.; MILLENAAR, F. F.; SCHULKES, R. K.; VAN DRIEL, R.; VOESENEK, L. A. (2009) **Phytochrome B and histone deacetylase 6 control light-induced chromatin compaction in *Arabidopsis thaliana***. PLoS Genet., 5:e1000638.
- VERPOORTE, R.; CONTIN, A.; MEMELINK, J. (2002) **Biotechnology for the production of plant secondary metabolites**. Phytochem Rev., 1:13-25.
- VICTÓRIO, C. P.; KUSTER, R. M.; LAGE, C. L. S. (2007) **Qualidade de luz e produção de pigmentos fotossintéticos em plantas *in vitro* de *Phyllanthus tenellus* Roxb.** Ver Bras Biosciências, 5(2):213-215.
- XU, F., CAO, S., SHI, L., CHEN, W., SU, X.; YANG, Z. (2014) **Blue light irradiation affects anthocyanin content and enzyme activities involved in postharvest strawberry fruit**. J. Agric. Food Chem., 62(20):4778-4783.
- ZHONG, J. J. (2001). **Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures**. Springer Berlin Heidelberg. pp. 1-26.
- ZHU, P.; YANG, S-M.; MA, J.; LI, S-X.; CHEN, Y. (2008) **Effect of shading on the photosynthetic characteristics and yield at later growth stage of hybrid rice combination**. Acta Agronomica Sinica, 34:2003-2009.
- ZORATTI, L.; KARPPINEN, K.; LUENGO ESCOBAR, A.; HÄGGMAN, H.; JAAKOLA, L. (2014) **Light-controlled flavonoid biosynthesis in fruits**. Front Plant Sci., 5:534.
- WOLFENDER, J-L.; MARTI, G.; THOMAS, A.; BERTRAND, S. (2015) **Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts**. J Chromatogr A, 1382:136-164.
- YANG, D.; SEATON, D. D.; KRAHMER, J.; HALLIDAY, K. J. (2016) **Photoreceptor effects on plant biomass, resource allocation, and metabolic state**. PNAS, 113(27):7667-7672.
- YEH, H.; CHUNG, J. P. (2009) **High-brightness LEDs-energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation**. Renew Sust Energy Rev, 13:2175–2180.
- YU, K. W.; MURTHY, H. N.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. (2005) **Ginsenoside production by hairy root cultures of *Panax ginseng*: influence of temperature and light quality**. Biochem Eng J., 23:53-56.
- YUE, W.; MING, Q-L.; LIN, C.; RAHMAN, K.; ZHENG, C-J.; HAN, T. (2016) **Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites**. Crit. Rev. Biotechnol., 36(2):215-232.

CONCLUSÕES GERAIS

Por meio deste estudo foi possível estabelecer um protocolo de clonagem *in vitro* eficiente para o crem (*T. pentaphyllum*) que servirá de referência para melhorias na micropropagação desta espécie.

O cultivo do crem em meio de cultura DKW semissólido e em condições fotomixotróficas proporcionou satisfatório desenvolvimento e vigor da espécie, bem como, elevado índice de plantas sobreviventes após a aclimatização. Condições de enraizamento *ex vitro* são indicadas para a finalização do protocolo de clonagem, não sendo necessária a adição de auxinas para a formação completa do sistema radicular.

Os ensaios bioquímicos demonstraram poucas alterações entre plantas cultivadas *in vitro* sob diferentes condições lumínicas e plantas sob cultivo *ex vitro* nos principais metabólitos primários e pigmentos. Os tubérculos de crem indicaram maior acúmulo do flavonoide quercetina quando comparado às folhas, enquanto que o flavonoide campeferol mostrou-se presente em maior quantidade nas folhas. Plantas cultivadas *in vitro* sob LED branco promoveram maior acúmulo dos flavonoides quantificados em relação às outras condições de cultivo.

ANEXO

Tabela 1. Constituição dos meios de cultura utilizados na propagação de *Tropaeolum pentaphyllum*

Componente	-----mg L ⁻¹ -----					
Macronutrientes	WPM	QL	DKW	Rugini	MS	JADS
NH ₄ NO ₃	400	400	1416	412	1650	324
KNO ₃		1800		1100	1900	809
CaCl ₂ .2H ₂ O	72,5		112,5	332,16	332,2	
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	386	833,77	1367	416,9		1181
KH ₂ PO ₄	170	270	265	340	170	4080
K ₂ SO ₄	990					
MgSO ₄ .7H ₂ O	22,3	0,76	361,49	732,5	180,7	739,5
Micronutrientes						
MnSO ₄ .H ₂ O	180,7	175,79	33,5	16,9	16,9	16,90
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	4,8	12,4	6,2	3,10
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	8,6		14,3	8,6	4,32
NaMoO ₄ .2H ₂ O			0,39	0,25	0,25	0,15
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25	0,025	0,25	0,25	0,025	1,25
CoCl ₂ .6H ₂ O		0,025		0,025	0,025	0,25
Na ₂ -EDTA.2H ₂ O	37,3	37,3	45,4	37,5	37,26	74,5
KI		0,08		0,83	0,83	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	27,8	33,8	27,8	27,8	55,60
KCl				500		
Myo-inositol	100	100	100	100	100	100
Vitaminas						
Ácido nicotínico	5	5	5	5	5	5
Piridoxina – HCl	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Thiamina – HCl	2	2	2	2	2	2
Glicina	2	2	2	2	2	2