

EVANDRO ALEXANDRE FORTINI

**POTENCIAL FOTOAUTOTRÓFICO *in vitro* E INFLUÊNCIA DO ESPECTRO DE LUZ E DA RADIAÇÃO UV-B SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE VITROPLANTAS DE *Vernonia condensata* Baker (ASTERACEAE)**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2017

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

T

F742p  
2017

Fortini, Evandro Alexandre, 1993-

Potencial fotoautotrófico *in vitro* e influência do espectro de luz e da radiação UV-B sobre o desenvolvimento de vitroplantas de *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae) / Evandro Alexandre Fortini. – Viçosa, MG, 2017.

viii, 91f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Wagner Campos Otoni.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Boldo. 2. *Vernonia condensata*. 3. Boldo - Cultivo.  
4. Plantas - Efeito da luz. 5. Radiação ultravioleta.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-graduação em Botânica. II. Título.

CDD 22 ed. 615.321

EVANDRO ALEXANDRE FORTINI

**POTENCIAL FOTOAUTOTRÓFICO *in vitro* E INFLUÊNCIA DO ESPECTRO  
DE LUZ E DA RADIAÇÃO UV-B SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE  
VITROPLANTAS DE *Vernonia condensata* Baker (ASTERACEAE)**

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

APROVADA: 20 de fevereiro de 2017.

  
Edgard Augusto de Toledo Picoli

  
João Paulo Viana Leite

  
Diego Silva Batista

  
Wagner Campos Otoni  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Biologia Vegetal e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, pela oportunidade de realização do curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador, professor Wagner Campos Otoni: sou muito grato pela oportunidade oferecida, pela amizade, incentivo e toda a confiança depositada em meu trabalho. Obrigado pelo exemplo de profissionalismo.

Ao Diego Silva Batista, /pela amizade, co-orientação e pelas valiosas sugestões, críticas e contribuições ao meu trabalho.

Aos professores Edgard Picoli e João Paulo Viana Leite, por aceitarem compor a banca de defesa e pelas valiosas sugestões.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetal (LCT), pelos conhecimentos adquiridos e pelos momentos de descontração da hora do café. É muito bom fazer parte desta família, com vocês o trabalho se tornou mais prazeroso. Agradeço em especial ao Sérgio, Ludmila, Talita, Priscila, Khistiano e Anyela, por toda ajuda disponibilizada, e por tornarem este trabalho possível.

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal, onde desenvolvi parte do meu trabalho: sou grato pelos ensinamentos e momentos de descontração.

Aos amigos da Pós-Graduação em Botânica, por todo companheirismo, pela boa convivência e pelas conversas alegres nas terças concretas.

A todos meus amigos, em especial às minhas orientadoras da graduação, professora Maria Aparecida Resende e professora Viviane Arruda, por todos os ensinamentos, carinho, boas conversas e pelas valiosas contribuições.

À Nayara: difícil colocar em palavras tudo o que tenho para agradecer... mas sou grato por toda ajuda, companheirismo e pelos bons momentos e histórias que passamos juntos.

À toda minha família, por sempre acreditarem em mim e por todo incentivo. Aos meus irmãos, Edson e Edna, e o meu cunhado Elder, por toda a amizade que nos une. À Laís, esta pequena criança ao qual tenho tanto carinho e orgulho de ser tio. E em especial aos meus pais, José Fortini e Maria de Lourdes Fortini: sou muito grato por todos os ensinamentos, confiança, incentivo e carinho. Vocês são meu grande exemplo!

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho:  
Muito obrigado!!

**“Não existem limites quando você está cercado de pessoas que acreditam em você”**

– Neil DeGrasse Tysson

## **BIOGRAFIA**

Evandro Alexandre Fortini, filho de Maria de Lourdes Ferraz Fortini e José da Cruz Fortini, é natural da cidade de Guiricema, Minas Gerais e nasceu no dia 03 de março de 1993. Licenciado em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Minas Gerais, campus Ubá/MG, graduado no ano de 2014. No ano de 2015 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal de Viçosa, em nível de Mestrado, junto ao Departamento de Biologia Vegetal, na área de concentração de “Botânica Estrutural e Funcional”, com ênfase em “Morfogênese *in vitro*, transformação de plantas e regulação da expressão gênica”. Defendeu tese em fevereiro de 2017.

## SUMÁRIO

|   |             |
|---|-------------|
| <b>RESUMO.....</b>  | <b>vii</b>  |
| <b>ABSTRACT .....</b>   | <b>viii</b> |
| <b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>   | <b>1</b>    |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>5</b>    |
| <b>CAPÍTULO I: EFEITO DAS TROCAS GASOSAS E DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE NO DESENVOLVIMENTO <i>in vitro</i> DE <i>Vernonia condensata</i> .....</b>                           | <b>10</b>   |
| <b>RESUMO.....</b>  | <b>10</b>   |
| <b>ABSTRACT .....</b>   | <b>11</b>   |
| <b>INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>12</b>   |
| <b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>   | <b>15</b>   |
| Material vegetal e estabelecimento <i>in vitro</i> .....  | 15          |
| Experimentos com trocas gasosas e concentração de sacarose .....  | 15          |
| Análises de desenvolvimento .....   | 16          |
| Teor de pigmentos fotossintéticos .....   | 16          |
| Análises anatômicas .....   | 16          |
| Mensuração da taxa fotossintética <i>in vitro</i> .....   | 17          |
| Análises estatísticas .....   | 18          |
| <b>RESULTADOS .....</b>   | <b>19</b>   |
| <b>DISCUSSÃO .....</b>  | <b>21</b>   |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>24</b>   |
| <b>FIGURAS .....</b>  | <b>29</b>   |
| <b>CAPÍTULO II37: Q QUALIDADE ESPECTRAL DA LUZ NO DESENVOLVIMENTO, ANATOMIA, FOTOSSÍNTESE E ACLIMATIZAÇÃO DE <i>Vernonia condensata</i> CULTIVADA <i>in vitro</i> .....</b> | <b>37</b>   |
| <b>RESUMO.....</b>  | <b>37</b>   |
| <b>ABSTRACT .....</b>   | <b>38</b>   |
| <b>INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>39</b>   |
| <b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>   | <b>42</b>   |
| Material vegetal e condições de cultivo .....   | 42          |

|  |           |
|--|-----------|
| Análise de crescimento e desenvolvimento .....   | 43        |
| Determinação de conteúdo dos pigmentos fotossintéticos .....   | 43        |
| Análises anatômicas .....  | 43        |
| Mensuração da taxa fotossintética <i>in vitro</i> .....  | 44        |
| Trocas gasosas e fluorescência da clorofila.....   | 45        |
| Análises estatísticas .....  | 45        |
| <b>RESULTADOS .....</b>  | <b>46</b> |
| <b>DISCUSSÃO .....</b>   | <b>50</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>53</b> |
| <b>FIGURAS .....</b>   | <b>58</b> |
| <br>   |           |
| <b>CAPÍTULO III: UV-B REDUZ O CRESCIMENTO E ESTIMULA A FOTOSSÍNTESE E RESPOSTAS AO ESTRESSE OXIDATIVO EM PLANTAS DE <i>Vernonia condensata</i> BAKER CULTIVADAS <i>in vitro</i>.....</b> | <b>64</b> |
| <b>RESUMO.....</b>   | <b>64</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>  | <b>65</b> |
| <b>INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>66</b> |
| <b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>  | <b>68</b> |
| Material vegetal e condições de cultivo .....  | 68        |
| Tratamento com UV-B .....  | 68        |
| Análise de crescimento.....  | 68        |
| Atividade enzimática .....   | 68        |
| Mensuração da taxa fotossintética <i>in vitro</i> .....  | 71        |
| Teste histoquímico.....  | 72        |
| Análise estatística .....  | 72        |
| <b>RESULTADOS .....</b>  | <b>73</b> |
| <b>DISCUSSÃO .....</b>   | <b>75</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>78</b> |
| <b>FIGURAS .....</b>   | <b>84</b> |
| <b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>   | <b>91</b> |

## RESUMO

FORTINI, Evandro Alexandre, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Potencial fotoautotrófico *in vitro* e influência do espectro de luz e da radiação UV-B sobre o desenvolvimento de vitroplantas de *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae).** Orientador: Wagner Campos Otoni.

*Vernonia condensata* Baker é uma planta tradicionalmente utilizada pela medicina popular brasileira. Suas propriedades medicinais se devem aos metabólitos produzidos pela espécie, tais como flavonoides, alcaloides, cumarinas e esteroides. Devido ao seu potencial farmacológico, a espécie foi incluída em uma lista de plantas da flora brasileira que necessitam de mais estudos para gerar produtos ao sistema único de saúde. A cultura de tecidos é uma ferramenta viável para a produção de plantas com maior biomassa e teor de compostos bioativos de interesse, pois permite a manipulação das condições de cultivo. Entretanto, existem poucos trabalhos abordando o cultivo de *V. condensata*. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência de diferentes condições de meio e ambientes no cultivo *in vitro* de *V. condensata*. Para isso, foram conduzidos quatro experimentos: **I**) Avaliação do potencial fotoautotrófico, através do cultivo em diferentes concentrações de sacarose (0; 7,5; 15 e 30 g L<sup>-1</sup>) e com o uso de tampas com membranas porosas de 0,45 µm; **II**) Análise do desenvolvimento, fotossíntese e anatomia de *V. condensata* cultivados *in vitro* sob diferentes qualidades de luz: Branco; Vermelho/Azul; Vermelho/Branco/Azul; Vermelho/Branco/Vermelho distante/Azul; **III**) Avaliação do desenvolvimento e fotossíntese de plantas de *V. condensata* aclimatizadas em casa-de-vegetação, cultivadas inicialmente *in vitro* sob os diferentes espectros luminosos descritos no experimento II; **IV**) Avaliação das respostas de *V. condensata* à exposição à radiação UV-B. Nossos resultados demonstraram que *V. condensata* apresenta potencial para propagação fotoautotrófica, e plantas com maior crescimento e acúmulo de biomassa foram encontrados nas condições de cultivo com maiores trocas gasosas. A qualidade da luz afetou o desenvolvimento de *V. condensata in vitro*, e essa influência foi mantida após a aclimatização. O desenvolvimento de *V. condensata* também foi influenciado pela radiação UV-B, que induziu respostas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas. Os resultados obtidos nesse trabalho contribuem para um melhor entendimento do desenvolvimento *in vitro* de *V. condensata*, e podem colaborar para futuros trabalhos futuros que explorem a biossíntese de compostos bioativos presentes em *V. condensata*, que são de grande interesse econômico e industrial.

## ABSTRACT

FORTINI, Evandro Alexandre, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Photoautotrophic potential *in vitro* and influence of light spectrum and UV-B radiation on the development of vitroplants of *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae).** Advisor: Wagner Campos Otoni.

*Vernonia condensata* is a species widely used by folk medicine. Its medicinal properties are due with the metabolites produced by the species, such as flavonoids, alkaloids, coumarins and steroids. Due to its pharmacological potential, the species was included in a list of plants of the Brazilian flora that need more studies to generate products to the single health system. Tissue culture is a viable tool for the production of plants with higher biomass and content of bioactive compounds of interest, because it allows the manipulation of the culture conditions. However, there are few studies addressing the cultivation of *V. condensata*. Thus, the objective of this work was to evaluate the influence of different environment conditions on the *in vitro* culture of *V. condensata*. For this, four experiments were carried out: **I**) Evaluation of the photoautotrophic potential, through the cultivation in different concentrations of sucrose (0; 7.5; 15 and 30 g L<sup>-1</sup>) and with the use of lids with porous membranes of 0.45 µm; **II**) Analysis of the development, photosynthesis and anatomy of *V. condensata* grown *in vitro* under different light spectral (White; White/Medium blue; Dark red/White/Medium blue; Dark red/White/Far red/Medium blue); **III**) Evaluation of the development and photosynthesis of plants of *V. condensata* acclimatized under greenhouse conditions, cultivated initially *in vitro* under the different light spectral described in experiment II; **IV**) Evaluation of the responses of *V. condensata* to the exposure to UV-B radiation. Our results demonstrate that *V. condensata* presents potential for photoautotrophic propagation, and the plants with the highest growth and accumulation of biomass were found in the culture conditions with the highest gas exchange. Light quality affected the development of *V. condensata in vitro*, and this influence was maintained after acclimatization. The development of *V. condensata* was also influenced by UV-B radiation, which induced enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses. The results obtained in this work contribute to a better understanding of the *in vitro* development of *V. condensata*, and may contribute to future works that explore the biosynthesis of bioactive compounds present in *V. condensata*, which are of great economic and industrial interest.

## INTRODUÇÃO GERAL

*Vernonia* é um importante gênero da família Asteraceae e constitui-se como um dos mais representativos dentro da tribo Vernoniae. O gênero é composto por mais de 1500 espécies e sua distribuição abrange principalmente a África e a América do Sul (Costa et al., 2008; Nergard et al., 2008). Diversas espécies do gênero são consumidas na alimentação, possuem sementes que são processadas pela indústria na produção de óleos e são amplamente utilizadas na medicina popular (Toyang & Verpoorte, 2013).

Muitas propriedades são atribuídas à *Vernonia* sp., como ação anti-inflamatória (Pandey et al., 2014; Quasie et al., 2016), anticancerígena (Beeran et al., 2014; Thomas et al., 2016), analgésica (Pandey et al., 2014; Afonso et al., 2015) e antimicrobiana (Toyang et al., 2013; Mabhiza et al., 2016). Dentre as espécies do gênero com propriedades fotoquímicas mais estudadas, pode-se citar *Vernonia amygdalina*, *V. cineria*, *V. guineenses* e *V. condensata*.

*Vernonia condensata* Baker é uma planta muito utilizada na medicina tradicional brasileira, sendo popularmente conhecida como boldo-da-bahia, boldo-do-chile, alumã, figatil e necroton. Seu centro de origem é a África, e possivelmente chegou ao Brasil com a vinda de escravos. É empregada como anti-inflamatório, antibacteriano, analgésico e como revigorante para o fígado (Lorenzi & Matos, 2008; Ghandi, 2014).

De acordo com o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, *V. condensata* pode ser utilizada no tratamento da indigestão (Brasil, 2011). A espécie também está relacionada na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS). A RENISUS lista plantas com potencial farmacológico e que necessitam de pesquisa, podendo gerar produtos de interesse para o SUS (Brasil, 2014).

Em geral, os efeitos medicinais das plantas estão diretamente relacionados com os metabólitos secundários que elas sintetizam e armazenam. *V. condensata* apresenta efeito analgésico, antinocepcivo, antiulcerogênico e anticancerígeno (Risso et al., 2010; Afonso et al., 2015; Boeing, et al., 2016; Thomas et al., 2016). Diversos compostos identificados em *V. condensata* podem estar relacionados com estas propriedades, tais como alcaloides, flavonoides, glicosídeos, saponinas, cumarinas, taninos, triterpenos e óleos voláteis (Silva, 2011). Em extrato etanólico de *V. condensata* são encontrados os flavonoides luteolina e apigenina, associados com sua a atividade antioxidante (Silva, 2013).

Luteolina também possui atividade anti-inflamatória e é o principal composto extraído das folhas de *V. condensata* (Khan et al., 2014; Boeing et al., 2016).

Apesar da importância medicinal da espécie, existem poucos estudos que abordem o seu cultivo. Assim, a cultura de tecidos surge como uma ferramenta promissora, devido à facilidade de controle e regulação do ambiente de cultivo (Naik & Al-Khayri, 2016). O cultivo *in vitro* oferece muitas vantagens, tais como possibilidade de multiplicar o material vegetal em curto espaço de tempo, controle sobre os fatores que influenciam o crescimento e metabolismo da planta, controle sobre as rotas de biossíntese de compostos de interesse, bem como a possibilidade de eliciação dos metabólitos (Hussain et al., 2012; Bhatia et al., 2015; Ng et al., 2016). Vicente et al., (2009) descreveram o estabelecimento *in vitro* de *V. condensata*, bem como avaliaram a influência de diferentes concentrações de 6-benziladenina no desenvolvimento e a posterior aclimatização. Porém, devido ao seu potencial farmacológico faz-se necessário realizar mais trabalhos com esta espécie.

Várias estratégias podem ser desenvolvidas utilizando a cultura de tecidos, resultando em potenciais aumentos no acúmulo de biomassa e de metabólitos produzidos pela planta. Dentre estes métodos, podem-se citar a otimização do meio e do ambiente de cultivo, a adição de precursores de metabólitos secundários de interesse, a eliciação e a biotransformação (Smetanska et al., 2008; Murthy et al., 2014).

As baixas taxas de atividade fotossintética das plantas *in vitro* podem ser contornadas com a otimização do meio e ambiente de cultivo. A utilização de frascos que permitem trocas gasosas, o cultivo em ambiente enriquecido com CO<sub>2</sub> e a redução ou eliminação das fontes de sacarose do meio são métodos utilizados para explorar o potencial fotoautotrófico das plantas *in vitro* (Yaseen et al., 2013). O cultivo em condições fotoautotróficas pode ter efeito no metabolismo secundário vegetal, com o aumento da produção dos compostos bioativos de interesse (Iarema et al., 2012; Saldanha et al., 2013; Saldanha et al., 2014).

Com relação ao meio, a concentração e o tipo fonte de carbono têm grande importância no cultivo *in vitro*, pois nestas condições as plantas perdem parcialmente a autotrofia, necessitando de uma fonte exógena (Nicoloso et al., 2003). São utilizadas como fontes de carbono um único tipo de açúcar ou misturas, como de frutose, glicose, sacarose (Murthy et al., 2014). O cultivo *in vitro* sem suplementação de uma fonte de carbono também pode alterar o metabolismo secundário das plantas. *Withania somnifera* cultivada em meios com diferentes fontes e concentração de carbono apresentou diferenças significativas na produção de withanolídeos A (Praveen & Murthy, 2012).

A utilização de tampas com membranas permeáveis a gases no cultivo *in vitro* aumenta as trocas gasosas, favorece a renovação da atmosfera interna dos frascos, reduz a umidade no interior dos frascos e facilita a absorção de água, nutrientes e a transpiração (Aitken-Christie et al., 1995; Xiao et al., 2011). Além do aumento das taxas fotossintéticas e da maior biomassa, a utilização de tampas com membranas que permitem as trocas gasosas também pode influenciar a anatomia (Saldanha et al., 2013; Nguyen et al., 2015; Batista et al., 2016) e o metabolismo secundário das plantas (Tisserat et al., 2009; Xiao et al., 2011; Rodriguez-Uribe et al., 2012).

A luz é outro fator que influencia no desenvolvimento, morfoanatomia e fisiologia das plantas (Wang & Folta, 2012; Gupta & Jatothu, 2013; Bian et al., 2015; Ouzounis et al., 2015). O controle do fotoperíodo, da intensidade e qualidade da luz pode favorecer a síntese de compostos de interesse, pois está diretamente envolvida na regulação de rotas de biossíntese de diversos metabólitos (Alvarenga et al., 2015; Batista et al., 2016). A qualidade do espectro luminoso pode influenciar ainda na eficiência fotossintética das plantas (Lin et al., 2013; Zienkiewicz et al., 2015) e induzir variações anatômicas, tais como observados em *Betula pendula* (Saebo et al., 1995), *Solanum lycopersicum* e *Platanus orientalis* (Arena et al., 2016).

A radiação ultravioleta B (UV-B, 280-315 nm) possui alta energia espectral e pode afetar o desenvolvimento, metabolismo e morfoanatomia das plantas (Chen et al., 2016; Schreiner et al., 2016). Diversos trabalhos associam a exposição à radiação UV-B com a redução no crescimento e biomassa (Raghuvanshi & Sharma, 2016; Yan et al., 2016), menor eficiência fotossintética (Doupis et al., 2016; Yan et al., 2016; Kataria et al., 2017), produção de enzimas antioxidantes (Czégény et al., 2016; Yoom et al., 2016), indução da biossíntese e acúmulo de metabólitos secundários (Pandey & Pandey-Rai, 2014; Randriamanana et al., 2015; Chen et al., 2016; Huang et al., 2016).

Tendo em vista a vasta utilização de *V. condensata* na medicina tradicional, bem como o fato desta espécie estar incluída em uma lista de interesse ao SUS (RENISUS), faz-se necessário realizar novos estudos visando explorar o cultivo *in vitro*, os quais subsidiarão trabalhos futuros explorando seu potencial farmacológico. Em *V. condensata*, diversos compostos bioativos já foram identificados e associados a propriedades medicinais, porém ainda não existem trabalhos na literatura que buscam desenvolver estratégias para maximizar a produção destes metabólitos de interesse.

A partir destes princípios, objetiva-se pelo presente trabalho testar as seguintes hipóteses:

- *V. condensata* possui potencial fotoautotrófico *in vitro*;
- Os níveis de sacarose e trocas gasosas influenciam o crescimento, fotossíntese e anatomia de *V. condensata* cultivadas *in vitro*;
- Vitroplantas de *V. condensata* cultivadas diferentes qualidades de luz apresentam variações morfofisiológicas, fotossintéticas e no desenvolvimento *in vitro*;
- Plantas cultivadas *in vitro* sob diferentes qualidades de luz apresentam, após a aclimatização em condições de casa-de-vegetação, diferenças no desenvolvimento e fotossíntese;
- A radiação UV-B afeta o desenvolvimento e leva a alterações fisiológicas em *V. condensata*.

## REFERÊNCIAS

AFONSO, S.; MATOS, A.C.; MARENGO, V.A.; MOREIRA, E.G.; SOARES, D.X.; KOOLEN, H.H.; SCARMINIO, I.S. Seasonal Effects on HPLC-DAD-UV and UPLC-ESI-MS Fingerprints and Analgesic Activities of *Vernonia condensata* Baker Extracts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 2, p. 350-358, 2015.

ALVARENGA, I.V.C.; PACHECO, F.V.; SILVA, S.T.; BERTOLUCCI, S.K.; PINTO, J.E. *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 122, n. 2, p. 299-308, 2015.

AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; SMITH, M.A.; (eds). **Automation and environmental control in plant tissue culture**. Dordrecht, Kluwer Academic, 1995. 574p.

ARENA, C., TSONEV, T., DONEVA, D., DE MICCO, V., MICHELOZZI, M., BRUNETTI, C., CENTRITTO, M.; FINESCHI, S.; VELIKOVA, V.; LORETO, F. The effect of light quality on growth, photosynthesis, leaf anatomy and volatile isoprenoids of a monoterpene-emitting herbaceous species (*Solanum lycopersicum* L.) and an isoprene-emitting tree (*Platanus orientalis* L.). **Environmental and Experimental Botany**, v. 130, p. 122-132, 2016.

BATISTA, D.S.; CASTRO, K.M.; SILVA, A.R.; TEIXEIRA, M.L.; SALES, T.A.; SOARES, L.I.; CARDOSO, M.G.; SANTOS, M.O.; OTONI, W.C. Light quality affects *in vitro* growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v. 52, n. 3, p. 276-282, 2016.

BEERAN, A.A.; MALIYAKKAL, N.; RAO, C.M.; UDUPA, N. The enriched fraction of *Vernonia cinerea* L. induces apoptosis and inhibits multi-drug resistance transporters in human epithelial cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, p. 33-42, 2014.

BHATIA, S.; SHARMA, K.; DAHIYA R.; BERA, T. Classical and Nonclassical Techniques for Secondary Metabolite Production in Plant Cell Culture. In: **Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences**, Academic Press, pp. 231-291, 2015.

BIAN, Z.H. Effects of light quality on the accumulation of phytochemicals in vegetables produced in controlled environments: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 5, p. 869-877, 2015.

BOEING, T.; SILVA, L.M.; SOMENSI, L.B.; CURY, B.J.; COSTA, A.P.; PETREANU, M.; NIERO, R.; ANDRADE, S.F. Antiulcer mechanisms of *Vernonia condensata* Baker: A medicinal plant used in the treatment of gastritis and gastric ulcer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 184, p. 196-207, 2016.

BRASIL. **RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS - Espécies vegetais**. Disponível em:  
<<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>> Acesso em 30/04/2016.

BRASIL. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011. 126p.

CHEN, M.; HUANG, Y.; LIU, G.; QIN, F.; YANG, S.; XU, X. Effects of enhanced UV-B radiation on morphology, physiology, biomass, leaf anatomy and ultrastructure in male and female mulberry (*Morus alba*) saplings. **Environmental and Experimental Botany**, v. 129, p. 85-93, 2016.

COSTA, F.J.; BANDEIRA, P.N.; ALBUQUERQUE, M.R.; PESSOA, O.D.; SILVEIRA, E.R.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos de *Vernonia chalybaea* Mart. **Química Nova**, v. 31, p. 1691-1695, 2008.

CZÉGÉNY, G.; LE MARTRET, B.; PÁVKOVICS, D.; DIX, P. J.; HIDEG, É. Elevated ROS-scavenging enzymes contribute to acclimation to UV-B exposure in transplastomic tobacco plants, reducing the role of plastid peroxidases. **Journal of Plant Physiology**, v. 201, p. 95-100, 2016.

DOUPIS, G.; BOSABALIDIS, A.M.; PATAKAS, A. Comparative effects of water deficit and enhanced UV-B radiation on photosynthetic capacity and leaf anatomy traits of two grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 28, n. 1, p. 131-141, 2016.

GHANDI, T.S.M. **Tratado de plantas medicinais**: Mineiras, nativas e cultivadas. 1 ed. digital, Belo Horizonte: Adaequatico Estudio. 1024p., 2014.

GUPTA, S.D. & JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. **Plant Biotechnology Reports**, v. 7, n. 3, p. 211-220, 2013.

HUANG, X.; YAO, J.; ZHAO, Y.; XIE, D.; JIANG, X.; XU, Z. Efficient rutin and quercetin biosynthesis through flavonoids-related gene expression in *Fagopyrum tataricum* Gaertn. hairy root cultures with UV-B Irradiation. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.

HUSSAIN, M.; FAREED, S.; ANSARI, S.; RAHMAN, M.A.; AHMAD, I.Z.; SAEED, M. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, n.4, pp.10-20, 2012.

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

KATARIA, S.; BAGHEL, L.; GURUPRASAD, K.N. Alleviation of adverse effects of ambient UV stress on growth and some potential physiological attributes in soybean (*Glycine max*) by seed pre-treatment with static magnetic field. **Journal of Plant Growth Regulation**, p. 1-16, 2017.

KHAN, J.; ALEXANDER, A.; SARAF, S.; SARAF, S. Luteolin-phospholipid complex: preparation, characterization and biological evaluation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, n. 66, pp. 1451–1462, 2014.

LIN, K. H., HUANG, M. Y., HUANG, W. D., HSU, M. H., YANG, Z. W., & YANG, C. M. 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). **Scientia Horticulturae**, v. 150, p. 86-91, 2013.

LORENZI, H. & MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**, 2nd ed.; Instituto Plantarum: Nova Odessa, Brazil, 2008; pp. 165–166.

MABHIZA, D.; CHITEMERERE, T.; MUKANGANYAMA, S. Antibacterial properties of alkaloid extracts from *Callistemon citrinus* and *Vernonia adoensis* against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Medicinal Chemistry**, v. 2016, 2016.

MURTHY, H.N.; LEE, E.J.; PAEK, K.Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 1, p. 1-16, 2014.

NAIK, P.M. & AL-KHAYRI, J.M. (2016). Abiotic and biotic elicitors–role in secondary metabolites production through in vitro culture of medicinal plants. In SHANKER, A.K & SHANKER, C. (Eds.). **Abiotic and biotic stress in plants - Recent advances and future perspectives**, InTech, p. 246-277, 2016.

NERGARD, C.S.; DIALLO, D.; MICHAELSEN, T.E.; MALTERUD, K.E.; KIYOHARA, H.; MATSUMOTO, T.; YAMADA, H.; PAULSEN, B.S. Isolation, partial characterisation and immunomodulating activities of polysaccharides from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 91, n. 1, p. 141–152, 2004.

NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C.F. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 1, p. 84-90, 2003.

NG, Y.S.; LIM, C.R.; CHAN, D.J.C. Development of treated palm oil mill effluent (POME) culture medium for plant tissue culture of *Hemianthus callitrichoides*. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v.4, n.4, p. 4890-4896, 2016.

NGUYEN, Q.T.; XIAO, Y.; KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation. In: KOZAI, T.; NIU, G.; TAKAGAKI, M. (Eds.). **Plant Factory: An Indoor Vertical Farming System for Efficient Quality Food Production**. Academic Press, p. 271-283, 2015.

OUZOUNIS, T. Spectral effects of artificial light on plant physiology and secondary metabolism: a review. **HortScience**, v. 50, n. 8, p. 1128-1135, 2015.

PANDEY, A.; DASH, D.; KELA, S.; DWIVEDI, S.; TIWARI, P. Analgesic and anti-inflammatory properties of the fruits of *Vernonia anthelmintica* (L) Willd. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, p. 874-878, 2014.

PANDEY, N. & PANDEY-RAI, S. Short term UV-B radiation-mediated transcriptional responses and altered secondary metabolism of *in vitro* propagated plantlets of *Artemisia annua* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 116, n. 3, p. 371-385, 2014.

PRAVEEN, N. & MURTHY, H. N. Synthesis of withanolide A depends on carbon source and medium pH in hairy root cultures of *Withania somnifera*. **Industrial Crops and Products**, v. 35, n. 1, p. 241-243, 2012.

QUASIE, O.; ZHANG, Y.M.; ZHANG, H.J., LUO, J.; KONG, L.Y. Four new steroid saponins with highly oxidized side chains from the leaves of *Vernonia amygdalina*. **Phytochemistry Letters**, v. 15, p. 16-20, 2016.

RAGHUVANSHI, R. & SHARMA, R.K. Response of two cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. (French beans) plants exposed to enhanced UV-B radiation under mountain ecosystem. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 1, p. 831-842, 2016.

RANDRIAMANANA, T.R.; LAVOLA, A.; JULKUNEN-TIITTO, R. Interactive effects of supplemental UV-B and temperature in European aspen seedlings: Implications for growth, leaf traits, phenolic defense and associated organisms. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 93, p. 84-93, 2015.

RISSO, W.E; SCARMINIO, I.S.; MOREIRA, E.G. Antinociceptive and acute toxicity evaluation of *Vernonia condensata* Baker leaves extracted with different solvents and their mixtures. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, n. 8, p. 811, 2010.

RODRIGUEZ-URIBE, L; GUZMAN, I.; RAJAPAKSE, W.; RICHINS, R.D.; O'CONNELL, M.A. Carotenoid accumulation in orange-pigmented *Capsicum annuum* fruit, regulated at multiple levels. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 1, p. 517-526, 2012.

SAEBO, A.; KREKLING, T.; APPELGREN, M. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 41, n. 2, p. 177-185, 1995.

SALDANHA, C.W.; OTONI, C.G.; NOTINI, M.M.; KUKI, K.N.; CRUZ, A.C.F.; NETO, A.R.; DIAS, L.L.C; OTONI, W.C. A CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere improves *in vitro* growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 49, n. 4, p. 433-444, 2013.

SALDANHA, C.W.; OTONI, C.G.; ROCHA, D.I.; CAVATTE, P.C.; DETMANN, K.S.C.; TANAKA, F.A.O.; DIAS, L.L.C.; DaMATTA, F.M.; OTONI, W.C. CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere and supporting material impact the growth, morphophysiology and ultrastructure of *in vitro* Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 1, p. 87-99, 2014.

SCHREINER, M.; MEWIS, I.; NEUGART, S.; ZRENNER, R.; GLAAB, J.; WIESNER, M.; JANSEN, M.A. UV-B Elicitation of secondary plant metabolites. In: **III-Nitride Ultraviolet Emitters**. Springer International Publishing, 2016. p. 387-414.

SILVA, J.B.; TEMPONI, V.D.; FERNANDES, F.V.; ALVES, G.D.; MATOS, D.M.; GASPARETTO, C.M.; RIBEIRO, A.; DE PINHO, J.D.; ALVES, M.S.; de SOUSA, O.V. New approaches to clarify antinociceptive and anti-inflammatory effects of the ethanol extract from *Vernonia condensata* leaves. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 12, p. 8993-9008, 2011.

SILVA, J.B.; TEMPONI, V.D.; GASPARETTO, C.M.; FABRI, R.L.; ARAGÃO, D.M.; PINTO, N.D.; RIBEIRO, A.; SCIO, E.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; SOUSA, O.V.; ALVES, M.S. *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae): A promising source of antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, 2013.

SMETANSKA, I. Production of secondary metabolites using plant cell cultures. In: **Food biotechnology**. Springer Berlin Heidelberg, 2008. p. 187-228.

THOMAS, E.; GOPALAKRISHNAN, V.; SOMASAGARA, R.R.; CHOUDHARY, B.; RAGHAVAN, S.C. Extract of *Vernonia condensata*, inhibits tumor progression and improves survival of tumor-allograft bearing mouse. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

TISSERAT, B.; BERHOW, M.; VAUGHN, S.F. Spearmint plantlet culture system as a means to study secondary metabolism. **Protocols for *in vitro* Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants**, p. 313-324, 2009.

TOYANG, N.J.; ATEH, E.N.; DAVIS, H.; TANE, P.; SONDEGAM, L. B.; BRYANT, J.; VERPOORTE, R. *In vivo* antiprostata tumor potential of *Vernonia guineensis* Benth. (Asteraceae) tuber extract (VGDE) and the cytotoxicity of its major compound pentaisovaleryl sucrose. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 724-728, 2013.

TOYANG, N. J. & VERPOORTE, R. A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, n. 3, p. 681-723, 2013.

VICENTE, M.A.A.; ALMEIDA, W.A.B.; CARVALHO, Z.S. *In vitro* multiplication and acclimation of *Vernonia condensata* Baker. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 11, n. 2, p. 176-183, 2009.

WANG, Y. & FOLTA, K.M. Contributions of green light to plant growth and development. **American Journal of Botany**, v. 100, n. 1, p. 70-78, 2013.

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

YAN, F.; LIU, Y.; SHENG, H.; WANG, Y.; KANG, H.; ZENG, J. Salicylic acid and nitric oxide increase photosynthesis and antioxidant defense in wheat under UV-B stress. **Biologia Plantarum**, v. 60, n. 4, p. 686-694, 2016.

YASEEN, M.; AHMAD, T.; SABLOK, G.; STANDARDI, A.; HAFIZ, I.A. Review: role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 4, p. 2837-2849, 2013.

YOON, M.Y.; KIM, M.Y.; SHIM, S.; KIM, K.D.; HA, J., SHIN, J.H; KANG, S.; LEE, S. Transcriptomic profiling of soybean in response to high-intensity UV-B irradiation reveals stress defense signaling. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.

ZIENKIEWICZ, M.; DROŻAK, A.; WASILEWSKA, W.; BACŁAWSKA, I.; PRZEDPEŁSKA-WĄSOWICZ, E.; ROMANOWSKA, E. The short-term response of *Arabidopsis thaliana* (C3) and *Zea mays* (C4) chloroplasts to red and far red light. **Planta**, v. 242, n. 6, p. 1479-1493, 2015.

## CAPÍTULO I

### Efeito das trocas gasosas e da concentração de sacarose no desenvolvimento *in vitro* de *Vernonia condensata*

#### RESUMO

*Vernonia condensata* é uma espécie comumente utilizada pela medicina popular. Dentre seus usos, é indicada como anti-inflamatório e analgésico. Existem poucos trabalhos na literatura abordando o seu cultivo, sendo a cultura de tecidos é uma alternativa potencial para a propagação da espécie. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência dos níveis de sacarose (0; 7,5; 15 e 30 g L<sup>-1</sup>) e de trocas gasosas (0, 1 e 2 membranas) no desenvolvimento, anatomia e atividade fotossintética no cultivo *in vitro* de *V. condensata*. Tratamentos com maior teor de sacarose (30 g L<sup>-1</sup>) e com uma ou duas membranas que permitem maiores trocas gasosas induziram plantas maiores e com maior acúmulo de biomassa. A taxa de explantes respondentes, por sua vez, foi menor quando não houve sacarose adicionada no meio. A presença de sacarose pode suprir as necessidades metabólicas da planta ou reduzir a eficiência da fotossíntese, como mostrado pelas menores taxas fotossintéticas. As condições de cultivo também causaram modificações anatômicas nas folhas, interferindo no índice estomático, na espessura da lâmina foliar e no desenvolvimento dos feixes vasculares. Estes resultados demonstram que *V. condensata* apresenta potencial para propagação fotoautotrófica. Trabalhos futuros que visem incrementar os níveis de CO<sub>2</sub> no cultivo *in vitro* dessa espécie podem reduzir a necessidade de uma fonte de carbono externa, induzindo assim plantas mais rústicas e aumentando a sobrevivência na aclimatização.

**Palavras-chave:** Vedação, fonte de carbono, boldo-da-Bahia, propagação fotoautotrófica.

## ABSTRACT

*Vernonia condensata* is a species widely used by folk medicine. Among its uses, it is indicated as anti-inflammatory and analgesic. There are few works in the literature approaching its cultivation and tissue culture is an interesting alternative for the propagation of the species. Thus, the objective of the present study was to evaluate the influence of the sucrose levels (0; 7.5; 15 e 30 g L<sup>-1</sup>) and gas exchange (0, 1 and 2 membranes) on development, anatomy and photosynthetic activity in *in vitro* culture of *V. condensata*. Treatments with higher content of sucrose (30 g L<sup>-1</sup>) and with one or two membranes induced plants with higher height and greater biomass. The responsive explants by its turn were lower when no sucrose was available in the medium. The presence of sucrose in the medium may also suppress the metabolic needs of the plant or reduce photosynthesis, as shown by the lower averages of photosynthetic rate. The conditions led to anatomical changes in leaves, interfering in the stomatal index and leaf thickness. These results demonstrate that *V. condensata* presents potential for photoautotrophic propagation. Future work aiming to increase CO<sub>2</sub> levels in *in vitro* culture of this specie may reduce the need for an external carbon source, inducing more rustic plants and increasing survival in acclimatization.

**Keywords:** Flask sealing, carbon source, ‘boldo-da-Bahia’, photoautotrophic propagation.

## INTRODUÇÃO

*Vernonia condensata* Baker (Asteraceae) é uma planta medicinal conhecida popularmente por alumã, necroton e boldo-da-Bahia. Nativa da África, a espécie foi provavelmente trazida para o Brasil pelos escravos (Lorenzi & Matos, 2008). Existem estudos que atestam a utilização como anti-inflamatório e analgésico (Risso et al., 2010; Silva et al., 2011), antiulcerogênico (Boeing et al., 2016), além de registros do uso no tratamento de picadas de serpentes (Pereira et al., 1994). Thomas et al. (2016) mostraram que o extrato da espécie tem ação anticancerígena, devido à sua potente atividade na diminuição do tumor e no aumento da vida útil em ratos doentes. Além disso, a planta também pode prevenir a hipercolesterolemia (Arantes et al., 2016). A presença de compostos bioativos, tais como alcaloides, flavonoides, saponinas, cumarinas, taninos, triterpenos e óleos voláteis, podem estar relacionados com a atividade medicinal da planta (Silva et al., 2011).

Devido ao grande potencial farmacológico de *V. condensata*, são necessários estudos visando a sua propagação e assim evitar a exploração predatória da espécie no ambiente. A cultura de tecidos vegetais pode ser uma alternativa viável, pois facilita a propagação clonal, a conservação em bancos de germoplasma, além de constituir uma ferramenta para a produção de compostos bioativos de plantas medicinais (Kumari et al., 2016). A propagação de espécies medicinais via cultura de tecidos é relatada em inúmeros trabalhos (Jaziri et al., 1996; Raja & Arockiasamy, 2009; Iarema et al., 2012; Coppede et al., 2014)

Plantas cultivadas *in vitro* pelo método convencional crescem em um microambiente com elevada umidade e baixa concentração de CO<sub>2</sub> durante o fotoperíodo (Xiao et al., 2011; Nguyen et al., 2016). Nestas condições, as plantas normalmente possuem menor desenvolvimento, baixas trocas gasosas e taxas fotossintéticas, desordens morfológicas, fisiológicas e maiores taxas de contaminação, além de possuírem menor sobrevivência na aclimatização (Kozai & Kubota, 2001; Kozai, 2010; Xiao et al., 2011; Nguyen et al., 2016). Visando contornar estes problemas, muitos trabalhos buscam alternativas através do cultivo em condições fotomixotróficas ou fotoautotróficas (Lucchesini et al., 2001; Iarema et al., 2012; Rodrigues et al., 2012; Martins et al., 2016). Para isso, pode-se diminuir ou eliminar a fonte de carbono do meio de cultivo, aumentar a luminosidade e prover maior difusão dos gases entre o ambiente interno e externo dos

frascos (Xiao et al., 2011; Pérez-Jiménez et al., 2015; Schmildt et al., 2015; Nguyen et al., 2016).

Plantas cultivadas *in vitro* podem perder parcialmente a autotrofia e com isso necessitar de uma fonte de carbono externa (Nicoloso et al., 2003). São utilizados como fonte de carbono em cultura de tecidos açúcares, tais como glicose, frutose, sacarose, ou a mistura destes (Murthy et al., 2014). Em geral, a sacarose é o açúcar mais utilizado (Xiao et al., 2011).

O metabolismo primário das plantas pode ser regulado pela disponibilidade de açúcar. Altas concentrações de sacarose podem gerar um incremento no crescimento, porém resultam em uma diminuição ou inibição da fotossíntese e da mobilização de nutrientes (Rolland et al., 2006). Nestas condições, o aparato fotossintético pode ter uma formação defeituosa, além de ocorrerem deformidades anatômicas e morfológicas nas plantas (Hazarika, 2006). Assim, a diminuição ou a eliminação do uso de uma fonte de carbono no meio de cultura pode ser útil na formação de plantas com melhor desenvolvimento, além de reduzir os custos do cultivo e aumentar a sobrevivência das plantas na aclimatização (Xiao & Kozai, 2006). O cultivo *in vitro* sem suplementação de uma fonte de carbono também pode alterar o metabolismo secundário das plantas. *Withania somnifera* cultivadas em meios com diferentes fontes e concentração de carbono apresentaram diferenças significativas na produção de withanolídeos A (Praveen & Murthy, 2012).

A difusão de gases entre o ambiente interno e externo dos frascos é limitada pelo tipo de vedação utilizado. Em condições de baixas trocas gasosas, o ambiente interno do frasco apresenta-se com elevada umidade, altas concentrações de etileno, além de baixo teor de CO<sub>2</sub> durante o fotoperíodo (Hazarika, 2006; Kozai, 2010). Estas condições podem comprometer o desenvolvimento das plantas e reduzir a taxa fotossintética e de absorção de nutrientes (Kozai et al., 1997; Mohamed & Alsdon, 2010; Kozai, 2010). A anatomia das plantas cultivadas em ambientes com condições de baixos níveis de trocas gasosas pode ser comprometida, sendo observado menor diferenciação do tecido vascular, células parenquimáticas menos justapostas, pouca deposição de cera epicuticular e ocorrência de estômatos não-funcionais (Saldanha et al., 2013; Nguyen et al., 2016; Batista et al., 2017a).

O uso de membranas de trocas gasosas no sistema de cultivo *in vitro* pode diminuir as limitações da baixa difusão de gases. Diversos trabalhos mostram que plantas cultivadas em frascos com membranas permeáveis apresentam maior crescimento, maior

taxa fotossintética, desenvolvimento anatômico semelhante aos das plantas de campo e maior taxa de sobrevivência *ex vitro* (Alvares et al., 2012; Rodrigues et al., 2012; Saldanha et al., 2012; Sáez et al., 2015; Batista et al., 2017b).

A partir disto, os objetivos do presente estudo são avaliar o potencial fotoautotrófico, e os efeitos da concentração de sacarose e dos níveis de trocas gasosas sobre o crescimento, fotossíntese e anatomia de *V. condensata*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal e estabelecimento *in vitro*

As plantas de *V. condensata* foram obtidas a partir de estacas, de planta matriz procedente da cidade de Guiricema/MG (21°00'28" S 42°43'04" O). As estacas com aproximadamente 15 cm de altura e com quatro gemas foram colocadas em vasos de polietileno com capacidade de 6 L, contendo a mistura de substrato comercial (PlantMax®), areia e fibra de coco na proporção de 2:1:1. As plantas foram mantidas no Instituto de Biotecnologia Aplicado à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde receberam tratos culturais e foram irrigadas periodicamente.

Para o estabelecimento *in vitro*, foram coletados segmentos nodais do 3° a 5° nós a partir do ápice, de ramos jovens das plantas em fase de crescimento vegetativo. Sob condições assépticas, a desinfestação dos explantes consistiu em imersão por 2 minutos em álcool 70%, seguido de imersão por 10 minutos em hipoclorito de sódio (1% do cloro ativo) em agitação. Posteriormente, foram realizadas três lavagens em água destilada, desionizada e autoclavada. Os explantes nodais foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio basal e vitaminas MS (Murashige & Skoog, 1962) com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 2,8 mg L<sup>-1</sup> de Phytigel®. O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,1 e o meio autoclavado a 121 °C e 108 kPa por 20 minutos. Os subcultivos foram realizados em meio básico MS nas mesmas condições anteriores, porém utilizando-se 7 g L<sup>-1</sup> de Agar (Merck, Darmstadt, Alemanha).

### Experimentos com trocas gasosas e concentração de sacarose

Segmentos nodais foram inoculados em frascos de vidro (250 mL de capacidade) contendo 60 mL de meio MS básico semi-sólido, nas condições utilizadas para o estabelecimento *in vitro*, sendo utilizadas as concentrações 0; 7,5; 15 e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Foram inoculados três explantes por frasco, com três tipos de vedação, resultando em diferentes níveis de trocas gasosas, mensurado por Batista et al. (2017b): tampas rígidas de polipropileno (TRP) sem membrana [taxa de troca de CO<sub>2</sub> (TTCO<sub>2</sub>) de 14 µL L<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>]; TRP com um orifício de 10 mm coberto por uma membrana fluoroporo hidrofóbica (PTFE, MilliSeal AVS-045 Air Vent) de 0,45 µm de poros (TTCO<sub>2</sub> de 21 µL L<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) e TRP com dois orifícios cobertos por membranas (TTCO<sub>2</sub> de 25 µL L<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) (Figura 1).

As culturas foram mantidas por 35 dias em sala de crescimento sob irradiância de  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 16 h e temperatura de  $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, totalizando 12 tratamentos com 5 repetições cada. Cada frasco constituiu uma repetição.

### **Análises de desenvolvimento**

Foram analisadas as seguintes características de desenvolvimento: massa fresca (g), massa seca (g), comprimento total da parte aérea (cm), comprimento total da maior raiz (cm), número de folhas, número de raízes, número de brotos, taxa de sobrevivência (%) e área foliar ( $\text{cm}^2$ ). Para a determinação da área foliar, as folhas foram fixadas em papel branco, e fotografadas com câmera digital. Após ajustes nas imagens, foi utilizado o programa ImageJ (Schneider et al., 2012), para o processamento e geração do atributo área foliar.

### **Teor de pigmentos fotossintéticos**

Foram retirados cinco discos foliares (7 mm de diâmetro), da terceira folha completamente expandida a partir do ápice. Os discos foliares foram colocados em 5 mL de solução de DMSO (saturado com carbonato de cálcio), onde permaneceram por 48 horas no escuro (Santos et al., 2008). A determinação da absorbância das amostras foi realizada em cubeta de quartzo de 10 mm de caminho ótico, no espectrofotômetro Genesys 10UV (ThermoScientific, EUA). Os comprimentos de onda analisados foram de 665, 645 e 480 nm. O cálculo das concentrações das clorofilas *a*, *b* e carotenoides foi baseado na metodologia descrita por Wellburn (1994).

### **Análises anatômicas**

Para a caracterização anatômica da folha, foi realizada uma amostragem de três plantas por tratamento, de onde foram retiradas 5 cortes da segunda folha apical completamente expandida. As folhas foram seccionadas na posição central do limbo, e as amostras coletadas foram de aproximadamente  $100 \text{ mm}^2$ . As amostras foram fixados em solução Karnovsky (Karnovsky, 1965), composto por 2,5 % de glutaraldeído, 4,0 % de paraformaldeído, 3,0 % de sacarose, 5 mM de  $\text{CaCl}_2$ , em tampão de cacodilato a 0,1M (pH 6,8), refrigerado.

Após a fixação, as amostras foram desidratadas em série etílica crescente (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90 e 95%) e incluídas em resina acrílica (Historesin, Leica

Instruments, Alemanha). As secções transversais e longitudinais de 5 µm de espessura, foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., USA) e corados com azul de Toluidina (pH 3,2) para caracterização estrutural (O'Brien & McCully, 1981), xylidine Ponceau para detecção de proteínas totais (Campos, 1977) e ácido periódico – reagente de Schiff (PAS) para polissacarídeos totais (Feder & O'Brien, 1968).

As lâminas foram montadas em resina sintética Permount® SP15-500 (Fisher Chemicals- Fisher Scientific). Para a captura de imagens, foi utilizado um microscópio de luz (modelo AX70 TRF, Olympus Optical) com sistema U-photo, acoplado à câmera fotográfica digital (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.) e microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic, no Laboratório de Anatomia Vegetal/ UFV.

Para o estudo das células epidérmicas, foi utilizada a técnica de diafanização, adaptado de Johansen (1940). Folhas completamente expandidas foram diafanizadas, desidratadas em etanol 50% e coradas com fucsina alcoólica. As lâminas foram montadas em Permount. As observações e a documentação fotográfica foram realizadas em um microscópio de luz (modelo AX70TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão) equipado com sistema U-Photo. A contagem das células epidérmicas e o cálculo do índice estomático foi realizado com o auxílio do programa ImageJ (Schneider et al., 2012).

### **Mensuração da taxa fotossintética *in vitro***

As trocas gasosas e a quantificação da taxa fotossintética *in vitro* foi realizada em um modelo adaptado do proposto por Costa et al. (2014).

Um IRGA (model S151; Qubit Systems, ON, Canada) foi utilizado para as medições de tocas gasosas e a coleta dos dados foi realizado através do software LoggerLite (LoggerLite, 1.8.1, Vernier Software & Technology Caliper, Beaverton). O CO<sub>2</sub> de referência foi calculado através da entrada de ar em um frasco vazio, trazido por uma bomba do ambiente externo a uma taxa de fluxo de ar constante de 300 mL min<sup>-1</sup>, dentro de uma câmara com iluminação (uma lâmpada LED branca). As plantas foram mantidas na ausência de luz por um período de 8 h que antecederam a análise. Logo após a medição do CO<sub>2</sub> referência, os frascos com as vitroplantas foram acoplados ao sistema, sendo o CO<sub>2</sub> calculado até o ponto de estabilização. As trocas gasosas foram calculadas através da diferença entre o CO<sub>2</sub> de referência e o CO<sub>2</sub> das plantas expostas ao ar

atmosférico. A temperatura e a umidade do ar no frasco foram mensuradas através do sensor Espec (Thermo Recorder RS-11, Takai Espec Corp.).

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

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

Onde,

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

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

### **Análises estatísticas**

As análises estatísticas de todos os experimentos foram realizadas por meio do software Genes versão Windows/2004.2.1 (Cruz, 2013). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott (Scott & Knott, 1974), em nível de 5% de significância.

## RESULTADOS

### **O desenvolvimento *in vitro* de *V. condensata* é influenciado pelas trocas gasosas e pela disponibilidade de sacarose**

O presente estudo analisou o efeito de diferentes concentrações de sacarose e das membranas de trocas gasosas sobre o desenvolvimento de vitroplantas de *V. condensata* (Figuras 2 e 3). As variáveis de desenvolvimento avaliadas apresentaram interações significativas entre a vedação do frasco (0; 1 e 2 membranas) e diferentes concentrações de sacarose (0; 7,5; 15 e 30 g L<sup>-1</sup>) para as variáveis comprimento da parte aérea (Figura 3A), da raiz (Figura 3B) e da massa fresca (Figura 3E). Para estas variáveis, as maiores médias foram encontradas em plantas cultivadas em frascos com 2 membranas e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose.

Para as variáveis área foliar e massa seca, os fatores analisados atuaram de forma independente (Figura 3D e 3F, respectivamente). Houve diferença significativa entre as condições de cultivo estudadas, sendo observado que as menores médias ocorreram em plantas cultivadas sem sacarose e sem membrana.

Para a variável da taxa de explantes respondentes (Figura 3C), os tratamentos diferiram apenas quanto à concentração de sacarose. Plantas cultivadas com sacarose apresentaram as maiores frequências de explantes respondentes, independente da concentração utilizada.

### ***V. condensata* cultivada *in vitro* sob condição fotoautotrófica apresenta maior taxa fotossintética**

A taxa fotossintética diferiu significativamente entre os tratamentos. Na ausência de interação, os fatores concentrações de sacarose e níveis de trocas gasosas foram analisados separadamente, sendo que apenas o primeiro contribuiu para a diferença entre os tratamentos. Os tratamentos sem sacarose apresentaram as maiores médias enquanto que a presença desta fonte de carbono no meio, nas diferentes concentrações utilizadas, levaram a respostas semelhantes quanto à taxa fotossintética (Figura 4).

Com relação aos teores de pigmentos fotossintéticos, houve interação entre os fatores estudados (Figuras 5A a 5D). A concentração de clorofila *a* foi maior nas plantas cultivadas com 1 e 2 membranas. Os teores de clorofila *b* só apresentaram diferenças significativas em plantas cultivadas em frascos sem membrana, em meios com 0 e 7,5 g L<sup>-1</sup> de sacarose, que apresentaram as menores médias. A razão clorofila *a/b* também não

diferiu significativamente para tratamentos com 1 ou 2 membranas, independente da concentração de sacarose. Em plantas cultivadas em frascos sem membrana, os maiores valores dessa razão ocorreram em meio sem sacarose. As menores concentrações de carotenoides totais ocorreram em plantas cultivadas sem sacarose e sem membrana, tratamento esse que diferiu significativamente dos demais.

### **Os níveis de sacarose e as trocas gasosas afetam a estrutura e anatomia foliar de vitroplantas de *V. condensata***

As folhas de *V. condensata* cultivadas *in vitro* apresentaram uma estrutura dorsiventral bem definida, tendo em média uma camada de parênquima paliçádico e três camadas de parênquima lacunoso. Alterações estruturais foram observadas nos tratamentos com maiores trocas gasosas (1 e 2 membranas), cujas plantas tiveram folhas mais espessas. Tratamentos com maiores concentrações de sacarose e com 1 ou 2 membranas apresentaram feixes vasculares maiores, mais organizados e células parenquimáticas mais volumosas (Figuras 6A a 6L).

O índice estomático também foi alterado pelos fatores sacarose e vedação, havendo interação entre eles no índice estomático adaxial. Neste, as maiores médias foram observadas nos tratamentos sem membrana. Não houve interação entre os fatores para a variável de índice estomático abaxial, sendo observados resultados similares ao adaxial, com as maiores médias associadas aos tratamentos sem membrana (Figura 7).

Testes histoquímicos indicaram a presença de compostos de reserva na região do feixe central e da lâmina foliar de *V. condensata* (Figuras 8, 9 e 10). Grãos de amido evidenciados pela reação positiva com lugol, se encontravam em pequena quantidade e dispersos principalmente próximo ao feixe vascular. Carboidratos totais e proteínas foram evidenciados na reação com PAS e xylidine Ponceau, porém em pouca quantidade na região da lâmina foliar. Os testes histoquímicos não mostraram diferenças entre os tratamentos.

## DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho evidenciaram que *V. condensata* possui diferentes respostas morfoanatômicas e no desenvolvimento *in vitro*, decorrentes das alterações na concentração de sacarose do meio e dos níveis de trocas gasosas. O único trabalho publicado com cultivo *in vitro* de *V. condensata* também apresentou desenvolvimento diferenciado em resposta à distintas concentrações de 6-benziladenina (Vicente et al., 2009).

O método de cultivo *in vitro* depende da capacidade da espécie em responder às condições fornecidas para o desenvolvimento. Vários trabalhos exploraram a capacidade fotoautotrófica de plantas *in vitro* (Iarema et al, 2012; Samosir et al., 2014; Shin et al., 2014; Corrêa et al., 2015; Corrêa et al., 2016). Nossos dados demonstraram que *V. condensata* possui potencial fotoautotrófico, visto o desenvolvimento em frascos com membranas que permitem trocas gasosas e as maiores taxas fotossintéticas em meio sem fonte externa de carbono.

O aumento das trocas gasosas resultou em maior crescimento e acúmulo de biomassa em *V. condensata*. Diversos trabalhos obtiveram resultados similares com outras espécies (Ribeiro et al., 2009; Rodrigues et al., 2012; Saldanha et al., 2012; Batista et al. 2017b). O uso de membranas facilita o fluxo de gases entre o ambiente externo e interno do frasco, reduzindo a umidade interna e facilitando a absorção de nutrientes pelas plantas (Arigita et al., 2010; Saldanha et al., 2012; Batista et al. 2017b).

O acréscimo de uma fonte de carbono no meio de cultura também pode influenciar diretamente o desenvolvimento das plantas micropropagadas (Rolland et al., 2006). Dentre as fontes de carbono, a sacarose é uma das mais utilizadas em cultura de tecidos vegetais. Diversos trabalhos relacionam a utilização de sacarose com maior crescimento, expansão foliar e ganho de biomassa (Badr et al., 2015; Fanta et al., 2016; Zahara et al., 2016). Além disso, o cultivo *in vitro* sem sacarose no meio de cultura leva a menores taxas de multiplicação do material vegetal (Jo et al., 2009). Nossos resultados corroboraram com estes trabalhos, visto que os melhores resultados das variáveis de desenvolvimento e das taxas de explantes respondentes ocorreram nos tratamentos com maiores concentrações de sacarose.

O cultivo de *V. condensata* na ausência de sacarose resultou em uma maior atividade fotossintética, mesmo com menor crescimento. A disponibilidade de sacarose pode ter atuado na inibição da produção de enzimas-chave da fotossíntese, contribuindo

para a formação de um aparato fotossintético disfuncional ou inibido por saturação (Hazarika, 2006; McCarthy et al., 2016). A disponibilidade de sacarose no meio pode ter suprido as necessidades metabólicas das plantas. Resultados semelhantes foram observados em outras espécies cultivadas *in vitro* (Hdider & Desjardins, 1994; Fuentes et al., 2005; McCarthy et al., 2016).

Os maiores teores de pigmentos fotossintéticos de *V. condensata* ocorreram nos tratamentos com maiores trocas gasosas. Maiores trocas gasosas proporcionam um aumento da concentração de CO<sub>2</sub> no interior do frasco, o que estimula a fotoautotrofia das plantas e conseqüentemente, maior concentração de pigmentos fotossintéticos (Mohamed & Alsadon, 2010). Menores concentrações de etileno no interior dos frascos com membranas também podem ter relação com uma maior biossíntese de pigmentos (Kozai, 2010). Muitos trabalhos também associam a maior disponibilidade de CO<sub>2</sub> dentro do frasco com o aumento dos teores de pigmentos fotossintéticos, como observado em *Pfaffia glomerata* (Saldanha et al., 2012; Saldanha et al., 2013), *Gevuina avellana* (Alvarez et al., 2012) e *Lippia alba* (Batista et al., 2017a).

A diferenciação e a organização celular são modificadas em cultura de tecidos vegetais. Plantas cultivadas em condições heterotróficas apresentam um aumento da densidade estomática, em decorrência das baixas trocas gasosas do frasco com o meio externo (Lian et al., 2002; Mohamed & Alsadon, 2010). Nossos resultados também evidenciaram que os níveis das trocas gasosas contribuíram para uma alteração da frequência estomática de *V. condensata*, sendo que os maiores índices foram encontrados em plantas cultivadas em menores trocas gasosas.

Diferentes níveis de trocas gasosas resultam em mudanças anatômicas nas folhas de plantas cultivadas *in vitro*. Folhas de vitroplantas de batata (*Solanum tuberosum*) cultivadas em frasco sem trocas gasosas se mostraram menos espessas e com menor vascularização (Mohamed & Alsadon, 2010). A análise anatômica de folhas de *V. condensata* corrobora com estes resultados, demonstrando que folhas de plantas cultivadas em frascos com tampas que permitem trocas gasosas são mais robustas, espessas e possuem sistema vascular mais desenvolvido.

Conclui-se que *V. condensata* possui potencial fotoautotrófico e que as trocas gasosas são benéficas no cultivo *in vitro* desta espécie. No entanto, os melhores resultados de crescimento e biomassa também ocorreram em meio com sacarose. A necessidade da presença de sacarose pode ser associada com a concentração insuficiente de CO<sub>2</sub> no interior do frasco durante o fotoperíodo (Xiao et al., 2011), demonstrando a necessidade de um

maior aporte de CO<sub>2</sub>. Estudos futuros testando o cultivo *in vitro* de *V. condensata* em ambiente com enriquecido de CO<sub>2</sub> à níveis próximos a concentração atmosférica podem resultar na redução da dependência de fonte externa de carbono, possibilitando à produção de plantas mais rustificadas, bem desenvolvidas e com menores perdas na fase de aclimatização.

## REFERÊNCIAS

ALVAREZ, C.; SÁEZ, P.; SÁEZ, K.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; RÍOS, D. Effects of light and ventilation on physiological parameters during *in vitro* acclimatization of *Gevuina avellana* mol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 1, p. 93-101, 2012.

ARANTES, A.A.; FALÉ, P.L.; COSTA, L.C.; PACHECO, R.; ASCENSÃO, L.; SERRALHEIRO, M. L. Inhibition of HMG-CoA reductase activity and cholesterol permeation through Caco-2 cells by caffeoylquinic acids from *Vernonia condensata* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 6, p. 738-743, 2016.

ARIGITA, L.; CAÑAL, M.J.; TAMÉS, R.S.; GONZÁLEZ, A. CO<sub>2</sub>-enriched microenvironment affects sucrose and macronutrients absorption and promotes autotrophy in the *in vitro* culture of kiwi (*Actinidia deliciosa* Chev. Liang and Ferguson). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 46, n. 3, p. 312-322, 2010.

BADR, A.; ANGERS, P.; DESJARDINS, Y. Comprehensive analysis of *in vitro* to *ex vitro* transition of tissue cultured potato plantlets grown with or without sucrose using metabolic profiling technique. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 122, n. 2, p. 491-508, 2015.

BATISTA, D.S.; CASTRO, K.M.; KOEHLER, A.D.; PORTO, B.N.; SILVA, A.R.; SOUZA, V.C.; TEIXEIRA, M.L.; CARDOSO, M.G.; SANTOS, M.O.; VICCINI, L.F.; OTONI, W.C. Elevated CO<sub>2</sub> improves growth, modifies anatomy, and modulates essential oil qualitative production and gene expression in *Lippia alba* (Verbenaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128, n. 2, p. 357-368, 2017a.

BATISTA, D.S.; DIAS, L.L.C.; RÊGO, M.M.; SALDANHA, C.W.; OTONI, W.C. Flask sealing on *in vitro* seed germination and morphogenesis of two types of ornamental pepper explants. **Ciência Rural**, v. 47, n. 3, 2017b.

BOEING, T.; SILVA, L.M.; SOMENSI, L.B.; CURY, B.J.; COSTA, A.P.; PETREANU, M.; NIERO, R.; ANDRADE, S.F. Antiulcer mechanisms of *Vernonia condensata* Baker: A medicinal plant used in the treatment of gastritis and gastric ulcer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 184, p. 196-207, 2016.

CAMPOS, V.B. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cellular and Molecular Biology, Including Cyto-enzymology**, v. 22, n. 1, p. 45-64, 1976.

COPPEDE, J.S.; PINA, E.S.; PAZ, T.A.; FACHIN, A.L.; MARINS, M.A.; BERTONI, B.W.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S. Cell cultures of *Maytenus ilicifolia* Mart. are richer sources of quinone-methide triterpenoids than plant roots in natura. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 1, p. 33-43, 2014.

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.; DAMATTA, F.M.; OTONI, W.C. *In vitro* photoautotrophic potential and ex vitro photosynthetic competence of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen accessions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 121, n. 2, p. 289-300, 2015.

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.; NOTINI, M.M.; FREITAS, D.M.S.; DAMATTA, F.M.; OTONI, W.C. Induced polyploidization increases 20-hydroxyecdysone content, *in vitro* photoautotrophic growth, and *ex vitro* biomass accumulation in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 52, p. 45-55, 2016.

COSTA, A.C.; ROSA, M.; MEGGUER, C.A.; SILVA, F.G.; PEREIRA, F.D.; OTONI, W. C. A reliable methodology for assessing the *in vitro* photosynthetic competence of two Brazilian savanna species: *Hyptis marrubioides* and *Hancornia speciosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 117, n. 3, p. 443-454, 2014.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

FEDER, N. & O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, p. 123-142, 1968.

FUENTES, G.; TALAVERA, C.; OROPEZA, C.; DESJARDINS, Y.; SANTAMARIA, J.M. Exogenous sucrose can decrease *in vitro* photosynthesis but improve field survival and growth of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro* plantlets. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v. 41, n. 1, p. 69-76, 2005.

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

HDIDER, C. & DESJARDINS, Y. Effects of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 36, n. 1, p. 27-33, 1994.

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

JAZIRI, M.; ZHIRI, A.; GUO, Y.W.; DUPONT, J.P.; SHIMOMURA, K.; HAMADA, H.; VANHAELEN, M.; HOMÈS, J. *Taxus* sp. cell, tissue and organ cultures as alternative sources for taxoids production: a literature survey. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 46, n. 1, p. 59-75, 1996.

JO, E.A.; TEWARI, R.K.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. *In vitro* sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 96, n. 3, p. 307-315, 2009.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw- Hill, 1940. 523 p.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137, 1965.

KOZAI, T.; KUBOTA, C.; JEONG, B.R. Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 51, n. 1, p. 49-56, 1997.

- KOZAI, T. & KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, v. 114, n. 4, p. 525-537, 2001.
- KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation—environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 10, p. 188-204, 2010.
- KUMARI, A.; BASKARAN, P.; VAN STADEN, J. *In vitro* propagation and antibacterial activity in *Cotyledon orbiculata*: a valuable medicinal plant. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 124, n. 1, p. 97-104, 2016.
- LIAN, M.L.; MURTHY, H.N.; PAEK, K.Y. Culture method and photosynthetic photon flux affect photosynthesis, growth and survival of *Limonium* ‘Misty Blue’ *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v. 95, n. 3, p. 239-249, 2002.
- LORENZI, H. & MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**, 2nd ed.; Instituto Plantarum: Nova Odessa, Brazil, 2008; pp. 165–166.
- LUCCHESINI, M.; MENSUALI-SODI, A.; MASSAI, R.; GUCCI, R. Development of autotrophy and tolerance to acclimatization of *Myrtus communis* transplants cultured *in vitro* under different aeration. **Biologia Plantarum**, v. 44, n. 2, p. 167-174, 2001.
- MARTINS, J.P.R.; VERDOODT, V.; PASQUAL, M.; DE PROFT, M. Physiological responses by *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae) when grown under controlled microenvironmental conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 36, p. 1952-1961, 2016.
- MCCARTHY, A.; CHUNG, M.; IVANOV, A.G.; KROL, M.; INMAN, M.; MAXWELL, D.P.; HÜNER, N.P. An established *Arabidopsis thaliana* var. Landsberg erecta cell suspension culture accumulates chlorophyll and exhibits a stay-green phenotype in response to high external sucrose concentrations. **Journal of Plant Physiology**, v. 199, p. 40-51, 2016.
- MENAMO, M. F. T., BANTTE, K., JIMMA, E. Optimization of sucrose, plant hormones and photoperiod for *in vitro* propagation of lemon (*C. limon*) and macrophylla (*C. macrophylla*) using shoot tip. **Optimization**, v. 47, p. 31-38, 2016.
- MOHAMED, M.H. & ALSADON, A.A. Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. **Scientia Horticulturae**, v. 123, n. 3, p. 295-300, 2010.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473–497, 1962.
- MURTHY, H.N.; LEE, E.J.; PAEK, K.Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 1, p. 1-16, 2014.
- NGUYEN, Q.T.; XIAO, Y.; KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation. In: KOZAI, T.; NIU, G.; TAKAGAKI, M. (Eds.). **Plant Factory: An Indoor Vertical Farming System for Efficient Quality Food Production**. Academic Press, p. 271-283, 2015.

NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; RUSSOWSKI, D.; MARTINS, C.F. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 1, p. 84-90, 2003.

O'BRIEN, T.P. & McCULLY, M.E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne, Termarcarphi Pty. Ltd, 1981.

PEREIRA, N.A.; PEREIRA, B.M.; NASCIMENTO, M.C.; PARENTE, J.P; MORS, W.B. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as snake venom antidotes; IV. Protection against Jararaca venom by isolated constituents. **Planta Medica**, v. 60, n. 02, p. 99-100, 1994.

PÉREZ-JIMÉNEZ, M.; LÓPEZ-PÉREZ, A.J.; OTÁLORA-ALCÓN, G.; MARÍN-NICOLÁS, D.; PIÑERO, M.C.; DEL AMOR, F.M. A regime of high CO<sub>2</sub> concentration improves the acclimatization process and increases plant quality and survival. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 121, n. 3, p. 547-557, 2015.

PRAVEEN, N. & MURTHY, H. N. Synthesis of withanolide A depends on carbon source and medium pH in hairy root cultures of *Withania somnifera*. **Industrial Crops and Products**, v. 35, n. 1, p. 241-243, 2012.

RAJA, H. D & AROCKIASAMY, D.I. *In vitro* propagation of *Mentha viridis* L. from nodal and shoot tip explants. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 1-6, 2009.

RISSO, W.E. SCARMINIO, I.S.; MOREIRA, E.G. Antinociceptive and acute toxicity evaluation of *Vernonia condensata* Baker leaves extracted with different solvents and their mixtures. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, n. 8, p. 811, 2010.

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

ROLLAND, F.; BAENA-GONZALEZ, E.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. **Annual Review in Plant Biology**, v.57, p. 675–709, 2006.

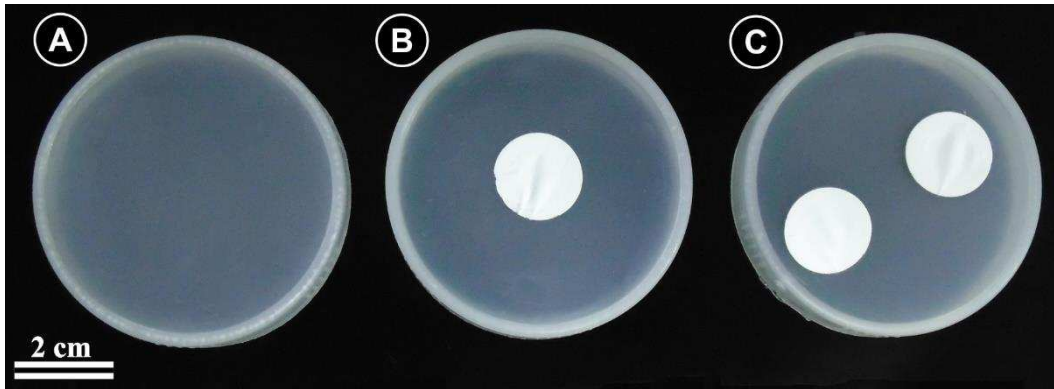
SÁEZ, P.L.; BRAVO, L.A.; LATSAGUE, M.I.; TONEATTI, M.J.; COOPMAN, R.E.; ÁLVAREZ, C.E.; OLATE-SÁNCHEZ, M.; RÍOS, D. G. Influence of *in vitro* growth conditions on the photosynthesis and survival of *Castanea sativa* plantlets during *ex vitro* transfer. **Plant Growth Regulation**, v. 75, n. 3, p. 625-639, 2015.

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

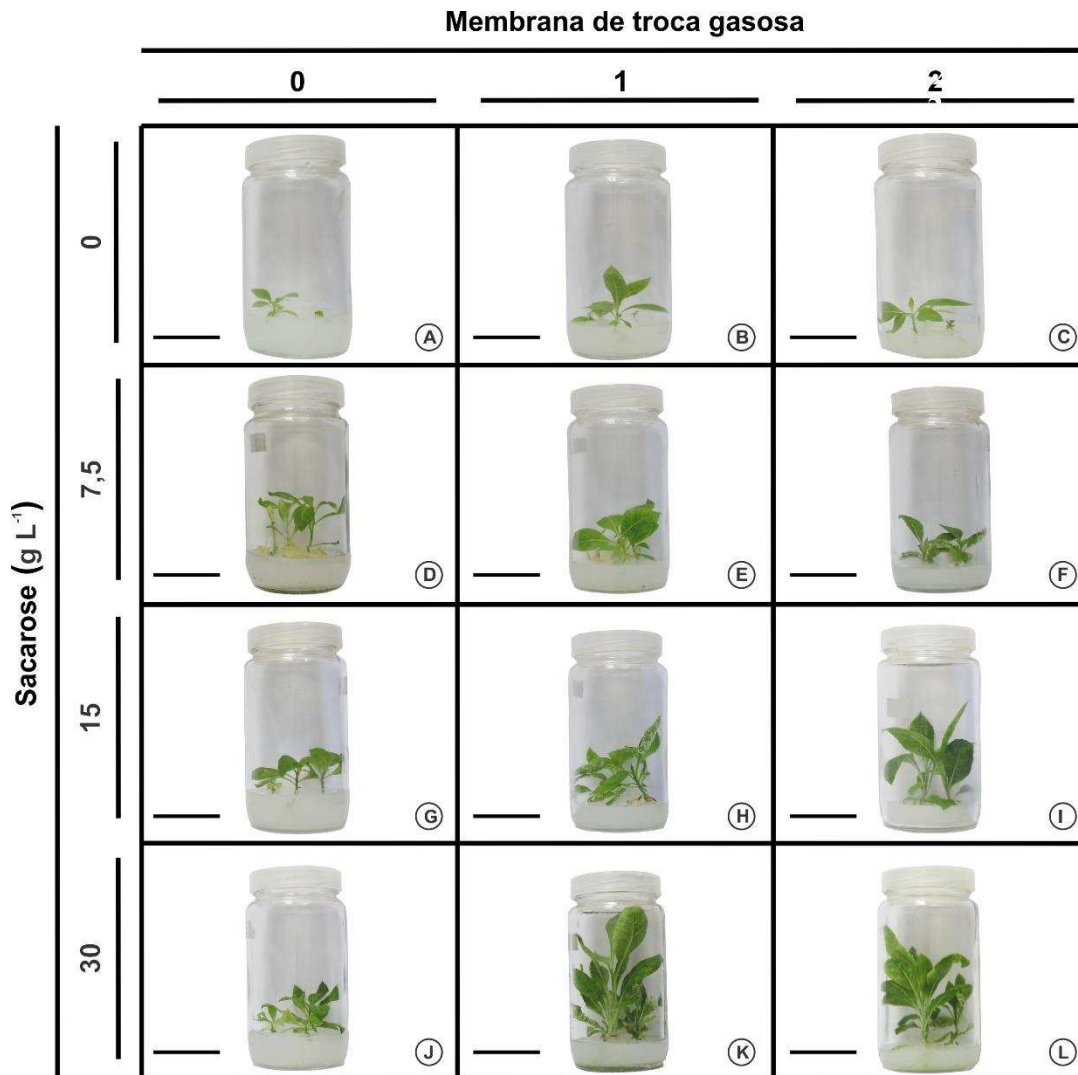
SALDANHA, C.W.; OTONI, C.G.; NOTINI, M.M.; KUKI, K.N.; CRUZ, A.C.F.; NETO, A.R.; DIAS, L.L.C.; OTONI, W.C. A CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere improves *in vitro* growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 49, n. 4, p. 433-444, 2013.

- SAMOSIR, Y.M.S. & ADKINS, S. Improving acclimatization through the photoautotrophic culture of coconut (*Cocos nucifera*) seedlings: an *in vitro* system for the efficient exchange of germplasm. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 50, n. 4, p. 493-501, 2014.
- SANTOS, R.P.; CRUZ, A.C.F.; IAREMA, L.; KUKI, K.N.; OTONI, W.C. Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Revista Ceres**, v. 55, n. 4, p.356-364, 2008.
- SCHMILDT, O.; NETTO, A.T.; SCHMILDT, E.R.; CARVALHO, V.S.; OTONI, W.C.; CAMPOSTRINI, E. Photosynthetic capacity, growth and water relations in 'Golden'papaya cultivated *in vitro* with modifications in light quality, sucrose concentration and ventilation. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 27, n. 1, p. 7-18, 2015.
- SCHNEIDER, C.A.; RASBAND, W.S.; ELICEIRI, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671-675, 2012.
- SHIN, K.S.; PARK, S.Y.; PAEK, K.Y. Physiological and biochemical changes during acclimatization in a *Doritaenopsis* hybrid cultivated in different microenvironments *in vitro*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 100, p. 26-33, 2014.
- SILVA, J.B.; TEMPONI, V.D.; FERNANDES, F.V.; ALVES, G.D.; MATOS, D.M.; GASPARETTO, C.M.; RIBEIRO, A.; DE PINHO, J.D.; ALVES, M.S.; SOUSA, O.V. New approaches to clarify antinociceptive and anti-inflammatory effects of the ethanol extract from *Vernonia condensata* leaves. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 12, p. 8993-9008, 2011.
- THOMAS, E.; GOPALAKRISHNAN, V.; SOMASAGARA, R.R.; CHOUDHARY, B.; RAGHAVAN, S.C. Extract of *Vernonia condensata*, inhibits tumor progression and improves survival of tumor-allograft bearing mouse. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-12, 2016.
- VICENTE, M.A.A.; ALMEIDA, W.A.B.; CARVALHO, Z.S. *In vitro* multiplication and acclimation of *Vernonia condensata* Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 2, p. 176-183, 2009.
- WELLBURN, A.R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.
- XIAO, Y. & KOZAI, T. *In vitro* multiplication of static plantlets using sugar-free media. **Scientia Horticulturae**, v. 109, n. 1, p. 71-77, 2006.
- XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, n. 2, p. 149-158, 2011.
- ZAHARA, M.; DATTA, A.; BOONKORKAEW, P. Effects of sucrose, carrot juice and culture media on growth and net CO<sub>2</sub> exchange rate in *Phalaenopsis hybrid* 'Pink'. **Scientia Horticulturae**, v. 205, p. 17-24, 2016.

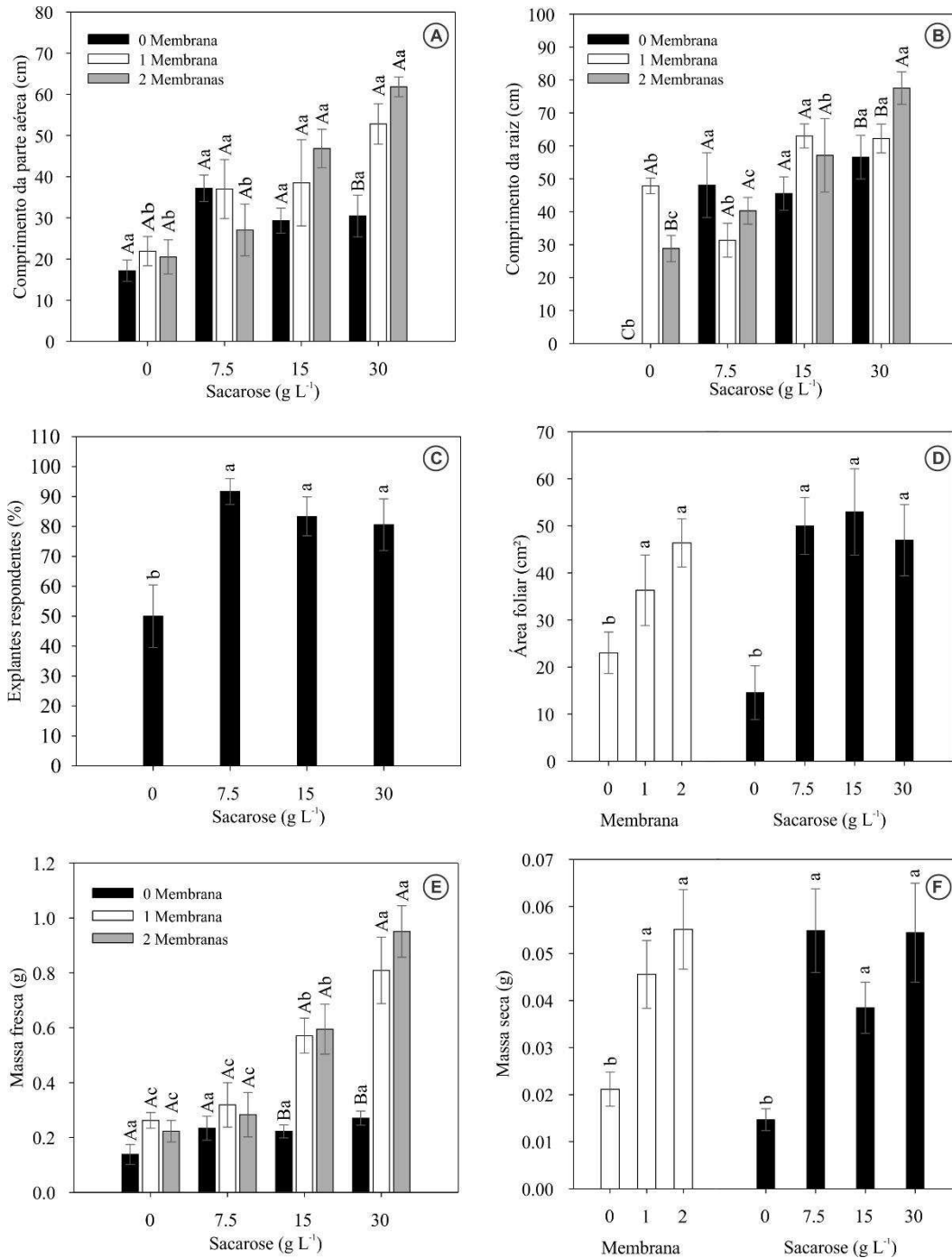
**FIGURAS**



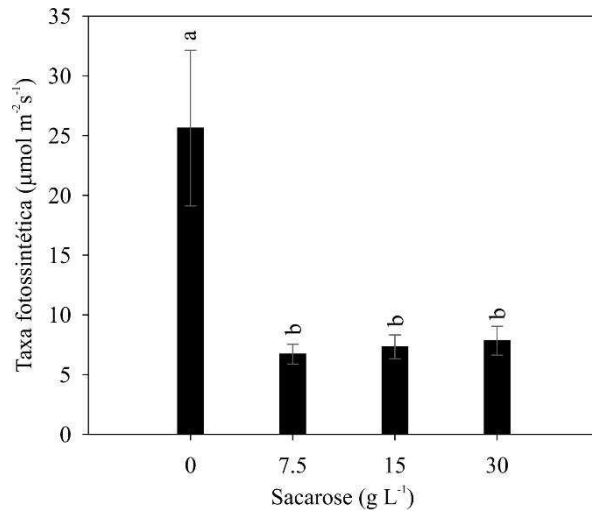
**Figura 1** – Detalhes dos padrões de vedação empregados no cultivo *in vitro* de *Vernonia condensata*. **A.** Tampa rígida de polipropileno (TRP); **B.** TRP com uma membrana; **C.** TRP com duas membranas.



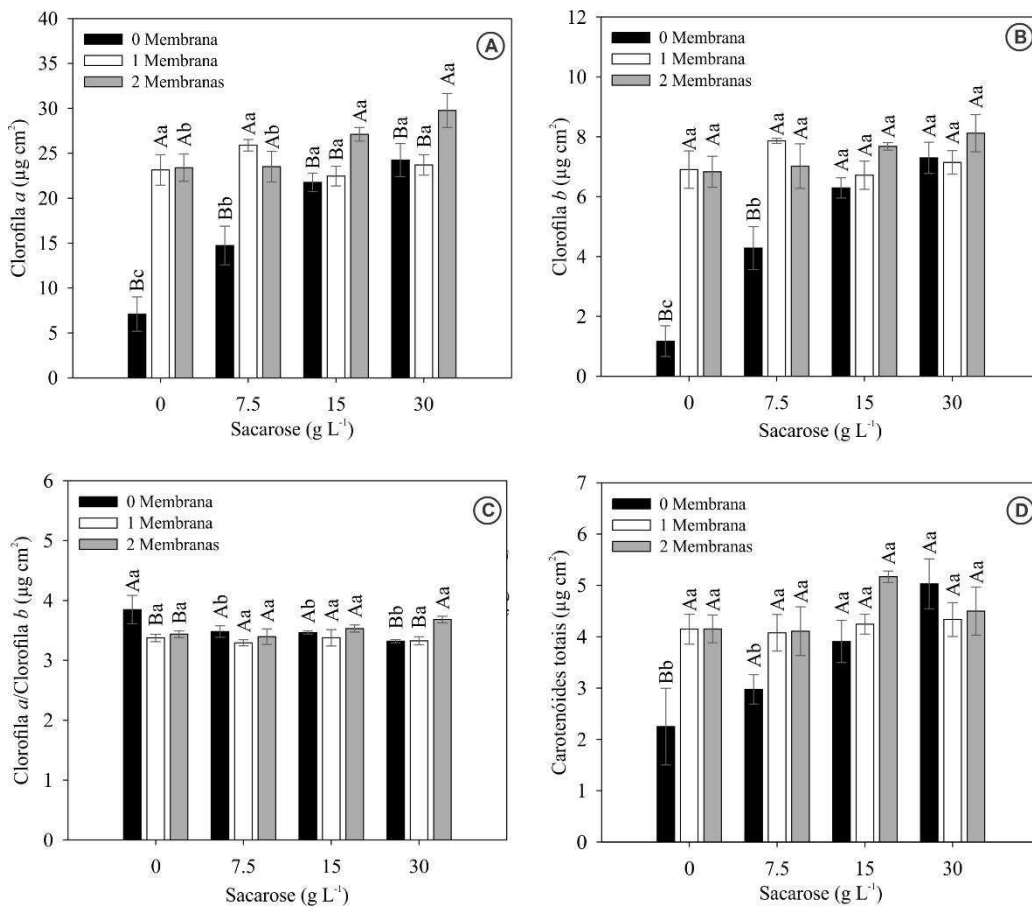
**Figura 2** - Plantas de *Vernonia condensata* cultivadas *in vitro* sobre diferentes concentrações de sacarose (0; 7,5; 15 e 30 g L<sup>-1</sup>) e níveis de trocas gasosas (0, 1 e 2 membranas), após 35 dias de cultivo. Barra equivale a 10 cm.



**Figura 3** - Desenvolvimento de *Vernonia condensata* após 35 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes concentrações de sacarose (0; 7,5; 15 e 30 g L<sup>-1</sup>) e níveis de trocas gasosas (0, 1 e 2 membranas). Letras maiúsculas comparam médias de diferentes níveis de trocas gasosas (membranas) e letras minúsculas comparam médias de diferentes concentrações de sacarose. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade.

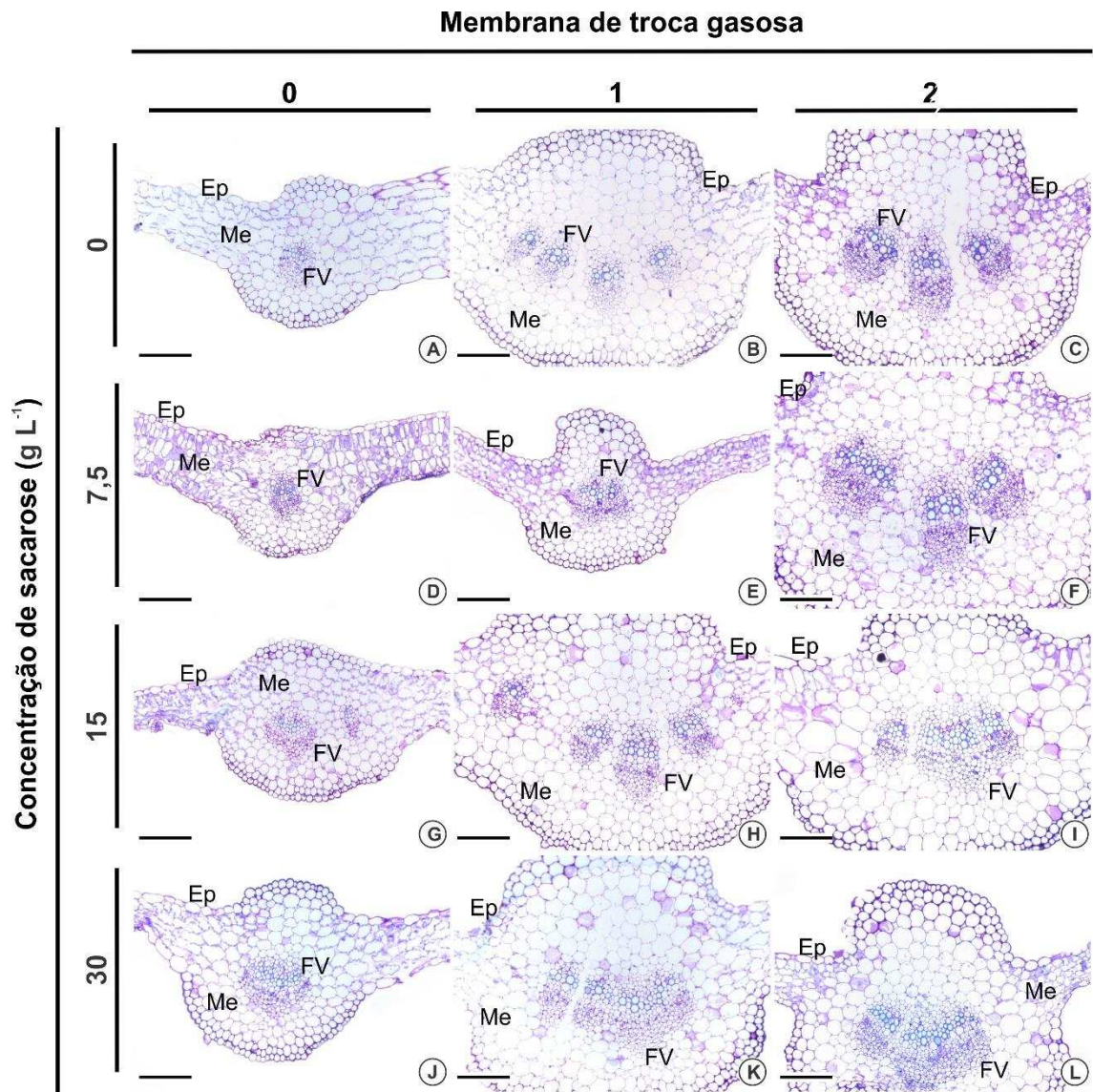


**Figura 4** - Taxa fotossintética de *Vernonia condensata*, após 35 dias de cultivo *in vitro* em diferentes concentrações de sacarose (0; 7,5; 15 e 30 g L<sup>-1</sup>) e níveis de trocas gasosas (0, 1 e 2 membranas). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade.

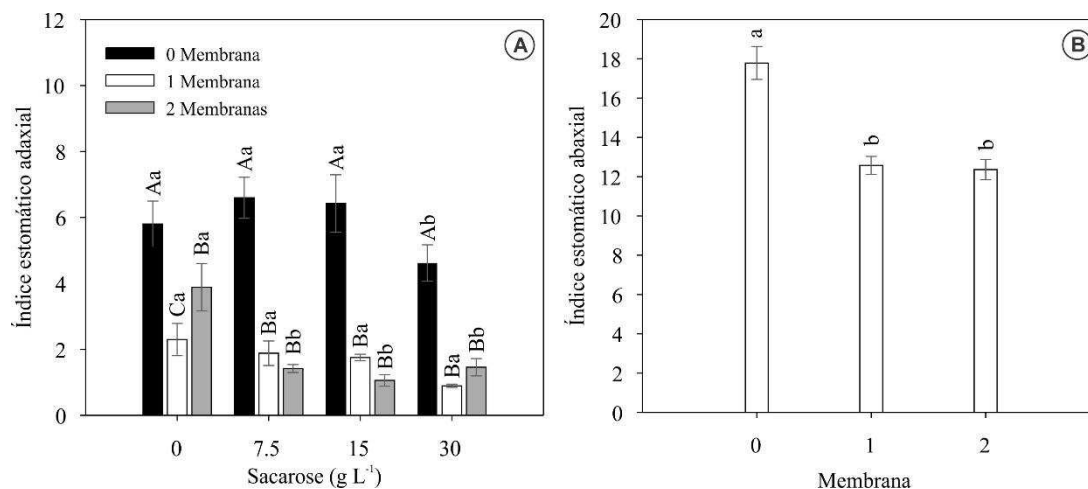


**Figura 5** - Pigmentos fotossintéticos em folhas de *Vernonia condensata* após 35 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes concentrações de sacarose (0; 7,5; 15 e 30 g L<sup>-1</sup>) e níveis de trocas gasosas (0, 1 e 2 membranas). Letras maiúsculas comparam médias de diferentes

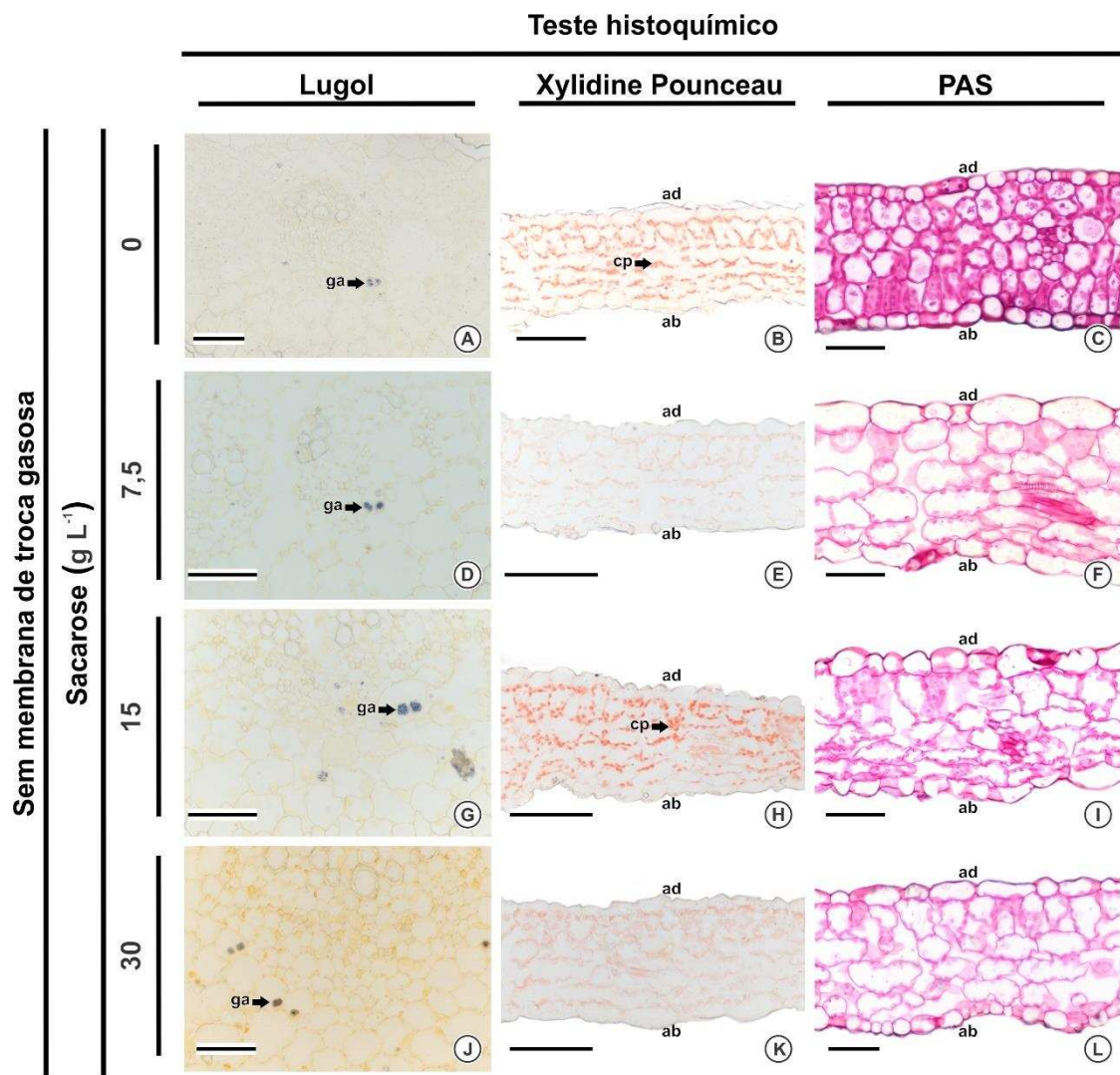
níveis de trocas gasosas (membranas) e letras minúsculas comparam médias de diferentes concentrações de sacarose. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade.



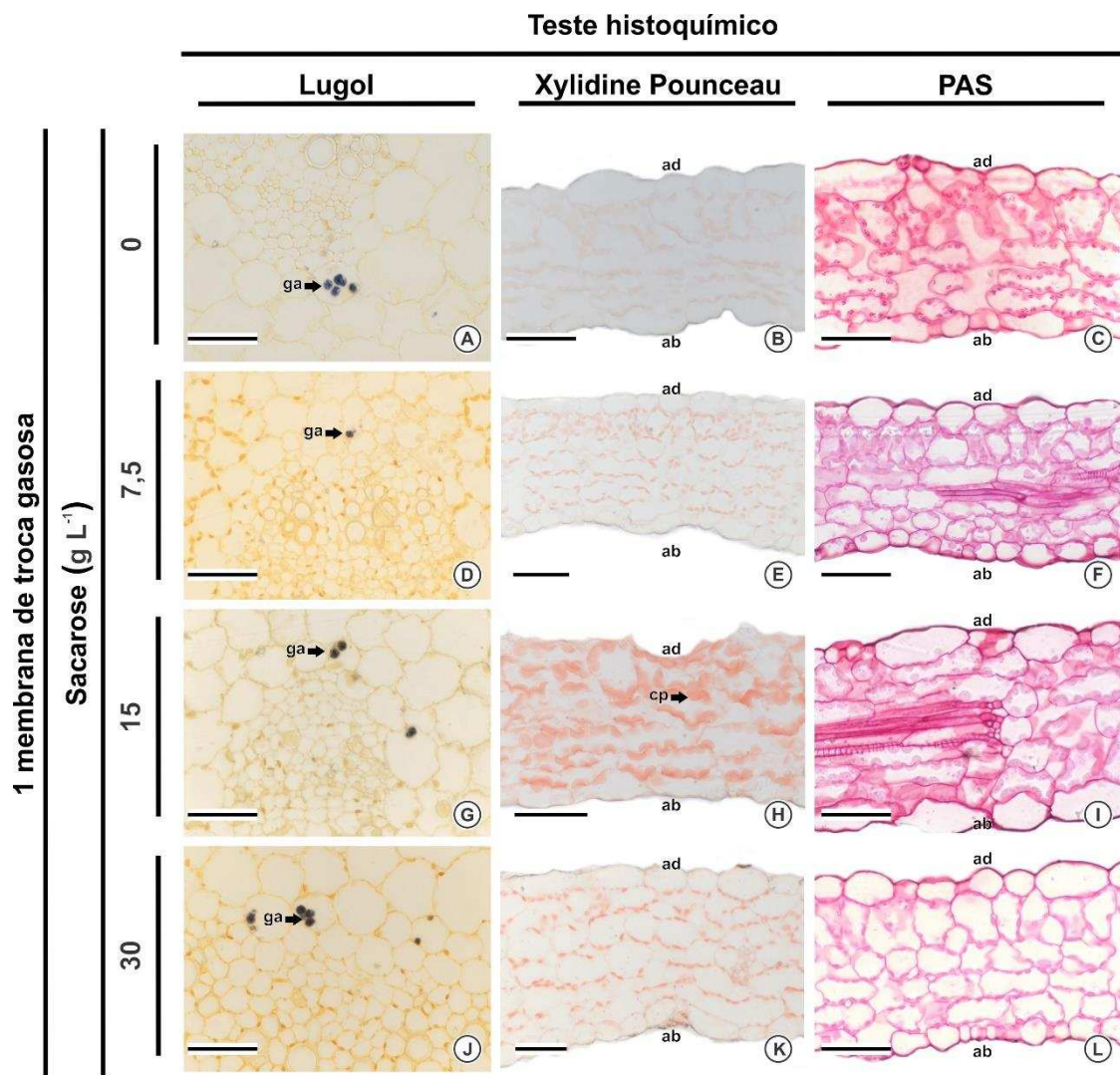
**Figura 6** - Folhas de *Vernonia condensata* coradas com azul de toluidina, após 35 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes concentrações de sacarose (0; 7,5; 15 e 30 g L<sup>-1</sup>) e níveis de trocas gasosas (0, 1 e 2 membranas). Ep – Epiderme; Me – Mesofilo; FV – Feixe Vascular. Barras correspondem a 30 µm.



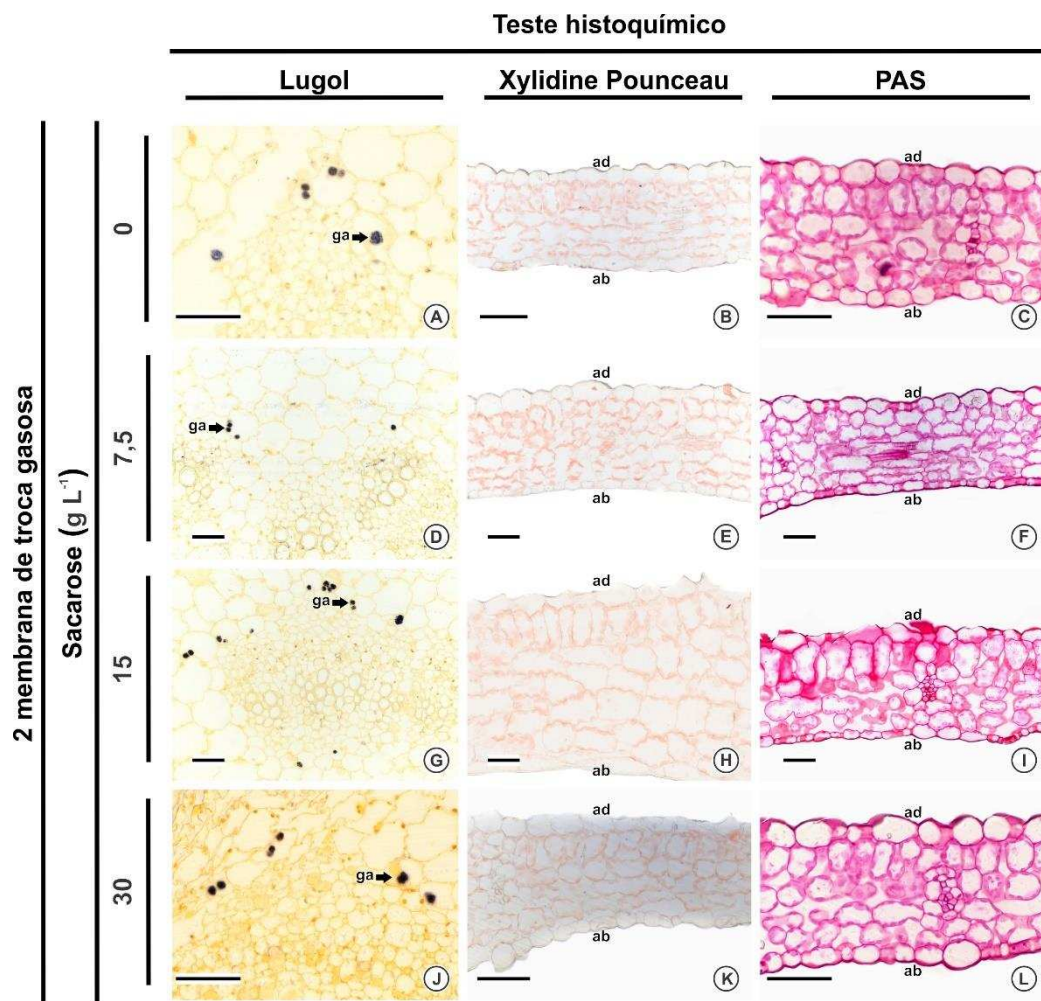
**Figura 7** - Índice estomático adaxial (A) e abaxial (B) de folhas de *Vernonia condensata* após 35 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes concentrações de sacarose (0; 7,5; 15 e 30 g L<sup>-1</sup>) e níveis de trocas gasosas (0, 1 e 2 membranas). Letras maiúsculas comparam médias de diferentes níveis de trocas gasosas (membranas) e letras minúsculas comparam médias de diferentes concentrações de sacarose. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade.



**Figura 8** - Análises histoquímicas de folhas de vitroplantas de *V. condensata* cultivadas em frascos sem membrana, em meio suplementado com 0 (A-C); 7,5 (D-F); 15 (G-I) e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (J-L). Seções transversais submetidas ao lugol (A, D, G, J), xylidine ponceau (B, E, H, K) e ao PAS (C, F, I, L). Corpos proteicos corados em laranja (B, H). Reação positiva para carboidratos totais (C, F, I, L). A reação foi positiva para lugol (A, D, G, J). Abreviações: ga, grãos de amido; cp, corpos protéicos; ad, adaxial; ab, abaxial. Barras equivalem a 10 µm.



**Figura 9** - Análises histoquímicas de folhas de vitroplantas de *Vernonia condensata* cultivadas em frascos com uma membrana, em meio suplementado com 0 (A-C); 7,5 (D-F); 15 (G-I) e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (J-L). Seções transversais submetidas ao lugol (A, D, G, J), xylidine ponceau (B, E, H, K) e ao PAS (C, F, I, L). Reação negativa para corpos proteicos (B, E, K). Reação positiva para carboidratos totais (C, F, I, L). A reação foi positiva para lugol (A, D, G, J). Abreviações: ga, grãos de amido; cp, corpos protéicos; ad, adaxial; ab, abaxial. Barras equivalem a 10 μm.



**Figura 10** - Análises histoquímicas de folhas de vitroplantas de *Vernonia condensata* cultivadas em frascos com duas membranas de troca gasosa, em meio suplementado com 0 (A-C); 7,5 (D-F); 15 (G-I) e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (J-L). Seções transversais submetidas ao lugol (A, D, G, J), xylidine ponceau (B, E, H, K) e ao PAS (C, F, I, L). Reação negativa para corpos proteicos (B, E, H, K). Reação positiva para carboidratos totais (C, F, I, L). A reação foi positiva para lugol (A, D, G, J). Abreviações: ga, grãos de amido; cp, corpos protéicos; ad, adaxial; ab, abaxial. Barras equivalem a 10 µm.

## CAPÍTULO II

### Qualidade espectral da luz no desenvolvimento, anatomia, fotossíntese e aclimatização de *Vernonia condensata* cultivada *in vitro*

#### RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da qualidade espectral da luz sobre o desenvolvimento, anatomia, fotossíntese e aclimatização de vitroplantas de *Vernonia condensata*. Para tanto, plântulas foram cultivadas *in vitro* em diferentes tipos de iluminação: lâmpadas emitindo diodo (LED) branca, LED vermelho/azul (V/A), LED Branco/Azul alto (B/AA), LED Vermelho/Branco/Azul médio (V/B/AM) e LED Vermelho/Branco/Vermelho distante/Azul médio (V/B/VD/AM). Após 40 dias de cultivo *in vitro* foram realizadas as análises anatômicas, fotossintéticas e de desenvolvimento. A qualidade da luz influenciou o crescimento da parte aérea de *V. condensata*, sendo as maiores médias encontradas sobre luz V/B/VD/AM. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para o acúmulo de biomassa, crescimento da raiz, teor de pigmentos e taxa fotossintética. Resultados similares foram observados durante o cultivo *ex vitro*, indicando que as plantas mantiveram as características influenciadas pelo espectro luminoso durante a fase *in vitro*. A anatomia das vitroplantas foi influenciada pela qualidade de luz, sendo observadas modificações na espessura foliar, organização do mesofilo e dos feixes vasculares do caule e das folhas, além de acúmulo de compostos, tais como carboidratos e proteínas. Testes histoquímicos também evidenciaram a presença de flavonoides nas folhas de *V. condensata*, principalmente nas plantas cultivadas em LEDs V/B/AM. Conclui-se que a qualidade da luz afeta o desenvolvimento de *V. condensata in vitro*, e que essa influência pode ser mantida após a aclimatização. Esses resultados sugerem que a produção de flavonoides na espécie também pode ser alterada pelas diferentes qualidades de luz. Futuros trabalhos que visem quantificar estes metabólitos podem contribuir para o entendimento da biossíntese desses compostos.

**Palavras-chaves:** Espectros de luz, LED, planta medicinal, vermelho distante.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the influence of spectral light quality on the development, anatomy, photosynthesis and acclimatization of *in vitro* plants of *Vernonia condensata*. For this, plantlets were grown *in vitro* under different light conditions: white light-emitting diode (LED) bulbs, red/blue LED (R/B), White/High Blue LED (W/HB), Dark red/White/Medium Blue LED (DR/W/MB) and Dark red/White/Far red/High Blue LED (DR/W/FR/HB). After 40 days of *in vitro* culture, anatomical, photosynthetic and developmental analyzes were performed. The light quality influenced shoot development of *V. condensata*, being the higher values found on light DR/W/FR/HB. No significant differences were observed among the treatments for biomass accumulation, root growth, pigment content and photosynthetic rate. Similar results were observed during acclimatization, indicating that the plants maintained the characteristics influenced by the light spectrum during *in vitro* stage. The anatomy of vitroplants were influenced by light quality, with changes in leaf thickness, organization of mesophyll cells and stem bundles, and accumulation of compounds such as carbohydrates and proteins. Histochemical tests also evidenced the presence of flavonoids in the leaves of *V. condensata*, mainly in plants grown in DR/W/MB LEDs. It is concluded that light quality affects the development of *V. condensata in vitro*, and that this influence can be maintained after acclimatization. Our results suggest that flavonoid production can also be altered by different light conditions on this species. Future studies aiming to quantify these metabolites may contribute to better understand the biosynthesis of these compounds.

**Keywords:** Light spectrum, LED, acclimatization, medicinal plant, far red.

## INTRODUÇÃO

A absorção da luz em seus diferentes espectros é mediada por fotorreceptores, tais como fitocromos, criptocromos e fototropinas (Hennig et al., 2001; Lu et al., 2015). A ativação destes fotorreceptores resulta em diferentes respostas fotomorfogênicas da planta (Kami et al., 2010). Os fitocromos são responsáveis pela absorção da luz no comprimento de onda vermelho e vermelho distante, sendo importantes no acúmulo de biomassa e os principais reguladores do crescimento em condições de estresse fisiológico (Yang et al., 2016). Fototropinas e criptocromos são responsáveis pela absorção do azul no espectro da luz visível, este último também pela absorção da radiação UV-A. Esses receptores controlam a abertura estomática, o desenvolvimento das folhas, o fototropismo e o crescimento das plantas (Christie, 2007; Pedmale et al., 2016).

Por estarem diretamente relacionados com o processo fotossintético, os espectros de luz visível azul e vermelho são os principais responsáveis pelo crescimento das plantas (Lin et al., 2013). Muitos trabalhos exploram a influência destes espectros luminosos sobre o desenvolvimento *in vitro* (Silva et al., 2014; Alvarenga et al., 2015; Al-Mayahi, 2016; Batista et al., 2016; Hung et al., 2016; Ramírez-Mosqueda et al., 2016). LEDs azul e vermelha se mostraram eficientes em incrementar o crescimento e desenvolvimento de *Rehmannia glutinosa* (Manivannan et al., 2015) e na aclimatização de clones elite de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) quando comparadas com plantas cultivadas em lâmpadas fluorescentes (Ferreira et al., 2017).

A qualidade da luz pode afetar a morfogênese de vitroplantas, porém poucos trabalhos relatam a influência no desenvolvimento destas plantas após a aclimatização. Iacona & Muleo (2010) observaram que plantas de *Prunus pseudocerasus* x *Prunus avium* mantiveram as características do desenvolvimento *in vitro* em diferentes qualidades de luz, mesmo após seis meses de aclimatização em casa-de-vegetação.

A eficiência fotossintética das plantas pode ser influenciada pela qualidade luminosa, porém as respostas às mudanças no espectro luminoso variam de acordo com a espécie (Lin et al., 2013; Zienkiewicz et al., 2015). Em trabalho com *Arabidopsis thaliana* e *Zea mays*, Zienkiewicz et al. (2015) observaram que a luz vermelha pode estimular a atividade do fotossistema II. Após um período de cultivo em luz branca, a exposição das plantas à luz vermelho distante estimulou a atividade do PSI em *Z. mays*, em uma proporção muito maior do que o observado em *A. thaliana*. A luz azul mostrou-se eficiente na formação do aparato fotossintético de *Cucumis sativus* cultivados em luz

fraca. Nesta condição de luz, foram observadas as maiores taxas fotossintéticas, bem como maior expansão foliar, condutância estomática e razão de clorofila *a/b*, quando comparados com plantas cultivadas em luz vermelha (Wang et al., 2015).

A qualidade da luz pode induzir alterações anatômicas nas plantas. Mudanças no espectro luminoso levaram a variações no tamanho das células e na espessura das folhas de *Betula pendula* (Saebo et al., 1995). O cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) sob as combinações de cores vermelho/verde/azul resultou em uma redução da espessura das folhas e no aumento na densidade do mesofilo, enquanto que as cores vermelho/azul leva ao aumento do tamanho do estômato. No mesmo estudo foi observado que as combinações de cores vermelho/verde/azul e vermelho/azul afetam inversamente o desenvolvimento das folhas de *Platanus orientalis*, resultando em aumento da espessura foliar (Arena et al., 2016).

O metabolismo secundário das plantas também pode ser regulado pela qualidade espectral da luz. A luz azul se mostrou eficiente na indução da produção de compostos fenólicos de *Citrus sinensis* (Ballester & Lafuente, 2017) e óleos essenciais de *Piper aduncum* (Pacheco et al., 2016). Em *Nicotiana tabacum*, a qualidade de luz leva à produção de classes distintas de flavonoides. A maior produção de flavonoides derivados de glicosídeos foram observados em plantas cultivadas nos espectros UV-A e na razão vermelho/vermelho distante, enquanto que a produção de flavonoides derivados do metil estão associados à luz vermelho distante e ao infravermelho (Fu et al., 2016).

*Vernonia condensata* Baker é uma planta herbácea nativa da África e muito utilizada na medicina popular brasileira como antibacteriano e analgésico (Lorenzi & Matos, 2008). Está listada na Farmacopeia Brasileira para o tratamento da indigestão (Brasil, 2011) e devido a sua importância medicinal está incluída em uma relação de plantas com potencial farmacológico, prioritárias na pesquisa (Brasil, 2014). A espécie produz diversos compostos de interesse farmacológico, tais como alcaloides, flavonoides, glicosídeos, saponinas, cumarinas, taninos, triterpenos e óleos voláteis (Silva, 2011). Os flavonoides luteolina e apigenina possuem propriedades antiinflamatórias e antioxidantes e são os principais compostos extraídos das folhas de *V. condensata* (Silva, 2013; Khan et al., 2014; Boeing et al., 2016).

Até o momento, não há trabalhos relatando os efeitos da qualidade de luz no cultivo *in vitro* de *V. condensata*. Assim, objetiva-se a partir deste trabalho avaliar as variações no desenvolvimento, fotossíntese e anatomia decorrentes do cultivo *in vitro* em

diferentes qualidades de luz em *V. condensata*, bem como a performance na aclimatização em condições de casa-de-vegetação.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal e condições de cultivo

Foram realizados dois experimentos com *V. condensata*: No primeiro experimento foi analisada a influência da qualidade luminosa sobre desenvolvimento, anatomia e fotossíntese no cultivo *in vitro* de *V. condensata*. No segundo experimento, as plantas do experimento 1 foram aclimatizadas e mantidas em casa-de-vegetação por 90 dias, quando foram avaliados o desenvolvimento, as trocas gasosas e a fluorescência da clorofila *a*.

Para o experimento 1, foram utilizados como fonte de explantes segmentos nodais sem folha, oriundos do banco de germoplasma do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCT, BIOAGRO, UFV).

Foram inoculados 3 explantes por frasco de vidro (250 mL de capacidade) contendo 60 mL de meio basal e vitaminas MS (Murashige & Skoog, 1962) com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar (Merck, Darmstadt, Alemanha). O pH foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  e o meio foi autoclavado a 121°C e 108 kPa por 20 minutos. Os frascos foram vedados com tampa de polipropileno com 2 orifícios de 10 mm, cobertos por duas membranas fluoroporó hidrofóbica (PTFE, MilliSeal AVS-045 Air Vent) de 0,45 µm de poros, resultando [taxa de troca de CO<sub>2</sub> de 25 µL L<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, mensurado por Batista et al. (2017)].

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

As culturas foram mantidas por 40 dias em salas de crescimento com temperatura de  $26 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 16 h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, totalizando cinco tratamentos com cinco repetições (frascos) cada.

Após 40 dias de cultivo, 5 plantas de cada tratamento foram aclimatizadas por 15 dias para compor o experimento 2. Em seguida, as plantas foram transferidas para vasos com capacidade de 6 L, contendo substrato comercial (Tropstrato Florestal Vida Verde, Mogi-Mirim, SP, Brazil). O delineamento foi inteiramente casualizado, consistindo de 5 tratamentos, com 5 repetições cada. Após 90 dias em casa-de-vegetação, foram avaliados as variáveis de crescimento e desenvolvimento, as trocas gasosas da folha e a fluorescência da clorofila *a*.

### **Análise de crescimento e desenvolvimento**

Após 40 dias de cultivo *in vitro* e 90 dias após a aclimação, foram avaliadas as seguintes medidas de desenvolvimento: massa fresca (g), massa seca (g), comprimento total da parte aérea (cm), comprimento total da maior raiz (cm), número de folhas, número de brotos e área foliar (cm<sup>2</sup>). Para a determinação da área foliar foi utilizado o programa Image J (Schneider et al., 2012).

### **Determinação de conteúdo dos pigmentos fotossintéticos**

Após 40 dias de cultivo *in vitro*, foram retirados cinco discos foliares (7 mm de diâmetro), da terceira folha apical completamente expandida. Os discos foliares foram colocados em 5 mL de solução de DMSO (saturado com carbonato de cálcio), onde permaneceram por 48 horas no escuro (Santos et al., 2008). A determinação da absorbância das amostras foi realizada em cubeta de quartzo de 10 mm de caminho ótico, no espectrofotômetro Genesys 10UV (ThermoScientific, EUA). Os comprimentos de onda analisados foram de 665, 645 e 480 nm. O cálculo das concentrações das clorofilas *a*, *b* e carotenoides foi baseado na metodologia descrita por Wellburn (1994).

### **Análises anatômicas**

As plantas cultivadas *in vitro* foram caracterizadas anatomicamente, ao final do experimento 1. Foi realizada uma amostragem de três plantas por tratamento, de onde foram retiradas 5 cortes da segunda folha apical. As folhas foram seccionadas na posição central do limbo, e as amostras coletadas foram de aproximadamente 100 mm<sup>2</sup>. As amostras foram fixados em solução Karnovsky (Karnovsky, 1965), desidratadas em série etílica crescente e incluídas em resina acrílica (Historesin, Leica Instruments, Alemanha). As secções transversais de 5 µm de espessura, foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., USA) e corados com azul de

Toluidina (pH 3,2) para caracterização estrutural (O'Brien & McCully, 1981), xylydine Ponceau para detecção de proteínas totais (Campos, 1976) e ácido periódico – reagente de Schiff (PAS) para polissacarídeos totais (Feder & O'Brien, 1968). Cortes longitudinais de folhas e caules frescos foram realizados em micrótomo de mesa (LPC, Rolemberg e Bhering Comércio e Importação Ltda., Belo Horizonte, Brasil) e submetidos a floroglucina ácida (Johansen, 1940), calcofluor white (Hughes & McCully, 1975) e acetato neutro de chumbo (Charrière-Ladreix, 1976) para evidenciar a presença de lignina, polissacarídeos celulósicos e flavonoides, respectivamente.

As lâminas foram montadas em resina sintética Permount® SP15-500 (Fisher Chemicals- Fisher Scientific). Para a captura de imagens, foi utilizado um microscópio de luz (modelo AX70 TRF, Olympus Optical) com sistema U-photo, acoplado à câmera fotográfica digital (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.) e microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic, no Laboratório de Anatomia Vegetal/ UFV.

### **Mensuração da taxa fotossintética *in vitro***

As trocas gasosas e a quantificação da taxa fotossintética *in vitro* foi realizada em um modelo adaptado do proposto por Costa et al. (2014).

Um IRGA (model S151; Qubit Systems, ON, Canada) foi utilizado para as medições de tocas gasosas e a coleta dos dados foi realizada através do software LoggerLite (LoggerLite, 1.8.1, Vernier Software & Technology Caliper, Beaverton). O CO<sub>2</sub> de referência foi calculado através da entrada de ar em um frasco vazio, trazido por uma bomba do ambiente externo a uma taxa de fluxo de ar constante de 300 mL min<sup>-1</sup>, dentro de uma câmara com iluminação (uma lâmpada LED branca). As plantas foram mantidas na ausência de luz por um período de 8 horas que antecederam a análise. Logo após a medição do CO<sub>2</sub> referência, os frascos com as vitroplantas foram acoplados ao sistema, sendo o CO<sub>2</sub> calculado até o ponto de estabilização. As trocas gasosas foram calculadas através da diferença entre o CO<sub>2</sub> de referência e o CO<sub>2</sub> das plantas expostas ao ar atmosférico. A temperatura e a umidade do ar no frasco foram mensuradas através do sensor Espec (Thermo Recorder RS-11, Takai Espec Corp.).

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

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

Onde,

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

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

### Trocas gasosas e fluorescência da clorofila

Após 90 dias de cultivo *ex vitro*, foram avaliadas a taxa fotossintética líquida (A), a concentração interna de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>) e a condutância estomática (G<sub>s</sub>) utilizando-se de um analisador portátil de gás infravermelho (LI-6400, LI-COR Biosciences Inc., Nebraska, EUA) equipado com uma fonte de luz azul/vermelho (LI-6400-02B, LI-COR).

A fluorescência variável foi obtida pela diferença entre a fluorescência mínima (F<sub>0</sub>, medida em folhas depois de 8 horas de escuro, com a intensidade de fótons de 30 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) e a fluorescência máxima (obtida pela saturação com pulsos de luz de 8000 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> por 0,8 segundos). A partir disso, foi calculado o rendimento quântico potencial do fotossistema II (Kooten & Snel, 1990):

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_0}{F_m}$$

Os coeficientes de extinção fotoquímica (q<sub>p</sub>), não-fotoquímica (n<sub>q</sub>) e a eficiência fotoquímica do transporte de elétrons associado ao fotossistema II (ΦPSII), foram obtidos logo após a fluorescência máxima e a aplicação de luz vermelho distante com o objetivo de obter-se a fluorescência mínima após aclimatização à luz saturante (F<sub>0</sub>'), sendo os cálculos realizados de acordo com o proposto por Maxwell & Johnson (2000).

### Análises estatísticas

As análises estatísticas de todos os experimentos foram realizadas por meio do software Genes versão Windows/2004.2.1 (Cruz, 2013), sendo estes analisados separadamente. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas por meio do teste Tukey a 5% de significância.

## RESULTADOS

### Qualidade de luz afeta o crescimento de *V. condensata*

Plantas cultivadas na condição de luz V/B/VD/AM apresentaram as maiores médias de comprimento da parte aérea (Tabela 1). As médias da massa fresca da parte aérea e a área foliar de plantas cultivadas em LED brancas foram significativamente menores quando comparadas com as plantas cultivadas em LEDs V/B/VD/AM.

Em relação à massa seca da parte aérea, não houve diferença entre os tratamentos testados. O desenvolvimento da raiz não foi afetado pelas qualidades de luz testadas, uma vez que não foram observadas diferenças significativas em seu comprimento e biomassa (Tabela 1, Figura 2).

**Tabela 1:** Variáveis fisiológicas e de crescimento de *V. condensata* cultivada *in vitro* por 40 dias seguintes qualidades de luz: Branca, Vermelho/Azul (V/A), Branco/Azul alto (B/AA); Vermelho/Branco/Azul médio (B/B/AM); Vermelho/Branco/Vermelho distante/Azul médio (V/B/VD/AM).

|   | LEDs    |          |          |          |           |
|---|---------|----------|----------|----------|-----------|
|   | Branca  | V/A      | B/AA     | V/B/AM   | V/B/VD/AM |
| CPA (cm)                                  | 5,07 b  | 5,53 b   | 5,58 b   | 5,72 b   | 10,02 a   |
| CR(cm)                                    | 5,91 a  | 6,11 a   | 5,65 a   | 6,27 a   | 7,31 a    |
| AF (cm <sup>2</sup> )                     | 424,1 b | 481,1 ab | 777,3 ab | 689,1 ab | 833,4 a   |
| MFPA (g)                                  | 0,491 b | 0,591 ab | 0,735 ab | 0,654 ab | 0,89 a    |
| MSPA (g)                                  | 0,083 a | 0,097 a  | 0,103 a  | 0,088 a  | 0,091 a   |
| MFR (g)                                   | 0,285 a | 0,302 a  | 0,312 a  | 0,339 a  | 0,307 a   |
| MSR (g)                                   | 0,025 a | 0,029 a  | 0,03 a   | 0,029 a  | 0,019 a   |
| Chl (µg cm <sup>-2</sup> )                | 57,45 a | 53,46 a  | 54,31 a  | 54,48 a  | 48,32 a   |
| Car (µg cm <sup>-2</sup> )                | 7,14 a  | 6,89 a   | 6,62 a   | 6,64 a   | 5,79 a    |
| A (µmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ) | 3,81 a  | 4,96 a   | 5,1 a    | 4,14 a   | 3,84 a    |

Abreviações: CPA, comprimento da parte aérea; CR, comprimento da raiz; AF, área foliar; MFPA, massa fresca da parte aérea; MSPA, massa seca da parte aérea; MFR, massa fresca da raiz; MSR, massa seca da raiz; Chl, clorofilas totais; Car, carotenoides totais; A, taxa fotossintética. Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ( $p < 0,05$ ).

Os conteúdos totais de clorofilas e carotenoides não foram influenciados pela qualidade lumínica. Do mesmo modo, plantas cultivadas nos diferentes espectros luminosos também não apresentaram diferenças significativas na taxa fotossintética. (Tabela 1).

### Qualidade lumínica causa variações anatômicas em *V. condensata*

O cultivo *in vitro* de *V. condensata* em diferentes espectros luminosos resultaram em variações na anatomia das folhas e caule, bem como no acúmulo de compostos de reservas.

A região da nervura central de plantas cultivadas sob LEDs V/B/AM apresentou-se menos espessa, com feixes vasculares de menor calibre, e células do mesofilo menos organizadas, com mais espaços intercelulares. Plantas cultivadas na condição de luz V/B/VD/AM apresentaram maior espessamento da nervura central, com células de maior diâmetro. Plantas cultivadas em lâmpadas LED branca mostraram maior organização celular, com células menores e justapostas. Não houve diferença na espessura da lâmina foliar entre os tratamentos. (Figura 3).

O teste com lugol evidenciou a presença de amido na forma de pequenos grãos, dispersos em pequena quantidade próximos aos feixes vasculares da nervura central. O teste com PAS revelou que os carboidratos totais se encontram dispersos principalmente na região da lâmina foliar. Os carboidratos estão presentes nas folhas de vitroplantas de todos os tratamentos, porém em maior quantidade nas plantas cultivadas em lâmpadas LED branca e V/A. Corpos proteicos foram evidenciadas pelo teste xylydine Pounceau na região da lâmina foliar, principalmente nas folhas de plantas cultivadas em LED branca. O teste para proteína foi negativo em plantas cultivadas em LED V/A e V/B/VD/AM. O teste com acetato de chumbo mostrou que os flavonoides se encontram dispersos em toda a folha, mas concentrado principalmente na região próximo aos feixes vasculares da nervura central. O teste detectou maior presença de flavonoides em plantas cultivadas em LED V/B/AM (Figura 4).

O teste histoquímico com calcofluor White para caracterização dos carboidratos celulósicos não mostrou diferenças na espessura da parede celular. O teste com floroglucina ácida também não mostrou diferenças na deposição de lignina e no espessamento de células do xilema no caule e folha de *V. condensata*. No entanto, evidenciou que plantas cultivadas em LED branca e V/A apresentam caule com maior diferenciação do tecido vascular e feixes vasculares mais organizados e com maior calibre (Figura 5).

### **Aclimatização de *V. condensata***

Após 90 dias de aclimatização em condições de casa-de-vegetação (Figura 6), as plantas foram avaliadas quanto ao desenvolvimento, fotossíntese, trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* (Tabela 2).

Assim como para o cultivo *in vitro*, os maiores valores de comprimento da parte aérea ocorreram em plantas micropropagadas em condição de luz V/B/VD/AM, que diferiram estatisticamente das plantas cultivadas em LEDs branca. Não foi observada diferença quanto a variável comprimento da raiz, no entanto a massa seca da raiz diferiu significativamente, sendo os maiores valores encontrados em plantas micropropagadas em LED V/B/VD/AM e B/AA, e as menores em LEDs branca. Para a variável área foliar, as menores médias foram encontradas em plantas micropropagadas em LED V/A, e as maiores médias na qualidade de luz V/B/VD/AM. Não foram observadas diferenças significativas para a variável comprimento da parte aérea.

O tipo de luz utilizado no cultivo *in vitro* não afetou a eficiência fotossintética e a fluorescência da clorofila das plantas após a aclimatização, como observado nas variáveis taxa fotossintética, condutância estomática, concentração interna de CO<sub>2</sub>, rendimento quântico e eficiência do transporte de elétrons do fotossistema II, além dos coeficientes de extinção fotoquímica e não-fotoquímica. Estes dados correspondem com os obtidos no cultivo *in vitro*, no qual os teores de pigmentos e a taxa fotossintética também não diferiram significativamente. O rendimento quântico do fotossistema II se manteve próximo a 0,8 para todas as plantas avaliadas, indicando que elas não estavam em condição de estresse ou fotoinibição.

**Tabela 2** - Variáveis fisiológicas e de desenvolvimento de *V. condensata* após 90 dias de aclimatização em condições de casa-de-vegetação. A condição de cultivo *in vitro* foi nas condições de luz: LED Branca, Vermelho/Azul (V/A), Branco/Azul alto (B/AA); Vermelho/Branco/Azul médio (B/B/AM); Vermelho/Branco/Vermelho distante/Azul alto (V/B/VD/AM).

|  | <b>Condição de cultivo <i>in vitro</i> (LED)</b> |            |             |               |                  |
|--|--|------------|-------------|---------------|------------------|
|  | <b>Branca</b>                                    | <b>V/A</b> | <b>B/AA</b> | <b>V/B/AM</b> | <b>V/B/VD/AM</b> |
| <b>CPA (cm)</b>  | 29,6 b   | 32,8 ab    | 34,8 ab     | 35,2 ab       | 45,8 a           |
| <b>CR (cm)</b>   | 66,2 a   | 74,6 a     | 71,6 a      | 77,4 a        | 85,2 a           |
| <b>AF (cm<sup>2</sup>)</b>                                   | 324 ab   | 286,7 b    | 422,1 ab    | 404 ab        | 465,6 a          |
| <b>MSPA (g)</b>  | 2,67 a   | 3,33 a     | 4,71 a      | 3,86 a        | 4,76 a           |
| <b>MSR (g)</b>   | 2,55 b   | 4,71 ab    | 6,44 a      | 4,76 ab       | 6,75 a           |
| <b>A (mol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)</b>  | 16,99 a  | 16,5 a     | 17,01 a     | 16,31 a       | 16,42 a          |
| <b>Gs (mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)</b> | 0,67 a   | 0,51 a     | 0,36 a      | 0,7 a         | 0,76 a           |
| <b>Ci (mol CO<sub>2</sub>)</b>                               | 300,8 a  | 303,8 a    | 282,43 a    | 332,32 a      | 329,59 a         |
| <b>Fv/Fm</b>   | 0,792 a  | 0,790 a    | 0,792 a     | 0,792 a       | 0,791 a          |
| <b>ΦPSII</b>   | 0,28 a   | 0,32 a     | 0,29 a      | 0,30 a        | 0,29 a           |
| <b>qp</b>  | 0,57 a   | 0,63 a     | 0,59 a      | 0,6 a         | 0,59 a           |
| <b>qn</b>  | 1,98 a   | 2,05 a     | 1,98 a      | 1,97 a        | 1,97 a           |

Abreviações: CPA, comprimento da parte aérea; CR, comprimento da raiz; AF, área foliar; MSPA, massa seca da parte aérea; MSR, massa seca da raiz; A, taxa fotossintética; Gs, condutância estomática; Ci, concentração interna de CO<sub>2</sub>; Fv/Fm, rendimento quântico potencial do fotossistema II; ΦPSII, eficiência do transporte de elétrons do fotossistema II; qp, coeficiente de extinção fotoquímica; qn, coeficiente de extinção não fotoquímica. Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

## DISCUSSÃO

A luz é um dos principais fatores que influenciam o crescimento das plantas e muitos trabalhos têm discutido o impacto da qualidade de luz sobre o desenvolvimento *in vitro* (Manivannan et al., 2015; Batista et al., 2016; Szopa & Ekiert, 2016; Arena et al., 2016). O presente estudo mostrou que os espectros luminosos testados levaram à diferentes respostas no crescimento de vitroplantas de *V. condensata*.

O maior crescimento de *V. condensata* em condição de luz V/B/VD/AM sugere que a exposição ao comprimento de onda vermelho distante (VD) levou ao estiolamento da parte aérea das plantas. Isso é suportado pelo fato de que apesar das plantas cultivadas nesta condição possuírem maior crescimento, elas não responderam com o maior acúmulo de biomassa. As plantas possuem fotorreceptores que regulam a fotomorfogênese e sob condições de luz VD o fitocromo A (phyA) em interação com outros fotorreceptores, estimula o alongamento do caule (Hennig et al., 2001; Zheng et al., 2013; Lu et al., 2015; Sheerin et al., 2015; Wit et al., 2016). O suplemento de luz no comprimento de VD também resultou no maior crescimento de *Arabidopsis thaliana* (Franklin & Whitelam, 2005) e *Lactuca sativa* (Lee et al., 2015).

Os maiores valores de área foliar foram observados em plantas cultivadas nas condições nas combinações de luzes com o comprimento azul alto (AA). Wang et al. (2015) relataram que a luz azul também modulou a morfogênese de *Cucumis sativus*, incrementando a área foliar e o comprimento da parte aérea.

O espectro de luz pode influenciar a biossíntese de pigmentos fotossintéticos nas plantas (Wang et al., 2009). Entretanto, as condições de luz testadas neste trabalho não causaram diferença significativa na produção de carotenoides e clorofilas. Nossos dados corroboram com o obtido por Lin et al., (2013), no cultivo de alface em diferentes qualidades de luz. O autor relatou que provavelmente a alta densidade de luz utilizada pode ter sido suficiente para estimular a produção e a atividades dos pigmentos fotossintéticos, independente da qualidade luminosa.

A qualidade da luz não resultou em variação da taxa fotossintética de plantas de *V. condensata*. Estes resultados condizem com o teor de pigmentos fotossintéticos, que também não foram influenciados pelo espectro de luz. Resultado similar foi obtido com *Platanus orientalis*, em que a taxa fotossintética foi constante independente da qualidade de luz testada (Arena et al., 2016).

A qualidade de luz afetou a morfogênese de *V. condensata*, como observado pelas variações no espessamento, organização do mesofilo foliar, diferenciação e disposição dos feixes vasculares do caule e folha. Macedo et al., (2011) observaram que a luz azul foi responsável pela diferenciação do mesofilo e aumento dos espaços intercelulares de *Alternanthera brasiliana*. A variação na espessura da lâmina foliar também pode ser alterada por influência da qualidade luminosa. As combinações de cores vermelho/azul e vermelho/verde/azul incrementaram a espessura foliar de *Platanus orientalis* quando comparadas com plantas cultivadas em LED branca, e uma resposta inversa foi observada em *Solanum lycopersicum* (Arena et al., 2016).

Os testes histoquímicos revelaram que o acúmulo de compostos de reservas na folha pode ser influenciado pela qualidade de luz em que as plantas estão expostas. Foi observada maior quantidade de carboidratos em folhas de plantas expostas à luz branca e proteínas em luz branca e nas combinações vermelho e azul do espectro de luz. A exposição à diferentes qualidades de luz podem modular a produção e armazenamento destes compostos de reservas nas folhas, como demonstrado por Wang et al. (2009). Os autores relataram que a luz azul foi eficiente no incremento do teor de proteínas em folhas de *Cucumis sativus*, bem como a luz purpura e azul estimularam a produção de carboidratos.

Em folhas de *V. condensata*, a reação histoquímica para flavonoides foi mais intensa nas plantas expostas à combinação de luz V/B/AM. A qualidade da luz modula a biossíntese destes metabólitos secundários, como registrado em diversos trabalhos (Koyama et al., 2012; Liu et al., 2015; Fu et al., 2016; Ghasemzadehet al., 2016; Taulavuori et al., 2016). Fu et al., (2016) demonstraram que os espectros de luz regulam os mecanismos biossíntese de flavonoides em *Nicotiana tabacum*, e alterações na qualidade espectral levam a produção de grupos de flavonoides distintos.

Os resultados do desenvolvimento e da fotossíntese de *V. condensata* após 90 dias de cultivo em casa-de-vegetação foram muito similares aos observados no cultivo *in vitro*. Isso indica que a influência da qualidade de luz sobre o desenvolvimento das vitroplantas foi mantido após a aclimatização. Estes resultados corroboram com os obtidos por Iacona & Muleo (2010) no cultivo *in vitro* e *ex vitro* de *Prunus avium* x *Prunus cerasus*.

Pode-se concluir que alterações na qualidade da luz durante o cultivo *in vitro* de *V. condensata* levam a mudanças na anatomia, no acúmulo de compostos e no desenvolvimento das plantas, e muito destes efeitos podem ser observadas também após a aclimatização. Futuros trabalhos explorando a influência da qualidade da luz sobre o

metabolismo secundário pode auxiliar na compreensão da rota de biossíntese de compostos de interesse farmacológico, tais como flavonoides, triterpenos e alcaloides.

## REFERÊNCIAS

AL-MAYAH, A.M.W. Effect of red and blue light emitting diodes “CRB-LED” on *in vitro* organogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Alshakr. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 10, p. 160, 2016.

ALVARENGA, I.C.A.; PACHECO, F.V.; SILVA, S.T.; BERTOLUCCI, S.K.V.; PINTO, J.E.B.P. *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 122, n. 2, p. 299-308, 2015.

ARENA, C., TSONEV, T., DONEVA, D., DE MICCO, V., MICHELOZZI, M., BRUNETTI, C., CENTRITTO, M.; FINESCHI, S.; VELIKOVA, V.; LORETO, F. The effect of light quality on growth, photosynthesis, leaf anatomy and volatile isoprenoids of a monoterpene-emitting herbaceous species (*Solanum lycopersicum* L.) and an isoprene-emitting tree (*Platanus orientalis* L.). **Environmental and Experimental Botany**, v. 130, p. 122-132, 2016.

BALLESTER, A.R. & LAFUENTE, M.T. LED Blue Light-induced changes in phenolics and ethylene in citrus fruit: Implication in elicited resistance against *Penicillium digitatum* infection. **Food Chemistry**, v. 218, p. 575-583, 2017.

BATISTA, D. S., CASTRO, K. M., SILVA, A. R., TEIXEIRA, M. L., SALES, T. A., SOARES, L. I.; CARDOSO, M.G.; SANTOS, M.O.; VICCINI, L.F.; OTONI, W. C. Light quality affects *in vitro* growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 52, p. 276-282, 2016.

BATISTA, D.S.; DIAS, L.L.C.; RÊGO, M.M.; SALDANHA, C.W.; OTONI, W.C. Flask sealing on *in vitro* seed germination and morphogenesis of two types of ornamental pepper explants. **Ciência Rural**, v. 47, n. 3, 2017.

BOEING, T.; SILVA, L.M.; SOMENSI, L.B.; CURY, B.J.; COSTA, A.P.; PETREANU, M.; NIERO, R.; ANDRADE, S.F. Antiulcer mechanisms of *Vernonia condensata* Baker: A medicinal plant used in the treatment of gastritis and gastric ulcer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 184, p. 196-207, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **RENISUS: Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS - Espécies vegetais**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>> Acesso em 30/04/2016.

BRASIL. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2011. 126p.

CAMPOS, V.B. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evaluation and macromolecular orientation. **Cellular and Molecular Biology, Including Cyto-enzymology**, v. 22, n. 1, p. 45-64, 1976.

CHARRIÈRE-LADREIX, Y. Répartition intracellulaire du secrétat flavonique de *Populus nigra* L. **Planta**, v. 129, p. 167-174, 1976.

- CHRISTIE, J.M. Phototropin blue-light receptors. **Annual Review Plant Biology**, v. 58, p. 21-45, 2007.
- COSTA, A.C.; ROSA, M.; MEGGUER, C.A.; SILVA, F.G.; PEREIRA, F.D.; OTONI, W. C. A reliable methodology for assessing the *in vitro* photosynthetic competence of two Brazilian savanna species: *Hyptis marrubioides* and *Hancornia speciosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 117, n. 3, p. 443-454, 2014.
- CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.
- FEDER, N. & O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, p. 123-142, 1968.
- FERREIRA, L.T.; SILVA, M.M.A.; ULISSES, C.; CAMARA, T.R.; WILLADINO, L. Using LED lighting in somatic embryogenesis and micropropagation of an elite sugarcane variety and its effect on redox metabolism during acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128, n. 1, p. 211-221, 2017.
- FRANKLIN, K.A. & WHITELAM, G.C. Phytochromes and shade-avoidance responses in plants. **Annals of Botany**, v. 96, n. 2, p. 169-175, 2005.
- FU, B., J.I.; X.; ZHAO, M.; HE, F.; WANG, X.; WANG, Y.; PENGFEI, L.; NIU, L. The influence of light quality on the accumulation of flavonoids in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 162, p. 544-549, 2016.
- FUKUDA, N.; FUJITA, M.; OHTA, Y.; SASE, S.; NISHIMURA, S.; EZURA, H. Directional blue light irradiation triggers epidermal cell elongation of abaxial side resulting in inhibition of leaf epinasty in geranium under red light condition. **Scientia Horticulturae**, v. 115, n. 2, p. 176-182, 2008.
- GHASEMZADEH, A.; ASHKANI, S.; BAGHDADI, A.; PAZOKI, A.; JAAFAR, H.Z.; RAHMAT, A. Improvement in flavonoids and phenolic acids production and pharmaceutical quality of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) by Ultraviolet-B irradiation. **Molecules**, v. 21, n. 9, p. 1203, 2016.
- HENNIG, L., POPPE, C., SWEERE, U., MARTIN, A., & SCHÄFER, E. Negative interference of endogenous phytochrome B with phytochrome A function in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 125, n. 2, p. 1036-1044, 2001.
- HEO, J.W.; LEE, C.W.; MURTHY, H.N.; PAEK, K.Y. Influence of light quality and photoperiod on flowering of *Cyclamen persicum* Mi ll. cv. 'Dixie White'. **Plant Growth Regulation**, v. 40, n. 1, p. 7-10, 2003.
- HUGHES, J. & MCCULLY, M.E. The use of an optical brightener in the study of plant structure. **Stain Technology**, v. 50, p. 1037-1041, 1975.
- HUNG, C.D.; HONG, C.H.; KIM, S.K.; LEE, K.H.; PARK, J.Y.; NAM, M.W.; CHOI, D.H.; LEE, H.I. LED light for *in vitro* and *ex vitro* efficient growth of economically important highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 6, p. 1-9, 2016.

IACONA, C & MULEO, R. Light quality affects *in vitro* adventitious rooting and *ex vitro* performance of cherry rootstock Colt. **Scientia Horticulturae**, v. 125, n. 4, p. 630-636, 2010.

KAMI, C.; LORRAIN, S.; HORNITSCHKE, P.; FANKHAUSER, C. Chapter two - Light-regulated plant growth and development. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 91, p. 29-66, 2010.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137, 1965.

KHAN, J.; ALEXANDER, A.; SARAF, S.; SARAF, S. Luteolin-phospholipid complex: preparation, characterization and biological evaluation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, n. 66, pp. 1451–1462, 2014.

KOOTEN, O. & SNEL, J.F.H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**, v. 25, n. 3, p. 147-150, 1990.

KOYAMA, K.; IKEDA, H.; POUDEL, P.R.; GOTO-YAMAMOTO, N. Light quality affects flavonoid biosynthesis in young berries of Cabernet Sauvignon grape. **Phytochemistry**, v. 78, p. 54-64, 2012.

LEE, M.J.; PARK, S.Y.; OH, M.M. Growth and cell division of lettuce plants under various ratios of red to far-red light-emitting diodes. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 56, n. 2, p. 186-194, 2015.

LIN, K.H.; HUANG, M.Y.; HUANG, W.D.; HSU, M.H.; YANG, Z.W.; YANG, C.M. 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). **Scientia Horticulturae**, v. 150, p. 86-91, 2013.

LIU, Y.; SONG, L.; YU, W.; HU, Y.; MA, X.; WU, J.; YING, Y. Light quality modifies camptothecin production and gene expression of biosynthesis in *Camptotheca acuminata* Decne seedlings. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 137-143, 2015.

LORENZI, H. & MATOS, F.J.A. **Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas**, 2nd ed.; Instituto Plantarum: Nova Odessa, Brazil, 2008; pp. 165–166.

LU, X.D.; ZHOU, C.M.; XU, P.B.; LUO, Q.; LIAN, H. L.; YANG, H.Q. Red-light-dependent interaction of phyB with SPA1 promotes COP1–SPA1 dissociation and photomorphogenic development in *Arabidopsis*. **Molecular Plant**, v. 8, n. 3, p. 467-478, 2015.

MACEDO, A. F.; LEAL-COSTA, M.V.; TAVARES, E.S.; LAGE, C.L.S.; ESQUIBEL, M.A. The effect of light quality on leaf production and development of *in vitro*-cultured plants of *Alternanthera brasiliana* Kuntze. **Environmental and Experimental Botany**, v. 70, n. 1, p. 43-50, 2011.

MANIVANNAN, A.; SOUNDARARAJAN, P.; HALIMAH, N.; KO, C.H.; JEONG, B.R. Blue LED light enhances growth, phytochemical contents, and antioxidant enzyme

activities of *Rehmannia glutinosa* cultured *in vitro*. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 105-113, 2015.

MAXWELL, K. & JOHNSON, G.N. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.

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

O'BRIEN, T.P. & McCULLY, M.E. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Melbourne, Termarcarphi Pty. Ltd, 1981.

PACHECO, F.V.; AVELAR, R.P.; ALVARENGA, I.C.A.; BERTOLUCCI, S.K.V.; ALVARENGA, A.A.; PINTO, J.E.B.P. Essential oil of monkey-pepper (*Piper aduncum* L.) cultivated under different light environments. **Industrial Crops and Products**, v. 85, p. 251-257, 2016.

PEDMALE, U.V. HUANG, S.S.C.; ZANDER, M.; COLE, B.J.; HETZEL, J.; LJUNG, K.; REIS, P.A.B.; SRIDEVE, P., NITO, K.; NERY, J.R.; ECKER, J.R.; CHORY, J. Cryptochromes interact directly with PIFs to control plant growth in limiting blue light. **Cell**, v. 164, n. 1, p. 233-245, 2016.

RAMÍREZ-MOSQUEDA, M.A.; IGLESIAS-ANDREU, L.G.; BAUTISTA-AGUILAR, J.R. The Effect of light quality on growth and development of *in vitro* plantlet of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Sugar Tech**, p. 1-6, 2016.

SAEBO, A.; KREKLING, T.; APPELGREN, M. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 41, n. 2, p. 177-185, 1995.

SÁEZ, P.; SÁEZ, P.L.; BRAVO, L.A.; LATSAGUE, M.I.; TONEATTI, M.J.; SÁNCHEZ-OLATE, M.; RÍOS, D.G. Light energy management in micropropagated plants of *Castanea sativa*, effects of photoinhibition. **Plant Science**, v. 201, p. 12-24, 2013.

SHEERIN, D.J.; MENON, C.; OVEN-KROCKHAUS, S.Z.; ENDERLE, B.; ZHU, L.; JOHNEN, P.; SCHLEIFENBAUM, F.; YORK-DIETER, E.; ENAMUL, H.; HILTBRUNNER, A. Light-activated phytochrome A and B interact with members of the SPA family to promote photomorphogenesis in *Arabidopsis* by reorganizing the COP1/SPA complex. **The Plant Cell**, v. 27, n. 1, p. 189-201, 2015.

SCHNEIDER, C.A.; RASBAND, W.S.; ELICEIRI, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671-675, 2012.

SILVA, J.B.; TEMPONI, V.D.S.; GASPARETTO, C.M.; FABRI, R.L.; ARAGÃO, D.M.D.O.; PINTO, N.D.C.C.; RIBEIRO, A.; SCIO, E.; VIEIRA, G.D.V.; SOUZA, O.V.; ALVES, M. S. *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae): A promising source of antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, 2013.

SILVA, J.B.; TEMPONI, V.D.; FERNANDES, F.V.; ALVES, G.D.; MATOS, D.M.; GASPARETTO, C.M.; RIBEIRO, A.; DE PINHO, J.D.; ALVES, M.S.; SOUSA, O.V. New approaches to clarify antinociceptive and anti-inflammatory effects of the ethanol

extract from *Vernonia condensata* leaves. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 12, p. 8993-9008, 2011.

SILVA, S.T.; PACHECO, F.V.; ALVARENGA, I.C.A.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; FERREIRA, C.P. Optimization of the protocol for the *in vitro* cultivation of *Piper aduncum* L. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, n. 23, p. 3474, 2014.

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

TAULAVUORI, K.; HYÖKY, V.; OKSANEN, J.; TAULAVUORI, E.; & JULKUNEN-TIITTO, R. Species-specific differences in synthesis of flavonoids and phenolic acids under increasing periods of enhanced blue light. **Environmental and Experimental Botany**, v. 121, p. 145-150, 2016.

WANG, H.; GU, M.; CUI, J.; SHI, K.; ZHOU, Y.; YU, J. Effects of light quality on CO<sub>2</sub> assimilation, chlorophyll-fluorescence quenching, expression of Calvin cycle genes and carbohydrate accumulation in *Cucumis sativus*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 96, n. 1, p. 30-37, 2009.

WANG, X.Y.; XU, X.M.; CUI, J. The importance of blue light for leaf area expansion, development of photosynthetic apparatus, and chloroplast ultrastructure of *Cucumis sativus* grown under weak light. **Photosynthetica**, v. 53, n. 2, p. 213-222, 2015.

WELLBURN, A.R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.

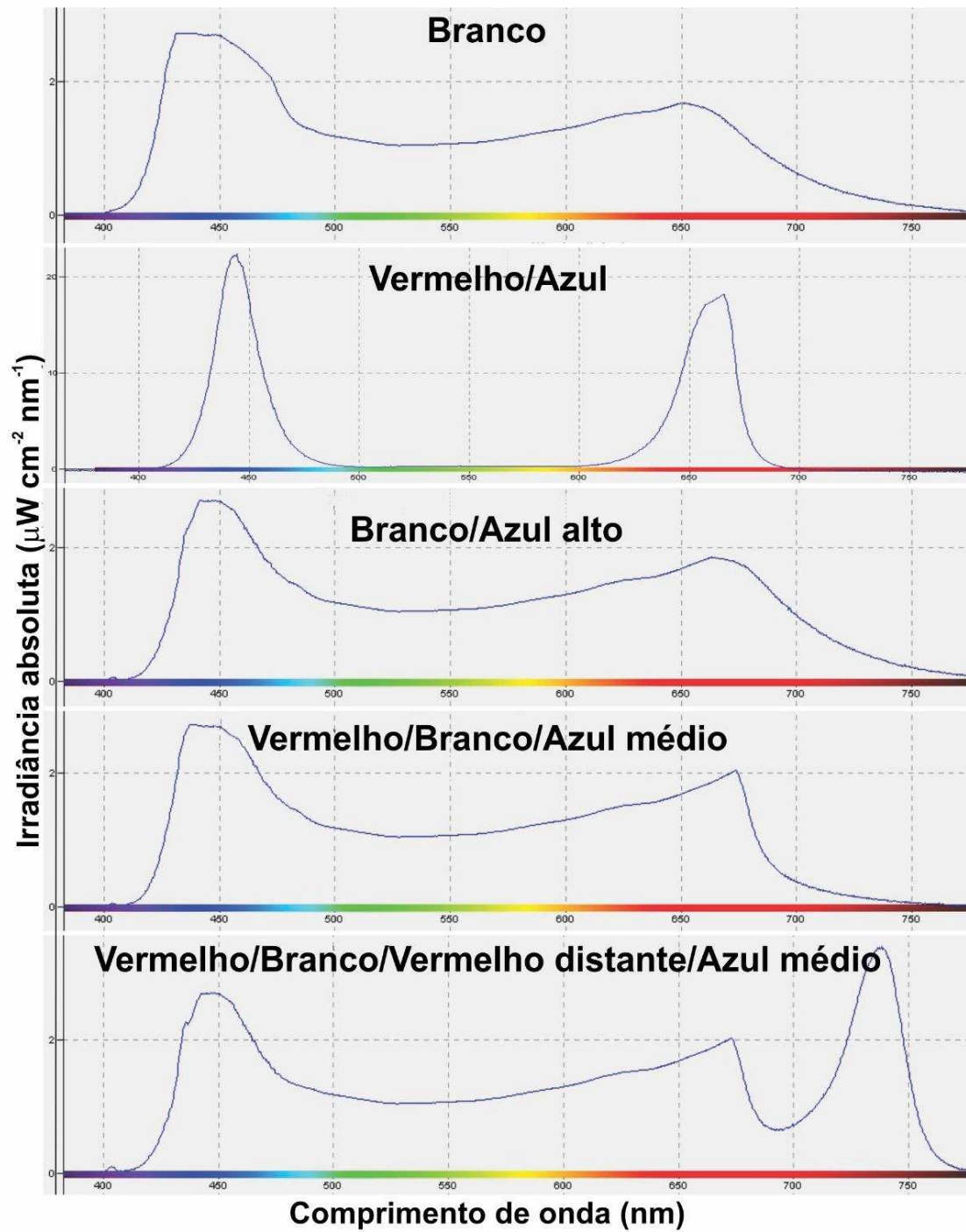
WIT, M.; GALVÃO, V.C.; FANKHAUSER, C. Light-Mediated Hormonal Regulation of Plant Growth and Development. **Annual Review of Plant Biology**, v. 67, p. 513-537, 2016.

YANG, D.; SEATON, D.D.; KRAHMER, J.; HALLIDAY, K.J. Photoreceptor effects on plant biomass, resource allocation, and metabolic state. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 27, p. 7667-7672, 2016.

ZIENKIEWICZ, M.; DROŻAK, A.; WASILEWSKA, W.; BACŁAWSKA, I.; PRZEDPEŁSKA-WĄSOWICZ, E.; ROMANOWSKA, E. The short-term response of *Arabidopsis thaliana* (C3) and *Zea mays* (C4) chloroplasts to red and far red light. **Planta**, v. 242, n. 6, p. 1479-1493, 2015.

ZHENG, X.; WU, S.; ZHAI, H.; ZHOU, P.; SONG, M.; SU, L.; XI, Y.; LI, Z.; CAI, Y.; MENG, F.; YANG, L.; WANG, H.; YANG, J. *Arabidopsis* phytochrome B promotes SPA1 nuclear accumulation to repress photomorphogenesis under far-red light. **The Plant Cell**, v. 25, n. 1, p. 115-133, 2013.

## FIGURAS



**Figura 1** – Espectro luminoso das diferentes lâmpadas LED utilizadas nesse estudo.

Qualidade de luz

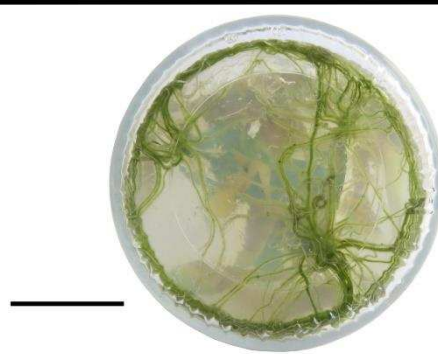
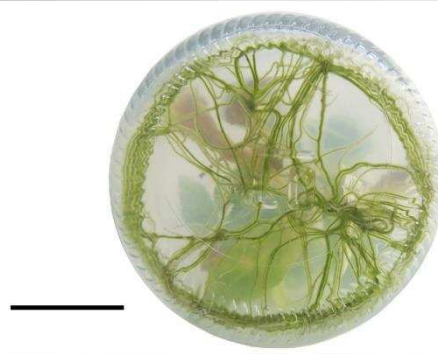
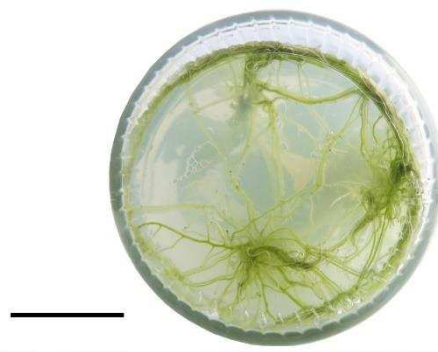
V/B/VD/AM

V/B/AM

B/AA

V/A

Branca



(E)

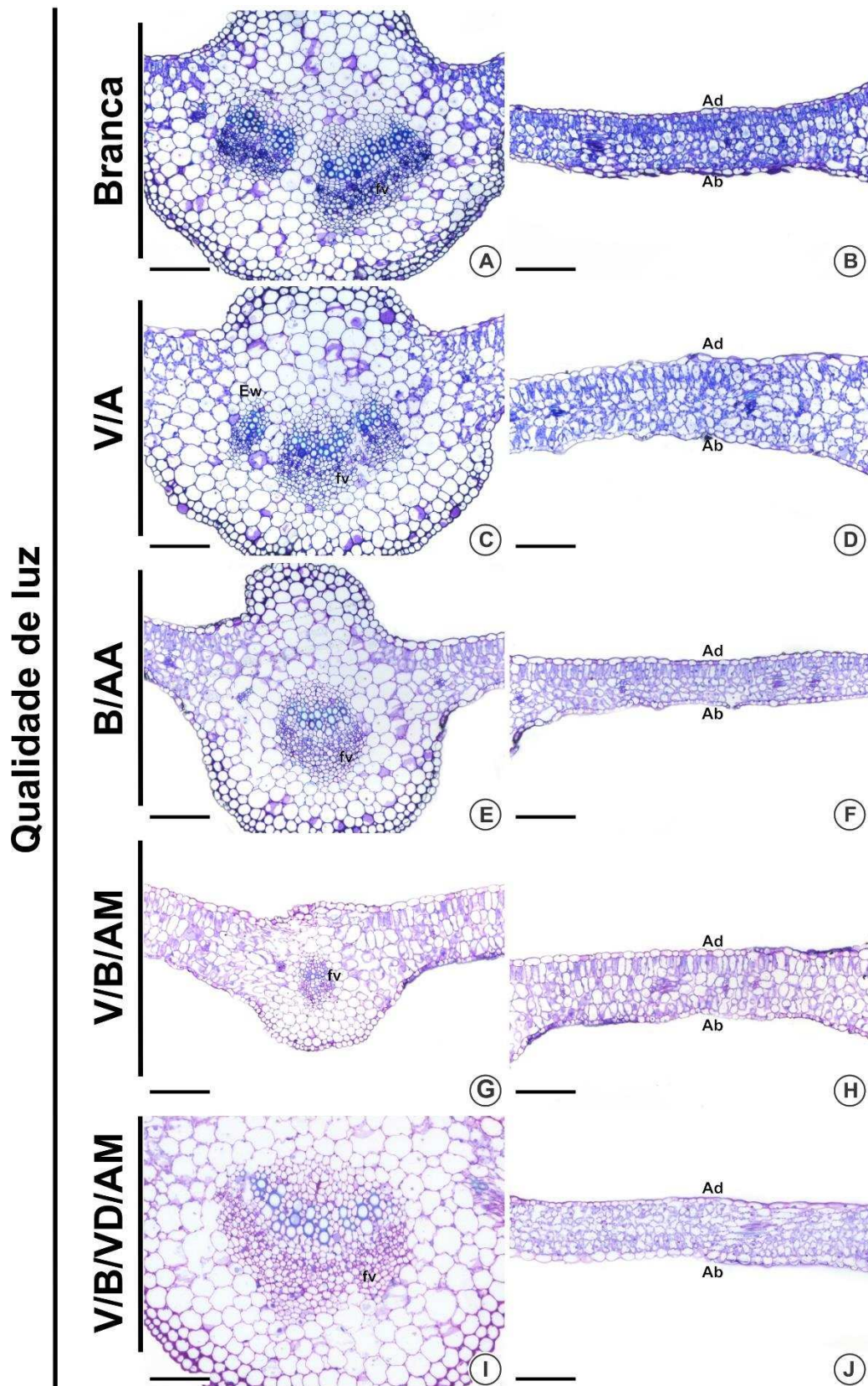
(D)

(C)

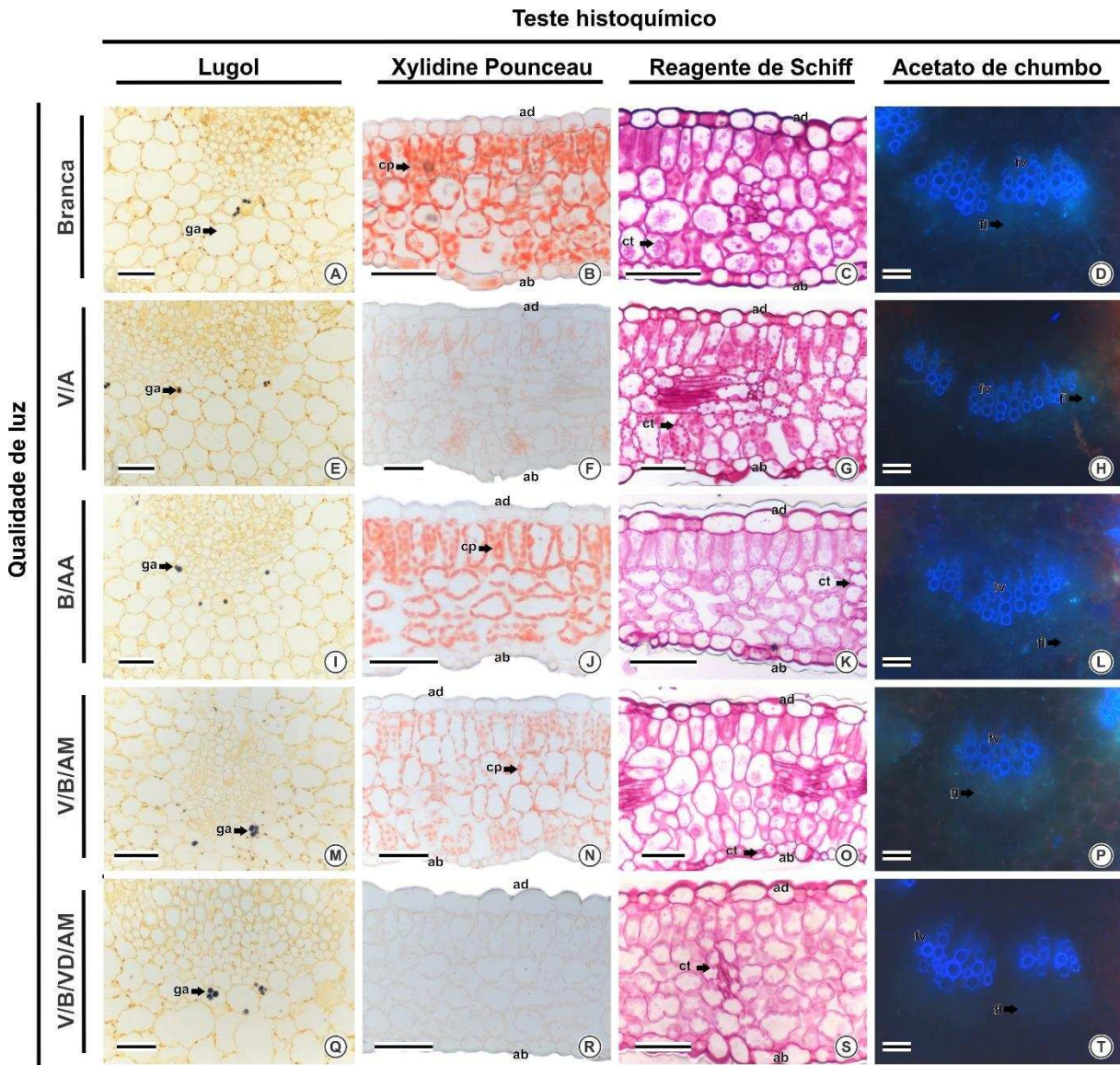
(B)

(A)

**Figura 2** - Plantas de *V. condensata* após 40 dias de cultivo *in vitro*, nas seguintes qualidades de luz: A: LED Branca; B: Vermelho/Azul (V/A); C: Branco/Azul alto (B/AA); D: Vermelho/Branco/Azul médio (B/B/AM); E: Vermelho/Branco/Vermelho distante/Azul médio (V/B/VD/AM). Barra equivale a 10 cm.

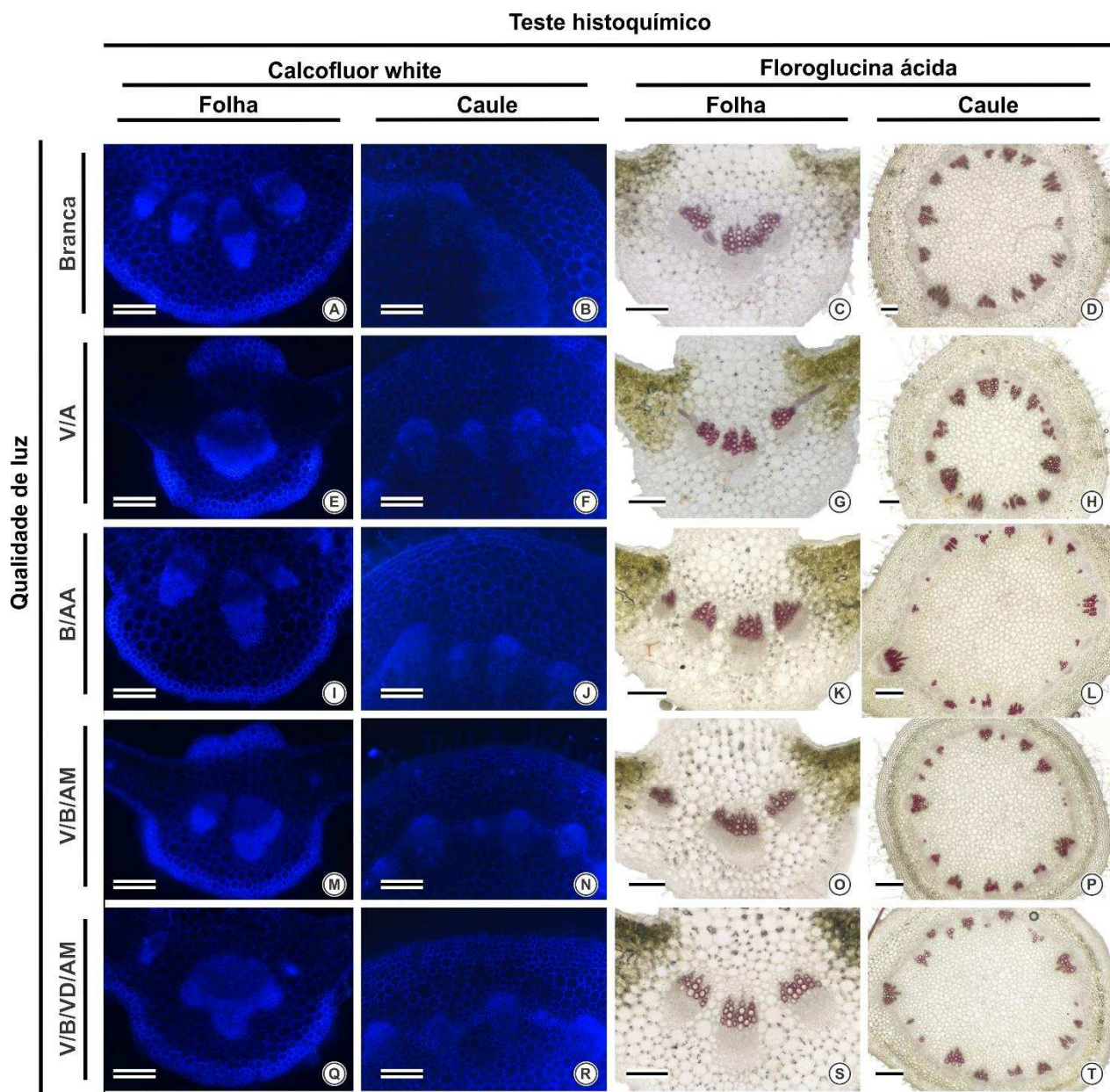


**Figura 3** — Cortes transversais da nervura central (A, C, E, G e I) e porção medianalateral (B, D, F, H e J) do limbo de folhas de *V. condensata* coradas com azul de toluidina, após 40 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes condições de luz: A e B: LED Branca; C e D: Vermelho/Azul (V/A); E e F: Branco/Azul alto (B/AA); G e H: Vermelho/Branco/Azul médio (V/B/AM); I e J: Vermelho/Branco/Vermelho distante/Azul médio (V/B/VD/AM). Abreviações: fv, feixe vascular; Ad, adaxial; Ab, abaxial. Barras correspondem a 30 µm.



**Figura 4** - Análises histoquímicas de folhas de vitropintas de *V. condensata*, após 40 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes condições de luz: LED Branca, Vermelho/Azul (V/A), Branco/Azul alto (B/AA); Vermelho/Branco/Azul médio (B/B/AM); Vermelho/Branco/Vermelho distante/Azul médio (V/B/VD/AM). Seções transversais submetidas ao lugol (A, E, I, M, Q), xylidine ponceau (B, F, J, N, R), PAS (C, G, K, O, S) e ao acetato de chumbo (D, H, L, P, T). Reação negativa para corpos proteicos (F, P). Reação positiva para amido (A, E, I, M, Q), carboidratos totais (C, G, K, O, S) e flavonoides (D, H, L, P, T). Abreviações: ga, grãos de amido; cp, corpos protéicos; ct,

carboidratos totais; fl flavonoides; fv, feixe vascular; Ad, adaxial; Ab, abaxial. Barras equivalem a 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 5** - Análises histoquímicas de folhas e caules de vitroplantas de *V. condensata*, após 40 dias de cultivo *in vitro*, em diferentes condições de luz: LED Branca, Vermelho/Azul (V/A), Branco/Azul alto (B/AA); Vermelho/Branco/Azul médio (B/B/AM); Vermelho/Branco/Vermelho distante/Azul médio (V/B/VD/AM). Seções transversais das folhas (A, E, I, M, Q) e dos caules (B, F, J, N, R) submetidas ao calcofluor white para evidenciar a celulose. A lignina foi evidenciada em cortes transversais das folhas (C, G, K, O, S) e dos caules (D, H, L, P, T) através do teste com floroglucina ácida. Abreviações: fv, feixe vascular; Ad, adaxial; Ab, abaxial. Barras equivalem a 30  $\mu\text{m}$ .



**Figura 6** - Plantas de *V. condensata* após 90 dias de cultivo *ex vitro*, em condições de luz natural. Da esquerda para a direita, as plantas foram cultivadas *in vitro* sob as seguintes qualidades de luz: LED Branca; Vermelho/Azul; Branco/Azul alto; Vermelho/Branco/Azul médio e Vermelho/Branco/Vermelho distante/Azul alto. Barra equivale a 10 cm.

## CAPÍTULO III

### **UV-B reduz o crescimento e estimula a fotossíntese e respostas ao estresse oxidativo em plantas de *Vernonia condensata* Baker cultivadas *in vitro***

#### **RESUMO**

A luz UV-B afeta diretamente o desenvolvimento vegetal, uma vez que pode reduzir o crescimento, alterar ou mesmo danificar o aparato fotossintético, induzir respostas enzimáticas de estresse ou mesmo atuar em nível molecular inibindo reações do metabolismo primário. Objetivou-se neste trabalho analisar como a radiação UV-B afeta o crescimento, a fotossíntese e as respostas bioquímicas de defesa ao estresse oxidativo de *Vernonia condensata*. Para isso, plantas com 25 dias de cultivo *in vitro* foram mantidas diariamente nos seguintes tempos de exposição à radiação UV-B: 0; 0,5; 1; 2 e 4 horas. Após 40 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliados crescimento, taxa fotossintética, teor de açúcares solúveis e enzimas do estresse oxidativo, além de verificar a presença de flavonoides nas folhas por meio de teste histoquímico. A exposição à radiação UV-B levou à redução no crescimento e acúmulo de biomassa da parte aérea de *V. condensata*. No entanto, o desenvolvimento da raiz não foi afetado. O aumento da exposição à radiação UV-B induziu a fotossíntese, sendo os maiores valores encontrados em plantas expostas diariamente a 4 horas de radiação. Testes histoquímicos evidenciaram maior quantidade de flavonoides em folhas expostas a radiação UV-B, o que pode ter auxiliado na fotoproteção. Os mecanismos enzimáticos de resposta antioxidante também foram afetados e a maior atividade da catalase foi observada nas plantas expostas à UV-B por mais tempo. Pode-se concluir que a radiação UV-B reduz o crescimento, o acúmulo de biomassa e aumenta a fotossíntese e mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos de resposta antioxidante. Uma maior compreensão sobre como a UV-B regula a produção de flavonoides poderá auxiliar no entendimento da rota biossintética destes compostos, que possuem grande potencial de exploração econômica e industrial.

**Palavras-chave:** catalase, flavonoides, planta medicinal, radiação ultravioleta.

## **ABSTRACT**

UV-B light directly affects plant development, since it can reduce growth, alter or damage the photosynthetic apparatus, induce enzymatic stress responses or even act in molecular level, inhibiting reactions of the primary metabolism. This work aimed to analyze how UV-B radiation affects growth, photosynthesis and biochemical defense responses to oxidative stress in *Vernonia condensata*. For this, vitroplants with 25 days of culture were submitted daily at the following UV-B radiation exposure times: 0; 0,5; 1; 2 and 4 hours. After 40 days of *in vitro* culture, growth, photosynthetic rate, soluble sugar contents and oxidative stress enzymes were evaluated, as well as the presence of flavonoids at the leaves by histochemical test. Exposure to UV-B radiation led to reduced growth and biomass accumulation of *V. condensata*. However, root development was not affected. Increased exposure to UV-B radiation induced photosynthesis, with the highest levels found in plants exposed daily to 4 hours of UV-B radiation. Histochemical tests showed more flavonoids in leaves longer exposed to UV-B, which may have helped the photoprotection. The enzymatic mechanisms of antioxidant response were also affected and the higher catalase activity was observed in plants longer exposed to UV-B. It can be concluded that UV-B radiation reduces growth and biomass accumulation and increases photosynthesis and enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses. A deep understanding of how UV-B regulates flavonoids production can help to elucidate the biosynthesis pathway of these compounds, which have high economic and industrial potential.

**Keywords:** Catalase, flavonoids, medicinal plant, ultraviolet radiation.

## INTRODUÇÃO

As condições ambientais, tais como a disponibilidade de água, nutrientes e variações de temperatura e luminosidade, podem afetar diretamente o desenvolvimento das plantas e levar a situações de estresse (Asensi-Fabado et al., 2017). Em relação à luz, a radiação ultravioleta B (UV-B, 280-315 nm) possui alta energia espectral e é potencialmente danosa (Heilmann et al., 2016), podendo influenciar nos processos fisiológicos, metabólicos e morfoanatômicos das plantas (Chen et al., 2016; Schreiner et al., 2016).

As plantas possuem fotorreceptores específicos para determinados espectros de luz, sendo o UV-B *response locus* 8 (UVR8) o responsável pela regulação dos estímulos gerados pela radiação UV-B (Fernández et al., 2016). As respostas mediadas pelo UVR8 induzem a fotoproteção, podem evitar danos deletérios e mutagênicos no DNA (Willing et al., 2016), inibir a termomorfogênese (Hayes et al., 2017) e proteger a maquinaria fotossintética das plantas expostas a radiação UV-B (Allorent et al., 2016). Além disso, a percepção da radiação UV-B pode ser realizada por meio de hormônios, tais como o ácido abscísico, etileno e auxina, que levam a alterações no crescimento e na fotoproteção (Vanhaelewyn et al., 2016).

A radiação UV-B pode afetar o desenvolvimento das plantas. Biever et al. (2014) observaram que a radiação UV-B causa danos ao DNA, inibe a atividade do ciclo celular e leva a redução do alongamento do hipocótilo de *Arabidopsis thaliana*. A diminuição da divisão e da expansão celular causado pelo UV-B pode ter como consequência plantas com menor área foliar (Suchar & Robberrecht, 2015). A UV-B também pode afetar o acúmulo de biomassa, tal como obtido em trabalhos com feijão (*Phaseolus vulgaris*) (Raghuvanshi & Sharma, 2016), e trigo (*Triticum polonicum*) (Yan et al., 2016). A menor biomassa de plantas expostas à UV-B pode estar relacionada com a redução da taxa fotossintética ou com os custos metabólicos da biossíntese de compostos fotoprotetores (Suchar & Robberrecht, 2016).

A exposição à UV-B pode levar a uma redução da fotossíntese, por meio de danos causados ao aparato fotossintético das plantas (Allorent et al., 2016). Vários trabalhos relatam que a exposição à UV-B reduz a eficiência da fotossíntese e o teor de pigmentos fotossintéticos (Chen et al., 2016; Doupis et al., 2016; Yan et al., 2016; Kataria et al., 2017). Entretanto, nem sempre a radiação UV-B tem como consequência injúrias para as plantas, sendo que o efeito do estresse pode depender da espécie, da intensidade da

radiação e das outras condições ambientais associadas ao cultivo (Hideg et al., 2013; Czégény et al., 2016a; Suchar & Robberrecht, 2016). A exposição à radiação UV-B aliado à alta intensidade da radiação fotossinteticamente ativa induziu a fotoproteção de *Plectranthus coleoides*, por meio do aumento das taxas fotossintéticas e da biossíntese de flavonoides (Vidović et al., 2015).

A defesa vegetal contra o estresse oxidativo causado pela radiação UV-B pode se dar através de enzimas antioxidantes (Majer et al., 2014; Czégény et al., 2016a; Czégény et al., 2016b; Yoom et al., 2016) ou por compostos provenientes do metabolismo secundário (Schreiner et al., 2016). A exposição à UV-B levou à regulação de genes envolvidos na rota de biossíntese de flavonóis em *A. thaliana* (Zhou et al. 2016). A radiação UV-B também foi responsável pelo aumento da produção de ácidos fenólicos (Randriamanana et al., 2015a; Randriamanana et al., 2015b; Ghasemzadeh et al., 2016), flavonoides (Chen et al., 2016; Ghasemzadeh et al., 2016; Huang et al., 2016), alcaloides (Qin et al., 2014), óleos essenciais e terpenos (Pandey & Pandey-Rai, 2014a).

Devido a possibilidade de controle sobre as condições de cultivo, a cultura de tecidos pode ser uma alternativa viável para entender como a radiação UV-B influencia no desenvolvimento vegetal, como observado em diversos trabalhos (Namli et al., 2014; Pandey & Pandey-Rai, 2014b; Gai et al., 2016; Huang et al., 2016; Rajendiran et al., 2016).

*Vernonia condensata* é uma planta muito utilizada na medicina popular brasileira (Lorenzi & Matos, 2008) e possui muitos compostos de interesse farmacológicos, tais como flavonoides, cumarinas, terpenos, e óleos essenciais (Silva et al., 2011). Dentre suas propriedades, destaca-se como anti-inflamatória, analgésica (Risso et al., 2010; Silva et al., 2011), antiulcerogênica (Boeing et al., 2016), anticancerígena (Thomas et al., 2016) e na prevenção do acúmulo de colesterol no sangue (Arantes et al., 2016). A espécie faz parte de uma lista com 71 plantas da flora brasileira que possuem potencial de gerar produtos para o Sistema Único de Saúde (RENISUS, Relação Nacional de Plantas Medicinais; Brasil, 2014), porém existem poucos trabalhos abordando o cultivo *in vitro* da espécie. Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo verificar a influência da radiação UV-B sobre o desenvolvimento e fotossíntese de *V. condensata*, bem como analisar as respostas da planta ao estresse oxidativo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal e condições de cultivo**

Plantas de *V. condensata* oriundas do banco de germoplasma do laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCT, BIOAGRO, UFV) foram subcultivadas mensalmente em meio MS meio basal e vitaminas MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 7 g L<sup>-1</sup> de ágar (Merck, Darmstadt, Alemanha) como agente gelificante.

Foram utilizados como fonte de explante segmentos nodais sem folhas de aproximadamente 1 cm, excisados de plantas subcultivadas *in vitro*. Foram inoculados três explantes por frasco de vidro (250 mL de capacidade) contendo 60 mL de meio MS básico, nas mesmas condições utilizadas para a manutenção do banco. O pH foi ajustado para  $5,7 \pm 0,1$  e o meio foi autoclavado a 121°C e 108 kPa por 20 minutos. Os frascos foram vedados com tampa de polipropileno com duas membranas (MilliSeal AVS-045 Air Vent), de 0,45 µm de poros que permitem uma taxa de troca de CO<sub>2</sub> de 25 µL L<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (Batista et al., 2017). As culturas foram mantidas por 40 dias em sala de crescimento sob irradiância de 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fotoperíodo de 16 h e temperatura de  $26 \pm 2$  °C.

### **Tratamento com UV-B**

Aos 25 dias de cultivo, as plantas foram levadas para uma câmara de crescimento (5 lâmpadas UV-B Sankio Denki, G15T8E, 9E, Japão e 4 lâmpadas fluorescentes brancas, Philips, TL-D, 15W/75-650, China; Figura 1) e mantidas por 15 dias nos seguintes tempos de exposição à radiação ultravioleta UV-B: 0; 0,5; 1; 2 e 4 horas. Após o período de exposição diário, as plantas retornaram para a sala de crescimento. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, totalizando 5 tratamentos com 5 repetições cada. Cada frasco constituiu uma repetição.

### **Análise de crescimento**

Foram avaliadas as seguintes variáveis de crescimento: massa fresca (g), massa seca (g), comprimento da parte aérea (cm), comprimento da maior raiz (cm), número de folhas, número de brotos, e área foliar (cm<sup>2</sup>). Para o processamento e geração do atributo área foliar, foi utilizado o programa ImageJ (Schneider et al., 2012).

### **Atividade enzimática**

Foram quantificadas as enzimas Catalase (CAT, EC 1.11.1.6), Peroxidase do Ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) e Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1). Para tanto, foram coletados 50 mg de massa fresca da parte aérea, que foi congelada e conservada em ultra freezer -80 °C. Para a obtenção do extrato bruto, o material foi macerado em almofariz de porcelana juntamente com 2 mL do meio de extração (Tampão fosfato de potássio a 0,1 M, pH 6,8; ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 0,1 mM; fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) a 1 mM e PVPP 1% (p/v). Após a maceração, o material foi centrifugado a 12000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi retirado e reservado em gelo.

Para a determinação da atividade da CAT foram adicionados 2,9 mL de meio de reação (Tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5 mM) e 10 µL do extrato em microplaca (Havir & McHale, 1987). A leitura foi realizada no comprimento de onda de 240 nm por 1 minuto (a cada 10 segundos), e o cálculo da atividade enzimática foi dado pelo decréscimo da absorvância, sendo expressa em µmol<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> de massa fresca.

A determinação da atividade da APX foi realizada através do acréscimo do meio de reação (Tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, ácido ascórbico 0,25 mM, EDTA 0,1 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3 mM) com 10 µL do extrato em microplaca. Após a homogeneização, foi realizada a leitura em comprimento de onda de 290 nm durante um minuto. A absorvância foi decrescente e a quantificação da enzima foi dada por µmol<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> massa fresca.

A quantificação da SOD foi preparada através da adição de 2,97 mL de meio de reação (Tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75 µM, EDTA 0,1 mM e Riboflavina 2 µM) e 30 µL do extrato bruto em microplaca. A microplaca com as amostras foi mantida à 25 °C por 5 minutos em câmara de reação (iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W). Após este tempo, a placa foi retirada da iluminação interrompendo a reação. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 560 nm. A absorvância foi incrementada pela produção de formazana azul durante a reação, e o valor de absorvância foi subtraído do branco, que não possuía extrato enzimático. A atividade da superóxido dismutase foi representada em U min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> de massa fresca, sendo 1 U o equivalente a concentração necessária de SOD para inibir em 50% a fotorredução do NBT.

### **Determinação de açúcares, amido e clorofila**

A massa fresca foi coletada, congelada com nitrogênio líquido e conservada em ultrafreezer a 80 °C. Para a extração de açúcares, amido e pigmentos fotossintéticos (clorofilas *a* e *b*), foi pesado 25 mg de matéria fresca macerada e acrescentou-se 250 µL de etanol 98% em microtubo. A solução foi agitada em vórtex, incubada a 80 °C e agitada a 450 rpm por 20 minutos e centrifugada por 10 minutos (14000 rpm, 4 °C). O sobrenadante foi coletado e mantido a 4 °C. O procedimento foi repetido mais duas vezes, acrescentando-se 250 µL de etanol (80% na segunda e 50% na terceira vez). Ao final do procedimento foi obtido 750 µL de sobrenadante para a quantificação de açúcares e pigmentos, além do precipitado para a quantificação do amido, sendo ambos os microtubos conservados em freezer -20 °C.

A quantificação dos açúcares glicose, frutose e sacarose foi realizada de acordo com metodologia descrita por Fernie et al. (2001). Inicialmente foi preparado uma mistura (meio de reação) contendo tampão HEPES/KOH (100 mM) com MgCl<sub>2</sub> (3 mM, pH 7, ATP 118 mM, NADP<sup>+</sup> 48,4 mM) e 56 U de desidrogenase da glicose-6-fosfato (5 mg mL<sup>-1</sup>). Foram adicionados em cada poço de uma microplaca 170 µL do mix, 15 µL do extrato e 25 µL de etanol 76%, e em seguida realizado leituras das absorvâncias a 340 nm. Após a estabilização da densidade ótica (OD), foram adicionados 5 µL das enzimas hexocinase (1,5 U por reação), fosfoglicose isomerase (0.7 U por reação) e invertase (5 U por reação) com intervalos de 20 minutos a aplicação de cada enzima. Todas as enzimas foram ressuspendidas no mesmo tampão do meio de reação. A concentração dos respectivos açúcares foi calculada em uma equação baseada na lei de Lambert-Beer, e os resultados expressos em µmol g<sup>-1</sup>:

$$\text{NADPH } (\mu\text{mol}) = \frac{\Delta\text{OD}}{2,85 \times 6,22}$$

Para a quantificação do amido, foi utilizado o protocolo descrito por Fernie et al. (2001). Os tubos contendo o precipitado da extração etanólica e o NaOH 0,1 M (mesmo extrato utilizado para quantificação de proteínas), foram acrescidos de 70 µL de ácido acético (1 M) para neutralização do extrato, e após foram homogeneizados. Uma alíquota de 40 µL da suspensão foi retirada e colocada em uma microplaca, a qual continha 60 µL do mix de hidrolise do amido, composto pelas enzimas amiloglicosidase (0,14 unidades µL<sup>-1</sup>) e α-amilase (0,01 U µL<sup>-1</sup>) ressuspendidas em acetato de sódio (0,5 M, pH 4,9). A microplaca foi vedada com fita de alumínio (Scotch 3M Modelo 425®) e incubada por uma hora a 55 °C com leve agitação. Posteriormente, a microplaca foi centrifugada por 15 segundos a 12.800 g e 25 µL da suspensão foram retirados e transferidos para uma

nova microplaca. Em cada poço foi adicionado 185 µL do meio de reação composto por tampão Hepes/KOH (1M, pH 7,0 MgCl<sub>2</sub>, 3 mM, ATP 118 mM, NADP<sup>+</sup> 48,4 mM) e 56 unidades de desidrogenase da glicose-6-fosfato– G6PDH (0,7 unidades µL<sup>-1</sup>). As absorvâncias das respectivas a 340 nm foram lidas por um leitor de microplacas, com um minuto de intervalo entre leituras. Uma vez estabilizado a OD, foi adicionado aos poços 5 µL de hexocinase (2 unidades por reação). O conteúdo de amido foi então calculado de acordo com a equação e os resultados expressos em µmol de glicose por g<sup>-1</sup> de massa fresca.

$$\text{NADPH } (\mu\text{mol}) = \frac{\Delta\text{OD}}{2,85 \times 6,22}$$

A determinação de clorofilas *a* e *b* foi realizada com base na metodologia proposta por Porra et al. (1989). Foram adicionados em cada poço 25 µL do extrato etanólico fresco, 25 µL do mix etanólico (contendo etanol 98%, 80% e 50% na proporção 2:1:2, respectivamente) e 120 µL de etanol 98% em uma microplaca de 96 poços. Posteriormente foram feitas leituras nos comprimentos de onda 665 e 645 nm. Os teores de clorofilas foram determinados por meio das equações abaixo e expressos em mg g<sup>-1</sup> de massa fresca.

$$\text{Chl } a = 5,21 * \text{Abs}_{665} - 2,07 * \text{Abs}_{645}$$

$$\text{Chl } b = 9,29 * \text{Abs}_{645} - 2,74 * \text{Abs}_{665}$$

### **Mensuração da taxa fotossintética *in vitro***

As trocas gasosas e a quantificação da taxa fotossintética *in vitro* foram realizadas em um modelo adaptado do proposto por Costa et al. (2014).

Um IRGA (model S151; Qubit Systems, ON, Canada) foi utilizado para as medições de tocas gasosas e a coleta dos dados foi realizada através do software LoggerLite (LoggerLite, 1.8.1, Vernier Software & Technology Caliper, Beaverton). O CO<sub>2</sub> de referência foi calculado através da entrada de ar em um frasco vazio, trazido por uma bomba do ambiente externo a uma taxa de fluxo de ar constante de 300 mL min<sup>-1</sup>, dentro de uma câmara com iluminação (uma lâmpada LED branca). As plantas foram mantidas no escuro por 8 horas antes da análise. Logo após a medição de CO<sub>2</sub> referência, os frascos com as vitroplantas foram acoplados ao sistema, sendo o CO<sub>2</sub> calculado até o ponto de estabilização. As trocas gasosas foram calculadas através da diferença entre o CO<sub>2</sub> de referência e o CO<sub>2</sub> das plantas expostas ao ar atmosférico. A temperatura e a

umidade do ar no frasco foram mensuradas através do sensor Espec (Thermo Recorder RS-11, Takai Espec Corp.).

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

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

Onde,

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

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

### Teste histoquímico

Após 40 dias de cultivo *in vitro*, foram realizados cortes transversais de folhas com o auxílio de um micrótomo de mesa (LPC, Rolemberg e Bhering Comércio e Importação Ltda., Belo Horizonte, Brasil), que foram submetidos ao acetato neutro de chumbo (Charrière-Ladreix, 1976) para evidenciar a presença de flavonoides. As lâminas foram montadas em resina sintética Permout® SP15-500 (Fisher Chemicals- Fisher Scientific). Para a captura de imagens, foi utilizado um microscópio de luz (modelo AX70 TRF, Olympus Optical) com sistema U-photo e equipado com fluorescência, acoplado à câmera fotográfica digital (modelo Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.) e microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic, no Laboratório de Anatomia Vegetal/ UFV.

### Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do software Genes versão Windows/2004.2.1 (Cruz, 2013). Os dados foram submetidos à análise de variância e comparados por meio do teste Tukey à 5% de significância.

## RESULTADOS

### **O desenvolvimento de *V. condensata* é afetado pela alta exposição à radiação UV-B**

O menor desenvolvimento da parte aérea ocorreu em plantas expostas aos maiores tempos de radiação UV-B, como mostrado pelas variáveis comprimento (Figura 3A), acúmulo de massa fresca (3C) e seca (3E). Por outro lado, não houve diferenças significativas no desenvolvimento da raiz (Figuras B, D, F).

A influência da radiação UV-B sobre a área foliar de *V. condensata* foi proporcional ao tempo de exposição. Maiores tempos de aplicação da radiação UV-B induziram menores áreas foliares. Entretanto, não houve diferença entre as plantas que ficaram expostas por 0,5 hora e o controle (Figura 3G).

### **A radiação UV-B aumenta a taxa fotossintética, mas não o teor de clorofilas**

As plantas mais expostas à radiação UV-B, por 4 horas diárias, apresentaram as maiores taxas fotossintéticas. Não houve diferença na fotossíntese das plantas expostas ao UV-B por 1 e 2 horas diárias, mas estas foram superiores aos tratamentos controle e com meia hora de exposição ao UV-B (Figura 3H).

A quantificação dos pigmentos fotossintéticos demonstrou que os teores de clorofila *a* e *b* não foram afetados pelos tempos de exposição à radiação UV-B (Figura 4).

### **Radiação UV-B pode afetar os produtos do metabolismo primário de *V. condensata***

A tendência geral no acúmulo dos metabólitos primários foram de maiores valores associados aos menores tempos de exposição à radiação UV-B, no entanto, essa diferença não foi significativa para frutose e amido (Figuras 5B e 5D). Para glicose e sacarose, as menores médias foram observadas em plantas mantidas sob o maior tempo de exposição à radiação UV-B. Entretanto, não houveram diferenças no acúmulo deste composto para os demais tratamentos (Figuras 5A e 5C).

### **A radiação UV-B induz o acúmulo de flavonoides nas folhas de *V. condensata***

Testes histoquímicos evidenciaram a presença de flavonoides em toda a região do mesófilo e próximo a epiderme, mas a maior concentração encontra-se ao redor dos feixes vasculares. A presença deste metabólito mostrou-se menos intensa nas folhas de plantas não expostas ao UV-B, e com maior intensidade nas folhas expostas por 1 e 4 horas (Figura 6).

## **A atividade enzimática de *V. condensata* é influenciada pela exposição à radiação UV-B**

A análise da atividade enzimática na parte aérea de *V. condensata* revelou que a catalase foi a principal responsável pela resposta antioxidante. A menor atividade desta enzima foi observada em plantas não expostas à UV-B, enquanto que entre as plantas expostas não houve diferença significativa (Figura 7A). As atividades da APX e da SOD não foram afetadas pela exposição à radiação UV-B (Figura 7B e C).

## DISCUSSÃO

Estudos prévios com radiação UV-B têm demonstrado que essa faixa do espectro luminoso exerce influência no desenvolvimento de muitas espécies de plantas, bem como induz diferentes mecanismos de adaptação a situações de estresse (Chen et al., 2016; Ma et al., 2016; Hayes et al., 2017; Kataria et al., 2017; Wu et al., 2017). Nossos resultados mostraram que diferentes tempos de exposição à radiação UV-B levou a diferentes respostas no crescimento, fotossíntese e metabolismo de *V. condensata*.

A exposição prolongada de *V. condensata* à radiação UV-B resultou em plantas com menor parte aérea. O menor crescimento pode ser resultado de danos moleculares causados pelo UV-B, tal como observado em *Arabidopsis thaliana* por Biever et al. (2014). Esses autores observaram que danos causados no DNA pela radiação UV-B impediram a atividade do ciclo celular, levando à inibição do alongamento do hipocótilo de *A. thaliana*.

A radiação UV-B reduziu a biomassa na parte aérea. Essa redução possivelmente está relacionada com a produção de compostos fotoprotetores, que atenuam os danos causados pela radiação UV-B (Suchar & Robberrecht, 2016). Resultados similares foram observados em outras espécies, tais como canola (*Brassica napus*), amoreira (*Morus alba*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), e trigo (*Triticum polonicum*) (Zhu & Yang, 2015; Chen et al., 2016; Raghuvanshi & Sharma, 2016; Yan et al., 2016).

O aumento da exposição à radiação UV-B afetou o desenvolvimento das folhas de *V. condensata* resultando em menores áreas foliares. Estes resultados podem estar relacionados com a diminuição da divisão e da expansão celular, afetado pela radiação UV-B (Suchar & Robberrecht, 2015). Além de levar a redução da área foliar de muitas espécies (Baroniya et al., 2014; Randriamanana et al., 2015b; Zhu & Yang, 2015; Raghuvanshi & Sharma, 2016), a radiação UV-B também pode causar outras modificações nas folhas, tais como menor espessura, maior concentração de compostos fenólicos (Randriamanana et al., 2015b), desenvolvimento de um tecido semelhante a periderme para proteção (Nascimento et al., 2015) e menor abertura estomática (Almeida et al., 2013).

As concentrações de clorofilas não foram alteradas significativamente pelos níveis de radiação UV-B. Estes resultados estão de acordo com o obtido para arroz superhíbrido cv. Liangyoupeijiu (Yu et al., 2013), videira cv. Tempranillo (Martínez-Lüscher et al., 2015) e *Plectranthus coleoides* (Vidović et al., 2015).

Vários trabalhos associam a redução da atividade fotossintética com a radiação UV-B (Zhu & Yang, 2015; Chen et al., 2016; Doupis et al., 2016; Kataria et al., 2017). Entretanto, os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que houve um aumento na fotossíntese proporcional ao incremento de UV-B no cultivo de *V. condensata*. Tais resultados corroboram com os obtidos por Vidović et al. (2015b), onde a radiação UV-B estimulou a fotossíntese de *Plectranthus coleoides* por meio do incremento da assimilação de CO<sub>2</sub> e da condutância estomática, e também estimulou a biossíntese de flavonoides que foram os responsáveis pela fotoproteção. Assim, o efeito da radiação UV-B sobre a eficiência fotossintética das plantas depende da espécie e dos níveis de radiação utilizados.

As menores concentrações de açúcares, principalmente glicose e sacarose, foram observadas nas plantas mais expostas à UV-B. Nestas condições de estresse, recursos do metabolismo primário podem ser alocados para a biossíntese de metabólitos de defesa (Caretto et al., 2015). Em condições de alta intensidade da radiação fotossinteticamente ativa, a radiação UV-B regulou o transporte de monossacarídeos para a região branca de folhas variegadas de *Pelargonium zonale*, onde foram utilizados para a biossíntese de compostos fenólicos, visando à proteção contra o estresse oxidativo (Vidović et al., 2015a).

Flavonoides são os principais compostos relacionados com a filtragem da radiação ultravioleta, e a maior biossíntese sob UV-B pode estar relacionada com a fotoproteção (Guidi et al., 2016; Pascual et al., 2017). Zhou et al. (2016) relataram que a radiação UV-B leva a regulação de genes envolvidos na rota de biossíntese de flavonóis em *A. thaliana*. A exposição à radiação UV-B induziu a biossíntese e o acúmulo de flavonoides em folhas de *V. condensata*, como evidenciado pelo teste histoquímico. Nossos resultados são similares aos obtidos com *Morus alba* (Chen et al., 2016), *Ligustrum vulgare*, *Phillyrea latifolia* (Guidi et al., 2016), *Chrysanthemum morifolium* (Ma et al., 2016), *A. thaliana* (Bernula et al., 2017), *Pinus radiata* (Pascual et al., 2017). A indução da síntese de flavonoides pode ser interessante, devido as suas propriedades farmacológicas, nutracêuticas e sua ampla utilização em processos industriais, como na produção de corantes (Wang et al., 2011).

A radiação UV-B pode induzir a atividade de enzimas antioxidantes (Raghuvanshi & Sharma, et al., 2016). Nossos resultados demonstraram que o estresse oxidativo ativou mecanismos enzimáticos de defesa, com aumento da atividade da catalase. Respostas similares foram encontradas com batata (*Solanum tuberosum*) Santos et al., 2004), soja

(*Glycine max*), milho (*Zea mays*) (Shen & Chen, 2015) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Pusa Himlata e Pusa Parvati) (Raghuvanshi & Sharma, et al., 2016).

Conclui-se que a exposição prolongada à radiação UV-B afeta negativamente o desenvolvimento de *V. condensata*, resultando em um menor crescimento e acúmulo de biomassa. Além disso, a UV-B também pode induzir mecanismos de resposta antioxidantes, através do aumento da atividade da enzima catalase e do acúmulo de flavonoides em folhas. Futuros trabalhos que explorem o papel da radiação UV-B sobre a regulação da produção de flavonoides podem auxiliar no entendimento da rota de biossíntese destes compostos, que possuem grande interesse farmacológico e industrial.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, S.L.; SCHMIDT, E.C.; PEREIRA, D.T.; KREUSCH, M.; MARTHIELLEN, R.D L.; OSORIO, L.K.; MARTINS, M.P; LATINI, A.; RAMLOV, F.; CHOW, F.; MARASCHIN, M.; RODRIGUES, A.C.; BOUZON, Z.L. Effect of Ultraviolet-B radiation in laboratory on morphological and ultrastructural characteristics and physiological parameters of selected cultivar of *Oryza sativa* L. **Protoplasma**, v. 250, n. 6, p. 1303-1313, 2013.

ALLORENT, G.; LEFEBVRE-LEGENDRE, L.; CHAPPUIS, R.; KUNTZ, M.; TRUONG, T.B.; NIYOGI, K.K.; UHM, R.; Goldschmidt-Clermont, M. UV-B photoreceptor-mediated protection of the photosynthetic machinery in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 51, p. 14864–14869, 2016.

ARANTES, A.A.; FALÉ, P.L.; COSTA, L.C.; PACHECO, R.; ASCENSÃO, L.; SERRALHEIRO, M. L. Inhibition of HMG-CoA reductase activity and cholesterol permeation through Caco-2 cells by caffeoylquinic acids from *Vernonia condensata* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 6, p. 738-743, 2016.

ASENSI-FABADO, M.A; AMTMANN, A.; PERRELLA, G. Plant responses to abiotic stress: The chromatin context of transcriptional regulation. **Biochimica et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1860, n. 1, p. 106-122, 2017.

BARONIYA, S.S.; KATARIA, S.; PANDEY, G.P.; GURUPRASAD, K.N. Growth, photosynthesis and nitrogen metabolism in soybean varieties after exclusion of the UV-B and UV-A/B components of solar radiation. **The Crop Journal**, v. 2, n. 6, p. 388-397, 2014.

BATISTA, D.S.; DIAS, L.L.C.; RÊGO, M.M.; SALDANHA, C.W.; OTONI, W.C. Flask sealing on *in vitro* seed germination and morphogenesis of two types of ornamental pepper explants. **Ciência Rural**, v. 47, n. 3, 2017.

BERNULA, P.; CROCCO, C.D.; ARONGAUS, A.B.; ULM, R.; NAGY, F.; VICZIÁN, A. Expression of the UVR8 photoreceptor in different tissues reveals tissue-autonomous features of UV-B signalling. **Plant, Cell & Environment**, 2017.

BIEVER, J.J.; BRINKMAN, D.; GARDNER, G. UV-B inhibition of hypocotyl growth in etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings is a consequence of cell cycle arrest initiated by photodimer accumulation. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 2949-2961, 2014.

BOEING, T.; SILVA, L.M.; SOMENSI, L.B.; CURY, B.J.; COSTA, A.P.; PETREANU, M.; NIERO, R.; ANDRADE, S.F. Antiulcer mechanisms of *Vernonia condensata* Baker: A medicinal plant used in the treatment of gastritis and gastric ulcer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 184, p. 196-207, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2014. **RENISUS: Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS - Espécies vegetais**. Disponível em:

<<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf> > Acesso em 30/04/2016.

CARETTO, S.; LINSALATA, V.; COLELLA, G.; MITA, G.; LATTANZIO, V. Carbon fluxes between primary metabolism and phenolic pathway in plant tissues under stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 11, p. 26378-26394, 2015.

CHARRIÈRE-LADREIX, Y. Répartition intracellulaire du secrétat flavonique de *Populus nigra* L. **Planta**, v. 129, p. 167-174, 1976.

CHEN, M.; HUANG, Y.; LIU, G.; QIN, F.; YANG, S.; XU, X. Effects of enhanced UV-B radiation on morphology, physiology, biomass, leaf anatomy and ultrastructure in male and female mulberry (*Morus alba*) saplings. **Environmental and Experimental Botany**, v. 129, p. 85-93, 2016.

COSTA, A.C.; ROSA, M.; MEGGUER, C.A.; SILVA, F.G.; PEREIRA, F.D.; OTONI, W. C. A reliable methodology for assessing the in vitro photosynthetic competence of two Brazilian savanna species: *Hyptis marrubioides* and *Hancornia speciosa*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 117, n. 3, p. 443-454, 2014.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

CZÉGÉNY, G., LE MARTRET, B., PÁVKOVICS, D., DIX, P. J., & HIDEG, É. Elevated ROS-scavenging enzymes contribute to acclimation to UV-B exposure in transplastomic tobacco plants, reducing the role of plastid peroxidases. **Journal of Plant Physiology**, v. 201, p. 95-100, 2016a.

CZÉGÉNY, G.; MÁTAI, A.; HIDEG, É. UV-B effects on leaves—Oxidative stress and acclimation in controlled environments. **Plant Science**, v. 248, p. 57-63, 2016b.

DOUPIS, G.; BOSABALIDIS, A.M.; PATAKAS, A. Comparative effects of water deficit and enhanced UV-B radiation on photosynthetic capacity and leaf anatomy traits of two grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 28, n. 1, p. 131-141, 2016.

FERNÁNDEZ, M.B.; TOSSI, V.; LAMATTINA, L.; CASSIA, R. A comprehensive phylogeny reveals functional conservation of the UV-B photoreceptor UVR8 from green algae to higher plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.

FERNIE, A.R.; ROSCHER, A.; RATCLIFFE, R.G.; KRUGER, N.J. Fructose 2, 6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. **Planta**, v. 212, n. 2, p. 250-263, 2001.

GAI, Q. Y.; JIAO, J.; LUO, M.; WANG, W.; ZHAO, C.J.; FU, Y.J.; MA, W. UV elicitation for promoting astragaloside production in *Astragalus membranaceus* hairy root cultures with transcriptional expression of biosynthetic genes. **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 350-357, 2016.

GHASEMZADEH, A.; ASHKANI, S.; BAGHDADI, A.; PAZOKI, A.; JAAFAR, H.Z.; RAHMAT, A. Improvement in flavonoids and phenolic acids production and pharmaceutical quality of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) by Ultraviolet-B irradiation. **Molecules**, v. 21, n. 9, p. 1203-1218, 2016.

GUIDI, L.; BRUNETTI, C.; FINI, A.; AGATI, G.; FERRINI, F.; GORI, A.; TATTINI, M. UV radiation promotes flavonoid biosynthesis, while negatively affecting the biosynthesis and the de-epoxidation of xanthophylls: Consequence for photoprotection? **Environmental and Experimental Botany**, v. 127, p. 14-25, 2016.

HAVIR, E.A., McHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, n. 84, p. 450-455, 1987.

HAYES, S.; SHARMA, A.; FRASER, D.P.; TREVISAN, M.; CRAGG-BARBER, C.K.; TAVRIDOU, E.; FANKHAUSER, C.; JENKINS, G.I.; FRANKLIN, K.A. UV-B perceived by the UVR8 photoreceptor inhibits plant thermomorphogenesis. **Current Biology**, v. 27, p. 120-127, 2016.

HEILMANN, M.; VELANIS, C.N.; CLOIX, C.; SMITH, B.O.; CHRISTIE, J.M.; JENKINS, G.I. Dimer/monomer status and *in vivo* function of salt-bridge mutants of the plant UV-B photoreceptor UVR8. **The Plant Journal**, v. 88, n. 1, p. 71-81, 2016.

HIDEG, Éva; JANSEN, Marcel A.; STRID, Åke. UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates? **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 2, p. 107-115, 2013.

HUANG, X.; YAO, J.; ZHAO, Y.; XIE, D.; JIANG, X.; XU, Z. Efficient rutin and quercetin biosynthesis through flavonoids-related gene expression in *Fagopyrum tataricum* Gaertn. hairy root cultures with UV-B irradiation. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.

KATARIA, S.; BAGHEL, L.; GURUPRASAD, K.N. Alleviation of adverse effects of ambient UV stress on growth and some potential physiological attributes in soybean (*Glycine max*) by seed pre-treatment with static magnetic field. **Journal of Plant Growth Regulation**, p. 1-16, 2017.

LORENZI, H. & MATOS, F.J.A. **Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas**, 2nd ed.; Instituto Plantarum: Nova Odessa, Brazil, 2008; pp. 165–166.

MA, C.H.; CHU, J.Z.; SHI, X.F.; LIU, C.Q.; YAO, X.Q. Effects of enhanced UV-B radiation on the nutritional and active ingredient contents during the floral development of medicinal chrysanthemum. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 158, p. 228-234, 2016.

MAJER, P.; CZÉGÉNY, G.; SÁNDOR, G.; DIX, P.J.; HIDEG, É. Antioxidant defence in UV-irradiated tobacco leaves is centred on hydrogen-peroxide neutralization. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 82, p. 239-243, 2014.

MARTÍNEZ-LÜSCHER, J. MORALES, F.; SÁNCHEZ-DÍAZ, M.; DELROT, S.; AGUIRREOLEA, J.; GOMÈS, E.; PASCUAL, I. Climate change conditions (elevated CO<sub>2</sub> and temperature) and UV-B radiation affect grapevine (*Vitis vinifera* cv.

Tempranillo) leaf carbon assimilation, altering fruit ripening rates. **Plant Science**, v. 236, p. 168-176, 2015.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473–497, 1962.

NAMLI, S.; İŞIKALAN, Ç.; AKBAŞ, F.; TOKER, Z.; TILKAT, E.A. Effects of UV-B radiation on total phenolic, flavonoid and hypericin contents in *Hypericum retusum* Aucher grown under *in vitro* conditions. **Natural Product Research**, v. 28, n. 24, p. 2286-2292, 2014.

NASCIMENTO, L.B.S.; MOREIRA, N.S.; LEAL-COSTA, M.V.; COSTA, S.S.; TAVARES, E.S. Induction of wound-periderm-like tissue in *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.(Crassulaceae) leaves as a defence response to high UV-B radiation levels. **Annals of Botany**, v. 116, p. 763-769, 2015.

PANDEY, N.; PANDEY-RAI, S. Modulations of physiological responses and possible involvement of defense-related secondary metabolites in acclimation of *Artemisia annua* L. against short-term UV-B radiation. **Planta**, v. 240, n. 3, p. 611-627, 2014.

PANDEY, N. & PANDEY-RAI, S. Short term UV-B radiation-mediated transcriptional responses and altered secondary metabolism of *in vitro* propagated plantlets of *Artemisia annua* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 116, n. 3, p. 371-385, 2014b.

PASCUAL, J.; CANAL, M.J.; ESCANDON, M.; MEIJON, M.; WECKWERTH, W.; VALLEDOR, L. Integrated physiological, proteomic and metabolomic analysis of UV stress responses and adaptation mechanisms in *Pinus radiata*. **Molecular & Cellular Proteomics**, p. 1-44, 2017.

PORRA, R.J.; THOMPSON, W.A.; KRIEDEMANN, P.E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics**, v. 975, n. 3, p. 384-394, 1989.

QIN, B.; MA, L.; WANG, Y.; CHEN, M.; LAN, X.; WU, N.; LIAO, Z. Effects of acetylsalicylic acid and UV-B on gene expression and tropane alkaloid biosynthesis in hairy root cultures of *Anisodus luridus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 117, n. 3, p. 483-490, 2014.

RAGHUVANSHI, R. & SHARMA, R.K. Response of two cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. (French beans) plants exposed to enhanced UV-B radiation under mountain ecosystem. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 1, p. 831-842, 2016.

RANDRIAMANANA, T.R.; LAVOLA, A.; JULKUNEN-TIITTO, R. Interactive effects of supplemental UV-B and temperature in European aspen seedlings: Implications for growth, leaf traits, phenolic defense and associated organisms. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 93, p. 84-93, 2015a.

RANDRIAMANANA, T.R.; NISSINEN, K.; MOILANEN, J.; NYBAKKEN, L.; JULKUNEN-TIITTO, R. Long-term UV-B and temperature enhancements suggest that

females of *Salix myrsinifolia* plants are more tolerant to UV-B than males. **Environmental and Experimental Botany**, v. 109, p. 296-305, 2015b.

RAJENDIRAN, K.; VIDYA, S.; ARULMOZHI, D. *In vitro* callus proliferation from leaf explants of green gram after *in situ* UV-B exposure. **International Journal of Applied Sciences and Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 82-91, 2016.

RISSO, W.E.; SCARMINIO, I.S.; MOREIRA, E.G. Antinociceptive and acute toxicity evaluation of *Vernonia condensata* Baker leaves extracted with different solvents and their mixtures. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, n. 8, p. 811, 2010.

SANTOS, I.; FIDALGO, F.; ALMEIDA, J.M.; SALEMA, R. Biochemical and ultrastructural changes in leaves of potato plants grown under supplementary UV-B radiation. **Plant Science**, v. 167, n. 4, p. 925-935, 2004.

SHEN, X.; DONG, Z.; CHEN, Y. Drought and UV-B radiation effect on photosynthesis and antioxidant parameters in soybean and maize. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 2, p. 1-8, 2015.

SCHNEIDER, C.A.; RASBAND, W.S.; ELICEIRI, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 671-675, 2012.

SCHREINER, M.; MEWIS, I.; NEUGART, S.; ZRENNER, R.; GLAAB, J.; WIESNER, M.; JANSEN, M.A. UV-B Elicitation of secondary plant metabolites. In: **III-Nitride Ultraviolet Emitters**. Springer International Publishing, 2016. p. 387-414.

SILVA, J.B.; TEMPONI, V.D.; FERNANDES, F.V.; ALVES, G.D.; MATOS, D.M.; GASPARETTO, C.M.; RIBEIRO, A.; DE PINHO, J.D.; ALVES, M.S.; SOUSA, O.V. New approaches to clarify antinociceptive and anti-inflammatory effects of the ethanol extract from *Vernonia condensata* leaves. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 12, p. 8993-9008, 2011.

SUCHAR, V.A.; ROBBERECHT, R. Integration and scaling of UV-B radiation effects on plants: from DNA to leaf. **Ecology and Evolution**, v. 5, n. 13, p. 2544-2555, 2015.

SUCHAR, V.A. & ROBBERECHT, R. Integration and scaling of UV-B radiation effects on plants: from molecular interactions to whole plant responses. **Ecology and Evolution**, v. 6, n. 14, p. 4866-4884, 2016.

THOMAS, E.; GOPALAKRISHNAN, V.; SOMASAGARA, R.R.; CHOUDHARY, B.; RAGHAVAN, S.C. Extract of *Vernonia condensata*, inhibits tumor progression and improves survival of tumor-allograft bearing mouse. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-12, 2016.

VANHAELEWYN, L.; PRINSEN, E.; VAN DER STRAETEN, D.; VANDENBUSSCHE, F. Hormone-controlled UV-B responses in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 15, p. 4469-4482, 2016.

VIDOVIĆ, M.; MORINA, F.; MILIĆ, S.; ALBERT, A.; ZECHMANN, B.; TOSTI, T.; WINKLER, J.B.; JOVANOVIĆ, S.V. Carbon allocation from source to sink leaf tissue in relation to flavonoid biosynthesis in variegated *Pelargonium zonale* under UV-B radiation and high PAR intensity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 93, p. 44-55, 2015a.

VIDOVIĆ, M.; MORINA, F.; MILIĆ, S.; ZECHMANN, B.; ALBERT, A.; WINKLER, J.B.; JOVANOVIĆ, S.V. Ultraviolet-B component of sunlight stimulates photosynthesis and flavonoid accumulation in variegated *Plectranthus coleoides* leaves depending on background light. **Plant, Cell & Environment**, v. 38, n. 5, p. 968-979, 2015b.

WANG, Y.; CHEN, S.; YU, O. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 4, p. 949, 2011.

WILLING, E.M.; PIOFCZYK, T.; ALBERT, A.; WINKLER, J.B.; SCHNEEBERGER, K.; PECINKA, A. UVR2 ensures transgenerational genome stability under simulated natural UV-B in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Communications**, v. 7, 2016.

WU, Q.; PARK, S.; KIRKHAM, M.B.; WILLIAMS, K.A. Transcriptome analysis reveals potential mechanisms for inhibition of intumescence development by UV radiation in tomato. **Environmental and Experimental Botany**, v. 134, p. 130-140, 2017.

YAN, F.; LIU, Y.; SHENG, H.; WANG, Y.; KANG, H.; ZENG, J. Salicylic acid and nitric oxide increase photosynthesis and antioxidant defense in wheat under UV-B stress. **Biologia Plantarum**, v. 60, n. 4, p. 686-694, 2016.

YOON, M.Y.; KIM, M.Y.; SHIM, S.; KIM, K.D.; HA, J., SHIN, J.H; KANG, S.; LEE, S. Transcriptomic profiling of soybean in response to high-intensity UV-B irradiation reveals stress defense signaling. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.

YU, G.H.; LI, W.; YUAN, Z.Y.; CUI, H.Y.; LV, C.G.; GAO, Z.P.; GONG, Y.Z.; CHEN, G.X. The effects of enhanced UV-B radiation on photosynthetic and biochemical activities in super-high-yield hybrid rice Liangyoupeijiu at the reproductive stage. **Photosynthetica**, v. 51, n. 1, p. 33-44, 2013.

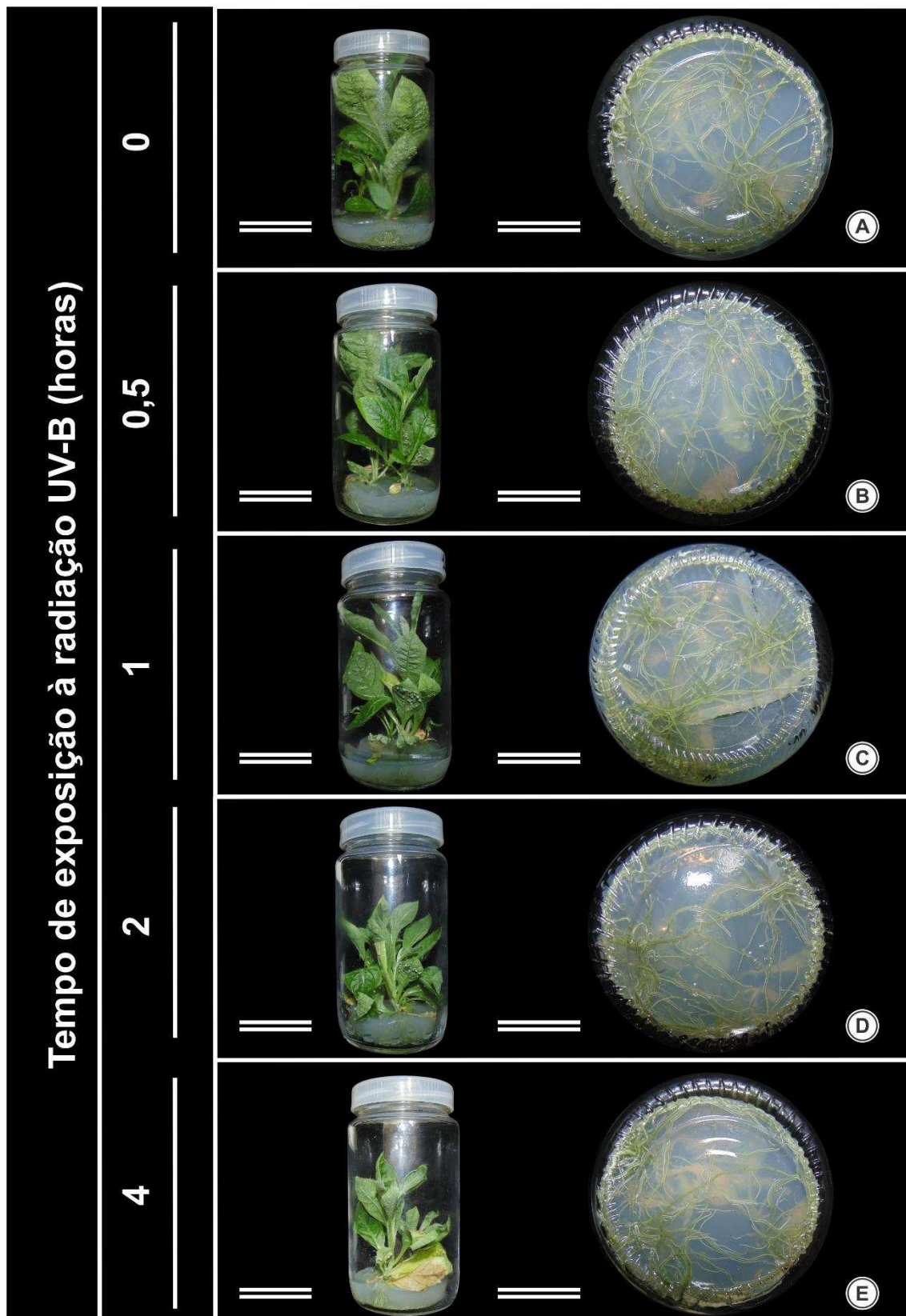
ZHOU, Z.; SCHENKE, D.; MIAO, Y.; CAI, D. Investigation of the crosstalk between the flg22 and the UV-B-induced flavonol pathway in *Arabidopsis thaliana* seedlings. **Plant, Cell & Environment**, 2016.

ZHU, P. & YANG, L. Ambient UV-B radiation inhibits the growth and physiology of *Brassica napus* L. on the Qinghai-Tibetan plateau. **Field Crops Research**, v. 171, p. 79-85, 2015.

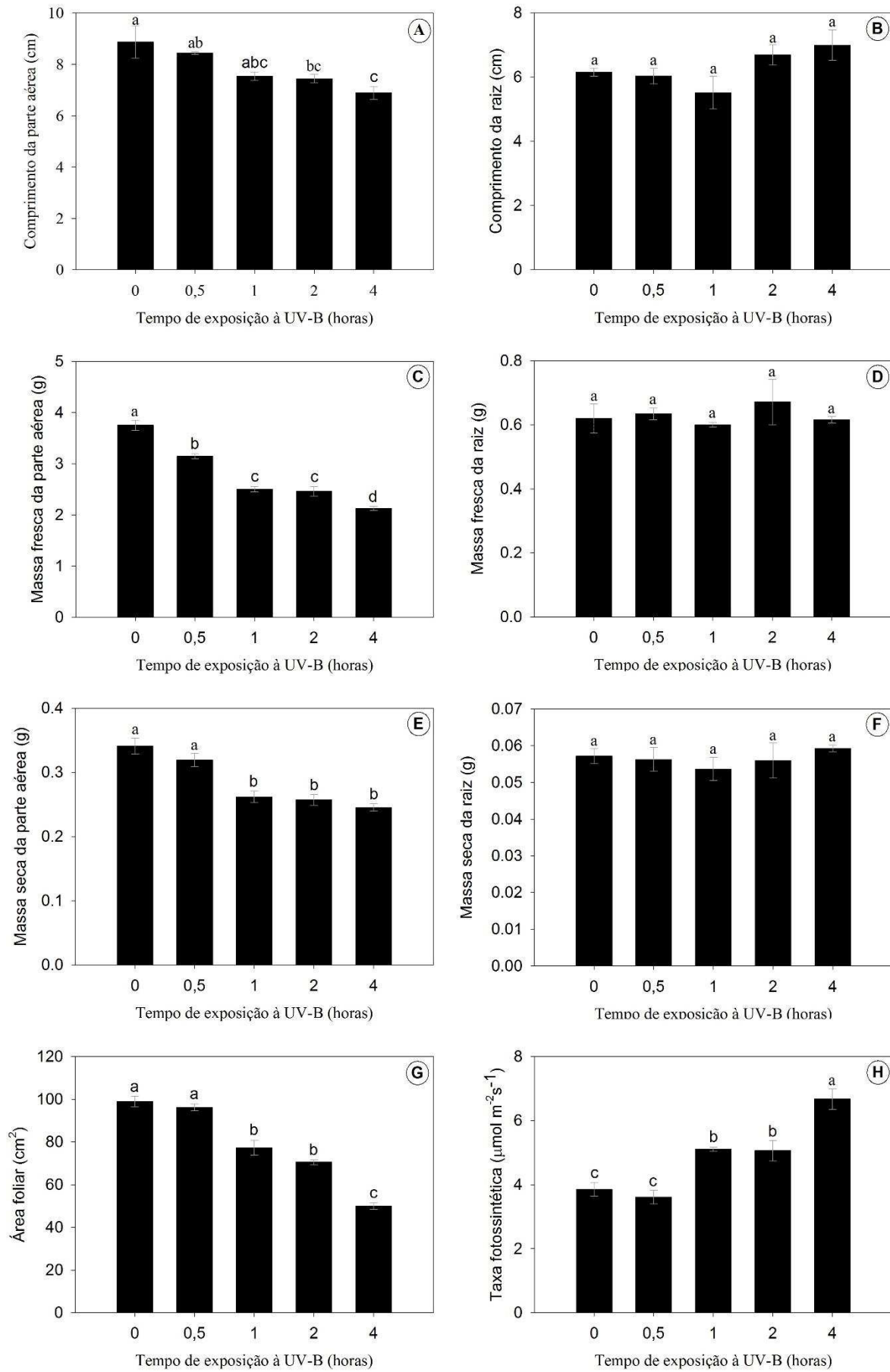
## FIGURAS



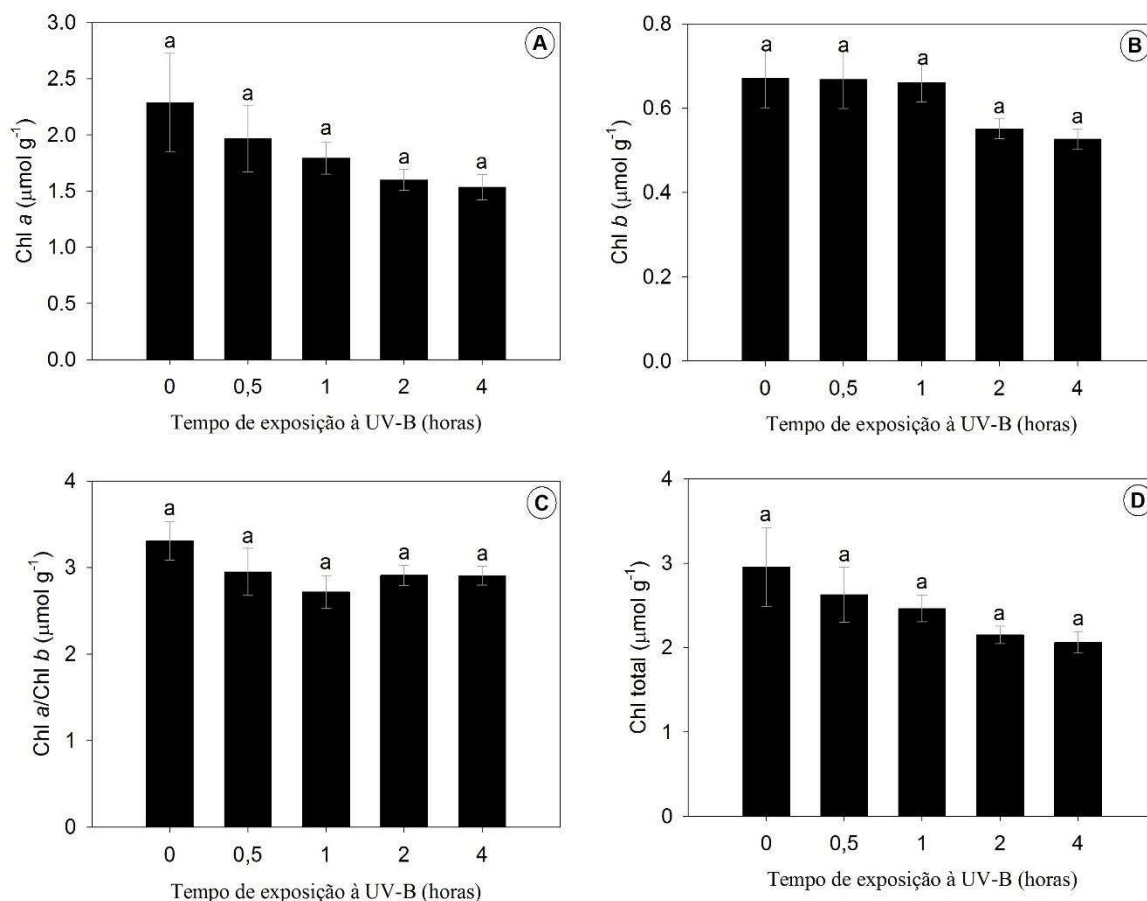
**Figura 1** – Plantas *in vitro* de *Vernonia condensata* acondicionadas em câmara de crescimento iluminada por 5 lâmpadas UV-B (Sankio Denki, G15T8E, 9E, Japão) e 4 lâmpadas fluorescentes brancas (Philips, TL-D, 15W/75-650, China).



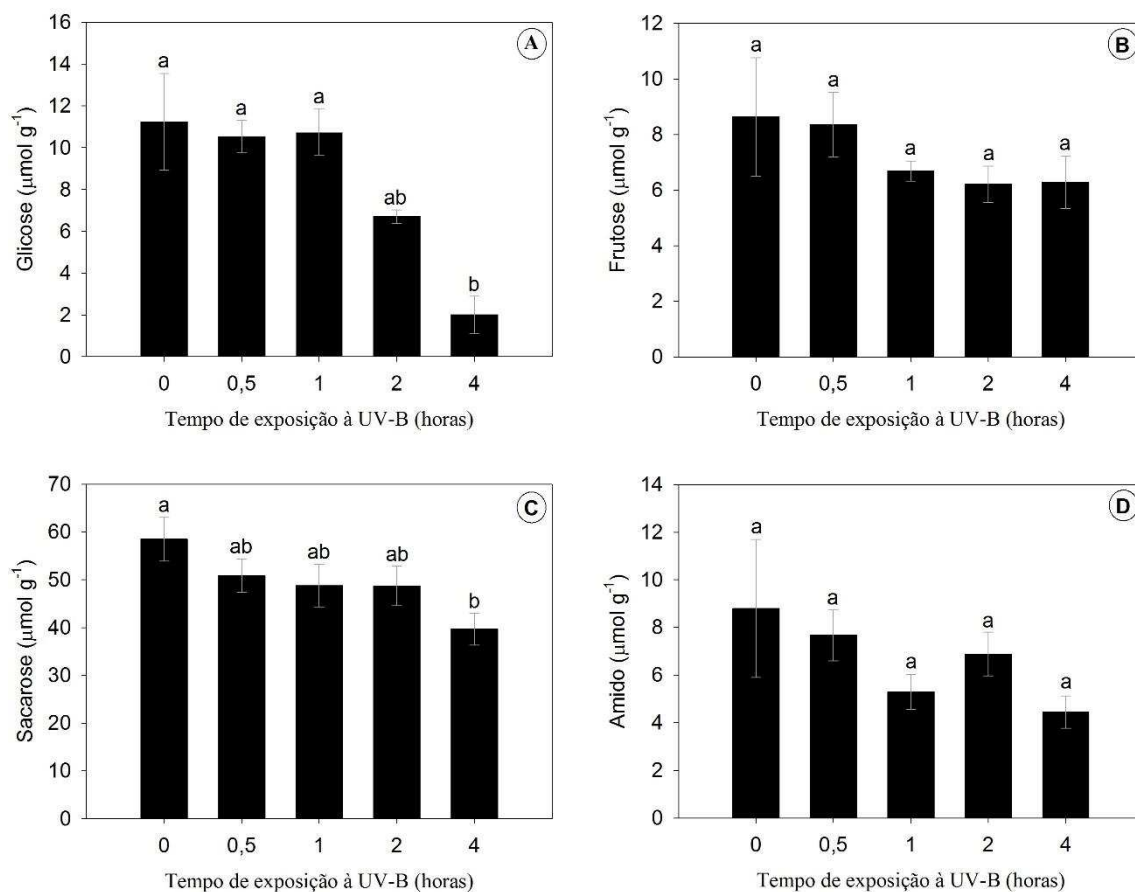
**Figura 2** - Plantas de *Vernonia condensata* após 40 dias de cultivo *in vitro*. Aos 25 dias de cultivo, as plantas foram submetidas aos seguintes tempos de exposição diária à radiação UV-B: 0 (A), 0,5 (B), 1 (C), 2 (D) e 4 horas (E). Barra equivale a 5 cm.



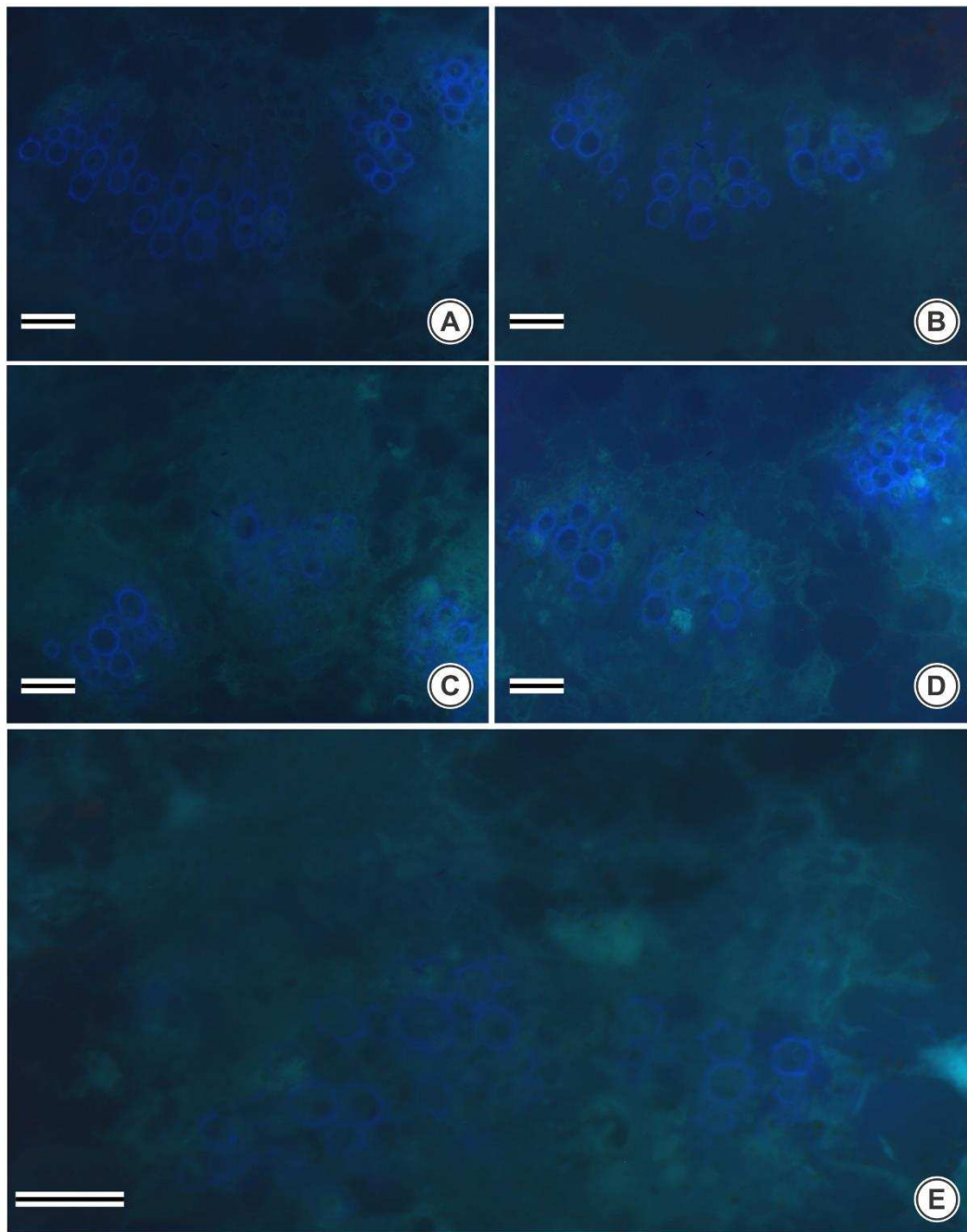
**Figura 3** - Variáveis de crescimento e taxa fotossintética de *Vernonia condensata* após 40 dias de cultivo *in vitro*. Aos 25 dias de cultivo, as plantas foram submetidas aos seguintes tempos de exposição diária à radiação UV-B: 0; 0,5; 1; 2 e 4 horas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Barras representam o erro médio.



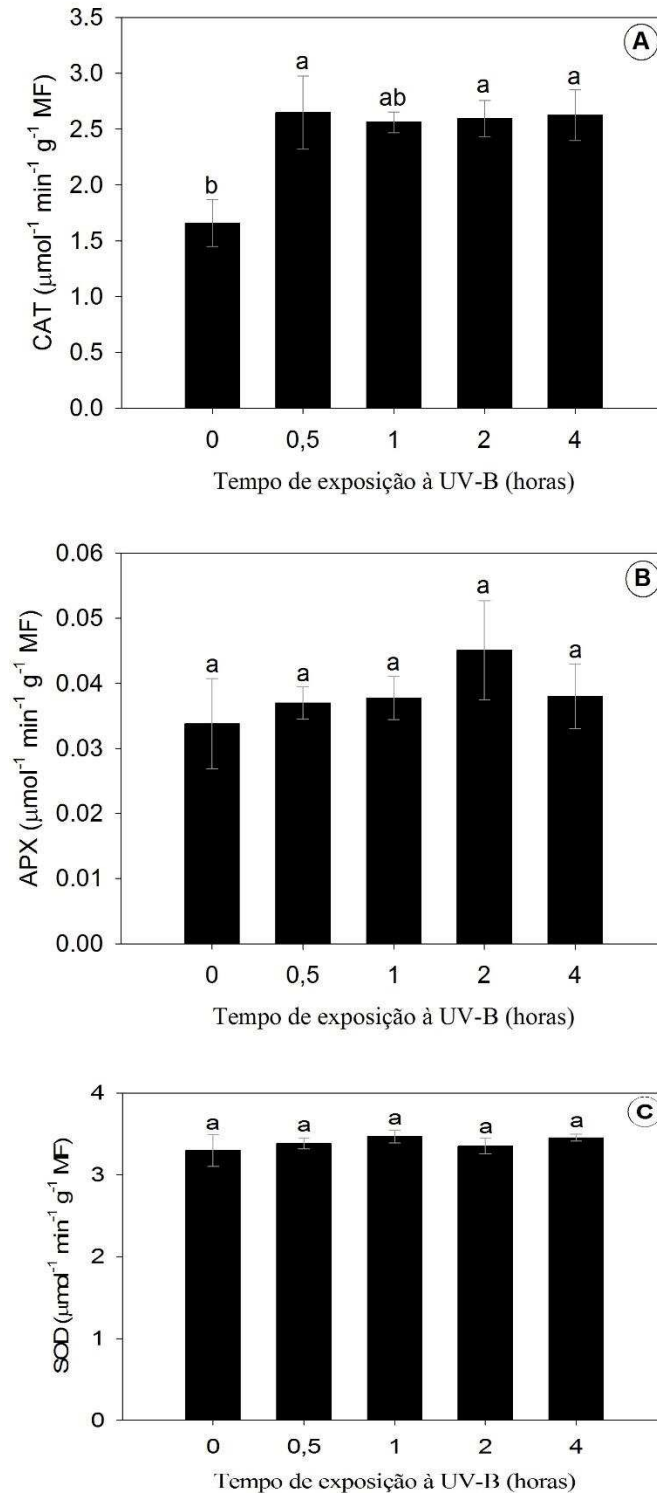
**Figura 4** – Teor de clorofilas de *Vernonia condensata* após 40 dias de cultivo *in vitro*. Aos 25 dias de cultivo as plantas foram submetidas aos seguintes tempos de exposição diária à radiação UV-B: 0; 0,5; 1; 2 e 4 horas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro médio. Abreviações – Chl a: clorofila a; Chl b: clorofila b.



**Figura 5** – Concentração de metabólitos primários de *Vernonia condensata* após 40 dias de cultivo *in vitro*. Aos 25 dias de cultivo, as plantas foram submetidas aos seguintes tempos de exposição diária à radiação UV-B: 0; 0,5; 1; 2 e 4 horas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Barras representam o erro médio.



**Figura 6** - Seções transversais de folhas de vitroplantas de *V. condensata* após 40 dias de cultivo *in vitro*, submetidas ao acetato de chumbo para evidenciar a presença de flavonoides. Tempos de exposição à radiação UV-B: 0 (A), 0,5 (B), 1 (C), 2 (D) e 4 horas (E). Barras equivalem a 10  $\mu\text{m}$



**Figura 7** – Atividade das enzimas do estresse oxidativo na parte aérea de vitroplantas de *V. condensata* após 40 dias de cultivo *in vitro*. Aos 25 dias de cultivo as plantas foram submetidas aos seguintes tempos de exposição diária à radiação UV-B: 0; 0,5; 1 ; 2 e 4 horas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras representam o erro médio. Abreviações – CAT: Catalase; APX: Ascorbato peroxidase; SOD: Desmutase do superóxido.

## CONCLUSÕES GERAIS

*Vernonia condensata* possui potencial de propagação fotoautotrófica. As melhores condições de cultivo *in vitro* da espécie são em meio com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose em frascos com maiores trocas gasosas. Maiores níveis de trocas gasosas foram benéficos para o desenvolvimento da espécie e contribuíram para a maior rusticidade das plantas. A presença de sacarose no meio induziu a heterotrofia, reduzindo as taxas fotossintéticas.

A qualidade espectral da luz influencia no desenvolvimento de *V. condensata*, sendo o comprimento de onda vermelho distante responsável pelo estiolamento das plantas. A variação da qualidade de luz também afetou a anatomia das vitroplantas, sendo observadas alterações no espessamento, organização do mesofilo, diferenciação e disposição dos feixes vasculares no caule e na folha. Entretanto, as condições de luz testadas não interferiram no acúmulo de biomassa, no teor de pigmentos e taxa fotossintética. A influência da qualidade de luz sobre o crescimento e fotossíntese de *V. condensata* no cultivo *in vitro* foi mantida mesmo após as plantas serem aclimatizadas em condições de casa-de-vegetação.

A radiação ultravioleta-B afeta negativamente o desenvolvimento de *V. condensata*. A exposição das plantas à UV-B levou ao menor crescimento e acúmulo de biomassa. Entretanto, a radiação UV-B não causou danos à maquinaria fotossintética das plantas, não sendo observadas diferenças significativas do teor de pigmentos fotossintéticos de plantas expostas e não expostas à UV-B. Além disso, a taxa fotossintética foi maior nas plantas expostas. A catalase foi a principal responsável pela atividade antioxidante em resposta ao estresse oxidativo induzido pela radiação UV-B. Testes histoquímicos evidenciaram a presença de flavonoides em folhas de *V. condensata*, principalmente nas plantas expostas por mais tempo. Os flavonoides também podem ter atuado como antioxidantes e fotoprotetores.