

TATIANE DULCINEIA SILVA

**ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS E MOLECULARES DO DESENVOLVIMENTO  
*in vitro* DE *Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN INFLUENCIADOS PELA LUZ**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2019

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

T

S586a  
2019

Silva, Tatiane Dulcineia, 1991-  
Aspectos morfofisiológicos e moleculares do  
desenvolvimento *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.)  
Pedersen influenciados pela luz / Tatiane Dulcineia Silva. –  
Viçosa, MG, 2019.  
xi, 100 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Wagner Campos Otoni.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. *Pfaffia glomerata* - Desenvolvimento - Efeito da luz. 2.  
Biotecnologia. 3. Metabolismo. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de  
Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 583.53

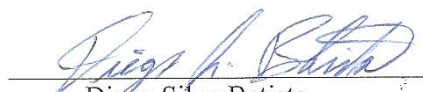
TATIANE DULCINEIA SILVA

**ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS E MOLECULARES DO DESENVOLVIMENTO  
*in vitro* DE *Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN INFLUENCIADOS PELA LUZ**

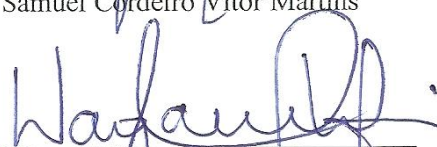
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 18 de fevereiro de 2019.

  
\_\_\_\_\_  
Diego Ismael Rocha

  
\_\_\_\_\_  
Diego Silva Batista  
(Coorientador)

  
\_\_\_\_\_  
Samuel Cordeiro Vitor Martins

  
\_\_\_\_\_  
Wagner Campos Otoni  
(Orientador)

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Terezinha e João, e aos meus irmãos Cláudia, Eliane e Gilberto, pelo apoio, incentivo e por tudo que representam na minha vida. E, também, dedico a meu noivo, Thiago, que passou a fazer parte da minha vida e compartilhar meus sonhos. Durante todos esses anos juntos, foi e é uma fonte inesgotável de amor, carinho e compreensão, nunca medindo esforços para me ajudar e apoiar. Só tenho a agradecer a Deus por ter vocês em minha vida, amo muito todos vocês.

*Nada é tão nosso quanto nossos sonhos.*

Friedrich Nietzsche

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todas as bênçãos e por todos os dias dar sentido à minha vida.

Aos meus pais, Terezinha e João, por tudo o que fizeram e continuam fazendo todos os dias, por caminharem ao meu lado e por me oferecerem tantas coisas. Por me amarem e por me ensinarem a ser quem eu sou hoje.

Aos meus irmãos Cláudia, Eliane e Gilberto. Gratidão pelo apoio de todos os dias e por terem vocês na minha vida.

Ao meu noivo, Thiago, que esteve ao meu lado em todos os momentos. Agradeço a Deus por ter colocado você na minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Biologia Vegetal (DBV) e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de crescimento profissional.

Aos professores do departamento de Biologia Vegetal, pelas disciplinas oferecidas, que contribuíram de forma valiosa para o meu aprendizado.

Ao meu querido orientador Wagner Otoni. Por cada palavra de sabedoria, por cada lição, cada conselho, pela confiança depositada, por acreditar e me incentivar, pela amizade, respeito, e principalmente por ser meu maior exemplo de profissional.

Ao Diego Batista, que foi muito mais que um coorientador, um grande amigo que me ajudou com muito zelo e paciência em todos os momentos da execução deste trabalho. Meu muito obrigada!

Aos professores Diego Rocha e Samuel Martins, por aceitarem tão prontamente meu pedido para participarem como membros da banca.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos II, especialmente à Kamila Motta, Evandro Fortini, Sérgio Heitor, Raysa Mayara, Amanda Mendes e Victor Siqueira, cujo trabalho e colaboração foram fundamentais para a realização desse trabalho, sem vocês esse trabalho teria sido inviável. À Ludmila Nayara pela ajuda nas análises moleculares. Ao Kristhiano Chagas, meu querido “chefinho” e mentor, meu muito obrigada por todos ensinamentos, sem dúvidas você contribuiu para meu crescimento profissional e pessoal. À Eliza Louback e Gabriela Torres, que me ensinaram tudo que eu sei sobre análises

anatômicas. À Anyela, Ana Cláudia, Daniele, Débora, Lorena, Lili, Márcia, Wellington e aos demais amigos do laboratório pelo bom convívio, seja nos momentos de trabalho ou nas sempre animadas conversas na hora do café

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal (DBV/UFV), em especial Aurora e Rosana, queridas técnicas, sempre dispostas a ajudar.

Ao Laboratório de Biodiversidade (DBB/UFV), especialmente à Letícia Faria pela análise quantitativa de 20E.

A todos os funcionários, professores e colegas que de alguma forma contribuíram para minha formação acadêmica e profissional e a todos que de alguma forma colaboraram para a conclusão deste trabalho, o meu mais sincero MUITO OBRIGADO!

## **BIOGRAFIA**

TATIANE DULCINEIA SILVA, filha de João Nicolau da Silva e Terezinha Martins Campos Silva, nasceu em Viçosa-MG, no dia 16 de setembro de 1991. Concluiu o curso de Bacharel em Ciências Biológicas em 2017, pela Universidade Federal de Viçosa. No mesmo ano ingressou no Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa, em nível de Mestrado, submetendo-se à defesa de dissertação em 18/02/2019.

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	viii
<b>Abstract</b> .....	x
<b>Introdução Geral</b> .....	1
<b>Referências</b> .....	4
<b>CAPÍTULO I</b> .....	9
<b>Resumo</b> .....	9
<b>Abstract</b> .....	11
<b>Introdução</b> .....	12
<b>Metodologia</b> .....	15
Crescimento das plantas e desenho experimental.....	15
Parâmetros avaliados.....	15
Variáveis de crescimento.....	15
Determinação do conteúdo de pigmentos.....	16
Determinação da atividade fotossintética e fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	16
Quantificação dos carboidratos, amido, proteína e níveis de aminoácidos.....	17
Determinação da atividade das enzimas do estresse oxidativo .....	17
Determinação do teor de 20-hidroxicidisona.....	18
Caracterização morfoanatômica.....	18
Análise estrutural .....	18
Análise histoquímica da parede.....	18
Determinação da densidade estomática.....	19
Extração de RNA, síntese de cDNA e análise de expressão gênica por RT-qPCR.....	19
Análises estatísticas.....	20
<b>Resultados</b> .....	21
<b>Discussão</b> .....	26
<b>Referências</b> .....	31
<b>Tabelas</b> .....	41
<b>Figuras</b> .....	42
<b>CAPÍTULO II</b> .....	55
<b>Resumo</b> .....	55
<b>Abstract</b> .....	57
<b>Introdução</b> .....	58
<b>Metodologia</b> .....	61
Crescimento das plantas e desenho experimental.....	61
Parâmetros avaliados.....	61
Variáveis de crescimento.....	61
Determinação do conteúdo de pigmentos.....	62
Determinação da atividade fotossintética e fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	62
Quantificação dos carboidratos, amido, proteína e níveis de aminoácidos.....	63

Ensaio enzimático .....	63
Determinação do teor de 20-hidroxicedisona.....	64
Extração de RNA, síntese de cDNA e análise de expressão gênica por RT-qPCR.....	64
Caracterização morfoanatômica.....	64
Análise estrutural.....	64
Análise histoquímica da parede.....	65
Determinação da densidade estomática.....	65
Análises estatísticas.....	65
<b>Resultados.....</b>	<b>66</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>71</b>
<b>Referências.....</b>	<b>76</b>
<b>Tabelas.....</b>	<b>86</b>
<b>Figuras.....</b>	<b>87</b>
<b>Conclusão Geral .....</b>	<b>100</b>

## RESUMO

SILVA, Tatiane Dulcineia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Aspectos morfofisiológicos e moleculares do desenvolvimento *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen influenciado pela luz.** Orientador: Wagner Campos Otoni. Coorientador: Diego Silva Batista.

A *Pfaffia glomerata* apresenta potenciais propriedades farmacológicas e medicinais, como anabolizante, analgésica, anti-inflamatória, antimutagênica, afrodisíaca, sedativa, antidiabética e de tônico muscular. As propriedades nessa espécie se devem principalmente à produção de um metabólito secundário, o fitoecdisteroide 20-hidroxiecdisona (20E). Contudo sua via biossintética e suas funções em plantas ainda não estão totalmente elucidadas. A luz (qualidade e quantidade) afeta inúmeros processos morfofisiológicos em plantas cultivadas *in vitro*, como crescimento e desenvolvimento, fotossíntese, morfogênese, produção de metabólitos secundários, entre outros. Diante disso, objetivou-se avaliar a influência da qualidade e quantidade de luz na morfofisiologia e na produção de 20E em dois acessos (Ac 22 e Ac 43) de *Pfaffia glomerata* cultivadas *in vitro*. Para tal, foram executados dois experimentos. Primeiro foi analisado a influência de diferentes níveis de irradiâncias ( $65$ ,  $130$  e  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e segundo a influência de diferentes proporções de vermelho (V) e azul (A) (1V:1A; 1V:3A e 3V:1A). Em ambos os experimentos foram utilizados explantes com um segmento nodal, os quais foram inoculados meio de Murashige e Skoog (MS) sem adição de fitorreguladores, sendo as culturas foram mantidas a  $25 \pm 2 \text{ }^\circ \text{C}$  e sob fotoperíodo de 16 h de luz. Observou-se que tanto a quantidade, quanto a qualidade da luz no cultivo *in vitro* de *Pfaffia glomerata* alteram o teor e a produção de 20E. No entanto, não houve relação direta do conteúdo de 20E com a expressão relativa do gene *Phantom*, envolvido possivelmente na biossíntese de 20E. Além disso, as características morfofisiológicas, assim como a produção de 20E, se mostraram genótipo-dependentes em ambos os experimentos. O aumento da irradiância promove o crescimento e o desenvolvimento *in vitro* de *P. glomerata*, aumentando também a eficiência fotossintética, o que refletiu no maior acúmulo de biomassa nas plantas. A qualidade de luz também leva a modificações na morfofisiologia de *P. glomerata* cultivada *in vitro*. Visto que, a qualidade espectral 1V:3A influenciou na eficiência fotossintética e na atividade das enzimas do estresse oxidativo. Já a igual proporção de luz (1V:1A) favoreceu o desenvolvimento morfoanatômico das plantas e a produção de 20E. Este trabalho fornece novas perspectivas a respeito dos efeitos da luz no ambiente *in vitro* e pode

auxiliar na otimização de protocolos de bioprospecção e propagação em larga escala de 20E em *P. glomerata*.

## ABSTRACT

SILVA, Tatiane Dulcinea, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Morphophysiological and molecular aspects of the *in vitro* development of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen as influenced by light.** Adviser: Wagner Campos Otoni. Co-Adviser: Diego Silva Batista.

*Pfaffia glomerata* has potential pharmacological and medicinal properties, such as anabolic, analgesic, anti-inflammatory, antimutagenic, aphrodisiac, sedative, antidiabetic and muscle tonics. The properties in this species are mainly due to the production of a secondary metabolite, the phytoecdysteroid 20-hydroxyecysone (20E). However its biosynthetic pathway and its functions in plants are not yet fully elucidated. Light (quality and quantity) affects numerous morphophysiological processes in plants grown *in vitro*, such as growth and development, photosynthesis, morphogenesis, production of secondary metabolites and others. The aim of this study was to evaluate the influence of quality and quantity of light on morphophysiology and 20E production in two accessions (Ac22 and Ac43) of *Pfaffia glomerata* grown *in vitro*. For this, two experiments were performed. In the first experiment, the influence of different levels of irradiance (65, 130 and 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and in second experiment different proportions of red (R) and blue (B) LED lights (1R:1B; 1R:3B and 3R:1B) in two accessions (Ac22 and Ac43) of *P. glomerata* were evaluated. In both experiments explants with a single nodal segment were used. The explants were cultured in Murashige and Skoog (MS) medium lacking phytohormones and the cultures were maintained at  $25 \pm 2$  °C and photoperiod of 16 h of light. We observed that both the amount and the quality of light in the *in vitro* culture of *Pfaffia glomerata* alter the content and the production of 20E. However, there was no direct relationship of the 20E content with the relative expression of the *Phantom* gene, possibly involved in 20E biosynthesis. In addition, the morphophysiological characteristics as well as the production of 20E were shown to be genotype-dependent in both experiments. The increase in irradiance levels promotes the *in vitro* growth and development of *P. glomerata*, also increasing the photosynthetic efficiency, which reflected into a greater accumulation of biomass in the plants. The light quality also leads to modifications in the morphology of *P. glomerata* cultivated *in vitro*. Remarkably, the spectral quality 1R:3B influenced the photosynthetic efficiency and the activity of oxidative stress enzymes, whereas the proportion of light (1R:1B) favored the morphoanatomic development of the plants and the production of 20E. This work provides new perspectives

on the effects of light in the *in vitro* environment and may aid in the optimization of bioprospecting protocols and large-scale propagation of 20E in *P. glomerata*.

## INTRODUÇÃO GERAL

A família Amaranthaceae possui ampla distribuição, incluindo aproximadamente 170 gêneros e 2000 espécies. No Brasil ocorrem 20 gêneros nativos e estima-se a ocorrência de 100 espécies (Souza & Lorenzi, 2005), é encontrado em quase todas as regiões do país, sendo planta típica de vegetação ciliar e de campos de inundação de rios (Marchioretto, 2015). Dentre as plantas do gênero *Pfaffia*, a *Pfaffia glomerata*, conhecida como fáfia, ginseng-do-pantanal ou ginseng-brasileiro, tem se destacado sendo considerada sucessora do ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer.) (Nascimento et al., 2007).

*P. glomerata* é amplamente utilizada na medicina tradicional. Estudos farmacológicos evidenciaram resultados positivos no combate de problemas gástricos (Freitas et al., 2004; Mazzeo et al., 2013); ação tônica e rejuvenescedora (Lorenzi, 2002); ação anti-inflamatória e analgésica (Neto et al., 2005); anti-oxidante (Souza et al., 2005); ação antimicrobiana como adjuvante no controle da cárie dentária (Moura et al., 2011). Além disso, a *P. glomerata* é considerada uma espécie promissora para o tratamento do câncer, devido seus efeitos aneugênicos e clastogênicos (Neves et al., 2016).

As propriedades medicinais de *P. glomerata* podem ser atribuídas aos compostos ácido glomérico, ácido pfamérico, rubrosterona, 20-hidroxiecdisona (20E), ecdisterona e  $\beta$ -D glucopiranosil oleato (Shiobara et al., 1993), frutanos inulínicos (Caleffi et al., 2015), ou até mesmo a combinação desses fitoquímicos (Festucci-Buselli et al., 2008a). Dentre esses compostos, o 20E é o encontrado em maiores teores em *P. glomerata* (Schmelz et al., 1998; Dinan, 2001). O 20E é um composto análogo ao hormônio da ecdise de insetos sendo que este é produzido apenas por algumas espécies de plantas (Festucci-Buselli et al., 2008b; Dinan et al., 2009). A função mais aceita do 20E em plantas é que este atua como composto protetor contra insetos fitófagos não-adaptados (Lafont, 1997; Festucci-Buselli et al., 2008a), afetando o desenvolvimento larval de insetos, antecipando o processo de ecdise e ocasionando a morte das larvas no momento em que se alimentam de plantas produtoras desse metabólito (Mondy et al., 1997; Blackford, 1997; Schmelz et al., 2002; Rharrabe et al., 2009; Rharrabe et al., 2010).

A produção de 20E pode ser modulada pelas condições de cultivo de *P. glomerata*. Iarema et al. (2012), por exemplo, demonstraram que o sistema fotoautotrófico promoveu o aumento do conteúdo de 20E em *P. glomerata*. Além disso, em estudo realizado por Saldanha et al. (2013) revelou-se que a atmosfera enriquecida em CO<sub>2</sub> (720  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ) contribui para o maior acúmulo de biomassa e maiores níveis de 20E em *P. glomerata*. Isto

sugere que o sistema fotoautotrófico com enriquecimento de CO<sub>2</sub> pode ser adequado para a propagação em larga escala desta espécie. Corrêa et al. (2015) analisaram a produção *in vitro* de 20E em seis acessos de *P. glomerata* (Ac4, Ac13, Ac22, Ac43, Ac57 e Ac58), mostrando uma variação na produção deste composto entre diferentes acessos e órgãos. Dentre estes, dois acessos (Ac4 e Ac43) apresentaram maior concentração total de 20E, tendo o Ac4 apresentado maior conteúdo no sistema radicular e o Ac43 nas folhas.

Apesar do potencial farmacológico de 20E, sua rota biossintética não é totalmente elucidada e seu papel pouco compreendido (Festucci-Buselli et al., 2008a; Ohyama et al., 2009; Boo et al., 2013; Tsukagoshi et al., 2016; Thussagunpanit et al., 2017) apesar de alguns estudos já terem demonstrado genes candidatos associados a produção de 20E. Recentemente Batista et al. (2018b) realizaram o sequenciamento *de novo* do transcriptoma da *P. glomerata*, evidenciaram em *P. glomerata* sob condições fotoautotróficas o aumento da concentração de 20E e da expressão do gene *Phantom (CYP76C)*, indicando um possível envolvimento na síntese do 20E.

A luz é um dos fatores ambientais mais importantes para o crescimento da planta, pois é a fonte primária de energia. No cultivo *in vitro* é possível alterar a condição de luz, com a qualidade (diferentes comprimentos de onda), quantidade (fluxo de fótons) e duração da luz (fotoperíodo) (Batista et al., 2018a). A luz influencia o crescimento, fotossíntese, desenvolvimento dos estômatos, morfogênese, produção de metabólitos secundários e outros processos fisiológicos nas plantas (Lee et al., 2007; Saez et al., 2013; Wang et al., 2016; He et al., 2017; Mamedes-Rodrigues et al., 2018). Embora a importância da condição de luz para as respostas morfogenéticas das plantas, os efeitos da irradiância e da qualidade espectral na morfogênese de plantas *in vitro* ainda não são bem elucidados (Batista et al., 2018a).

Apesar da importância da luz para a fisiologia e morfologia das plantas, até o presente momento não foram realizados estudos sobre a influência da qualidade e quantidade de luz nas respostas morfofisiológicas e na produção de 20E em *P. glomerata*. Diante da importância farmacológica dessa espécie, objetivou-se avaliar a influência da qualidade e quantidade de luz no desenvolvimento *in vitro* de *P. glomerata* e produção de 20-hidroxiecdisona (20E). Esse trabalho foi subdividido em dois capítulos. No capítulo I intitulado ‘Influência da intensidade de luminosa na morfofisiologia *in vitro* e biossíntese de 20-hidroxiecdisona em acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen’ foi analisada a influência de diferentes níveis de irradiâncias. No capítulo II intitulado ‘O balanço entre as luzes azul e vermelho afeta a morfogênese e o conteúdo de 20-hidroxiecdisona em acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen *in vitro*’ avaliou-se a influência de diferentes

proporções de luzes LEDs vermelho e azul em acessos de *P. glomerata*.

## REFERÊNCIAS

- Batista DS, Dias LLC, Rêgo MMD, Saldanha CW, Otoni WC (2017) Flask sealing on *in vitro* seed germination and morphogenesis of two types of ornamental pepper explants. *Cienc Rural* 47:1–6
- Batista DS, Felipe SHS, Silva TD, Castro KMD, Mamedes-Rodrigues TC, Miranda NA, Ríos-Ríos AM, Faria DV, Fortini EA, Chagas K, Torres-Silva G, Xavier A, Arencibia AD, Otoni WC (2018a) Light quality in plant tissue culture: does it matter? *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 54:195–215
- Batista DS, Koehler AD, Romanel E, de Souza VC, Silva TD, Almeida MC, Maciel TEF, Ferreira PRB, Felipe SHS, Saldanha CW, Maldaner J, Dias LLC, Festucci-Buselli RA, Otoni WC (2018b) *De novo* assembly and transcriptome of *Pfaffia glomerata* uncovers the role of photoautotrophy and the P450 family genes in 20-hydroxyecdysone production. *Protoplasma* 1-14. DOI: 10.1007/s00709-018-1322-1
- Blackford MJP, Dinan L (1997) The effects of ingested 20-hydroxyecdysone on the larvae of *Aglais urticae*, *Inachis io*, *Cynthia cardui* (Lepidoptera: Nymphalidae) and *Tyria jacobaeae* (Lepidoptera: Arctiidae). *J Insect Physiol* 43:315–327
- Boo KH, Lee D, Nguyen QV, Jin SB, Kang S, Viet CD, Park SP, Lee DS, Riu KZ (2013) Fluctuation of 20-hydroxyecdysone in individual organs of *Achyranthes japonica* during reproductive growth stage and its accumulation into seed. *J Kor Appl Biol Chem* 56:335–338
- Carvalho MDJDS, Souza ADS, Santos EB, Soares Filho WDS, Ledo CADS, Souza FVD (2016) Univariate and multivariate statistical tools for *in vitro* conservation of citrus genotypes. *Acta Sci Agron* 38:129–137
- Caleffi ER, Krausová G, Hyršlová I, Paredes LLR, dos Santos MM, Sasaki GL, Gonçalves RAC, de Oliveira AJB (2015) Isolation and prebiotic activity of inulin-type fructan extracted from *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen roots. *Int J Biol Macromol* 80: 392-399
- Corrêa JPO, Vital CE, Pinheiro MVM, Batista DS, Azevedo JFL, Saldanha CW, Otoni WC (2015) *In vitro* photoautotrophic potential and *ex vitro* photosynthetic competence of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen accessions. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 121:289–300
- Dinan L (2001) Phytoecdysteroids: biological aspects. *Phytochemistry* 57:325–339
- Dinan L, Harmatha J, Volodin V, Lafont R (2009) Phytoecdysteroids: diversity, biosynthesis and distribution. In: *Ecdysone: Structures and Functions*. Netherlands 3–45 p
- Esserti S, Faize M, Rifai LA, Smaili A, Belfaiza M, Faize L, Albuquerque N, Burgos L, Koussa T, Makroum K. (2017) Media derived from brown seaweeds *Cystoseira myriophylloides* and *Fucus spiralis* for *in vitro* plant tissue culture. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 128:437–446
- Festucci-Buselli RA, Contim LAS, Barbosa LCA, Stuart JJ, Otoni WC (2008a) Biosynthesis and potential functions of the ecdysteroid 20-hydroxyecdysone – a review. *Botany* 86:978–987

- Festucci-Buselli RA, Contim LAS, Barbosa LCA, Stuart J, Otoni WC (2008b) Level and distribution of 20-hydroxyecdysone during *Pfaffia glomerata* development. *Braz J Plant Physiol* 20:305–311
- Freitas CS, Baggio CH, Da Silva-Santos JE, Rieck L, De Moraes Santos CA, Correa JRC, Ming LC, Cortez DAG, Marques MCA (2004) Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of an aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. *Life Sci* 74:1167–1179
- Gentile A, Frattarelli A, Nota P, Condello E, Caboni E (2017) The aromatic cytokinin metatopolin promotes *in vitro* propagation, shoot quality and micrografting in *Corylus colurna* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 128:693–703
- Guo B, He W, Zhao Y, Wu Y, Fu Y, Guo J, Wei Y (2017) Changes in endogenous hormones and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> burst during shoot organogenesis in TDZ-treated *Saussurea involucre* explants. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 128:1–8
- He J, Qin L, Chong EL, Choong TW, Lee SK (2017) Plant growth and photosynthetic characteristics of *Mesembryanthemum crystallinum* grown aeroponically under different blue- and red-LEDs. *Front Plant Sci* 8:361
- Hung CD, Hong CH, Kim SK, Lee KH, Park JY, Nam MW, Choi DH, Lee HI (2016) LED light for *in vitro* and *ex vitro* efficient growth of economically important highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Acta Physiol Plant* 38:1
- Iarema L, Da Cruz ACF, Saldanha CW, Dias LLC, Vieira RF, Oliveira EJ, Otoni WC (2012) Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 110:227–238
- Kamada T (2006) Avaliação da diversidade genética de populações de fáfia (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) por RAPD, caracteres morfológicos e teor de betaecdisona. (Tese de Doutorado em Genética e Melhoramento) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 191p.)
- Lafont R (1997) Ecdysteroids and related molecules in animals and plants. *Arch Insect Biochem Physiol* 35:3–20
- Lee SH, Tewari RK, Hahn EJ, Paek KY (2007) Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania somnifera* (L.) Dunal plantlets. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 90:141–151
- Lembrechts R, Ceusters N, Maurice P, Ceusters J (2017) Sugar and starch dynamics in the medium-root-leaf system indicate possibilities to optimize plant tissue culture. *Sci Hortic* 224:226–231
- Lorenzi H, Matos FJA (2002) Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum

Mamedes-Rodrigues TC, Batista DS, Napoleão TA, Cruz ACF, Fortini EA, Nogueira FTS, Romanel E, Otoni WC (2018) Lignin and cellulose synthesis and antioxidative defense mechanisms are affected by light quality in *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 133:1–14

Marchioretto MS (2015) *Pfaffia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4330>>

Mazzeo GCCS, Cortez FS, Pusceddu FH, Santos AR, Guimarães LL, Amaral FP, Silva MPO, Toma W (2013) Avaliação da atividade antiulcerogênica e ecotoxicológica do extrato hidroalcoólico 70% obtido a partir das folhas de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen (Amaranthaceae). *UNISANTA BioSci* 2:75–80

Mondy N, Caissa C, Pitoizet N, Delbecque JP, Corio-Costet MF (1997) Effects of the ingestion of *Serratula tinctoria* extracts, a plant containing phytoecdysteroids, on the development of the vineyard pest *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Arch Insect Biochem Physiol* 35:227–235

Moura CL, Casemiro LA, Martins CHG, Cunha WR, Silva MLA, Cury AHV (2011) Evaluation of the antimicrobial activity of the plant species *Pfaffia glomerata* against oral pathogens. *Rev Invest* 11:24–28

Muneer S, Park YG, Jeong BR (2017) Red and blue Light Emitting Diodes (LEDs) participate in mitigation of hyperhydricity in *in vitro*-grown carnation genotypes (*Dianthus caryophyllus*). *J Plant Growth Regul* 1–10

Nascimento EX, Mota JH, Carmo Vieira M, Zárate NAH (2007) Produção de biomassa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Plantago major* L. em cultivo solteiro e consorciado. *Ciênc Agrotecnol* 31:724–730

Neto AG, Costa JMLC, Belati C, Vinholis AHC, Possebom LS, Da Silva Filho AA, Cunha WR, Carvalho JCT, Bastos JK, Silva MLA (2005) Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. *J Ethnopharmacol* 96:87–91

Neves CS, Gomes SSL, dos Santos TR, de Almeida MM, de Souza YO, Garcia RMG, Otoni WC, Raposo NBR, Viccini LF, Campos, JMS (2016) “Brazilian ginseng” (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen, Amaranthaceae) methanolic extract: cytogenotoxicity in animal and plant assays. *South Afr J Bot* 106:174–180

Oliveira C, Degenhardt-Goldbach J, França Bettencourt GM, Amano E, Franciscon L, Quoirin M (2017) Micropropagation of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* AEC 224 clone. *J For Res* 28:29–39

Ohyama K, Suzuki M, Kikuchi J, Saito K, Muranaka T (2009) Dual biosynthetic pathways to phytosterol via cycloartenol and lanosterol in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:725–730

Ozudogru EA, Benelli C, Dradi G, Lambardi M (2017) Effect of culture container and carbohydrate content on *in vitro* slow growth storage of the cherry rootstock ‘Gisela® 5’. *Acta Physiol Plant* 39:94

- Rharrabe K, Bouayad N, Sayah F (2009) Effects of ingested 20-hydroxyecdysone on development and midgut epithelial cells of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera, Pyralidae). *Pestic Biochem Physiol* 93:112–119
- Rharrabe K, Sayan F, Lafont R (2010) Dietary effects of four phytoecdysteroids on growth and development of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *J Insect Sci* 10:13
- Sáez PL, Bravo LA, Latsague MI, Toneatti MJ, Sánchez-Olate M, Ríos DG (2013) Light energy management in micropropagated plants of *Castanea sativa*, effects of photoinhibition. *Plant Sci* 201:12–24
- Saldanha CW, Otoni CG, Notini MM, Kuki KN, DA Cruz ACF, Neto AR, Otoni WC (2013) A CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere improves *in vitro* growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 49:433–444
- Schmelz EA, Grebenok RJ, Galbraith DW, Bowers WS (1998) Damage-induced accumulation of phytoecdysteroids in spinach: A rapid root response involving the octadecanoic acid pathway. *J Chem Ecol* 24:339–360
- Schmelz EA, Grebenok RJ, Ohnmeiss TE, Bowers WS (2002) Interactions between *Spinacia oleracea* and *Bradysia impatiens*: a role for phytoecdysteroids. *Arch Insect Biochem Physiol* 51:204–221
- Shiobara Y, Inque SS, Keato K, Nishigushi Y, Oishi Y, Nishimito N, Oliveira F, Aksue G, Akisue MK, Hashimoto GA (1993) A nortriterpenoid, triterpenoid and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. *Phytochemistry* 32:1527–1530
- Silva ST, Bertolucci SKV, Cunha SHB, Lazzarini LES, Tavares MC, Pinto JEBP (2017) Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 129:501–510
- Silva TD, Chagas K, Batista DS, Felipe SHS, Louback E, Machado LT, Fernandes AM, Buttrós VHT, Koehler AD, Farias LM, Santos AF, Otoni WC (2019) Morpho-physiological *in vitro* performance of Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] as affected by culture media formulations. *In Vitro Cell Dev Biol Plant (Aceito para publicação)*
- Souza Daniel JF, Alves KZ, Silva Jacques D, Silva e Souza PV, Carvalho MG, Freire RB, Ferreira DT, FREIRE MFI (2005) Free radical scavenging activity of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). *Indian J Pharmacol* 37:174
- Souza VC, Lorenzi H (2005) Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p:220–223
- Thussagunpanit J, Jutamane K, Homvisasevongsa S, Suksamrarn A, Yamagami A, Nakano T, Asami T (2017) Characterization of synthetic ecdysteroid analogues as functional mimics of brassinosteroids in plant growth. *J Steroid Biochem Mol Biol* 172:1–8

Tsukagoshi Y, Ohyama K, Seki H, Akashi T, Muranaka T, Suzuki H, Fujimoto Y (2016) Functional characterization of CYP71D443, a cytochrome P450 catalyzing C-22 hydroxylation in the 20-hydroxyecdysone biosynthesis of *Ajuga hairy* roots. *Phytochemistry* 127:23–28

Wang T, Tian X-R, Wu X-Y, Luo Z, Li G, Peng X-L, Liu S-B (2018) Effect of light quality on total gypenosides accumulation and related key enzyme gene expression in *Gynostemma pentaphyllum*. *Chin Herb Med* 10:34–39

## CAPITULO I

### INFLUÊNCIA DA INTENSIDADE DE LUMINOSA NA MORFOFISIOLOGIA *in vitro* E BIOSÍNTESE DE 20-HIDROXIECDISONA EM ACESSOS DE *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen

#### RESUMO

*Pfaffia glomerata* apresenta potenciais propriedades farmacológicas e medicinais devido, principalmente, à produção de 20-hidroxicadisona (20E). Portanto, a oferta de matéria-prima, em qualidade e quantidade é fundamental para atender a demanda da indústria. Objetivou-se avaliar a influência da quantidade de luz na morfofisiologia e na produção de 20E em *P. glomerata in vitro*. Segmentos nodais dos acessos 22 e 43 (Ac22 e Ac 43) de *P. glomerata*, foram inoculados em meio de cultura constituído pelos sais e vitaminas MS. As culturas foram mantidas a  $25 \pm 2$  °C e fotoperíodo de 16 h, sob irradiâncias de 65, 130 e 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , de acordo com cada tratamento, fornecidas por lâmpadas fluorescentes. As plantas de ambos os acessos de *P. glomerata* cultivadas *in vitro* sob 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  obtiveram maior teor ( $\text{mg g}^{-1}$ ) e produção por frasco (mg) de 20E, sendo que as plantas do Ac22 apresentaram o dobro do que as plantas do Ac43. Houve aumento da taxa fotossintética com aumento da irradiância, o que acarretou no maior acúmulo de biomassa nas plantas sob 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Tanto os compostos do estresse oxidativo não enzimáticos (carotenoides e antocianinas), quanto os enzimáticos (SOD, CAT, APX e POD) apresentaram baixos valores nas plantas cultivadas na maior irradiância. Com aumento da intensidade de luz, também houve maior investimento nos parênquimas clorofilianos e nos tecidos de suporte e transporte de água. Os diferentes níveis de irradiância não influenciaram na expressão relativa dos genes *PgCAD*, *PgCOMT*, *PgCCoAOMT*, *PgCCR* e *PgC4H* da via biossintética da lignina. Além disso, não houve correlação direta da expressão do gene *Phantom* com o conteúdo de 20E em alta irradiância. Conclui-se que o crescimento e o desenvolvimento das plantas de *P. glomerata* são influenciados pelo aumento da irradiância. Além disso, plantas de *P. glomerata* do Ac22 cultivadas sob 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradiância aumentaram significativamente sua produção de 20E (mais de 10 vezes em comparação com tratamento sob 65  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), demonstrando a influência da quantidade de luz na produção desse metabólito.

**Palavras-chave:** Ginseng-brasileiro, fatores abióticos, irradiância, metabolismo secundário, plantas medicinais.

## ABSTRACT

*Pfaffia glomerata* has presents potential pharmacological and medicinal properties, mainly due to the secondary metabolite 20-hydroxyecysone (20E). Therefore, the supply of raw material in quality and quantity is fundamental to meet the demand of the industry. This study aimed at evaluating the influence of the amount of light on morphology and the production of 20E in *P. glomerata in vitro*. Nodal segments of *P. glomerata* accessions 22 and 43 (Ac22 and Ac 43) were inoculated in culture medium consisting of MS salts and vitamins. Cultures were maintained at  $25 \pm 2$  ° C and 16 h-photoperiod, under irradiances of 65, 130 and 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , according to each treatment, provided by fluorescent lamps. The plants of both accessions of *P. glomerata* grown *in vitro* under 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  obtained higher content ( $\text{mg g}^{-1}$ ) and production per bottle (mg) of 20E, and the plants of Ac22 showed double than the Ac43 plants. There was an increase of the photosynthetic rate with increase of the irradiance, which resulted in greater accumulation of biomass in the plants under 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Both the non-enzymatic (carotenoids and anthocyanins) and enzymatic oxidative stress compounds (SOD, CAT, APX and POD) presented low values in plants grown at the highest irradiance. With increased light intensity, there was also greater investment in chlorophyllic parenchyma and in tissues supporting and transporting water. The different levels of irradiance did not influence the relative expression of the *PgCAD*, *PgCOMT*, *PgCCoAOMT*, *PgCCR* and *PgC4H* genes of the lignin biosynthetic pathway. In addition, there was no direct correlation of *Phantom* gene expression with 20E content at high irradiance. It is concluded that the growth and development of *P. glomerata* plants are influenced by the increase in irradiance. In addition, *P. glomerata* plants from Ac22 cultivated under 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  irradiance significantly increased their yield of 20E (more than 10 times compared with treatment under 65  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), demonstrating the influence of the amount of light in the production of this metabolite.

**Key words:** Ginseng-Brazilian, abiotic factors, irradiance, secondary metabolism, medicinal plants.

## INTRODUÇÃO

O crescimento e desenvolvimento das plantas são modulados por fatores ambientais que afetam a morfogênese. A luz é um dos principais fatores abióticos pois é fonte primária de energia para a fotossíntese (Barber 2009; Kozai 2016). A fotossíntese é um processo foto-bioquímico no qual as plantas usam energia da luz para converter dióxido de carbono e água em moléculas orgânicas (Blankenship et al., 2011; Guanter et al., 2014; Romero et al., 2017). Embora a importância da condição de luz para as respostas morfogenéticas das plantas, os efeitos da qualidade e especialmente da quantidade de luz no ambiente *in vitro* ainda não são bem elucidados (Batista et al., 2018a).

Na cultura de células e tecidos vegetais é possível alterar a condição de luz, como a duração (fotoperíodo), qualidade (diferentes comprimentos de onda) e quantidade (irradiância). A alta irradiância pode afetar parâmetros estruturais e funcionais nas plantas, como taxa fotossintética, acúmulo de biomassa, área foliar específica, teor de clorofilas e carotenoides (Tripathi & Raghubanshi, 2014, Costa et al., 2015; Rooijen et al., 2015; Zhang et al., 2015; Sánchez-Sánchez et al., 2018).

A exposição das folhas à luz acima da capacidade de utilização resulta frequentemente num declínio da atividade do processo fotossintético, evento esse denominado fotoinibição. A fotoinibição ocorre independentemente de danos mecânicos, mas não inclui reduções transitórias que são rapidamente reversíveis e provavelmente refletirão a regulação de curto prazo (fotoinibição dinâmica) (Powles, 1984; Björkman, 1987). Por outro lado, a fotoinibição crônica resulta na danificação do sistema fotossintético, o que diminui a eficiência quântica e a taxa fotossintética máxima (Werner et al., 2002; Míguez et al., 2015 e 2017; Solhaug, 2018).

O estresse por alta irradiância pode resultar no acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e dano foto-oxidativo do aparato fotossintético. A proteção contra os danos oxidativos ocorre com auxílio dos carotenoides e da via metabólica das EROs, em função da maior atividade do sistema antioxidante (Apel & Hirt, 2004; Zhao & Tan, 2005; Gill & Tuteja, 2010; Choudhury et al., 2017). Esse sistema é constituído pelas chamadas enzimas antioxidantes (e.g., dismutase de superóxido (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidases (APX) e glutatona redutase (GSR), além da atividade de moléculas antioxidantes hidrofílicas (e.g., ascorbato e glutatona) e lipofílicas (e.g.,  $\beta$ -caroteno, carotenoides e vitamina E) (Demmig-Adams, 1992; Arora et al., 2002; Ort & Baker, 2002; Brunetti et al., 2015). A proteção contra excesso de irradiância também pode decorrer de respostas morfoanatômicas,

como alteração do ângulo de orientação foliar, espessura e localização dos parênquimas clorofilianos, densidade de venação, espessura da cutícula, produção de tricomas, densidade estomática, deposição de parede celular, entre outras (Larbi et al., 2015; Scoffoni et al., 2015; Fini et al., 2016; Peguero-Pina et al., 2017; Mamedes-Rodrigues et al., 2018).

É notório que alta irradiância pode promover impactos negativos nas plantas, bem como mudanças na morfologia, fisiologia e crescimento. Já em plantas de *Alocasia amazonica* regeneradas *in vitro* sob densidade de fluxo fotônicos de 15 ou 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  apresentaram melhor crescimento e desenvolvimento do que aquelas cultivadas sob irradiâncias mais elevadas (Jo et al., 2008). Contudo, algumas espécies apresentam plasticidade fenotípica que garantem bom desenvolvimento em elevadas irradiâncias. No cultivo de plantas jovens de tomateiro o valor de 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foi considerado ideal para essa espécie, pois foi o que proporcionou a maior taxa fotossintética (Fan et al., 2013). De forma similar, plantas de rabanete-cereja cultivadas nessa mesma irradiância, apresentaram maior incremento da razão raiz/parte aérea (Zha & Liu, 2018). No cultivo *in vitro* de duas orquídeas (*Phaius* spp. e *Vanda* spp.), o valor de 74  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foi considerado ideal para essas espécies (Soontornchainaksaeng et al. 2001). Já na propagação *in vitro* de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), o aumento de 29 para 369  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  induziu mais que o dobro da massa fresca e seca (Jorge et al., 2000). Resultados semelhantes foram observados em plantas micropropagadas de *Acer saccharum* Marsh (Singh et al., 2017). Esses resultados mostram que a quantidade de luz pode induzir maior assimilação de carbono, o que reflete no acúmulo de biomassa.

Além disso, a irradiância pode influenciar no metabolismo secundário das plantas, seja pela maior disponibilidade de esqueletos de carbono destinado para investimento desses compostos ou pela sua indução causada por estresse. Alvarenga et al. (2015) observaram na cultura *in vitro* de *Achillea millefolium* que a classe de monoterpenos era favorecida por maiores irradiâncias, e sesquiterpenos por menores irradiâncias. Vários estudos demonstram a influência da luz na produção de metabólitos secundários em plantas cultivadas *in vitro* (Batista et al., 2016; Li et al., 2017; Bach et al., 2018; Cioć et al., 2018; Khan et al., 2018; Kitazaki et al., 2018; Szopa et al., 2018; Tokarz et al., 2018), porém até o presente momento não há estudos sobre o efeito da irradiância sobre fitoecdisteroides (p.ex. 20-hidroxiecdisona (20E)).

O 20E é produzido apenas por algumas espécies de plantas, como a *Pfaffia glomerata* e é análogo ao hormônio da ecdise de insetos (Festucci-Buselli et al., 2008b; Dinan et al., 2009). A hipótese mais aceita sobre a função do 20E nas plantas é que ele atua como

composto protetor contra insetos fitófagos não-adaptados (Lafont, 1997; Festucci-Buselli et al., 2008a), embora a importância biológica e até mesmo farmacológica do 20E, sua rota biossintética não seja totalmente elucidada e seu papel pouco compreendido (Boo et al., 2013; Tsukagoshi et al., 2016; Thussagunpanit et al., 2017). Batista et al. (2018b) realizaram recentemente o sequenciamento *de novo* do transcriptoma da *P. glomerata*, onde foi observado o possível da expressão do gene *Phantom (CYP76C)* com a síntese de 20E em *P. glomerata*. Esses dados abriram perspectivas para a análise da via de biossíntese de 20E, oferecendo uma melhor compreensão do metabolismo secundário dessa espécie.

Esse trabalho teve por objetivo avaliar a influência da quantidade de luz na morfofisiologia e na biossíntese de 20E em plantas de *P. glomerata* cultivadas *in vitro*.

## METODOLOGIA

### *Crescimento das plantas e desenho experimental*

Plantas de *Pfaffia glomerata* (Ac22 e Ac43) utilizadas neste estudo foram retiradas do banco de Germoplasma do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (Universidade Federal de Viçosa, Brasil).

Explantos com um segmento nodal (2 cm) provenientes de condições fotomixotróficas com 30 dias de cultivo, foram inoculados em meio de cultura constituído pelos sais e vitaminas MS (Murashige & Skoog, 1962) (Phytotechnology<sup>®</sup> Lab, EUA), suplementado com 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 3% sacarose (p/v), solidificado com 5,5 g L<sup>-1</sup> ágar (PhytoTechnology<sup>®</sup>) e pH 5,7 ± 0,1. O meio foi autoclavado a 121° C e 1,5 atm durante 20 minutos em frascos (600 mL de capacidade) contendo 100 mL de meio. Os frascos foram vedados com tampa de polipropileno com duas membranas (0,45 µm de poro) que permitem uma taxa de trocas gasosas com o meio externo de 25 µL L de CO<sub>2</sub><sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (Batista et al., 2017) (MilliSeal<sup>®</sup> AVS-045 Air Vent, Tóquio, Japão). As culturas foram mantidas em 25 ± 2° C com fotoperíodo de 16 h sob diferentes níveis de irradiância: 65, 130 e 200 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecidas por respectivamente 2, 4 e 6 lâmpadas fluorescentes (Sylvania HO TLT, São Paulo, Brasil).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 3, sendo dois acessos (Ac22 e Ac43), com três níveis de irradiância (65, 130 e 200 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), resultando em 6 tratamentos com dez repetições cada, sendo cada unidade experimental foi constituída por um frasco contendo três explantes.

### *Variáveis de crescimento*

Após 30 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliados comprimento do caule (cm), comprimento da maior raiz (cm) área foliar (cm<sup>2</sup> / planta). As plantas foram coletadas ao final do experimento e separadas em parte aérea e raiz. As folhas foram destacadas e fixadas individualmente em papel branco plastificado e milimetrado. Foram capturadas fotos com câmera digital e as imagens foram processadas no programa ImageJ (Schneider et al., 2012). Após o material vegetal foram secos em estufa a 50 °C por 72 h, para obtenção do peso seco da parte aérea, da raiz e total (g).

### *Determinação do conteúdo de pigmentos*

Amostras da parte aérea foram coletadas aos 30 dias em nitrogênio líquido, moídas e liofilizadas para análise. Aproximadamente 10 mg de tecidos liofilizados foram utilizados para determinação dos pigmentos fotossintéticos e de carotenoides totais (xantofilas e carotenos), como descrito por Wellburn (1994). A determinação da antocianina foi realizada de acordo com Peters et al. (1989).

### *Determinação da atividade fotossintética e fluorescência da clorofila a*

Para a determinação da atividade fotossintética (*A*) *in vitro*, foi adaptado um sistema de analisador de gás infravermelho (IRGA). O esquema utilizado segue a metodologia descrita por Costa et al. (2014) e como fonte de energia luminosa foi desenvolvido um sistema composto por 8 LEDs brancas dispostas no interior das laterais de um recipiente de poliestireno expandido. As LEDs foram ligadas em um circuito de corrente contínua sob tensão de 12 V, formados por dois conjuntos em paralelo de 4 LEDs ligadas em série ( $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* foram tomados com um fluorômetro modulado MINI-PAM (Walz, Effeltrich, Alemanha), para avaliação da eficiência quântica máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ), as folhas foram aclimatadas ao escuro por 30 minutos, nestas condições foram tomadas a fluorescência inicial ( $F_0$ ) e a fluorescência máxima ( $F_m$ ). A partir desses valores, calculado a eficiência quântica máxima do fotossistema II ( $F_v/F_m$ , onde  $F_v = F_m - F_0$ ).

O desempenho fotossintético em relação a densidade de fluxo de fótons foi determinado pela programação do fluorômetro com níveis crescentes de luz (50–1350  $\mu\text{E}$ ) ao longo de 4 min, especificamente, oito níveis com duração de 30 segundos cada. A partir desses resultados foram calculados a fluorescência mínima da folha na região iluminada, segundo a fórmula  $F_0' = F_0 / [(F_m - F_0 / F_m) + F_0 / F_m']$  (Oxborough & Baker, 1997), o rendimento quântico efetivo do PSII na folha iluminada segundo Genty et al. (1989), usando a fórmula  $\Delta F / F_m' = (F_m' - F / F_m')$  e a taxa aparente de transporte de elétrons (*ETR*), calculada segundo Bilger et al. (1995),  $ETR = \Delta F / F_m' * PAR * 0,84 * 0,5$ , onde PAR é o fluxo de fótons ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) incidente sobre a folha; 0,5 é o valor correspondente à fração de energia de excitação distribuída para o PSII; 0,84 corresponde a fração de luz incidente que é absorvida pelas folhas (Maxwell & Johnson, 2000).

### *Quantificação dos carboidratos, amido, proteína e aminoácidos*

Amostras da parte aérea foram coletadas aos 30 dias em nitrogênio líquido, moídas e liofilizadas para análise. Aproximadamente 25 mg de tecidos liofilizados foram utilizados para extração com etanol como descrito por Gibon et al. (2004). Os carboidratos (amido, sacarose, glicose e frutose) foram avaliados conforme descrito por Fernie et al. (2001). A proteína e os níveis de aminoácidos totais foram analisados como relatado em Cross et al. (2006).

### *Determinação da atividade das enzimas do estresse oxidativo*

As enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidases (POD) e ascorbato peroxidase (APX) foram extraídos por homogeneização de 100 mg de material fresco congelado com 1 mL do meio de extração (tampão de fosfato de potássio 0,1 M e pH 6,8; fluoreto fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM, polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM). A mistura foi centrifugada a 10.000 xg durante 15 min e o sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático em bruto. Todos os passos foram realizados a 4 ° C.

A atividade da SOD foi determinada conforme descrito por Del Longo et al. (1993). As amostras foram expostas a lâmpadas de 15 W por 5 min antes de serem quantificadas por leituras de absorvância a 560 nm. O branco foi obtido nas mesmas condições, mas na ausência de luz. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da foto-redução de nitroazul de tetrazólio (NBT) (Beauchamp & Fridovich, 1971). A atividade de CAT foi determinada como descrito por Havir e McHale (1987). A diminuição da absorvância a 240 nm foi monitorada e a atividade enzimática foi calculada usando um coeficiente de extinção molar igual a  $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . A atividade de POD foi determinada conforme descrito por Kar e Mishra (1976). O aumento na absorvância a 420 nm foi monitorado e a atividade enzimática foi calculada usando um coeficiente de extinção molar igual a  $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Chance & Maehley, 1955). A atividade de APX foi determinada conforme descrito por Nakano e Asada (1981). A diminuição da absorvância a 290 nm foi monitorizada e a atividade enzimática foi calculada utilizando um coeficiente de extinção molar igual a  $2,8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . O resultado da atividade da SOD foi expresso como  $\text{U min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína, enquanto CAT, POD e APX foram expressos como  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína.

### *Determinação do teor e total de 20-hidroxicidisona*

A preparação do extrato metanólico foi realizada conforme descrito por Corrêa et al. (2015). A determinação de 20E foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) no aparelho Shimadzu SPD-10Avp (Kyoto, Japão) equipado com detector ultravioleta (UV) regulado para 245 nm e coluna Supelco C18 (30 cm x 7,9 mm de diâmetro), com fluxo lento de 0,8 mL min<sup>-1</sup> e pressão da coluna de 97,6 kgf. A fase móvel consistiu de sistema isocrático com uma mistura de metanol grau HPLC e água deionizada na proporção (1:1) (v:v). O volume da amostra injetada foi de 20 µL, com duração de 15 min. A curva de calibração foi obtida preparando soluções padrão 20E (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) em metanol grau HPLC (0 a 120 mg L<sup>-1</sup>).

### *Caracterização morfoanatômica*

Para avaliação anatômica e histoquímica, secções transversais do segundo par de folhas expandida e caules da região mediana do segundo internódio foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965). Para análise estrutural, as amostras foram desidratadas em série etanólica e incluídas em metacrilato (Historesin, Leica Instruments, Alemanha). Secções transversais com 5 µm de espessura, foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., USA). Os cortes foram corados em azul de toluidina (pH 3,2) por 15 min (O'Brien & McCully, 1981). Posteriormente, as lâminas foram montadas em Permount<sup>®</sup> SP15-500 (Fisher Scientific) e observadas em microscópio de luz. As imagens foram capturadas em microscópio de luz (modelo AX70 TRF, Olympus Optical) com sistema U-photo, acoplado a câmera fotográfica digital (Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.) e microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic.

### *Análise histoquímica da parede*

Foi utilizado o método de coloração de Wiesner (floroglucinol-HCl) para detectar lignina, conforme utilizado por Guo et al. (2001) e Trabucco et al. (2013). As secções transversais obtidas em micrótomo de mesa, foram montadas em floroglucinol a 1% e HCl a 50% e observadas em microscópio. As imagens foram capturadas em microscópio de luz (modelo AX70 TRF, Olympus Optical) com sistema U-photo, acoplado a câmera fotográfica

digital (Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.) e microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic.

#### *Determinação da densidade estomática*

A densidade estomática foi analisada pela técnica de diafanização, segundo a metodologia de Foster (1950), com modificações, onde folhas inteiras foram diafanizadas com solução de NaOH 10%, lavadas com água destilada e coradas com fucsina alcoólica. Cada folha diafanizada foi montada em lâmina com gelatina glicerinada e vedadas com Permout® SP15-500, com o objetivo de evitar eventuais distorções dimensionais, uma vez que as amostras se apresentam planificadas. As imagens foram capturadas em microscópio de luz (modelo AX70 TRF, Olympus Optical) com sistema U-photo, acoplado a câmera fotográfica digital (Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.) e microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic.

#### *Extração de RNA, síntese de cDNA e análise de expressão gênica por RT-qPCR*

Para a análise de expressão os genes *Phantom* (pertencente à via de biossíntese da 20-hidroxiecdisona) bem alguns da rota dos fenilpropanoides da biossíntese de lignina [*cinamato 4-hidroxilase (PgC4H)*, *cafeoil-CoA O-metiltransferase (PgCCoAOMT)*, *cinamoil-CoA redutase (PgCCR)*, *cinamil álcool desidrogenase (PgCAD)* e *ácido caféico O-metiltransferase (PgCOMT)*] foram obtidos do transcriptoma da *P. glomerata* (Batista et al., 2018b). Como referência interna foi usado o gene *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)* (Batista et al., 2019). PCR em tempo real foi realizada em aparelho CFX96 Touch™ (BIO-RAD), usando qPCR-SYBR-Green mix/Rox (Ludwig Biotec®, Alvorada, RS, Brasil), as reações foram realizadas com três repetições biológicas em duplicata técnica cada, em um volume de reação de 10 µL (4 µL de SYBR-Green, 1 µL (4 µM) de cada primer, 3 µL de água tratada com dietilpirocarbonato e 1 µL (40 ng) de cDNA). As condições de amplificação foram realizadas nas seguintes etapas: 2 min a 50°C e 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 95°C por 16 s e 60°C por 60 s, e a curva de dissociação de 60 a 95°C a 0,1°C s<sup>-1</sup>. O método comparativo ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) (Livak & Schmittgen, 2001) foi aplicado para calcular as diferenças de expressão do gene alvo.

### *Análises estatísticas*

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GENES (Cruz, 2013). Todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F, e as médias comparadas pelo teste de Dunnett (análises de expressão gênica) ou Tukey (demais análises), todos ao nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS

### *A alta irradiância promoveu maior acúmulo de biomassa*

O crescimento e desenvolvimento de plantas de dois acessos (Ac22 e Ac43) de *P. glomerata* cultivadas *in vitro* mostraram-se significativamente distintos sob diferentes intensidades de luz (Figura 1). A ANOVA mostrou interação entre os fatores (acessos x intensidade de luz) somente para o comprimento da maior raiz, e os resultados diferiram significativamente ( $P < 0,01$ ) para essa variável.

Em ambos os acessos de *P. glomerata*, observou-se maior acúmulo de biomassa com o aumento da irradiância (Tabela 1). Comparado com as plantas sob menor irradiância ( $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a massa seca total das plantas do Ac22 aumentou significativamente em 130 (22.72%) e 200 (35.85%)  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; já no Ac43 em 130 (34.15%) e 200 (48.05%)  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A massa seca da parte aérea variou de 24.32-36.36% e 35.29-50% nos Ac22 e Ac43, respectivamente. Já a massa seca da raiz, variou de 14.28-33.33% no Ac22 e 28.57-37.5% no Ac43. Além da massa seca das plantas, também houve o incremento significativo da área foliar com aumento da irradiância. No Ac22 em 130 (22.93%) e 200 (34.63%)  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e no Ac43 em 130 (40.3%) e 200 (54.58%)  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Tabela 1).

Plantas do Ac22 apresentaram maior comprimento do caule sob  $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . No entanto as plantas do Ac43 não diferiram significativamente, em relação à essa variável. Também não houve diferença significativa no comprimento da maior raiz em ambos os acessos de *P. glomerata* sob diferentes irradiâncias (Tabela 1).

### *A quantidade de luz influenciou no conteúdo de pigmentos e na densidade estomática*

Os teores de Clorofila (Chl) *a*, Chl *b*, Chl *a/b*, Chl total, carotenoides, antocianinas e a densidade estomática de dois acessos (22 e 43) de *P. glomerata* foram influenciados pela intensidade de luz (Figuras 2 e 3). A ANOVA mostrou interação entre os fatores (acessos x intensidade de luz) somente para o conteúdo de Chl *b*, Chl total e densidade estomática da face abaxial, e os resultados diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ) para essas variáveis.

Plantas do Ac22 apresentaram maior teor significativo de Chl *a* e carotenoides e antocianinas quanto expostas à menor irradiância ( $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), no entanto não diferiram significativamente no conteúdo de Chl *b*, Chl *a/b* e Chl total. Já as plantas do Ac43 apresentaram incremento significativo no teor de Chl *b*, Chl total, carotenoides e antocianinas sob  $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e de Chl *a/b* em  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de irradiância. Por outro lado, não diferiram significativamente em relação à Chl *a* (Figura 2).

Ambos os acessos tiveram redução significativa no conteúdo de antocianinas com o aumento da irradiância (Figura 2). Comparado com as plantas sob menor irradiância, o teor de antocianina nas plantas do Ac22 diminuiu significativamente em 130 (39.5%) e 200 (34%)  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , já no Ac43 reduziu em 130 (37.5%) e 200 (39.58%)  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 2).

A densidade estomática da face abaxial em plantas do Ac22 sob 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  obteve redução significativa de 76,92% com relação às sob menor irradiância, já as plantas do Ac43 não apresentaram diferença significativa nos diferentes níveis de irradiância (Figura 3).

#### *A alta irradiância melhorou o desempenho fotossintético*

A fotossíntese *in vitro* de *P. glomerata* foi aumentada nas plantas cultivadas sob maior irradiância (Figura 4). Comparada com as plantas cultivadas em 65  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , houve incremento significativo da taxa fotossintética das plantas do Ac22 de 17.08% e 35.10% sob 130 e 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectivamente. Já no Ac43, o aumento foi de 28.24% (130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e 40.86% (200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Figura 4). Para essa variável não houve interação entre os fatores (acessos x intensidade de luz).

Entre os parâmetros avaliados de acordo com a fluorescência da Chl *a* no PSII, o cultivo sob diferentes níveis de irradiâncias influenciou a dissipação não-fotoquímica (NPQ) e a eficiência de transporte de elétrons (ETR) em dois acessos de *P. glomerata* (Figura 5B e C). O NPQ, responsável pela dissipação de energia em excesso no PSII, foi mais induzido nas plantas do Ac43 do que nas plantas do Ac22, independente da irradiância. Na menor irradiância (65  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), o NPQ das plantas do Ac43 foi 3 vezes maior comparado às do Ac22; já sob a maior irradiância (200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) essa diferença foi de 1.6 vezes (Figura 5B).

Com relação à ETR, plantas de ambos os acessos de *P. glomerata* apresentaram maior taxa quando cultivadas em maior de irradiância. Comparado com a menor irradiância, plantas sob 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  apresentaram 2 e 1.5 vezes maior ETR no Ac22 e Ac43, respectivamente (Figura 5C). Quanto ao rendimento quântico efetivo do FSII (Fv/Fm) e a dissipação fotoquímica (qP), ambos não exibiram diferenças significativas (Figura 5A e D).

#### *A quantidade de luz afetou a atividade das enzimas antioxidantes*

A atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, APX e POD) em plantas de *P. glomerata* foi aumentada quando cultivadas em 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 6). A ANOVA

mostrou interação entre os fatores (acessos x intensidade de luz) somente para atividade da APX e os resultados diferiram significativamente ( $P < 0,01$ ) para essa variável.

Plantas do Ac22, sob  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , apresentaram incremento significativo de 57,73 e 50,10% (SOD), 63,05 e 45% (CAT), 62,45 e 65% (APX), 55,13 e 28,61% (POD) em relação as plantas cultivadas sob 65 e  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectivamente (Figura 6A, B, C e D). Já em plantas do Ac43 não houve diferença na atividade da SOD, CAT e POD quando expostas a 130 ou  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 6A, B e D). Sob  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  as plantas desse acesso apresentaram aumento de 45,02 e 26,39 (SOD), 47,46 e 26,93% (CAT), 47,89 e 37,08% (APX), 45,84 e 22,72% (POD) com relação às plantas cultivadas sob 65 e  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respectivamente (Figura 6 A-D).

#### *A alta irradiância influenciou no metabolismo dos carboidratos e dos aminoácidos*

O teor dos açúcares (glicose, frutose e sacarose), amido, aminoácidos e proteína das plantas de dois acessos (22 e 43) de *P. glomerata* foram influenciados pela intensidade de luz (Figuras 7 e 8). A ANOVA mostrou interação entre os fatores (acessos x intensidade de luz) somente para o conteúdo de glicose e frutose, e os resultados diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ) para essas variáveis.

Ambos os acessos de *P. glomerata*, apresentaram redução drástica no conteúdo de glicose e amido quando cultivados sob alta irradiância (Figura 7A e D). Houve redução significativa, de mais de 70%, no teor de glicose nas plantas dos dois acessos de *P. glomerata* sob  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  em relação às plantas cultivadas sob  $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 7A). Já o conteúdo de amido decresceu significativamente 51% (Ac22) e 73,41% (Ac43) nas plantas expostas a maior irradiância comparado com as cultivadas sob  $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 7D). Em relação ao teor de frutose, as plantas do Ac22 obtiveram maior valor significativo sob  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e as do Ac43 nas irradiâncias 65 e  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 7B). Não houve diferença significativa no conteúdo de sacarose (Figura 7C).

Plantas do Ac43 obtiveram redução significativa de 17,44% no conteúdo de aminoácidos quando cultivadas em  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  em relação às plantas sob  $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , já as plantas do Ac22 não diferiram em relação aos níveis de irradiância. Independente da irradiância, plantas do Ac43 apresentaram maior teor significativo de aminoácidos do que o Ac22 (Figura 8A). Não houve diferença significativa nos níveis de proteína (Figura 8B).

### *A alta irradiância aumentou a produção de 20E*

Em ambos os acessos de *P. glomerata* houve o incremento tanto no teor, quanto no total de 20E na parte aérea, na raiz e na planta toda com o aumento da irradiância (Figura 9). A interação entre os acessos e a intensidade de luz foi significativa para todas essas variáveis, com exceção do total de 20E da parte aérea, ( $P < 0,05$ ).

Plantas do Ac22 apresentaram aumento significativo no teor de 20E de 76.60% na parte aérea, 64.93% na raiz e 78.42% na planta toda quando cultivadas em  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , em relação às plantas sob  $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Já as plantas Ac43, nessa mesma condição de luz, o aumento no teor de 20E foi de 72.64% na parte aérea e 55.79% na planta toda, mas não houve aumento significativo no teor de 20E na raiz (Figuras 9A, B e C).

Ambos os acessos, também apresentaram incremento na produção de 20E com o aumento da quantidade de luz. Com relação às plantas do Ac22 cultivadas em  $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , houve aumento significativo na produção de 20E de 84.96% na parte aérea, 77.38% na raiz e 90.28% (10 vezes) na planta toda sob  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Plantas do Ac43 sob  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , obtiveram aumento significativo no total de 20E de 85.91% na parte aérea e 71.83% na planta toda, com relação às plantas cultivadas em  $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Também não houve aumento significativo na produção de 20E na raiz no Ac43 (Figuras 9D, E e F).

Em todos os parâmetros analisados de 20E, foi observado em plantas do Ac22 sob  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  maiores valores significativos desse metabólito do que nas plantas do Ac43, já em  $65$  e  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  não houve diferença significativa de 20E, com exceção do teor de 20E da parte aérea em  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 9).

### *A morfoanatomia é afetada pela irradiância*

Nas análises microscópicas, não foram observadas alterações histológicas nas folhas e caules de plantas do Ac22 e Ac43 de *P. glomerata* cultivadas *in vitro* em diferentes irradiâncias (Figura 10), quando comparadas com essa espécie cultivadas *ex vitro*. A folha de *P. glomerata* possui epiderme unisseriada, anfiestomático e dorsiventral (Figura 10D, H, L, P, T e Y). O feixe vascular central é do tipo colateral e é circundado por parênquima fundamental (Figura 10A, C, E, G, I, K, M, O, Q, S, U e X).

Houve aumento visível no tamanho dos feixes vasculares da nervura central nas plantas cultivadas em  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , em comparação àquelas sob  $65$  e  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , para ambos os acessos de *P. glomerata* (Figura 10I e U). Além disso, plantas cultivadas na maior irradiância apresentaram tecido de suporte (colênquima) na região subepidérmica da

nervura central da folha e do caule mais desenvolvido, com células de clorênquima maiores e com paredes celulares mais espessadas, em relação as plantas sob menor irradiância (Figura 10I, K, U e X). As características anatômicas do caule mostraram diferenças significativas, principalmente relacionadas à lignificação da parede celular, no tamanho dos elementos do vaso e na espessura das fibras (acima da região do câmbio fascicular), sendo essas características foram mais proeminentes nas plantas sob maior irradiância (Figura 10I e U). As folhas das plantas cultivadas em  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  exibiram mais camadas de parênquima paliádico e parênquima lacunoso e mais espaços intercelulares quando comparadas aos tratamentos sob menores irradiâncias (Figura 10L e Y).

As análises histoquímicas do caule de *P. glomerata* confirmaram o maior desenvolvimento estrutural de plantas cultivadas em  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 11I, J, K e L). A coloração com floroglucinol detectou estruturas lignificadas em seções do caule em todos os tratamentos (Figura 11). As seções de caule de ambos os acessos de *P. glomerata* cultivadas em  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  exibiam um grau maior de lignificação (Figura 11I, J, K e L). A coloração intensa dos feixes vasculares indicou forte lignificação do xilema e espessamento da parede celular na região interfascicular, formando um anel contínuo (Figura 11I e K).

*A quantidade de luz alterou a expressão do gene da rota síntese do 20E mas não dos genes da rota da lignina*

A expressão do gene de biossíntese de 20E (*Phantom*) em *P. glomerata* foi influenciada pela intensidade de luz. Comparado com as plantas sob  $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , o *Phantom* foi mais expresso, quase duas vezes mais nas plantas cultivadas em  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , no entanto não houve diferença significativa em  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 12). Já a expressão dos genes da rota de síntese de lignina (*PgCAD*, *PgCOMT*, *PgCCoAOMT*, *PgCCR* e *PgC4H*) não foi afetado pela quantidade de luz (Figura 13).

## DISCUSSÃO

Como organismos fotossintetizantes, as plantas têm seu crescimento e desenvolvimento necessariamente regulados pela luz. Embora a importância da condição de luz para as respostas morfogênicas das plantas, os efeitos da quantidade de luz no ambiente *in vitro* ainda não sejam elucidados (Fankhauser & Christie, 2015; Batista et al., 2018a). Este estudo é o primeiro a investigar os efeitos de diferentes níveis de irradiância na morfofisiologia e na produção de 20E em *P. glomerata in vitro*. Os resultados aqui encontrados mostram que a alta irradiância aumenta a biomassa e também induz maior produção de 20E nessa espécie.

O aumento da irradiância *in vitro* melhorou o desempenho fotossintético em *P. glomerata*, o que refletiu no acúmulo de biomassa. Resultados semelhantes foram observados em *Solanum lycopersicum*, *Cassia occidentalis*, *Acer saccharum*, *Raphanus sativus* e *Dinoroseobacter shibae* (Fan et al., 2013; Naz & El, 2015; Singh et al., 2017; Zha & Liu, 2018; Piwosz et al., 2018). Além do incremento da massa fresca e seca, também houve o aumento da área foliar das plantas com aumento da irradiância, o que refletiu na diminuição drástica da densidade estomática na face abaxial das folhas, como observado no presente estudo (Beerling et al., 1993; Wang et al., 2007; Fraser et al., 2008).

A quantidade de luz pode induzir maior assimilação de carbono, ou seja, quanto mais fótons, mais elétrons são formados na cadeia transportadora de elétrons, e conseqüentemente, mais energia metabólica poderá ser liberada para assimilação de carbono. Além disso, quanto maior a irradiância, espera-se maior abertura estomática (devido aumento da transpiração), o que acarreta em maior aporte de CO<sub>2</sub> para dentro da célula vegetal, refletindo no acúmulo de biomassa (Walker, 1976; Anderson et al., 1995; Poorter & Nagel, 2000).

No entanto, não são todas as espécies dotadas de mecanismos eficientes para evitar os fotodanos e com aparato fotossintético capaz de induzir maior ganho de carbono em ambiente sob alta intensidade lumínica. Em plantas de *Hymenaea stigonocarpa* a alta irradiância promove decréscimos no rendimento quântico, o que reduziu a taxa fotossintética (Costa et al., 2015). Respostas similares foram encontradas em *Alocasia amazonica* (Jo et al., 2008) e *Scenedesmus abundans* (Gupta et al., 2018). O ganho de biomassa associado ao aumento de fotossíntese em plantas sob alta irradiância indica que a *P. glomerata* apresenta plasticidade fisiológica para diferentes ambientes de luz.

Os dados da ETR reforçaram os resultados obtidos na taxa fotossintética, pois em ambos os acessos avaliados de *P. glomerata*, os maiores valores da ETR foram observados

em plantas cultivadas sob  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . De acordo com Maxwell e Johnson (2000), a ETR é um bom parâmetro para indicar danos na maquinaria fotossintética, visto que se a ETR estiver alta durante os picos de maior intensidade de luz, o transporte de elétrons está ocorrendo normalmente, no entanto se esse valor for baixo isso significa que o excesso de luz pode ter danificado o aparato fotossintético. Outra evidência que *P. glomerata* é tolerante a alta intensidade de luz, é o fato de que os teores de carotenoides e antocianinas diminuíram com o aumento da irradiância, evidenciando a capacidade desses pigmentos para a fotoproteção do aparato fotossintético (Young, 1991; Feild et al., 2001; Nisar et al., 2015; Landi et al., 2015).

O NPQ foi mais induzida em plantas do Ac43 do que nas plantas do Ac22 de *P. glomerata*, independentemente da irradiância de cultivo. Os processos de dissipação não fotoquímicos agem como mecanismos fotoprotetores para o PSII, pois estão associados à dissipação de energia como calor pelo ciclo da xantofila (Müller et al., 2001, Tietz et al., 2017). Dessa forma, o NPQ fornece informações sobre o estado da fotossíntese nas plantas (Gonçalves & Santos Jr. 2005). Plantas do Ac43 sob  $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de fótons apresentaram NPQ três vezes maior do que as plantas do Ac22 nessa mesma condição de luz (Figura 5B). Semelhantemente,  $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foi o único nível de irradiância que as plantas do Ac43 obtiveram menor taxa fotossintética do que as do Ac22 (Figura 4). Variações em diferentes respostas no crescimento e desenvolvimento de *P. glomerata* dependente do genótipo, também foram demonstradas no estudo de Correa et al. (2015), evidenciando a plasticidade fenotípica dessa espécie.

Um efeito bastante frequente e comum do estresse por alta irradiância é a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), incluindo radicais de superóxido, peróxido e íon hidroxila em muitas espécies de plantas (Nosaka & Nosaka, 2017). As EROs interrompem as membranas e outras macromoléculas através da peroxidação lipídica. No entanto, as plantas regulam esses processos por meio da produção de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos para eliminar EROs (Shahzad et al., 2018). Dentro de uma célula, as SODs constituem a primeira linha de defesa contra as EROs, elas catalisam a dismutação do radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) a peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é altamente deletério, por participar da reação que produz radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ), o qual é considerado mais reativo em sistemas biológicos (McCord & Fridovich, 1969). No entanto, as enzimas como CAT, APX e POD têm capacidade de catalisar o  $\text{H}_2\text{O}_2$  mantendo o equilíbrio dos EROs nas células (Mittler, 2002). Nesse estudo houve um aumento da atividade das enzimas do estresse oxidativo (SOD, CAT, APX e POD) em plantas de *P. glomerata* cultivadas na irradiância de

130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , porém houve decréscimo dessas enzimas em plantas sob a maior 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 6). Plântulas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) diminuíram a atividade da CAT quando expostas a alta irradiância (Ye et al., 2000). Fan et al. (2014) relataram que em plantas de *Zizania latifolia* a irradiação induziu redução na atividade da CAT, SOD e POD. De forma oposta, a atividade de enzimas do estresse oxidativo foi aumentada com a elevação da irradiância em estudos anteriores (Vandenhove et al., 2010; He et al., 2015; Naz et al., 2015). Assim, possivelmente há um mecanismo particular de proteção das plantas de *P. glomerata* contra o estresse oxidativo quando expostas à alta irradiação.

Houve uma queda no teor de glicose e amido nas plantas de ambos os acessos de *P. glomerata* cultivadas na maior irradiância (Figura 7), além da redução no conteúdo de aminoácidos totais nas plantas do Ac43 sob 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 8). Já em plantas de *Aloe vera* (Paez et al., 2000), *Arabidopsis* (Mengin et al., 2017) e tabaco (Karpinska et al., 2018) houve aumento dos metabólitos primários com aumento da irradiância. As plantas apresentam mecanismos eficientes de regulação entre os fluxos do metabolismo primário com do metabolismo secundário. Redes de expressão gênica operam mantendo um bom equilíbrio da conversão de metabólitos primários para metabólitos secundários derivado deles (Aharoni & Galili, 2011). O menor investimento no acúmulo de metabólitos primários nas plantas de *P. glomerata* sob alta irradiância pode ter possibilitado um maior direcionamento para a produção do 20E.

Em ambos os acessos estudados, houve incremento tanto no teor, quanto no total de 20E com o aumento da irradiância, sendo que a produção de 20E foi mais de 10 vezes aumentada em plantas sob 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  em relação àquelas sob 65  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figura 9). No entanto, a expressão relativa do gene *Phantom*, envolvido na síntese de 20E (Batista et al., 2018b), não foi aumentada como foi o conteúdo de 20E sob 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , revelando que a biossíntese desse metabólito pode ser regulada por outros fatores. Plantas de cevada obtiveram aumento no conteúdo de lutoarina e ácido feruloilquínico com aumento da radiação fotossinteticamente ativa (Klem et al., 2015). De acordo com Chang et al. (2008), a maior irradiância aumentou significativamente o teor relativo de linalol e eugenol em plantas de manjeriço (*Ocimum basilicum*). No entanto, uma diminuição nos metabólitos secundários, de *p*-Cimeno,  $\gamma$ -terpineno e carvacrol, também foi observada com o aumento irradiância em *Plectranthus amboinicus* (Silva et al., 2017). O conteúdo total de compostos fenólicos e flavonoides em *Labisia pumila* também diminuiu em resposta à alta intensidade de luz (Ibrahim et al., 2014), mostrando que a alta irradiância pode ter consequências tanto negativas quanto positivas na produção de metabólitos secundários.

Em plantas cultivadas *in vitro* em  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  o aumento no tamanho dos feixes vasculares da nervura central, maior investimento nos tecidos de suporte, aumento no número de camadas do parênquima paliçádico e parênquima lacunoso, mais espaços intercelulares, forte lignificação do xilema e espessamento da parede celular na região interfascicular (Figuras 10 e 11). Em plantas de tomateiros, a irradiância abaixo de 300 e 450  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  favoreceu o espessamento das folhas e os parênquimas paliçádico e esponjoso foram maiores (Fan et al., 2013). Ham et al. (2017) relataram que folhas de *Chrysanthemum morifolium* sob 25 e 15% de irradiância eram mais finas com parênquima paliçádico, parênquima esponjoso e células de mesofilo dispostas irregularmente, enquanto as plantas cultivadas sob luz solar constante mostraram o parênquima paliçádico mais compacto. As plantas são altamente plásticas nas características relacionadas à estrutura e função do caule e principalmente da folha em resposta aos níveis de irradiância, o que pode afetar a eficiência fotossintética e o suprimento de água.

Os genes da rota de síntese de lignina (*PgCAD*, *PgCOMT*, *PgCCoAOMT*, *PgCCR* e *PgC4H*) em *P. glomerata* não foram afetados por diferentes níveis de irradiância. Santos (2018) relatou que o cultivo *in vitro* de *P. glomerata* responsável por promover a diminuição da expressão dos genes *PgC4H*, *PgCAD* e *PgCC*, foi o que promoveu o incremento dos polissacarídeos da parede celular. Em plantas de soja cultivadas sob baixa luz, o conteúdo de lignina foi intimamente relacionado com expressão dos genes *C3H*, *CCR*, *CCoAOMT* e *POD* (Liu et al., 2017). Da mesma forma, outros estudos relataram a correlação direta de genes da biossíntese de lignina com o seu conteúdo (John et al., 2012; Acker et al., 2013; Zhang et al., 2014; Mamedes-Rodrigues et al., 2018; Goh et al., 2018). A via biossintética da lignina é similar, mas não idêntica em diferentes espécies de plantas, e é constituída por várias enzimas que estão envolvidas em muitas etapas, por isso suas respostas a manipulações são de difícil compreensão (Faraji et al., 2018). A rota biossintética da lignina é bem conservada, mas os mecanismos de regulação são variados e difíceis de determinação.

Em conclusão, nossos resultados mostram que a irradiância  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foi capaz de aumentar mais 10 vezes a produção de 20E em plantas *in vitro* de *P. glomerata* em relação às plantas sob  $65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , demonstrando a influência desse fator na produção desse metabólito secundário. Além disso, a fotossíntese foi aumentada com o aumento da irradiância, e conseqüentemente, induziu maior produção de biomassa, indicando que plantas de *P. glomerata* apresentam plasticidade fisiológica para respostas a diferentes ambientes de luz. Os resultados evidenciam que ambos os acessos de *P. glomerata* são tolerantes à alta intensidade de luz no ambiente *in vitro*, devido aos baixos valores de carotenoides,

antocianinas e de enzimas do estresse oxidativo em plantas sob  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Foi observado aumento no investimento nos parênquimas clorofilianos e nos tecidos de suporte e transporte de água. Este trabalho fornece novas perspectivas a respeito da quantidade de luz no ambiente *in vitro* e auxilia na otimização de protocolos de bioprospecção e propagação em larga escala de plantas de *P. glomerata* para a produção de 20E.

## REFERÊNCIAS

Acker RV, Vanholme R, Storme V, Mortimer JC, Dupree P, Boerjan W (2013) Lignin biosynthesis perturbations affect secondary cell wall composition and saccharification yield in *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnol Biofuels* 6:1-17

Aharoni A & Galili G (2011) Metabolic engineering of the plant primary–secondary metabolism interface. *Curr Opin Biotechnol* 22:239-244

Alvarenga ICA, Pacheco FV, Silva ST, Bertolucci SKV, Pinto JEBP (2015) *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 122:299-308.

Anderson JM, Chow WS, Park YI (1995) The grand design of photosynthesis: acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. *Photosynth Res* 46:129-139

Apel K & Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373-399.

Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr Sci* 82:1227-1238

Bach A, Kapczyńska A, Dziurka K, Dziurka M (2018) The importance of applied light quality on the process of shoot organogenesis and production of phenolics and carbohydrates in *Lachenalia* sp. cultures *in vitro*. *South Afric J Bot* 114:14-19

Barber J (2009) Photosynthetic energy conversion: natural and artificial. *Chem Soc Rev* 38:185-196

Batista DS, de Castro KM, da Silva AR, Teixeira ML, Sales TA, Soares LI, Cardoso MG, Santos MO, Viccini LF, Otoni WC (2016) Light quality affects *in vitro* growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 52:276-282

Batista DS, Dias LLC, Rêgo MMD, Saldanha CW, Otoni WC (2017) Flask sealing on *in vitro* seed germination and morphogenesis of two types of ornamental pepper explants. *Ciência Rural* 47:1-6

Batista DS, Felipe SHS, Silva TD, Castro KMD, Mamedes-Rodrigues TC, Miranda NA, Ríos-Ríos AM, Faria DV, Fortini EA, Chagas K, Torres-Silva G, Xavier A, Arencibia AD, Otoni WC (2018a) Light quality in plant tissue culture: does it matter? *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 54:195-2015

Batista DS, Koehler AD, Romanel E, de Souza VC, Silva TD, Almeida MC, Maciel TEF, Ferreira PRB, Felipe SHS, Saldanha CW, Maldaner J, Dias LLC, Festucci-Buselli RA, Otoni WC (2018b) *De novo* assembly and transcriptome of *Pfaffia glomerata* uncovers the role of photoautotrophy and the P450 family genes in 20-hydroxyecdysone production. *Protoplasma* 1-14. DOI: 10.1007/s00709-018-1322-1

Batista DS, Moreira VS, Felipe SHS, Fortini EA, Silva TD, Chagas K, Louback E, Romanel E, Costa MGC, Otoni WC (2019). Reference gene selection for qRT-PCR in Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] as affected by various abiotic factors. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 1-11. DOI 10.1007/s11240-019-01606-6

Beauchamp C & Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44:276-287

Beerling DJ, Chaloner WG, Huntley B, Pearson JRA, Tooley MJ (1993) Stomatal density responds to the glacial cycle of environmental change. *Proc R Soc Lond B* 251:133-138

Bilger W, Schreiber U, Bock M (1995) Determination of the quantum efficiency of photosystem II and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia* 102:425-432

Björkman O (1987) High-irradiance stress in higher plants and interaction with other stress factors. *Progress in photosynthesis research* (pp. 11-18). Springer, Dordrecht.

Blankenship RE, Tiede DM, Barber J, Brudvig GW, Fleming G, Ghirardi M, Gunner MR, Junge W, Kramer DM, Melis A, Moore TA, Moser CC, Nocera DG, Nozik AJ, Ort DR, Parson WW, Prince RC, Sayre RT (2011) Comparing photosynthetic and photovoltaic efficiencies and recognizing the potential for improvement. *Science* 332:805-809

Boo KH, Lee D, Nguyen QV, Jin SB, Kang S, Viet CD, Park SP, Lee DS, Riu KZ (2013) Fluctuation of 20-hydroxyecdysone in individual organs of *Achyranthes japonica* during reproductive growth stage and its accumulation into seed. *J Kor Appl Biol Chem* 56:335–338

Brunetti C, Guidi L, Sebastiani F, Tattini M (2015) Isoprenoids and phenylpropanoids are key components of the antioxidant defense system of plants facing severe excess light stress. *Environ Exp Bot* 119:54-62

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

Chang X, Alderson PG, Wright CJ (2008) Solar irradiance level alters the growth of basil (*Ocimum basilicum* L.) and its content of volatile oils. *Environ Exp Bot* 63:216-223

Choudhury FK, Rivero RM, Blumwald E, Mittler R (2017) Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant J* 90:856-867

Cioć M, Szewczyk A, Żupnik M, Kalisz A, Pawłowska B (2018) LED lighting affects plant growth, morphogenesis and phytochemical contents of *Myrtus communis* L. *in vitro*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 132:433-447

Corrêa JPO, Vital CE, Pinheiro MVM, Batista DS, Azevedo JFL, Saldanha CW, Otoni WC (2015) *In vitro* photoautotrophic potential and *ex vitro* photosynthetic competence of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen accessions. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 121:289-300

- Costa AC, Rezende-Silva SL, Megguer CA, Moura LMF, Rosa M, Silva AA (2015) The effect of irradiance and water restriction on photosynthesis in young jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa*) plants. *Photosynthetica* 53:118-127
- Costa AC, Rosa M, Megguer CA, Silva FG, Pereira FD, Otoni WC (2014) A reliable methodology for assessing the *in vitro* photosynthetic competence of two Brazilian savanna species: *Hyptis marrubioides* and *Hancornia speciosa*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 117:443-454
- Cross JM, Von Korff M, Altmann T, Bartzetko L, Sulpice R, Gibon Y, Palacios N, Stitt M (2006) Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiol* 142:1574-1588
- Cruz CD (2013) GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Sci* 35:271-276
- Del Longo OT, González CA, Pastori GM, Trippi VS (1993) Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell Physiol* 34:1023-1028
- Demmig-Adams B & Adams III WW (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Biol* 43:599-626
- Dinan L, Harmatha J, Volodin V, Lafont R (2009) Phytoecdysteroids: diversity, biosynthesis and distribution. In: Ecdysone: Structures and Functions. Netherlands. p 3–45
- Fan J, Shi M, Huang JZ, Xu J, Wang ZD, Guo DP (2014) Regulation of photosynthetic performance and antioxidant capacity by <sup>60</sup>Co  $\gamma$ -irradiation in *Zizania latifolia* plants. *J Environ Radioact* 129:33-42
- Fan XX, Xu ZG, Liu XY, Tang CM, Wang LW, Han XL (2013) Effects of light intensity on the growth and leaf development of young tomato plants grown under a combination of red and blue light. *Sci Hortic* 153:50-55
- Fankhauser C & Christie JM (2015) Plant phototropic growth. *Curr Biol* 25:384–389
- Faraji M, Fonseca LL, Escamilla-Treviño L, Barros-Rios J, Engle N, Yang ZK, Tschaplinski TJ, Dixon RA, Voit EO (2018) Mathematical models of lignin biosynthesis. *Biotechnol Biofuels* 11:34
- Feild TS, Lee DW, Holbrook NM (2001) Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood. *Plant Physiol* 127:566-574
- Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* 212:250-26
- Festucci-Buselli RA, Contim LAS, Barbosa LCA, Stuart JJ, Otoni WC (2008a) Biosynthesis and potential functions of the ecdysteroid 20-hydroxyecdysone – a review. *Botany* 86:978-987

- Festucci-Buselli RA, Contim LAS, Barbosa LCA, Stuart J, Otoni WC (2008b) Level and distribution of 20-hydroxyecdysone during *Pfaffia glomerata* development. *Braz J Plant Physiol* 20:305-311
- Fini A, Loreto F, Tattini M, Giordano C, Ferrini F, Brunetti C, Centritto M (2016) Mesophyll conductance plays a central role in leaf functioning of Oleaceae species exposed to contrasting sunlight irradiance. *Physiol Plant* 157:54-68
- Foster AS (1950) Practical plant anatomy. New York: D. Van Nostrand Co.
- Foster CE, Martin TM, Pauly M (2010) Comprehensive compositional analysis of plant cell walls (Lignocellulosic biomass). Part I: Lignin. *J Vis Exp* 37:1-4
- Foyer CH (2018) The redox state of the apoplast influences the acclimation of photosynthesis and leaf metabolism to changing irradiance. *Plant Cell Environ* 41:1083-1097
- Fraser LH, Greenall A, Carlyle C, Turkington R, Friedman CR (2008) Adaptive phenotypic plasticity of *Pseudoroegneria spicata*: response of stomatal density, leaf area and biomass to changes in water supply and increased temperature. *Ann Bot* 103:769-775
- Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *BBA-Gen Subjects* 990:87-92
- Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, Carillo P, Höhne M, Hendriks JHM, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M (2004) A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *Plant Cell* 16:3304-3325
- Gill SS & Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48:909-930
- Goh KM, Dickinson M, Supramaniam CV (2018) Morphological and transcript changes in the biosynthesis of lignin in oil palm (*Elaeis guineensis*) during *Ganoderma boninense* infections *in vitro*. *Physiol Plant* 162:274-289
- Gonçalves JFC & Santos Junior UM (2005) Utilization of the chlorophyll *a* fluorescence technique as a tool for selecting tolerant species to environments of high irradiance. *Braz J Plant Physiol* 17:307-313
- Guanter L, Zhang Y, Jung M, Joiner J, Voigt M, Berry JA, Frankenberg C, Huete AR, Zarco-Tejada P, Lee JE, Moran MS, Ponce-Campos G, Beer C, Camps-Valls G, Buchmann N, Gianelle D, Klumpp K, Cescatti A, Baker JM, Griffis TJ (2014) Global and time-resolved monitoring of crop photosynthesis with chlorophyll fluorescence. *Proc Nat Acad Sci USA* 14:1327-1333

- Guo D, Chen F, Inoue K, Blount JW, Dixon RA (2001) Down regulation of caffeic acid 3-O-methyl transferase and caffeoyl CoA 3-O-methyl transferase in transgenic alfalfa: Impacts on lignins structure and implications for the biosynthesis is of G and S lignin. *Plant Cell* 13:73-88
- Gupta S, Pawar SB, Pandey RA, Kanade GS, Lokhande SK (2018) Outdoor microalgae cultivation in airlift photobioreactor at high irradiance and temperature conditions: effect of batch and fed-batch strategies, photoinhibition, and temperature stress. *Bioprocess Biosyst Eng* 1-14
- Han S, Chen SM, Song AP, Liu RX, Li HY, Jiang JF, Chen FD (2017) Photosynthetic responses of *Chrysanthemum morifolium* to growth irradiance: morphology, anatomy and chloroplast ultrastructure. *Photosynthetica* 55:84-192
- Havir EA & McHale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol* 84:450-455
- Hughes NM, Neufeld HS, Burkey KO (2005) Functional role of anthocyanins in high-light winter leaves of the evergreen herb *Galax urceolata*. *New Phytol* 168:575-587
- Ibrahim MH, Jaafar HZ, Karimi E, Ghasemzadeh A (2014) Allocation of secondary metabolites, photosynthetic capacity, and antioxidant activity of kacip fatimah (*Labisia pumila* Benth) in response to and light intensity. *Sci World J* 2014:1-13
- Jo EA, Tewari RK, Hahn EJ, Paek KY (2008) Effect of photoperiod and light intensity on *in vitro* propagation of *Alocasia amazonica*. *Plant Biotechnol Rep* 2:207-212
- John R, Takuya A, Heather DC, Shawn D (2012) Mansfield effects on lignin structure of coumarate 3-hydroxylase downregulation in poplar. *Bioenergy Res* 5:1009-1019
- Jorge MAB, Robertson AI, Mashingaidze AB, Keogh E (2000) How *in vitro* light affects growth and survival of *ex vitro* cassava. *Ann Appl Biol* 137:311-319
- Kar M & Mishra D (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol* 57:315-319
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:137-138
- Karpinska B, Zhang K, Rasool B, Pastok D, Morris J, Verrall SR, Hedley PE, Hancock RD,
- Khan T, Abbasi BH, Khan MA (2018) The interplay between light, plant growth regulators and elicitors on growth and secondary metabolism in cell cultures of *Fagonia indica*. *J Photochem Photobiol Biol* 185:153-160
- Kitazaki K, Fukushima A, Nakabayashi R, Okazaki Y, Kobayashi M, Mori T, Nishizawa T, Reyes-Chin-Wo S, Michelmore RW, Saito K, Shoji K, Kusano M (2018) Metabolic Reprogramming in leaf lettuce grown under different light quality and intensity Conditions using Narrow-and LEDs. *Sci Rep* 8:7914

- Klem K, Holub P, Štroch M, Nezval J, Špunda V, Tříška J, Marcel AK, Jansen T, Matthew, Urban O (2015) Ultraviolet and photosynthetically active radiation can both induce photoprotective capacity allowing barley to overcome high radiation stress. *Plant Physiol Biochem* 93:74-83
- Kozai T, Niu G, Takagaki M (2016) *Plant Factory: An Indoor Vertical Farming System for Efficient Quality Food Production*. Academic Press, London, 405 pp
- Lafont R (1997) Ecdysteroids and related molecules in animals and plants. *Arch Insect Biochem Physiol* 35:3–20
- Landi M, Tattini M, Gould KS (2015) Multiple functional roles of anthocyanins in plant-environment interactions. *Environ Exp Bot* 119:4-17
- Larbi A, Vázquez S, El-Jendoubi H, Msallem M, Abadía J, Abadía A, Morales F (2015) Canopy light heterogeneity drives leaf anatomical, eco-physiological, and photosynthetic changes in olive trees grown in a high-density plantation. *Photosynth Res* 123:141-155
- Li CX, Xu ZG, Dong RQ, Chang SX, Wang LZ, Khalil-Ur-Rehman M, Tao JM (2017) An RNA-seq analysis of grape plantlets grown *in vitro* reveals different responses to blue, green, red LED light, and white fluorescent light. *Front Plant Sci* 8:78
- Liu WG, Ren ML, Liu T, Du YL, Zhou T, Liu XM, LIU J, Sajad H, Yang WY (2017) Effect of shade stress on lignin biosynthesis in soybean stems. *J Integr Agric* 16:60345-7
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. *Methods* 25:402–408
- Maxwell K & Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J Exp Bot* 51:659-68
- McCord JM & Fridovich I (1969) Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 244:6049-6055
- Mengin V, Pyl ET, Alexandre Moraes T, Sulpice R, Krohn N, Encke B, Stitt M (2017) Photosynthate partitioning to starch in *Arabidopsis thaliana* is insensitive to light intensity but sensitive to photoperiod due to a restriction on growth in the light in short photoperiods. *Plant Cell Environ* 40:2608-2627
- Míguez F, Fernández-Marín B, Becerril JM, García-Plazaola JI (2015) Activation of photoprotective winter photoinhibition in plants from different environments: a literature compilation and meta-analysis. *Physiol Plant* 155:414-423
- Míguez F, Fernández-Marín B, Becerril JM, García-Plazaola JI (2017) Diversity of winter photoinhibitory responses: a case study in co-occurring lichens, mosses, herbs and woody plants from subalpine environments. *Physiol Plant* 160:282-296
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405-410

- Müller P, Li Xiao-Ping, Niyogi KK (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol* 125:1558-1566
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- Nakano Y & Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22:867-880
- Naz R, Anis M, El Atta HA (2015) Micropropagation of *Cassia occidentalis* L. and the effect of irradiance on photosynthetic pigments and antioxidative enzymes. *Bio Plant* 59:1-10
- Nisar N, Li L, Lu S, Khin NC, Pogson BJ (2015) Carotenoid metabolism in plants. *Mol Plant* 8:68-82
- Nosaka Y & Nosaka AY (2017) Generation and detection of reactive oxygen species in photocatalysis. *Chem R* 117:11302-11336
- O'Brien TP & McCully ME (1981) The study of plant structure principles and selected methods. Termarcarphi Pty Ltd, Melbourne Australia
- Ort DR & Baker NR (2002) A photoprotective role for O<sub>2</sub> as an alternative electron sink in photosynthesis?. *Curr Opin Plant Biol* 5:193-198
- Oxborough K & Baker NR (1997) Resolving chlorophylla fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components-calculation of qP and Fv'/Fm' without measuring Fo'. *Photosynth Res* 54:135-142
- Paez A, Gebre GM, Gonzalez ME, Tschaplinski TJ (2000) Growth, soluble carbohydrates, and aloin concentration of *Aloe vera* plants exposed to three irradiance levels. *Environ Exp Bot* 44:133-139
- Peguero-Pina JJ, Sisó S, Flexas J, Galmés J, García-Nogales A, Niinemets Ü, Sancho-Knapik D, Saz MA, Gil-Pelegrín E (2017) Cell-level anatomical characteristics explain high mesophyll conductance and photosynthetic capacity in sclerophyllous Mediterranean oaks. *New Phytol* 214:585-596
- Peters JL, Van Tuinen A, Adamse P, Kendrick RE, Koornneef M (1989) High pigment mutants of tomato exhibit high sensitivity for phytochrome action. *J Plant Physiol* 134:661-666
- Piwosz K, Kaftan D, Dean J, Šetlík J, Koblížek M (2018) Nonlinear effect of irradiance on photoheterotrophic activity and growth of the aerobic anoxygenic phototrophic bacterium *Dinoroseobacter shibae*. *Environ Microbiol* 20:724-733
- Poorter H & Nagel O (2000) The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO<sub>2</sub>, nutrients and water: a quantitative review. *Funct Plant Biol* 27:1191-1191
- Powles SB (1984) Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu Rev Plant Physiol* 35:15-44

Romero E, Novoderezhkin VI, Van Grondelle R (2017) Quantum design of photosynthesis for bio-inspired solar-energy conversion. *Nature* 543:355

Rooijen RV, Aarts MG, Harbiso J (2015) Natural genetic variation for acclimation of photosynthetic light use efficiency to growth irradiance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 167:1412-1429

Sánchez-Sánchez J, López-Orenes A, Ferrer MA, Calderón AA (2018) Subtle changes in light intensity affect *in vitro* responses but not *ex vitro* performance of *Limonium sinuatum*. *Biotechnology* 8:335

Santos ELC (2018) Análise da expressão gênica da rota da biossíntese de lignina e caracterização estrutural da parede celular em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) cultivada *in vitro* sob atmosfera enriquecida de CO<sub>2</sub>. Tese, DS em Botânica, UFV

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

Scoffoni C, Kunkle J, Pasquet-Kok J, Vuong C, Patel AJ, Montgomery RA, Givnish TJ, Sack, L (2015) Light-induced plasticity in leaf hydraulics, venation, anatomy, and gas exchange in ecologically diverse Hawaiian lobeliads. *New Phytol* 207:43-58

Shahzad B, Tanveer M, Che Z, Rehman A, Cheema SA, Sharma A, Song H, Shams R, Zhaorong D (2018) Role of 24-epibrassinolide (EBL) in mediating heavy metal and pesticide induced oxidative stress in plants: A review. *Ecotox Environ Safe* 147:935-944

Silva ST, Bertolucci SKV, da Cunha SHB, Lazzarini LES, Tavares MC, Pinto JEBP (2017) Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 129:501-510

Singh AS, Jones AMP, Shukla MR, Saxena PK (2017) High light intensity stress as the limiting factor in micropropagation of sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 129:209-221

Solhaug KA (2018) Low-light recovery effects on assessment of photoinhibition with chlorophyll fluorescence in lichens. *Lichenology* 50:139-145

Soontornchainaksaeng P, Chaicharoen S, Sirijuntarut M, Kruatrachue M (2001) *In vitro* studies on the effect of light intensity on plant growth of *Phaius tankervilleae* (Banks ex L'Herit.) Bl. and *Vanda coerulea* Griff. *Sci Asia* 27:233-237

Szopa A, Starzec A, Ekiert H (2018) The importance of monochromatic lights in the production of phenolic acids and flavonoids in shoot cultures of *Aronia melanocarpa*, *Aronia arbutifolia* and *Aronia × prunifolia*. *J Photochem Photobiol Biol* 179:91-97

- Thussagunpanit J, Jutamanee K, Homvisasevongsa S, Suksamrarn A, Yamagami A, Nakano T, Asami T (2017) Characterization of synthetic ecdysteroid analogues as functional mimics of brassinosteroids in plant growth. *J Steroid Biochem Mol Biol* 172:1-8
- Tietz S, Hall CC, Cruz JA, Kramer DM (2017) NPQ (T): a chlorophyll fluorescence parameter for rapid estimation and imaging of non-photochemical quenching of excitons in photosystem-II-associated antenna complexes. *Plant Cell Environ* 40:1243-1255
- Tokarz K, Makowski W, Banasiuk R, Krolicka A, Piwowarczyk B (2018) Response of *Dionaea muscipula* J. Ellis to light stress in *in vitro*: physiological study. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 134:65-77
- Trabucco GM, Matos DA, Lee SJ, Saathoff AJ, Priest HD, Mockler, TC, Hazen SP (2013) Functional characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase and caffeic acid *O*-methyltransferase in *Brachypodium distachyon*. *BMC Biotechnol* 13:1-18
- Tripathi SN, Raghubanshi AS (2014) Seedling growth of five tropical dry forest tree species in relation to light and nitrogen gradients. *J Plant Ecol* 27:250-263
- Tsukagoshi Y, Ohyama K, Seki H, Akashi T, Muranaka T, Suzuki H, Fujimoto Y (2016) Functional characterization of CYP71D443, a cytochrome P450 catalyzing C-22 hydroxylation in the 20-hydroxyecdysone biosynthesis of *Ajuga hairy* roots. *Phytochemistry* 127:23-28
- Vandenhove H, Vanhoudt N, Cuypers A, van Hees M, Wannijn J, Horemans N (2010) Life-cycle chronic gamma exposure of *Arabidopsis thaliana* induces growth effects but no discernable effects on oxidative stress pathways. *Plant Physiol Biochem* 48:778-786
- Vogel J (2008) Unique aspects of the grass cell wall. *Curr Opin Plant Biol* 11:301-307
- Walker DA (1976) Regulatory mechanisms in photosynthetic carbon metabolism. *Curr Top Cell Regul* 11:203-241
- Wang Y, Chen X, Xiang CB (2007) Stomatal density and bio-water saving. *J Integ Plant Biol* 49:1435-1444
- Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol* 144:307-313
- Werner C, Correia O, Beyschlag W (2002) Characteristic patterns of chronic and dynamic photoinhibition of different functional groups in a Mediterranean ecosystem. *Funct Plant Biol* 29:999-1011
- Ye L, Gao HY, Zou Q (2000) Responses of the antioxidant systems and xanthophyll cycle in *Phaseolus vulgaris* to the combined stress of high irradiance and high temperature. *Photosynthetica* 38:205-210
- Young AJ (1991) The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiol Plant* 83:702-708

Zha L & Liu W (2018) Effects of light quality, light intensity, and photoperiod on growth and yield of cherry radish grown under red plus blue LEDs. *Hort Environ Biotechnol* 59:511-518

Zhang GY, Zhang YJ, Xu JT, Niu XP, Qi JM, Tao AF, Zhang LW, Fang PP, Lin LH, Su JG (2014) The *CCoAOMT1* gene from jute (*Corchorus capsularis* L.) is involved in lignin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 546:398-402

Zhang L, Ma G, Yamawaki K, Ikoma Y, Matsumoto H, Yoshioka T, Ohta S, Kato M (2015) Effect of blue LED light intensity on carotenoid accumulation in citrus juice sacs. *J Plant Physiol* 188:58-63

Zhao HJ & Tan JF (2005) Role of calcium ion in protection against heat and high irradiance stress-induced oxidative damage to photosynthesis of wheat leaves. *Photosynthetica* 43:473-476

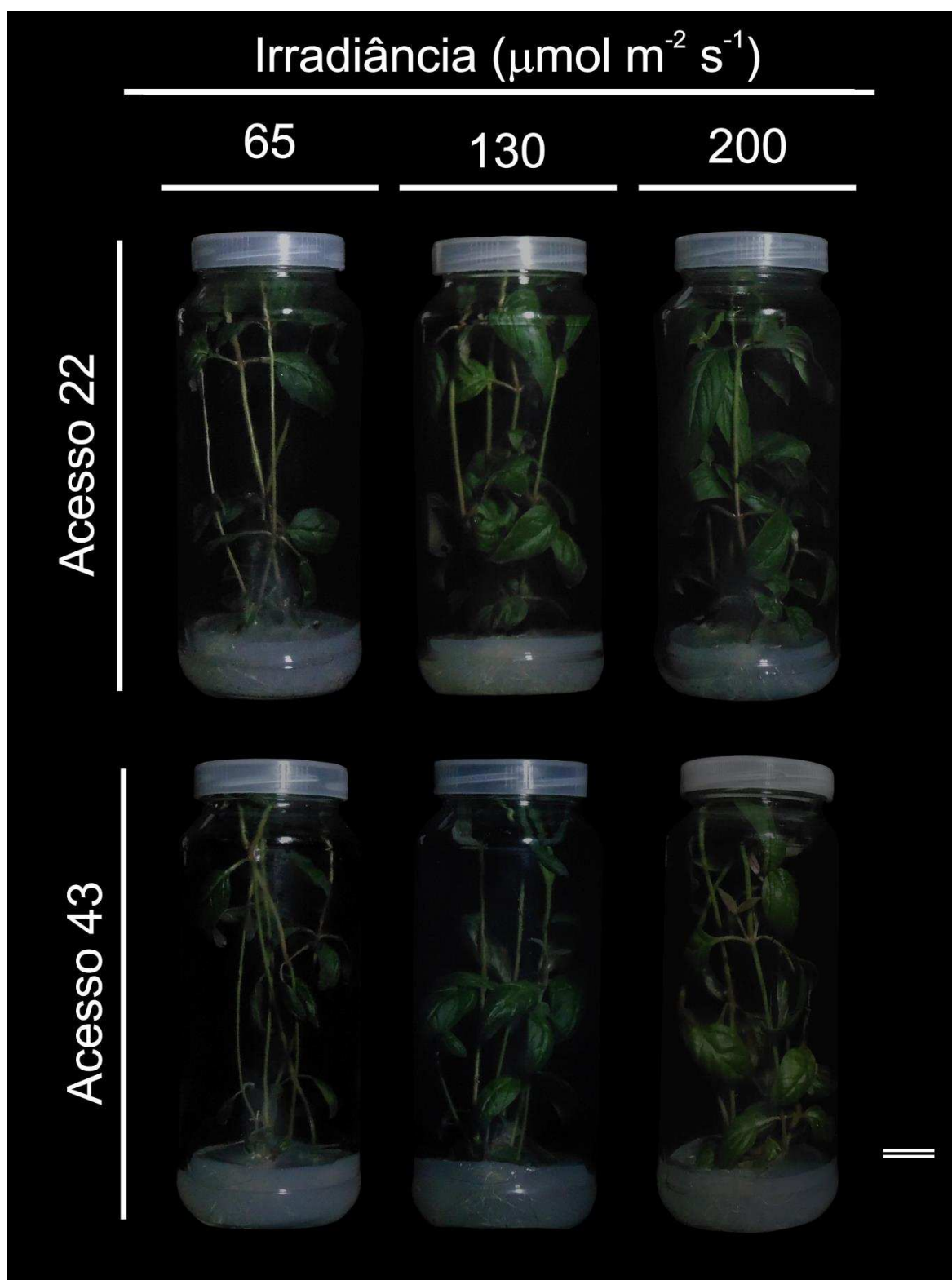
## TABELAS

**Tabela 1.** Variáveis de crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata* após 30 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes irradiâncias (65, 130 e 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

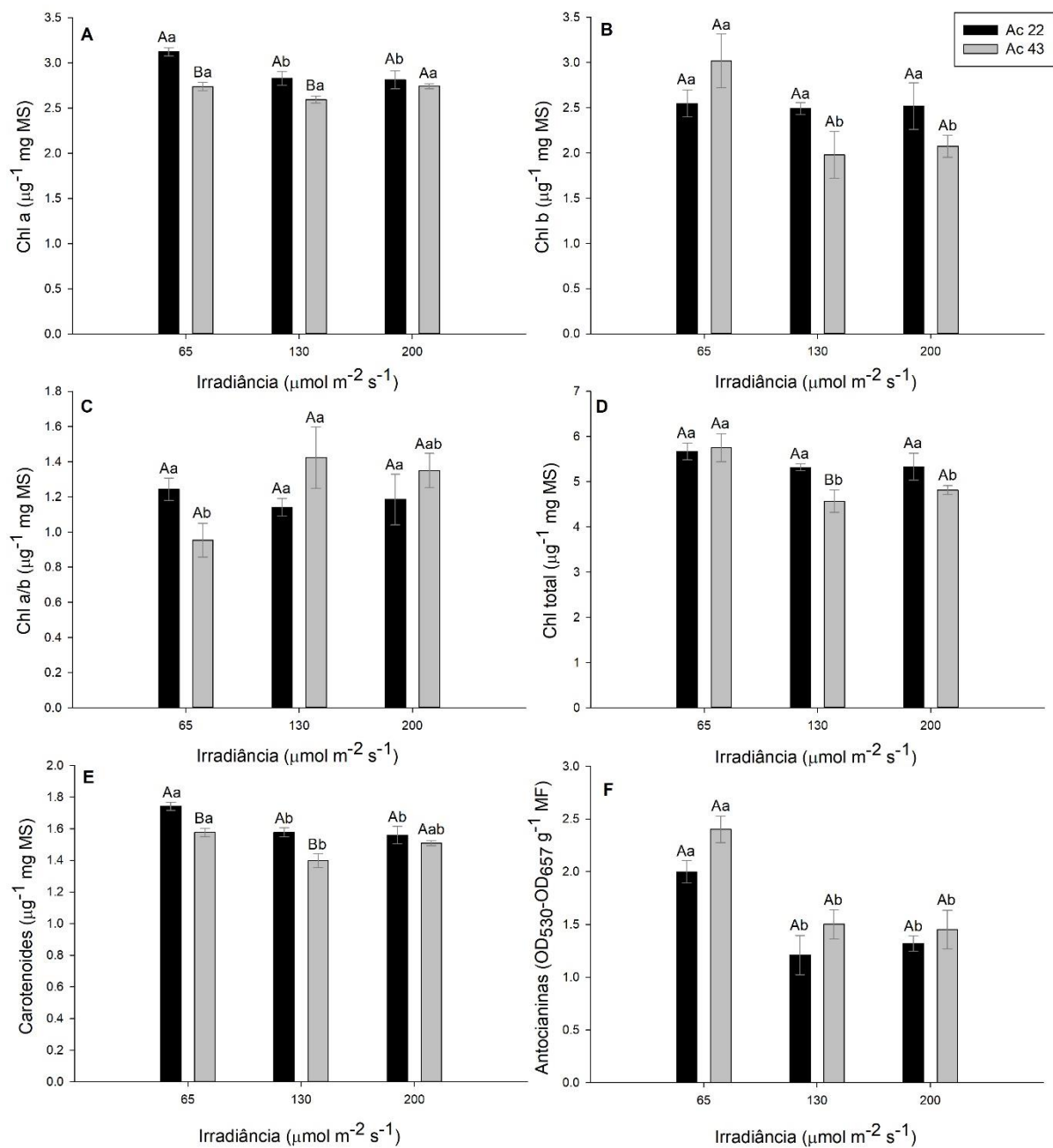
Variáveis de crescimento	Acesso	Irradiância ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )		
		65	130	200
Comprimento do caule (cm)	22	16.49 Aa	16.10 Bb	13.28 Bb
	43	17.99 Aa	19.82 Aa	17.77 Aa
Comprimento da maior raiz (cm)	22	6.29 Aa	5.35 Aa	5.07 Aa
	43	3.44 Ba	5.02 Aa	4.24 Aa
Massa seca da parte aérea (g)	22	0.28 Ac	0.37 Ab	0.44 Aa
	43	0.22 Bc	0.34 Ab	0.44 Aa
Massa seca da raiz (g)	22	0.06 Ab	0.07 Ab	0.09 Aa
	43	0.05 Ab	0.07 Aa	0.08 Aa
Massa seca total (g)	22	0.34 Ac	0.44 Ab	0.53 Aa
	43	0.27 Bc	0.41 Ab	0.52 Aa
Área foliar ( $\text{cm}^2 \text{ planta}^{-1}$ )	22	26.82 Ab	34.80 Aa	41.03 Aa
	43	14.87 Bc	24.94 Bb	32.74 Ba

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula dentro de uma coluna ou minúscula dentro de uma linha não são diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados são apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão (n = 4).

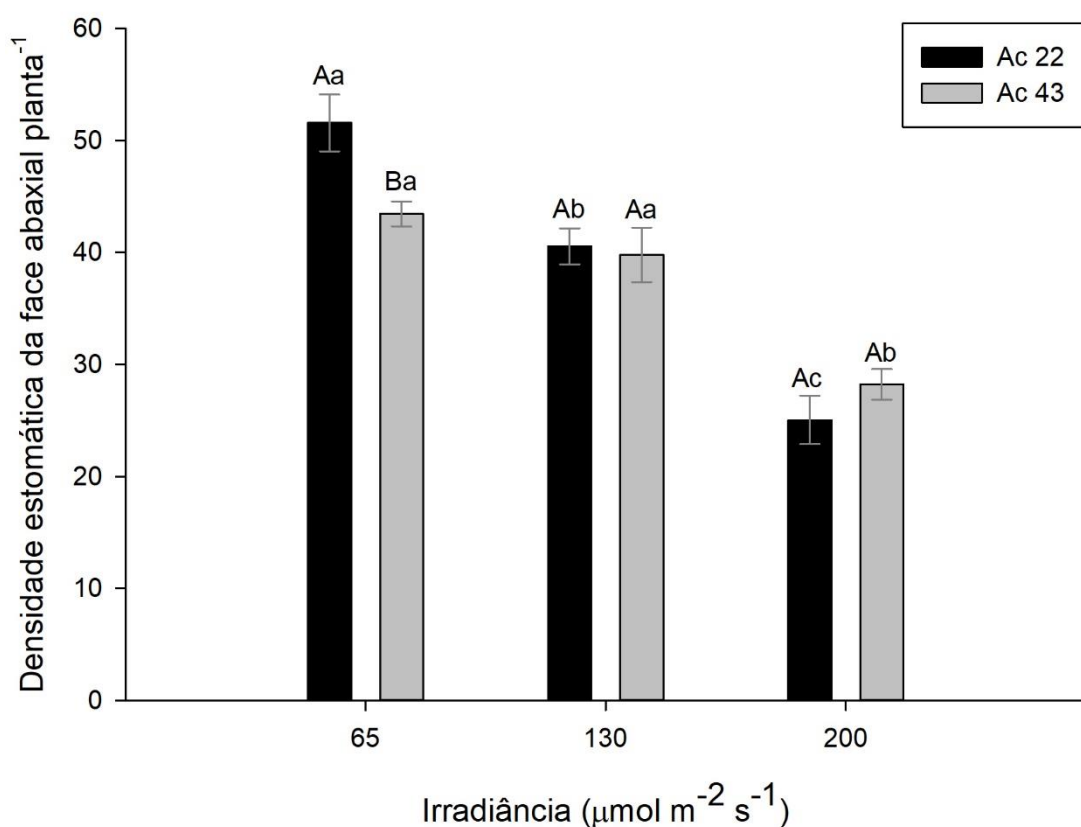
FIGURAS



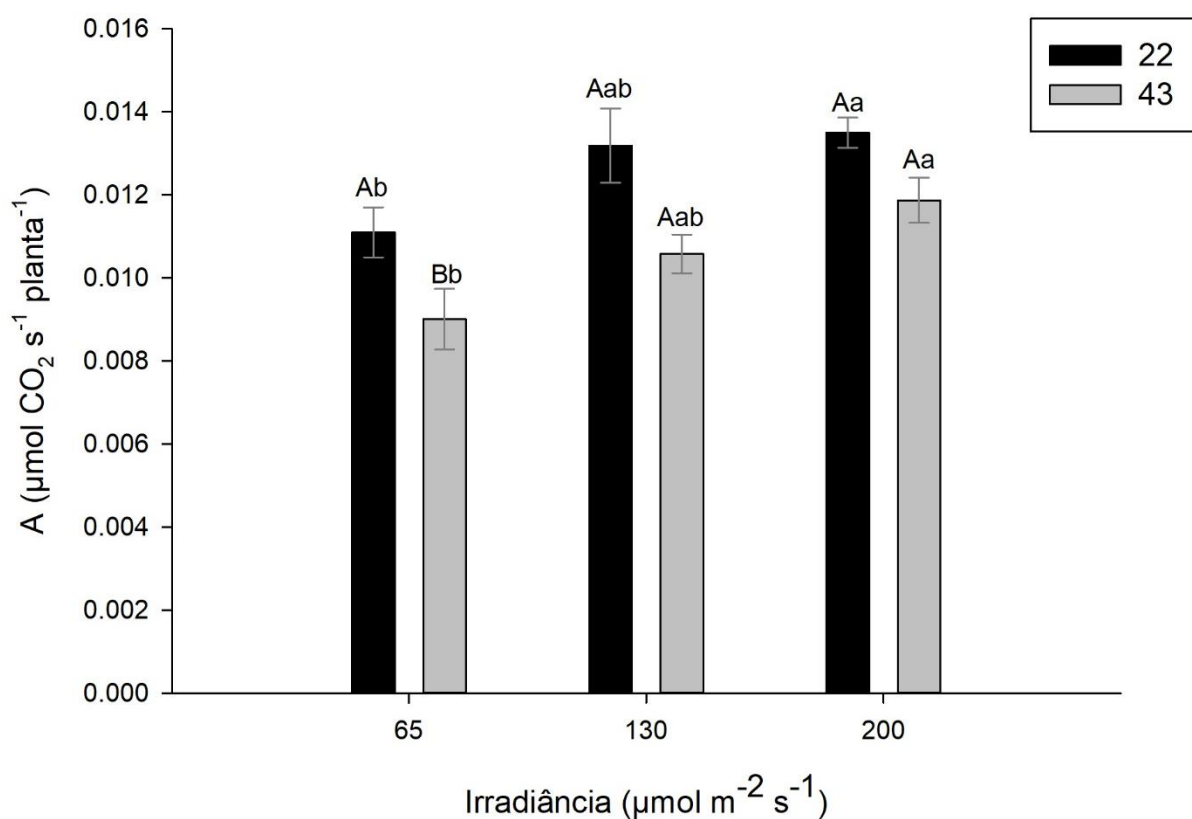
**Figura 1.** Plantas de *Pfaffia glomerata* após 30 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes irradiâncias (65, 130 e 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Barras = 2 cm.



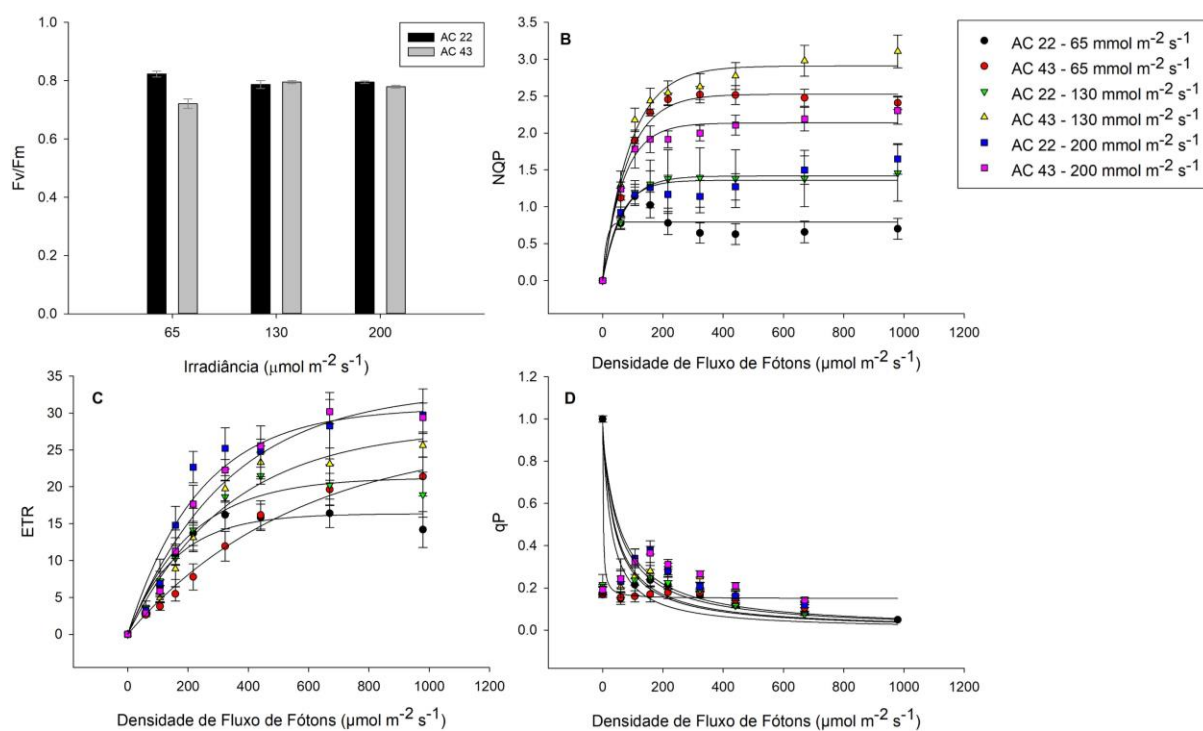
**Figura 2.** Teores de pigmentos em plantas de *Pfaffia glomerata* após 30 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes irradiâncias: 65, 130 e 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . (A) Clorofila a ( $\mu\text{g}^{-1} \text{mg MS}$ ); (B) Clorofila b ( $\mu\text{g}^{-1} \text{mg MS}$ ); (C) Clorofila a/b ( $\mu\text{g}^{-1} \text{mg MS}$ ), (D) Clorofila total ( $\mu\text{g}^{-1} \text{mg MS}$ ), (E) Carotenoides ( $\mu\text{g}^{-1} \text{mg MS}$ ), (F) Antocianinas ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ ). Letras maiúsculas iguais dentro dos acessos e minúsculas iguais dentro das irradiâncias não são diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão (n = 5).



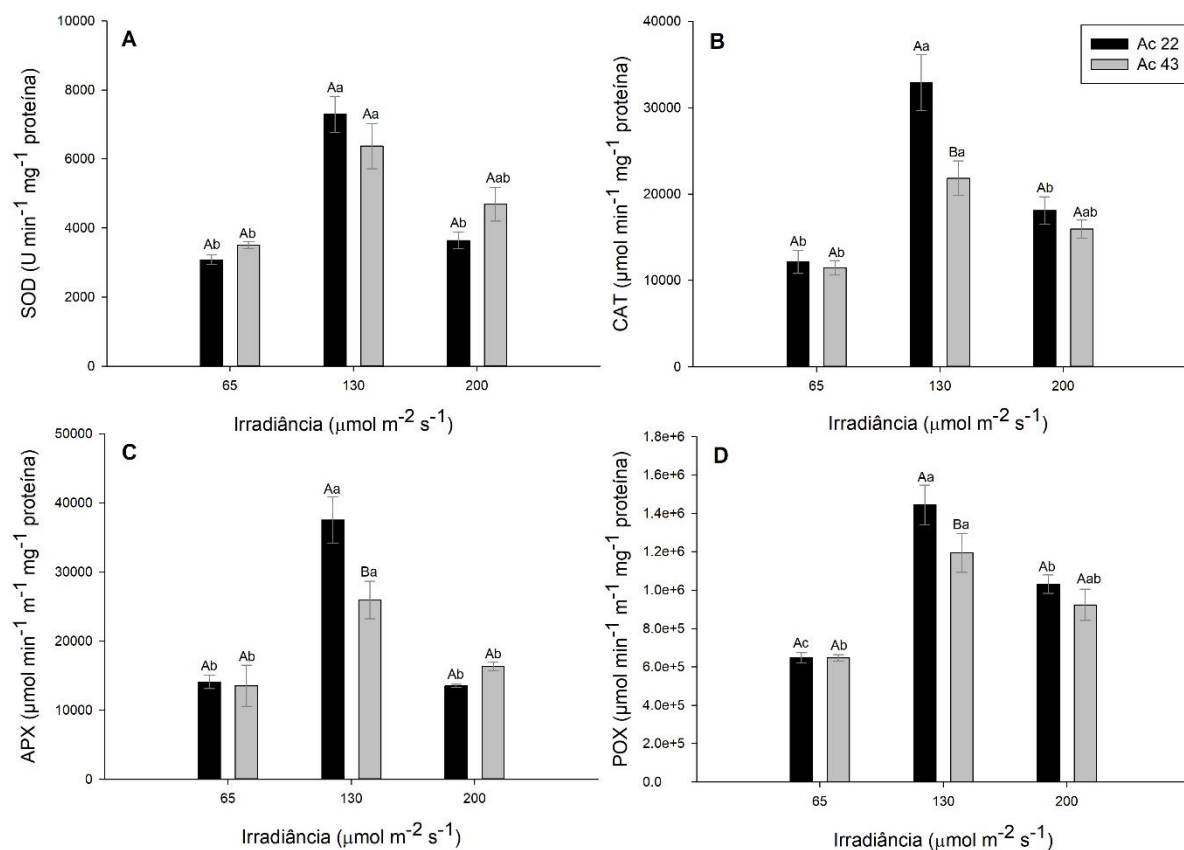
**Figura 3.** Densidade estomática da face abaxial em plantas de *Pfaffia glomerata* após 30 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes irradiâncias: 65, 130 e 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Letras maiúsculas iguais dentro dos acessos e minúsculas iguais dentro das irradiâncias não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão ( $n = 3$ ).



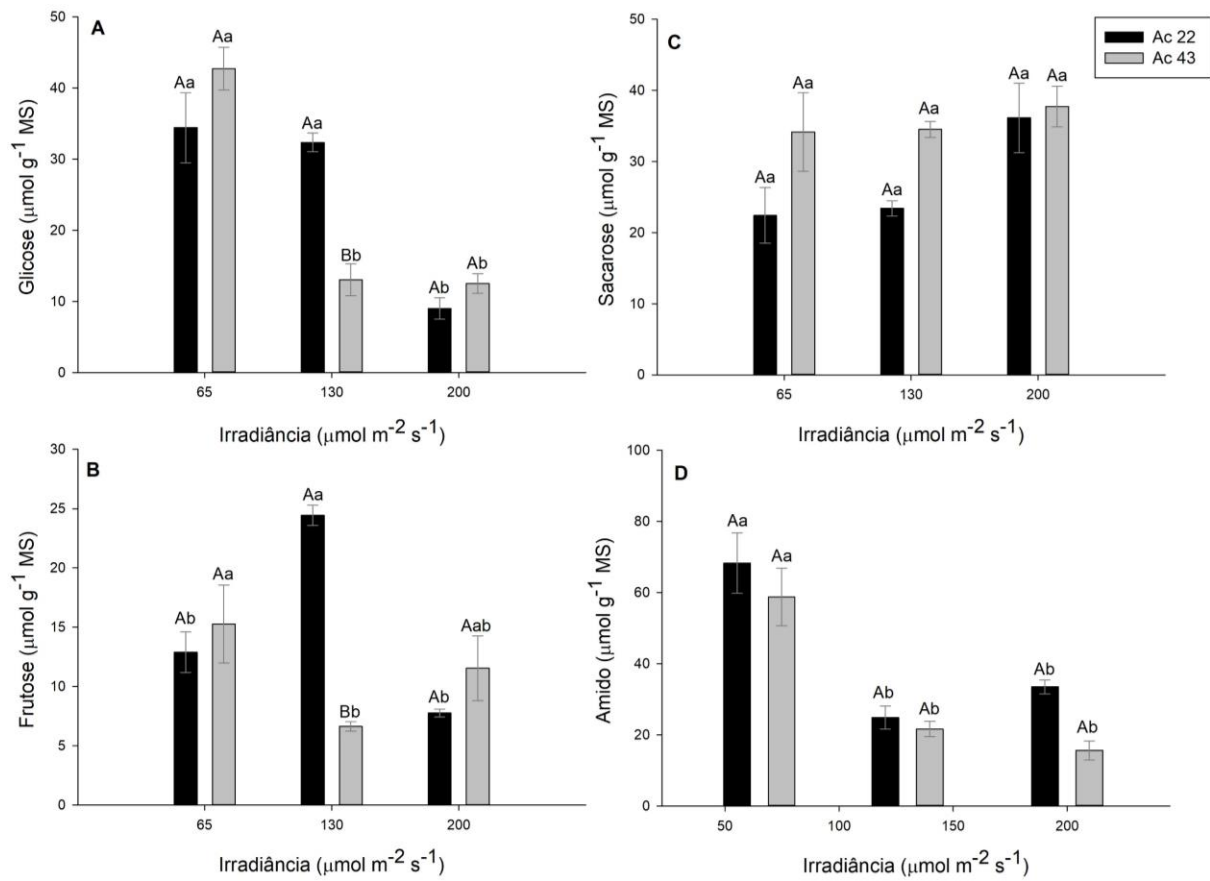
**Figura 4.** Taxa fotossintética ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{s}^{-1} \text{planta}^{-1}$ ) de plantas de *Pfaffia glomerata* após 30 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes irradiâncias: 65, 130 e 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Letras maiúsculas iguais entre os acessos e minúsculas iguais entre as irradiâncias do mesmo acesso não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão ( $n = 4$ ).



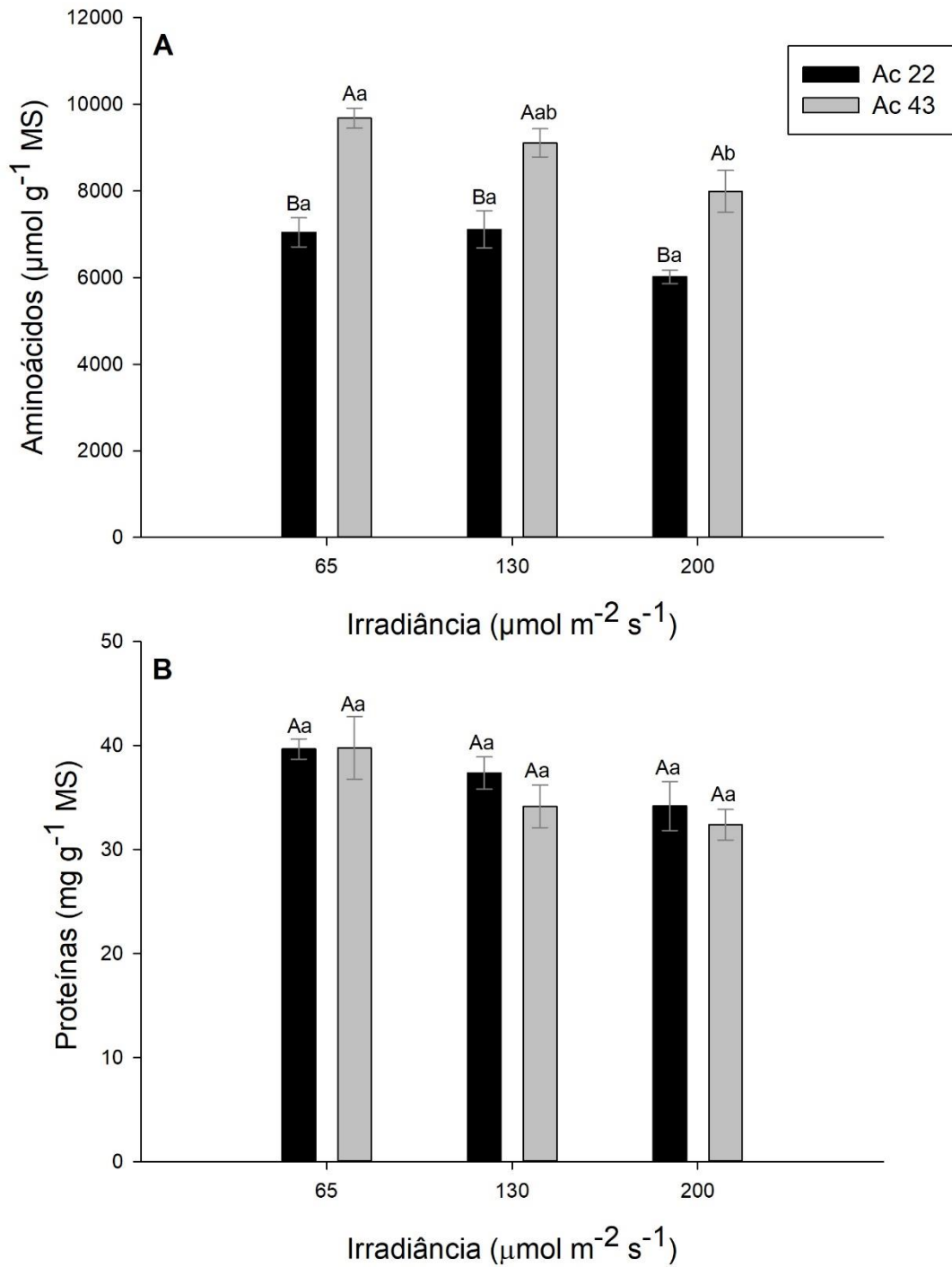
**Figura 5.** Fluorescência da clorofila de plantas de *Pfaffia glomerata* após 30 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes irradiância: 65, 130 e 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . (A) Rendimento quântico máximo do PS II ( $F_v/F_m$ ); (B); Gradiente não fotoquímico (NQP); (C) Taxa de transporte de elétrons (ETR); (D) Gradiente fotoquímico ( $q_p$ ). Dados apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão ( $n = 4$ ).



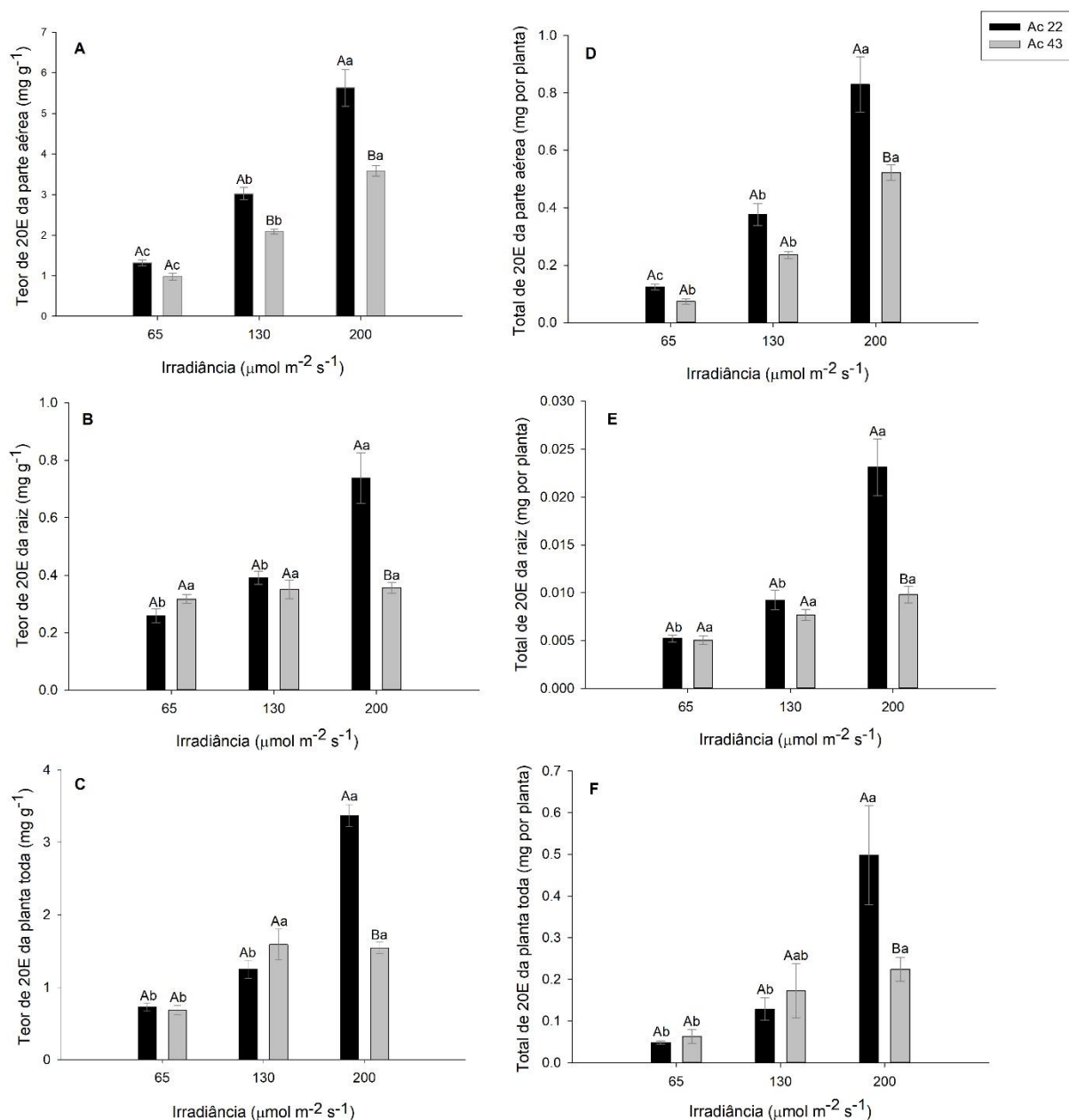
**Figura 6.** A atividade das enzimas antioxidantes em plantas de *Pfaffia glomerata* após 30 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes irradiâncias: 65, 130 e 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . (A) Superóxido dismutase (SOD), (B) Catalase (CAT), (C) Ascorbato peroxidase (APX) e (D) Peroxidases (POD). Letras maiúsculas iguais dentro dos acessos e minúsculas iguais dentro das irradiâncias não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão (n = 4).



**Figura 7.** Determinação de açúcares de plantas de *Pfaffia glomerata* após 30 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes irradiâncias: 65, 130 e 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . (A) Glicose ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$ ); (B) Frutose ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$ ) e (C) Sacarose ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$ ). Letras maiúsculas iguais dentro dos acessos e minúsculas iguais dentro das irradiâncias não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão ( $n = 4$ ).

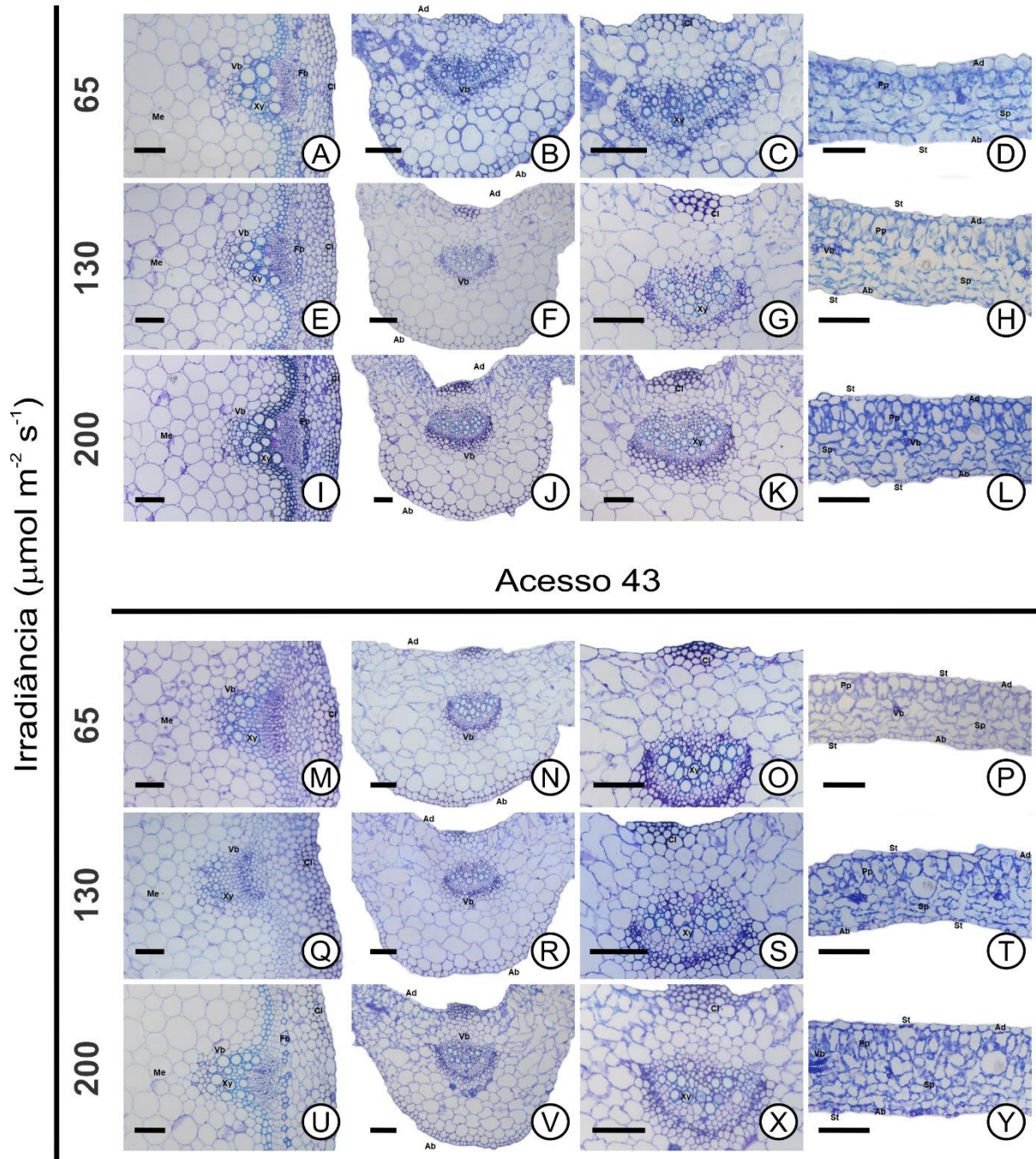


**Figura 8.** Determinação de aminoácidos e proteína de plantas de *Pfaffia glomerata* após 30 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes irradiâncias: 65, 130 e 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . (A) Aminoácidos ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS) e (B) Proteínas ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS). Letras maiúsculas iguais dentro dos acessos e minúsculas iguais dentro das irradiâncias não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão (n = 5).

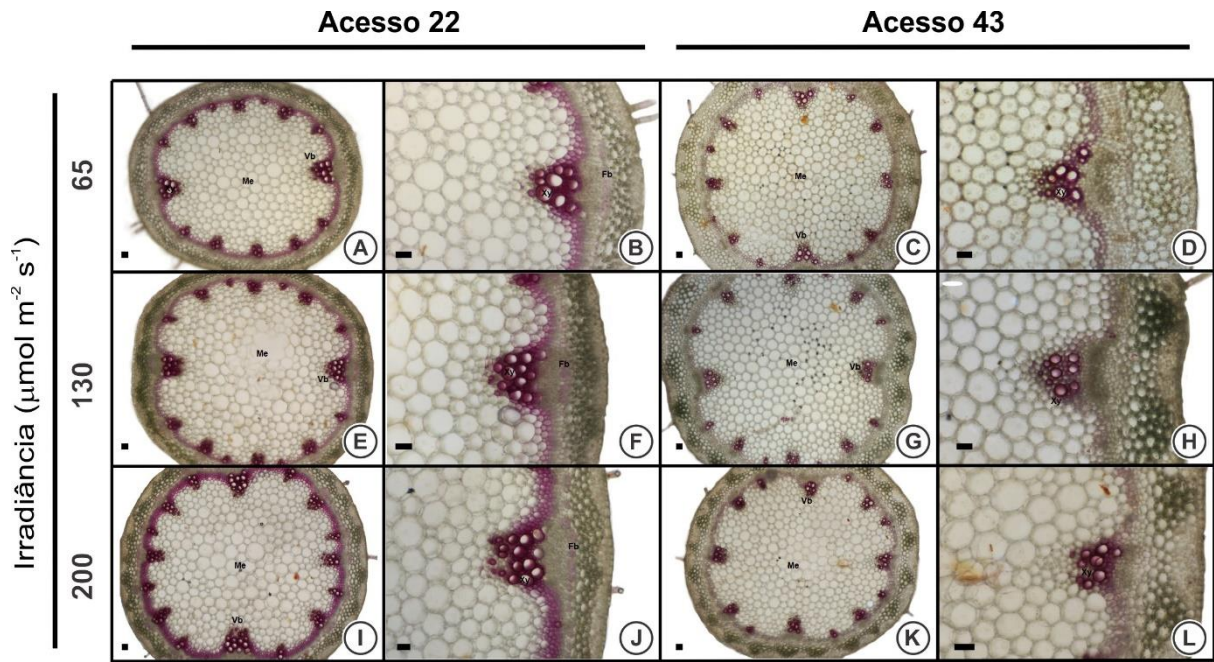


**Figura 9.** Determinação de 20-hidroxiecdisona (20E) de plantas de *Pfaffia glomerata* após 30 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes irradiâncias: 65, 130 e 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Teor de 20E (mg/g) da parte aérea (A), raiz (B) e planta toda (C). Produção de 20E/frasco (mg) da parte aérea (D), raiz (E) e planta toda (F). Letras maiúsculas iguais dentro dos acessos e minúsculas iguais dentro das irradiâncias não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão (n = 4).

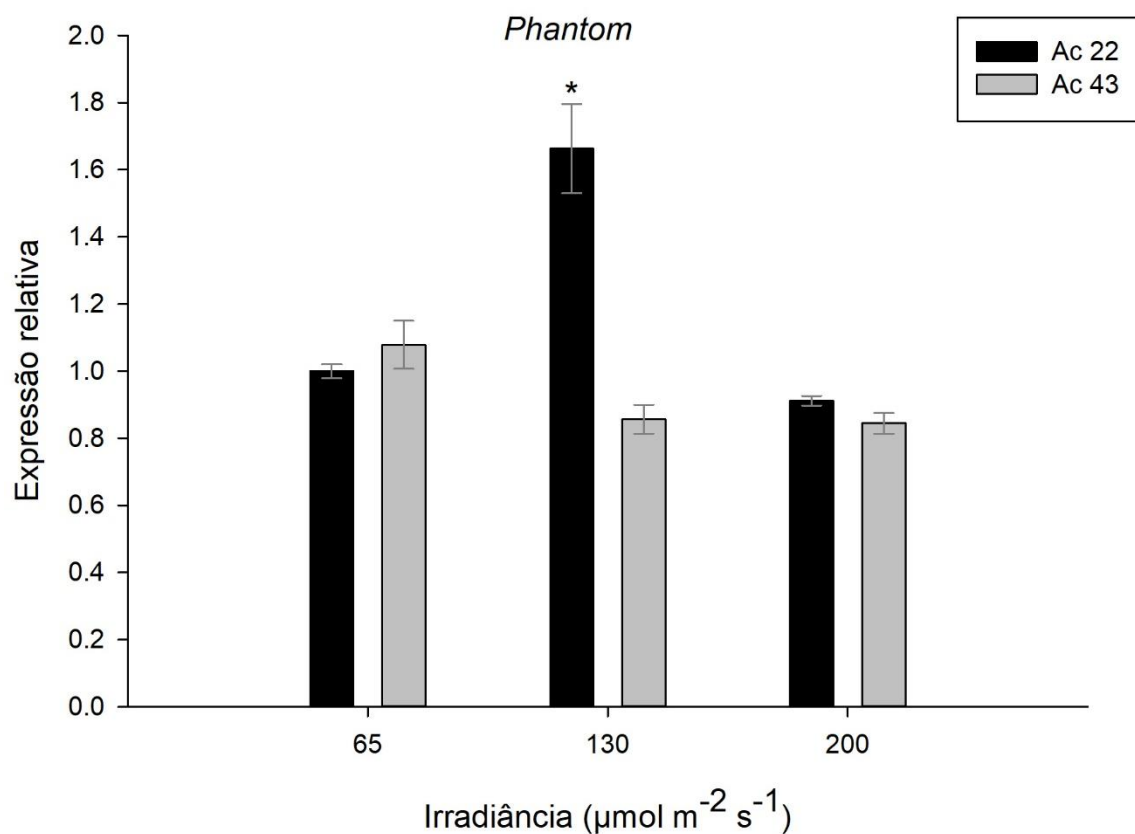
## Acesso 22



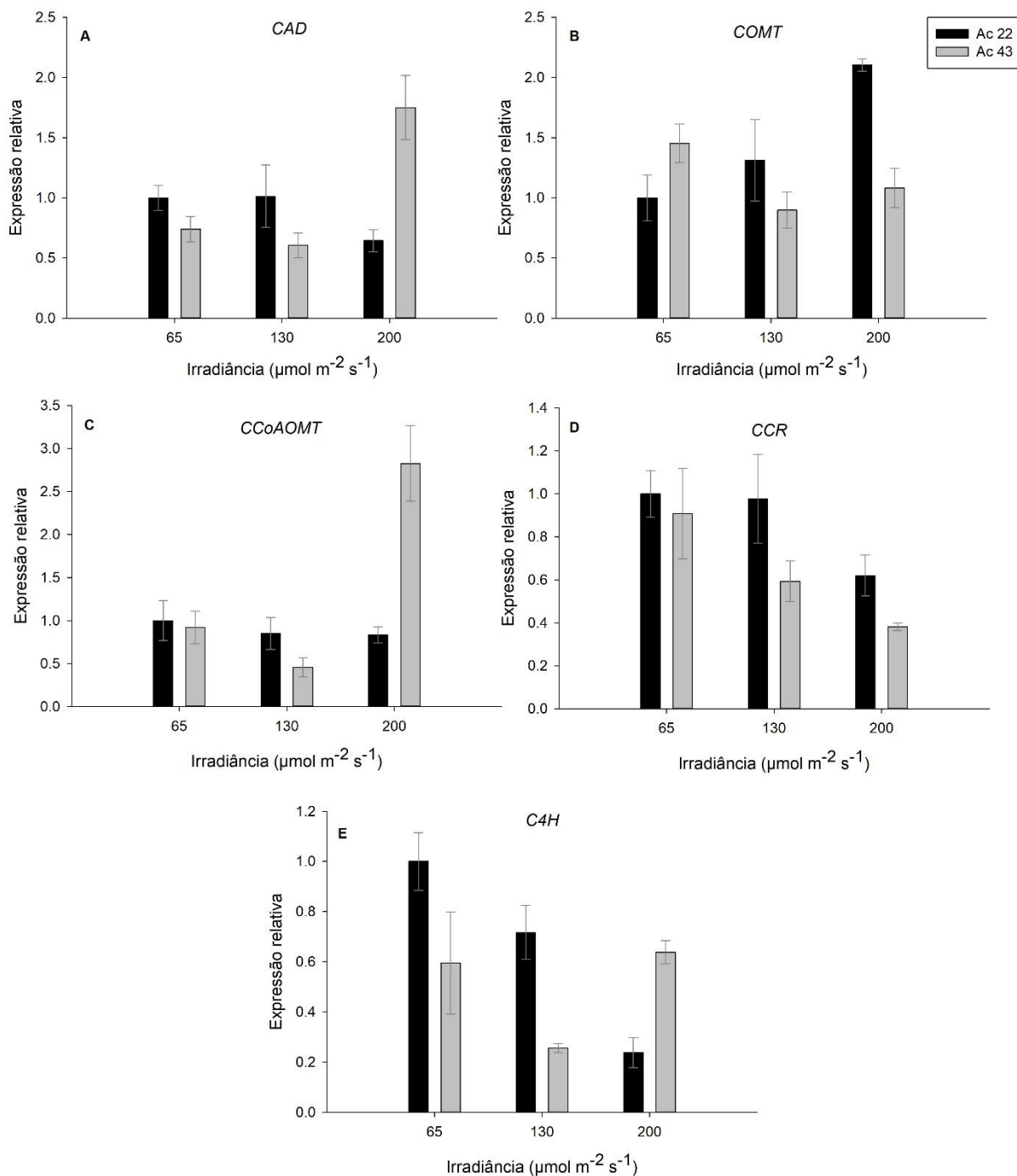
**Figura 10.** Seções transversais da porção mediana de folha e do caule de plantas de *Pfaffia glomerata* após 30 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes irradiâncias: 65, 130 e 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Detalhes do feixe vascular do caule (A, E, I, M, Q, U). Feixe vascular principal da porção mediana da folha (B, F, J, N, R, V). Detalhes do feixe vascular principal da folha (C, G, K, O, S, X). Detalhes da lâmina foliar (D, H, L, P, T, Y). Abreviaturas: Cl - Colênquima; Fb – fibra; Ad - epiderme superfície adaxial; Ab - superfície abaxial da epiderme; St - estômata; Me - medula; Vb - feixe vascular; Pp - parênquima paliçádico e Sp - parênquima esponjoso. Barra = 200  $\mu\text{m}$



**Figura 11.** Seções transversais da porção mediana do caule de plantas de *Pfaffia glomerata* após 30 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes irradiâncias: 65, 130 e 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Seções do caule (A, C, E, G, I, K) e detalhes do feixe vascular do caule (B, D, F, H, J, L) Abreviaturas: Fb – fibra; Me - medula; Vb - feixe vascular; Xy - xilema. Barras = 100  $\mu\text{m}$



**Figura 12.** Expressão relativa normalizada do gene *Phantom* de plantas de *Pfaffia glomerata* após 30 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes irradiâncias: 65, 130 e 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Expressão gênica relativa ao gene normalizador *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase*. Valores representam médias  $\pm$  erro padrão (n = 3),  $*=P<0,05$ , pelo teste de Dunnett



**Figura 13.** Expressão relativa de genes da via de síntese de lignina de plantas de *Pfaffia glomerata* após 30 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes irradiâncias: 65, 130 e 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . (A) *PgCAD*; (B) *PgCOMT*; (C) *PgCCoAOMT*; (D) *PgCCR* e (E) *PgC4H*. A expressão foi normalizada pelo gene *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase*. Dados são apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão (n = 3). Não houve diferença estatística entre os tratamentos,  $P < 0,05$ , pelo teste de Dunnett.

## CAPITULO II

### O BALANÇO ENTRE AS LUZES AZUL E VERMELHO AFETA A MORFOGÊNESE E O CONTEÚDO DE 20-HIDROXIECDISONA EM ACESSOS DE *Pfaffia glomerata* (SPRENG.) PEDERSEN *in vitro*

#### RESUMO

A influência da qualidade da luz na morfogênese e no conteúdo de metabólitos secundários em *Pfaffia glomerata* foi avaliada em cultura *in vitro*. Dentre os metabólitos secundários, a 20-hidroxicdisona (20E) é um fitoecdisteroide presente em algumas espécies vegetais amplamente utilizado na indústria farmacêutica, por exibir propriedades medicinais. No presente estudo avaliou-se o efeito da qualidade de luz na morfofisiologia e na produção de 20E em *P. glomerata in vitro*. Segmentos nodais de dois acessos (Ac22 e Ac 43) de *P. glomerata* foram inoculados em meio de cultura constituído pelos sais e vitaminas MS. As culturas foram mantidas a  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 16 h e irradiância de  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fornecidas por diferentes proporções de luz LED vermelho (V) e azul (A): 1V:1A, 1V:3A e 3V:1A. A igual proporção de luz vermelha e azul (1V:1A) aumentou o acúmulo de biomassa, o conteúdo de antocianina e a produção de 20E, sendo o incremento desse fitoecdisteroide de aproximadamente de 30-40%, tanto da parte aérea, como no sistema radicular. Além disso, no tratamento 1V:1A houve aumento no tamanho dos feixes vasculares e elementos de vaso, forte lignificação do xilema e espessamento da parede celular na região interfascicular. O tratamento 1V:3A, por sua vez foi o que proporcionou a maior taxa fotossintética e de transporte de elétrons, além de induzir o aumento da atividade das enzimas do estresse oxidativo. Já o conteúdo de Chl *b*, Chl *a/b*, Chl total e o NPQ variaram mais entre os diferentes acessos do que quanto às diferentes fontes lumínicas, mostrando que existe grande variabilidade de respostas entre os acessos. Em relação ao metabolismo primário, a qualidade espectral afetou cada acesso de forma diferenciada, no Ac22 o conteúdo de frutose foi maior nos tratamentos 1V:1A e 1V:3A, e o acúmulo de amido em 1V:3A, já o teor de sacarose foi maior em plantas cultivadas na proporção 3V:1A. Em plantas do Ac43, os açúcares não foram influenciados pela qualidade espectral, mas o conteúdo de amido foi maior nas plantas do tratamento 3V:1A. Diferentes proporções do balanço entre as faixas espectrais do azul e do vermelho afetam a morfofisiologia e a produção de 20E em plantas *in vitro* de *P. glomerata*. Esse trabalho fornece novas perspectivas a respeito da qualidade espectral no

ambiente *in vitro* e pode auxiliar na otimização de protocolos de propagação em larga escala de plantas de *P. glomerata* para a produção de 20E.

**Palavras-chave:** Cultura de tecidos, metabolismo secundário, fitoecdisteroide, qualidade de luz, ginseng-brasileiro.

## ABSTRACT

The influence of light quality on morphogenesis and content of secondary metabolites in *Pfaffia glomerata* was evaluated *in vitro* culture. 20-Hydroxycycosone (20E), a phytoecdysteroid found in some species (i.e. *Pfaffia glomerata*), is a secondary metabolite widely used in the pharmaceutical industry, known to exhibit medicinal properties. We evaluated the effect of light quality on morphology and the production of 20E in two accessions (Ac22 and Ac43) of *P. glomerata in vitro*. For this, nodal segments of Ac22 and Ac43 of *P. glomerata* were inoculated in MS culture medium. The cultures were maintained at  $25 \pm 2$  ° C, 16h-photoperiod and irradiances of  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  provided by different proportions of red (R) and blue (B) LED light: 1R:1B, 1R:3B and 3R:1B. Compared to other treatments, the same proportion of red and blue light (1R:1B) positively influenced biomass accumulation, anthocyanin content and 20E production. The increment of this phytoecdysteroid is approximately 30-40%, both in shoot and root. In addition, in the 1V: 1A treatment there was an increase in the size of vascular bundles and vessel elements, strong xylem lignification and thickening of the cellular wall in the interfascicular region. The 1R:3B treatment provided the highest photosynthetic and electron transport rate, in addition to inducing increased activity of oxidative stress enzymes. The content of Chl *b*, Chl *a / b*, total Chl and NPQ varied more between the different accessions than with the different light sources, showing that there is great variability of responses between the accesses. In relation to the primary metabolism, the spectral quality affected each accession in a different way. In the Ac22, fructose content was higher in the treatments 1R:1B and 1R:3B, while starch accumulation was higher in 1R:3B and the content of sucrose was greater in plants cultured under 3R:1B light. In plants of Ac43, the sugars were not influenced by the light quality, but the starch content was higher in the 3R:1B treatment. Different balance ratios between blue and red spectral bands affect morphophysiology and 20E production in *in vitro P. glomerata* plants. This work provides new perspectives on spectral quality in the *in vitro* environment and may help in the optimization of large-scale propagation protocols of *P. glomerata* plants for the production of 20E.

**Key words:** Tissue culture, secondary metabolism, phytoecdysteroids, light quality, Brazilian ginseng

## INTRODUÇÃO

O espectro de luz é constituído por diferentes faixas de comprimento de onda, que vai desde a luz ultravioleta (10-400 nm), luz visível (400-450 nm violeta; 450-500 nm azul; 500-570 nm verde; 570-590 nm amarelo; 590-610 nm laranja / âmbar; 610-760 nm vermelho) até a luz infravermelha (700-1000 nm). Porém, apenas 48% de toda energia solar corresponde à radiação fotossinteticamente ativa (Moheimani & Parlevliet, 2013).

A luz funciona como um sinal que é percebido por diferentes fotorreceptores, que apresentam respostas fisiológicas e bioquímicas específicas em cada estágio da planta (Smith, 2000; Huche-Thelier et al., 2016; van Gelderen et al., 2018). As fototropinas percebem a luz azul, e medeiam o fototropismo, movimento de cloroplastos e abertura estomática (Briggs e Christie, 2002). Os criptocromos também percebem a luz azul, mas exercem papel no florescimento, estiolamento, abertura estomática e alongamento da raiz primária (Galvão & Fankhauser, 2015; Canamero et al., 2006). Os fitocromos percebem a luz no vermelho e vermelho distante, e apresentam função no controle da germinação, desenvolvimento de estômatos, transição de floração, senescência e sombreamento (Franklin & Quail, 2010). E por último, o fotorreceptor ultravioleta-B (UVR8), que detecta a luz ultravioleta na faixa de 280-315 nm, e participa nos processos de inibição do crescimento do hipocótilo, morfogênese foliar, fechamento estomático e reparação de danos causados pela luz UV (Binkert et al., 2014; Galvão & Fankhauser, 2015).

O uso de LEDs no cultivo *in vitro* de plantas tem sido estudada em várias espécies (Edesi et al., 2017; Ferreira et al., 2017; Muneer et al., 2017; Mamedes-Rodrigues et al., 2018; Cioć et al., 2018; Tokarz et al., 2018; Izzo et al., 2019). A LED apresenta inúmeras vantagens em comparação com a iluminação tradicional (como lâmpadas fluorescentes, incandescentes, metal halogenado ou sólido de alta pressão), como baixo custo de energia, alta eficiência energética, durabilidade, tamanho pequeno, baixa emissão de calor e especialmente a capacidade de controlar a composição espectral (Shukla et al., 2017; Longcore et al., 2018; Long et al., 2018; Monostori et al., 2018).

A capacidade de controlar a composição espectral de fontes de luz LED permite o seu uso de forma isolada, com lâmpadas monocromáticas ou a combinação de LEDs de cores diferentes. As LEDs azul e vermelho (comprimento de onda entre 400 nm e 700nm, respectivamente) são amplamente utilizadas no cultivo *in vitro*, pois são as principais fontes de energia para a assimilação de carbono nas plantas (Lian et al., 2002; Nhut et al., 2003; Shin et al., 2008; Lin et al., 2011; Daud et al., 2013; Gupta & Sahoo, 2015; Ramírez-

Mosqueda et al., 2017; Tung et al., 2018). Em *Lachenalia* sp. cultivadas *in vitro*, a luz LED azul estimulou a formação de brotos, gemas e maior conteúdo fenólico total, já a luz LED vermelha induziu o alongamento dos brotos e a produção de açúcares (Bach et al., 2018). Cioć et al. (2018) observaram que a luz LED vermelha aumentou a taxa de multiplicação dos brotos e os teores de ácido fenólico e flavonoides em plantas de *Myrtus communis in vitro*. Em plantas de citrus e aspargo a luz LED azul estimulou a produção de pigmentos fotoprotetores (Zhang et al., 2015; Mastropasqua et al., 2016). A combinação de LEDs de cores diferentes pode favorecer o crescimento e desenvolvimento das plantas. Ramírez-Mosqueda et al. (2017) observaram em plantas *in vitro* de *Stevia rebaudiana* que a luz vermelha induziu a formação de raízes; no entanto, a composição de luz vermelha-azul (1:1) estimulou a maior produção e folhas e induziu o teor de clorofila, o que favoreceu a aclimatação dessas plântulas. Em plantas de tomateiros, os maiores valores na taxa fotossintética foram observados quando as plantas foram cultivadas na combinação de LEDs azul e vermelho do que sob lâmpadas monocromáticas (Xiao Ying et al., 2011). Portanto, as respostas das plantas à qualidade de luz são particulares de cada espécie, é às vezes, até mesmo do cultivar (Funk et al., 2017).

A luz pode influenciar tanto o metabolismo primário, como na produção de carboidratos, que estão diretamente relacionados com o processo fotossintético (Park et al., 2013; Bian et al., 2015; Miyagi et al., 2017), quanto o metabolismo secundário, como óleos essenciais, compostos fenólicos, flavonoides, antocianinas, triterpenos e outros compostos (Kuo et al., 2015; Alvarenga et al., 2015; Batista et al., 2016; Ahmar et al., 2016; Zhang et al., 2017; Li et al., 2018). Dessa forma, a cultura de tecidos vegetais é uma ferramenta com alto potencial para a produção de metabólitos secundários modulados pela condição lumínica.

O esteroide 20-hidroxiecdisona (20E) é o principal hormônio que medeia as transições de desenvolvimento em insetos e outros artrópodes, mas em plantas é um metabólito secundário produzido somente por determinadas espécies (Petryk et al., 2003; Festucci-Buselli et al., 2008; Splinder et al., 2009). Dentre as plantas produtoras de 20E, têm-se a *Pfaffia glomerata*, amplamente utilizada na medicina em mamíferos, incluindo humanos, como no combate de problemas gástricos, reumatismo, diabetes, ação anti-inflamatória e analgésica, ação antimicrobiana, tônico muscular, antimutagênica, antileishmania, afrodisíaca e outras propriedades fitoterápicas relacionados ao 20E (De Oliveira, 1986; Lorenzi; Matos, 2002; Freitas et al., 2004; Neto et al., 2005; Souza Daniel et al., 2005; Moura et al., 2011; Mazzeo et al., 2013; Queiroz et al., 2014; Neves et al., 2016; Almeida et al., 2017). Logo, determinar elicitores e mecanismos que possam induzir a produção de 20E em *P. glomerata* é

o ponto chave para análise de genes relacionados a essa molécula, já que sua rota biossintética não está totalmente elucidada (Batista et al., 2018b). Diante do exposto, esse trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da qualidade de diferentes proporções das faixas espectrais azul e vermelho na morfofisiologia e na produção de 20E em plantas de *P. glomerata* cultivadas *in vitro*.

## METODOLOGIA

### *Crescimento das plantas e desenho experimental*

Plantas de *Pfaffia glomerata* (Ac22 e Ac43) utilizadas neste estudo foram retiradas do banco de Germoplasma do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (Universidade Federal de Viçosa, Brasil).

Explantes com um segmento nodal (2 cm) provenientes de condições fotomixotróficas com 30 dias de cultivo, foram inoculados em meio de cultura constituído pelos sais e vitaminas MS (Murashige & Skoog, 1962) (Phytotechnology® Lab, EUA), suplementado com 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 3% sacarose (p/v), solidificado com 5,5 g L<sup>-1</sup> ágar (PhytoTechnology®) e pH 5,7 ± 0,1. O meio foi autoclavado a 121° C e 1,5 atm durante 20 minutos em frascos (600 mL de capacidade) contendo 100 mL de meio. Os frascos foram vedados com tampa de polipropileno com duas membranas (0,45 µm de poro) que permitem uma taxa de trocas gasosas com o meio externo de 25 µL L de CO<sub>2</sub><sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (Batista et al., 2017) (MilliSeal® AVS-045 Air Vent, Tóquio, Japão). As culturas foram mantidas em 25±2° C com fotoperíodo de 16 h sob irradiância de 80 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> em três diferentes espectros de luzes LEDs vermelha (V) e azul (A): 1V:1A, 1V:3A e 3V:1A (Figura 1).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 3, sendo dois acessos (Ac22 e Ac43) e três proporções de luz LEDs vermelha e azul (1V:1A, 1V:3A e 3V:1A), resultando em 6 tratamentos com dez repetições, sendo cada unidade experimental constituída por um frasco contendo três explantes, totalizando 60 frascos.

### *Variáveis de crescimento*

Após 35 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliados comprimento do caule (cm), comprimento da maior raiz (cm), massa fresca e seca, área foliar (cm<sup>2</sup> planta). Os tecidos vegetais foram coletados ao final do experimento e separados em parte aérea e raiz. As folhas foram destacadas e fixadas individualmente em papel branco plastificado e milimetrado. Foram capturadas fotos com câmera digital e as imagens foram processadas no programa ImageJ (Schneider et al., 2012). Após o material vegetal foram secos em estufa a 50 °C por 72 h para obtenção da massa seca (g).

### *Determinação do conteúdo de pigmentos*

Amostras da parte aérea foram coletadas aos 35 dias em nitrogênio líquido, moídas e liofilizadas para análise. Aproximadamente 10 mg de tecidos liofilizados foram utilizados para determinação dos pigmentos fotossintéticos e de carotenoides totais (xantofilas e carotenos), como descrito por (Wellburn, 1994). Para a determinação da antocianina foi realizada de acordo com Peters et al. (1989).

### *Determinação da atividade fotossintética e fluorescência da clorofila a*

Para a determinação da atividade fotossintética ( $A$ ) *in vitro*, foi adaptado um sistema de analisador de gás infravermelho (IRGA????). O esquema utilizado segue a metodologia descrita por Costa et al. (2014) e como fonte de energia luminosa foi desenvolvida um sistema composto por 8 LEDs brancas dispostas no interior das laterais de um recipiente de poliestireno expandido. As LEDs foram ligadas em um circuito de corrente contínua sob uma tensão de 12 v, formados por dois conjuntos em paralelo de 4 LEDs ligadas em série ( $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* foram tomados com um fluorômetro modulado MINI-PAM (Walz, Effeltrich, Alemanha), para avaliação da eficiência quântica máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ), as folhas foram aclimatadas ao escuro por 30 minutos, nestas condições foram tomadas a fluorescência inicial ( $F_0$ ) e a fluorescência máxima ( $F_m$ ). A partir desses valores, calculado a eficiência quântica máxima do fotossistema II ( $F_v/F_m$ , onde  $F_v = F_m - F_0$ ).

O desempenho fotossintético em relação ao PFD foi determinado pela programação do fluorômetro com níveis crescentes de luz (50–1350  $\mu\text{E}$ ) ao longo de 4 min, especificamente, oito níveis com duração de 30 segundos cada. A partir desses resultados foram calculados a fluorescência mínima da folha na região iluminada, segundo a fórmula  $F_0' = F_0 / [(F_m - F_0 / F_m) + F_0 / F_m']$  (Oxborough & Baker, 1997), o rendimento quântico efetivo do PSII na folha iluminada segundo Genty et al. (1989), usando a fórmula  $\Delta F / F_m' = (F_m' - F / F_m')$  e a taxa aparente de transporte de elétrons ( $ETR$ ), calculada segundo Bilger et al. (1995),  $ETR = \Delta F / F_m' * PAR * 0,84 * 0,5$ , onde PAR é o fluxo de fótons ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) incidente sobre a folha; 0,5 é o valor correspondente à fração de energia de excitação distribuída para o PSII; 0,84 corresponde a fração de luz incidente que é absorvida pelas folhas (Maxwell & Johnson, 2000).

### *Quantificação dos carboidratos, amido, proteína e aminoácidos*

Amostras da parte aérea foram coletadas aos 35 dias em nitrogênio líquido, moídas e liofilizadas para análise. Aproximadamente 25 mg de tecidos liofilizados foram utilizados para extração com etanol como descrito por Gibon et al. (2004). Os carboidratos (amido, sacarose, glicose e frutose) foram avaliados conforme descrito por Fernie et al. (2001). As proteínas e os níveis de aminoácidos totais foram analisados como relatado em Cross et al. (2006).

### *Determinação da atividade das enzimas do estresse oxidativo*

As enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidases (POD) e ascorbato peroxidase (APX) foram extraídas por homogeneização de 100 mg de material fresco congelado com 1 mL do meio de extração (tampão de fosfato de potássio 0,1 M e pH 6,8; fluoreto fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM, polivinilpirrolidona (PVPP) 1% (p/v), ácido etilenodiaminotetracíclico (EDTA) 0,1 mM). A mistura foi centrifugada a 10 000 xg durante 15 min e o sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático em bruto. Todos os passos foram realizados a 4 ° C.

A atividade da SOD foi determinada conforme descrito por Del Longo et al. (1993). As amostras foram expostas a lâmpadas de 15 W por 5 min antes de serem quantificadas por leituras de absorvância a 560 nm. O branco foi obtido nas mesmas condições, mas na ausência de luz. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da foto-redução de nitroazul de tetrazólio (NBT) (Beauchamp & Fridovich, 1971). A atividade de CAT foi determinada como descrito por Havir e McHale (1987). A diminuição da absorvância a 240 nm foi monitorada e a atividade enzimática foi calculada usando um coeficiente de extinção molar igual a 36 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. A atividade de POD foi determinada conforme descrito por Kar e Mishra (1976). O aumento na absorvância a 420 nm foi monitorado e a atividade enzimática foi calculada usando um coeficiente de extinção molar igual a 2,47 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Chance & Maehley, 1955). A atividade de APX foi determinada conforme descrito por Nakano e Asada (1981). A diminuição da absorvância a 290 nm foi monitorizada e a atividade enzimática foi calculada utilizando um coeficiente de extinção molar igual a 2,8 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. O resultado da atividade da SOD foi expresso como U min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína, enquanto CAT, POD e APX foram expressos como μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína.

### *Determinação do teor de 20-hidroxiecdisona (20E)*

A preparação do extrato metanólico foi realizada conforme descrito por Corrêa et al. (2015). A determinação de 20E foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) no aparelho Shimadzu SPD-10Avp (Kyoto, Japão) equipado com detector ultravioleta (UV) regulado para 245 nm e coluna Supelco C18 (30 cm x 7,9 mm de diâmetro), com fluxo lento de 0,8 mL min<sup>-1</sup> e pressão da coluna de 97,6 kgf. A fase móvel consistiu de sistema isocrático com uma mistura de metanol grau HPLC e água deionizada na proporção (1:1) (v:v). O volume da amostra injetada foi de 20 µL, com duração de 15 min. A curva de calibração foi obtida preparando soluções padrão 20E (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) em metanol grau HPLC (0 a 120 mg L<sup>-1</sup>).

### *Extração de RNA, síntese de cDNA e análise de expressão gênica por RT-qPCR*

O gene pertencente à via de biossíntese da 20-hidroxiecdisona *Phantom* e o gene *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)* (Batista et al., 2019) foram obtidos do transcriptoma da *P. glomerata* (Batista et al., 2018b). PCR em tempo real foi realizada em aparelho CFX96 Touch™ (BIO-RAD), usando qPCR-SYBR-Green mix/Rox (Ludwig Biotec®, Alvorada, RS, Brasil), as reações foram realizadas com três repetições biológicas em duplicata técnica cada, em um volume de reação de 10 µL (4 µL de SYBR-Green, 1 µL (4 µM) de cada primer, 3 µL de água tratada com dietilpirocarbonato e 1 µL (40 ng) de cDNA. As condições de amplificação foram realizadas nas seguintes etapas: 2 min a 50°C e 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 95°C por 16 s e 60°C por 60 s, e a curva de dissociação de 60 a 95°C a 0,1°C s<sup>-1</sup>. O método comparativo (2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>) (Livak & Schmittgen, 2001) foi aplicado para calcular as diferenças de expressão do gene alvo.

### *Caracterização morfoanatômica*

Para avaliação anatômica e histoquímica, secções transversais do segundo par de folhas expandida e caules da região mediana do segundo internódio foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965). Para a análise estrutural, as amostras foram desidratadas em série etanólica e incluídas em metacrilato (Historesin®, Leica Instruments, Alemanha). Secções transversais com 5 µm de espessura, foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (RM2155, Leica Microsystems Inc., USA). Os cortes foram corados em azul de toluidina (pH 3,2) por 15 min (O'Brien & McCully, 1981). Posteriormente, as lâminas foram

montadas em Permount® SP15-500 (Fisher Scientific) e observadas em microscópio de luz. As imagens foram capturadas em microscópio de luz (modelo AX70 TRF, Olympus Optical) com sistema U-photo, acoplado a câmera fotográfica digital (Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.) e microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic.

#### *Análise histoquímica*

Foi utilizado o método de coloração de Wiesner (floroglucinol-HCl) para detectar lignina, conforme utilizado por Guo et al. (2001) e Trabucco et al. (2013). As secções transversais obtidas em micrótomo de mesa, foram montadas em floroglucinol a 1% e HCl a 50% e observadas em microscópio. As imagens foram capturadas em microscópio de luz (modelo AX70 TRF, Olympus Optical) com sistema U-photo, acoplado a câmera fotográfica digital (Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.) e microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic.

#### *Determinação da densidade estomática*

A densidade estomática foi analisada pela técnica de diafanização, segundo a metodologia de Foster (1950), com modificações, onde folhas inteiras foram diafanizadas com solução de NaOH 10%, lavadas com água destilada e coradas com fucsina alcoólica. Cada folha diafanizada foi montada em lâmina com gelatina glicerinada e vedadas com Permount® SP15-500, com o objetivo de evitar eventuais distorções dimensionais, uma vez que as amostras se apresentam planificadas. As imagens foram capturadas em microscópio de luz (modelo AX70 TRF, Olympus Optical) com sistema U-photo, acoplado a câmera fotográfica digital (Spot Insightcolour 3.2.0, Diagnostic Instruments Inc.) e microcomputador com o programa de captura de imagens Spot Basic.

#### *Análises estatísticas*

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GENES (Cruz, 2013). Todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F, e as médias comparadas pelo teste de Dunnett (análises de expressão gênica) ou Tukey (demais análises), todos ao nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS

### *Efeito do balanço azul/vermelho no acúmulo de biomassa*

Houve variação no crescimento entre as plantas dos dois acessos (Ac22 e Ac43) de *P. glomerata* cultivadas *in vitro* sob diferentes proporções de luz (Figura 2). Não houve interação entre os fatores (acessos x proporção de luz) para as variáveis de crescimento.

Plantas do Ac43 apresentaram maior acúmulo de massa seca em igual proporção de luz LED vermelha e azul (Tabela 1). Em relação ao comprimento da maior raiz, plantas cultivadas nas proporções 1V:1A e 3V:1A apresentaram os maiores valores significativos. Mas não houve diferença significativa nas variáveis comprimento do caule, massa fresca e área foliar entre as plantas do Ac 43 cultivadas em diferentes proporções de luz vermelha e azul (Tabela 1).

O acúmulo de biomassa em plantas do Ac22 não foi afetado significativamente pela qualidade espectral (Tabela 1). O comprimento da maior raiz em plantas do Ac22 foi significativamente maior nas condições 1V:1A e 1V:3A. Já a massa fresca, massa seca e a área foliar não apresentaram diferenças significativas em diferentes proporções de luz LED vermelha e azul (Tabela 1).

### *O aumento na proporção da luz azul induziu perda do conteúdo de antocianina*

O teor de Clorofila (Chl) *b*, Chl *a/b*, Chl total e antocianinas dos dois acessos (22 e 43) de *P. glomerata* foram influenciados pela qualidade de luz (Figuras 3 e 4). Não houve interação entre os fatores acessos e intensidade de luz para essas variáveis.

O teor de Chl *b* e da Chl *a/b* foi influenciado apenas pelo acesso e não pela proporção de luz LED (Figura 3B e C). Plantas do Ac 22 apresentaram maior conteúdo significativo de Chl *b* e Chl total, já as plantas do Ac 43 obtiveram maior teor da Chl *a/b* (Figura 3B, C e D). No entanto, o Chl total do Ac43 foi afetado pela qualidade de luz, as plantas dos tratamentos 1V:3A e 3V:1A apresentaram maiores valores significativos (Figura 3D). Em ambos os acessos de *P. glomerata*, houve redução significativa no conteúdo de antocianinas com o aumento da luz azul (Figura 3). Comparado com as plantas do tratamento 1V:1A, que apresentaram maior teor significativo de antocianina, houve redução de 51,08% (Ac22) e 60,42% (Ac43) nas plantas cultivadas em 1V:3A e 26,29% (Ac22) e 45,12% (Ac43) nas plantas do tratamento 3V:1A (Figura 3F). Em relação ao conteúdo de Chl *a* e carotenoides

não houve diferença significativa tanto no fator acesso, quanto na proporção de luz (Figura 3A e E).

Plantas do Ac22 cultivadas sob 3V:1A apresentaram aumento significativo na densidade estomática da face adaxial (Figura 4). No entanto, não houve diferença significativa na densidade estomática da face adaxial no Ac43 e na face abaxial em ambos os acessos em relação a qualidade de luz (Figura 4). A ANOVA mostrou interação entre os fatores (acessos x proporção de luz) somente para a densidade estomática da face adaxial, e o resultado diferiu significativamente ( $P < 0,05$ ) para essa variável.

#### *O balanço favorável ao azul promoveu o aumento do desempenho fotossintético*

A fotossíntese ( $A$ ) *in vitro* de plantas do Ac22 de *P. glomerata* aumentou com o incremento da maior proporção da luz azul (Figura 5). Comparada com as plantas do Ac22 cultivadas na proporção 1V:1A, houve incremento significativo da  $A$  de 27,87% e 22,95% nos tratamentos 1V:3A e 3V:1A, respectivamente (Figura 5). Já as plantas do Ac43 não apresentaram diferença significativa nas diferentes proporções de luz LED vermelha e azul (Figura 5). Houve interação significativa entre os fatores (acessos x intensidade de luz) na  $A$ , e o resultado diferiu significativamente ( $P < 0,05$ ) para essa variável. Entre os parâmetros avaliados de acordo com a fluorescência da Chl  $a$  no PSII, o cultivo sob diferentes proporções de luz LED vermelha e azul foi capaz de influenciar a dissipação não-fotoquímica (NPQ) e a eficiência de transporte de elétrons (ETR) em dois acessos de *P. glomerata* (Figura 6B e C). O NPQ foi mais induzido nas plantas do Ac43 do que nas plantas do Ac22, independente da proporção de luz. No tratamento 3V:1A, o NPQ das plantas do Ac43 foi aproximadamente 35% maior que nas plantas do Ac22 (Figura 6B).

Com relação à ETR, plantas de ambos os acessos de *P. glomerata* apresentaram maior eficiência quando cultivadas na maior proporção de luz azul (Figura 6C). Comparado com o tratamento 1V:1A, houve aproximadamente incremento de 46,15% (Ac22) e 31,25% (Ac43) na ETR nas plantas do tratamento 1V:3A (Figura 6C). Quanto ao rendimento quântico efetivo do FSII ( $F_v/F_m$ ) e a dissipação fotoquímica ( $qP$ ), ambos não exibiram diferenças significativas (Figura 6A e D).

#### *A maior proporção de luz azul induziu a atividade das enzimas antioxidantes*

A atividade das enzimas antioxidantes em plantas de *P. glomerata* foi afetada pela qualidade de luz (Figura 7). Houve interação significativa entre os fatores (acessos x intensidade de luz) para atividade da SOD, CAT e POX e os resultados diferiram

significativamente ( $P < 0,05$ ) para essas enzimas. Plantas do Ac43 apresentaram maiores valores da atividade da SOD, CAT e POX com aumento da proporção de luz azul, mas não diferiram significativamente na atividade da APX em relação a proporção de luz (Figura 7). A SOD e POX foram significativamente maiores no tratamento 1V:3A, já a CAT não diferiu entre as proporções de luz 1V:3A e 3V:1A (Figura 7A, B e C). Em contrapartida, a atividade das enzimas SOD, APX e POX nas plantas do Ac22 não foi afetada pelas diferentes proporções de luz LED vermelha e azul (Figura 7A, C e D), mas a atividade da CAT foi significativamente aumentada nos tratamentos 1V:1A e 1V:3A (Figura 7B).

#### *A qualidade de luz influenciou no metabolismo dos carboidratos e no teor de aminoácidos e proteína*

Os teores dos açúcares (glicose, frutose e sacarose), amido, aminoácidos e proteína das plantas de dois acessos (22 e 43) de *P. glomerata* foram influenciados pela qualidade de luz (Figuras 8 e 9). Houve interação significativa entre os fatores (acessos x intensidade de luz) para todos esses metabólitos, com exceção do conteúdo de frutose e proteína, e os resultados diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ) para essas variáveis.

Os acessos de *P. glomerata* responderam de forma oposta em relação ao conteúdo de amido, o aumento da luz azul (1V:3A) favoreceu o acúmulo de amido no Ac22 e o aumento da luz vermelha (3V:1A) no Ac43 (Figura 8D). Em plantas do Ac22, o conteúdo de frutose e proteína foram significativamente maiores nos tratamentos 1V:1A e 1V:3A (Figuras 8B e 9B), já o teor de sacarose foi maior nas plantas cultivadas em 3V:1A (Figura 8C). Não houve diferença significativa no conteúdo de glicose e aminoácidos com relação a diferentes proporções de luz LED nas plantas do Ac22 (Figuras 8A e 9A). Em plantas do Ac 43, o teor dos açúcares e de proteína não variaram em razão as diferentes proporções de luz LED (Figuras 8A, B, C e 9B), mas o conteúdo de aminoácidos foi maior nas plantas cultivadas sob 1V:1A e 3V:1A (Figura 9A). Além disso, independente da qualidade de luz, plantas do Ac 43 apresentaram maiores valores significativo de sacarose e aminoácidos do que o Ac 22 (Figuras 8C e 9A).

#### *A igual proporção de luz vermelha e azul aumentou a produção de 20E*

Houve interação significativa entre os fatores (acessos x intensidade de luz) para o teor e produção de 20E da raiz, e os resultados diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ) para essas variáveis. O conteúdo e a produção de 20E, tanto da parte aérea, quanto da raiz foram

significativamente maiores na proporção de luz 1V:1A nas plantas do Ac22 (Figura 10). Esse incremento no teor de 20E variou de 31,77-32,90% (parte aérea) e 36,07-40,77% (raiz) e a produção de 20E aumentou 34,67-38,39% (parte aérea) e 36,65-40,70% (raiz) em relação aos demais tratamentos (Figura 10).

Não houve diferença significativa de 20E nas plantas do acesso 43 em relação às diferentes proporções de luz LED, com exceção do total de 20E da parte aérea, que foi menor no tratamento 1V:3A (Figura 10C). No entanto, independente da qualidade de luz, o teor e produção de 20E da raiz foram menores no Ac 43 (Figura 10B e D). De forma contrária, não houve diferença na expressão relativa do gene *Phantom* em plantas do Ac22, já no Ac 43 a proporção de luz 3V:1A induziu uma maior expressão desse gene (Figura 11).

#### *A morfoanatomia é afetada pela qualidade de luz*

Nas análises microscópicas, foram observadas alterações morfológicas nas folhas e caules de plantas do Ac22 e Ac43 de *P. glomerata* cultivadas *in vitro* em diferentes proporções de luz LED vermelha e azul (Figuras 12 e 13). A folha de *P. glomerata* possui epiderme unisseriada, anfiestomática e dorsiventral, com parênquima paliádico e parênquima lacunoso bem definidos (Figura 12D, H, L, P, T e Y). O feixe vascular central é do tipo colateral e é circundado por parênquima fundamental (Figura 12A, C, E, G, I, K, M, O, Q, S, U e X).

As características anatômicas do caule se mostraram distintas, houve aumento nos feixes vasculares da nervura central, na lignificação da parede celular e no tamanho do elemento de vaso nas plantas de ambos os acessos de *P. glomerata* cultivadas nas proporções 1V:1A e 3V:1A (Figura 12A, E, I, M, Q e U). Com destaque, para o cilindro vascular das plantas do Ac43 cultivadas em 1V:1A, que se mostraram mais desenvolvido que nos demais tratamentos (Figura 12M). Já as características anatômicas das folhas das plantas cultivadas em diferentes proporções de luz LED vermelho e azul, não apresentaram grandes diferenças significativas (Fig. 12C, D, G, H, K, L, O, P, S, T, X e Y).

As análises histoquímicas do caule de *P. glomerata* confirmaram o maior desenvolvimento estrutural de plantas cultivadas 1V:1A e 3V:1A (Figura 13). A coloração com floroglucina ácida detectou estruturas lignificadas em seções de haste em todos os tratamentos (Figura 13). As seções de caule de ambos os acessos de *P. glomerata* cultivadas 1V:1A exibiam um grau maior de lignificação, sendo que a coloração intensa de feixes vasculares indicou forte lignificação do xilema e espessamento da parede celular na região interfascicular, formando um anel contínuo (Figura 13A-D). Além disso, plantas de ambos os

acessos cultivadas em 1V:1A e 3V:1A apresentaram maior lignificação de suas fibras do que as plantas sob 1V:3A (Figura 13B, D, F, H, J e M).

## DISCUSSÃO

Um dos principais moduladores do crescimento e desenvolvimento das plantas é o fator luz. No entanto, embora a importância da condição de luz para as respostas morfogênicas das plantas (Batista et al., 2018a), os efeitos da qualidade de luz em *P. glomerata* cultivada *in vitro* ainda não são bem elucidados. Este estudo é o primeiro a investigar os efeitos da qualidade de luz na morfofisiologia e produção de 20E em *Pfaffia glomerata in vitro*.

A igual proporção de luz vermelha e azul (1V:1A) influenciou positivamente no acúmulo de biomassa em *P. glomerata*. Resultados semelhantes foram encontrados em plântulas de *P. amboinicus*, que apresentaram maior peso seco total sob 1V:1A em relação proporções 2.5V:1A e 1V:2.5A (Silva et al., 2017). Brotações regeneradas *in vitro* de *Swertia chirata* expostas sob 1A:1V exibiram maior acúmulo de biomassa e desenvolvimento de dossel em comparação com os tratamentos de iluminação monocromática ou outras proporções de azul e vermelho (Gupta & Karmakar, 2017). Hung et al. (2016) relataram em *Vaccinium corymbosum* cultivadas *in vitro*, que o misto de LEDs, 50% de vermelho mais 50% de azul, melhorou o crescimento das plantas em relação ao aumento notável da biomassa da parte aérea e da raiz. A citometria de fluxo em folhas de *Populus euramericana* (“Dorskamp”) mostrou que o tratamento com 50% de vermelho + 50% de luz azul foi o mais efetivo para induzir a divisão celular, o que refletiu diretamente no acúmulo de biomassa (Kwon et al., 2015). Já em outras espécies como, *Platycodon grandiflorum*, *Valerianella locusta* e *Raphanus sativu*, a luz monocromática ou diferentes proporções entre a luz vermelha e azul foram a que promoveu maior ganho de biomassa (Liu et al., 2014; Wojciechowska et al., 2015; Zha & Liu, 2018).

Embora o maior acúmulo de biomassa tenha ocorrido sob 1V:1A, foram as plantas do Ac22 do tratamento 1V:3A que apresentaram maiores taxas fotossintéticas, possivelmente pela maior proporção de luz azul. A luz azul regula uma série de respostas fisiológicas nas plantas que otimizam o potencial fotossintético, assim como fototropismo, migração de cloroplastos e abertura estomática (Kinoshita et al., 2001; Briggs & Christie, 2002; Takemiya et al., 2005). Terfa et al (2013) mostraram que uma porção maior de luz azul foi eficiente em aumentar o desempenho da fotossíntese em plantas *Rosa × hybrida*, aumentando o crescimento e as mudanças morfológicas, mas não afetou a produção total de matéria seca. Liu et al. (2014) inferiram que a luz azul em plantas *in vitro* de *Platycodon grandiflorum* foi mais eficiente para acúmulo de aminoácidos, metabolismo de nitrogênio e fotossíntese do que

a luz vermelha. Em plantas de *Cucumis sativus* o conteúdo de clorofila por área foliar, a taxa fotossintética líquida e a condutância estomática aumentaram com o aumento da luz azul (Hernández & Kubota, 2016). Wang et al. (2016) concluíram que a luz azul poderia promover o desempenho fotossintético ou crescimento, estimulando respostas morfológicas e fisiológicas em plantas de *Lactuca sativa*. A luz azul é um dos principais reguladores da condutância estomática, uma vez que os estômatos devem fornecer à folha o CO<sub>2</sub> necessário para a fotossíntese líquida.

O conteúdo de Chl *b*, Chl *a/b*, Chl total e a NPQ variaram mais entre os diferentes acessos do que quanto às diferentes fontes lumínicas, demonstrando diferenças intraespecífica nas respostas fisiológicas em *P. glomerata*, colaborando com os dados de Corrêa et al. (2015) para a mesma espécie. No entanto, observamos nas plantas de ambos os acessos cultivadas em 3V:1A apresentaram valores relativamente maiores de NPQ do que as plantas dos demais tratamentos. Ouzounis et al. (2015) relataram em plantas de *Phalaenopsis* ‘Vivien’ que a razão de luz 60% vermelha e 40% azul foi a que induziu o maior NPQ. Já em plantas de *Solanum lycopersicum* cultivadas em luz roxa e azul, apresentam maior NPQ do que nas plantas sob luz vermelha (Yang et al., 2018).

Plantas de ambos os acessos de *P. glomerata* apresentaram maior ETR quando cultivadas sob a proporção de luz 1V:3A, reforçando a maior eficiência fotossintética nessa condição de luz. Resultados semelhantes foram encontrados em plantas de *Mesembryanthemum crystallinum* e *Platanus orientalis*, mas em *Zea mays* a ETR diminuiu com aumento da luz azul, demonstrando que o efeito da luz depende da espécie (Loreto et al., 2009; He et al., 2017). O parâmetro *Fv/Fm* mede a eficiência do PSII, com um valor ideal de aproximadamente 0,83 para a maioria das plantas não estressadas, e se correlaciona com o rendimento quântico máximo da fotossíntese (Björkman e Demmig, 1987). Valores baixos do ideal de *Fv/Fm* pode ser usado para indicar possível fotoinibição em plantas sob condições estressantes (Maxwell e Johnson, 2000). Em nosso estudo, observamos valores próximos ao valor ótimo de *Fv/Fm* nas plantas de todos os tratamentos, indicando baixo ou nenhum estresse nas plantas.

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas em células não estressadas e estressadas, e podem danificar componentes celulares importantes. O sistema de defesa antioxidante da planta compreende uma variedade de mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos, envolvendo tanto a limitação da formação de EROs como a sua remoção (Arora et al., 2002; Alscher et al., 2002; Noctor et al., 2018). As enzimas do estresse oxidativo em plantas do Ac43 obteve maior atividade no tratamento com maior proporção de luz azul

(1V:3A). Em culturas *in vitro* de *Rehmannia glutinosa* o tratamento com LED azul aumentou significativamente as atividades das enzimas antioxidantes tanto na folha como na raiz (Manivannan et al., 2015). Gupta e Sahoo (2015) mostraram que a luz LED azul foi capaz de criar um ambiente de maior estresse oxidativo em plantas de *Curculigo orchioides*, mas propício para indução da organogênese, por meio do delicado equilíbrio entre a produção celular de EROs e sua taxa de eliminação. A luz azul diminuiu a incidência de oídio em plantas de melão através do acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e induzindo a síntese de substâncias resistentes, como as enzimas CAT e POD (Jing et al., 2018).

Os acessos aqui estudados de *P. glomerata* responderam de forma distinta em relação ao metabolismo primário. No Ac22 o conteúdo de frutose foi maior nos tratamentos 1V:1A e 1V:3A, e o acúmulo de amido em 1V:3A, já o teor de sacarose foi aumentado pela proporção de luz 3V:1A. Em plantas do Ac43, os açúcares não foram afetados pela qualidade de luz, mas o conteúdo de amido foi maior nas plantas do tratamento 3V:1A. Esses dados reforçam a importância da caracterização lumínica ideal para cada espécie de planta, e até mesmo para a variedade em cultivo.

Com relação ao metabolismo secundário, tanto o conteúdo de antocianina, como o de 20E foram aumentados nas plantas do tratamento 1V:1A. As antocianinas pertencem ao grupo dos flavonoides e absorvem luz em torno de 500 nm, fornecendo as tonalidades de vermelho a azul para flores, frutos e folhas. As antocianinas têm o papel de atrair ou repelir polinizadores e dispersores de sementes, na proteção contra estresses abióticos como UV-B, luz visível, variação de temperatura, e na defesa contra patógenos, insetos e herbívoros (Zhang et al., 2014; Jain & Gould, 2015; Martín et al., 2018). O aumento de antocianinas nas plantas pode ser causado por múltiplas respostas à qualidade da luz. Vários trabalhos mostram o aumento do conteúdo de antocianinas relacionado com a luz azul (Goto, 2012; Xu et al., 2012; Kadomura-Ishikawa et al., 2013; Hoffmann et al., 2016; Petrella et al., 2017). Em contraste, plantas de morango tratadas com LED azul ou vermelha mostraram menor concentração de antocianina do que as cultivadas em lâmpadas fluorescentes (Nadalini et al., 2017). Li e Kubota (2009) mostraram que a luz UV-A e azul causou aumento na concentração de antocianina de 11 e 31% respectivamente, enquanto LED vermelho-distante ocasionou queda de 40% no conteúdo desse metabólito em relação a luz branca. Portanto, o efeito dos LEDs no metabolismo secundário pode ser definido como altamente dependente da espécie.

O teor e a produção de 20E, tanto da parte aérea, quanto do sistema radicular foram aumentados na proporção de luz LED 1V:1A em plantas do Ac22, esse incremento foi

aproximadamente de 30-40% em relação aos demais tratamentos. Porém, a expressão relativa do gene *Phantom*, envolvido na síntese de 20E (Batista et al., 2018b), não foi diretamente correlacionada com o conteúdo de 20E sob luz LED 1V:1A, revelando que a biossíntese do 20E pode ser regulada por outros fatores. Esses resultados e outros dados da literatura, revelam que é possível regular a síntese fitoquímicos no ambiente *in vitro*, otimizando as condições de luz. Batista et al. (2016) relataram que o uso de LEDs branca ou azul/vermelho altera o perfil de óleo essencial em três quimiotipos de *Lippia alba in vitro*. Em plantas de *Plectranthus amboinicus in vitro* o conteúdo de carvacrol foi maior sob lâmpadas fluorescentes (Silva et al., 2017). Gupta e Karmakar (2017) mostraram que a qualidade espectral das luzes também influenciou o acúmulo de compostos fenólicos totais, flavonóides e flavonóis, sendo as culturas *in vitro* de *Swertia chirata* expostas sob luz azul exibiram o máximo acúmulo desses compostos. A luz azul também impulsionou a produção de salidroside, compostos fenólicos e flavonoides em cultura de calos de *Rhodiola imbricata* (Kapoor et al., 2018). Em culturas *in vitro* de *Lachenalia* sp., a luz branca e azul estimulou o maior conteúdo fenólico do que aquelas sob luz vermelha e no escuro (Bach et al., 2018).

A igual proporção de luz LED vermelho e azul também favoreu melhoria de aspectos anatomicos em plantas *in vitro* de *P. glomerata*. Observamos nos caules das plantas cultivadas sob 1V:1A o aumento do tamanho dos feixes vasculares e dos elementos de vaso, forte lignificação do xilema e espessamento da parede celular na região interfascicular. Com destaque, para o cilindro vascular das plantas do Ac43 cultivadas em 1V:1A, no qual foi mais desenvolvido que nos demais tratamentos. Já as plantas sob maior proporção de luz azul (1V:3A) apresentaram menor grau de lignificação do caule. Caules de *Brachypodium distachyon* divergiram quanto às composições de lignina e no desenvolvimento dos feixes vasculares internos. A luz fluorescente levou à deposição de lignina tipo G nas fibras interfasciculares e na bainha do feixe vascular do caule. Já na luz LED branca, os feixes vasculares estavam menos corados e apresentavam aumento da região do parênquima interfascicular com concentração de lignina tipo S (Mamedes-Rodrigues et al., 2018). A luz azul aumentou a espessura foliar em *Ficus benjamina*, e houve um aumento relativo do parênquima paliçádico. Também em *Sinningia speciosa*, o aumento do parênquima paliçádico foi encontrado em luz azul e vermelho/azul, embora a espessura total das folhas não tenha sido afetada (Zheng & Van Labeke, 2017). Corroborativamente, a luz azul também favorável no desenvolvimento anatômico das folhas de *Chrysanthemum*, mas a luz vermelha monocromática resultou na redução do parênquima paliçádico (Zheng & Van Labeke, 2018). De acordo com Wittmann e Pfan (2016), o regime de luz dentro do corpo da planta tem

efeitos profundos na diferenciação plastidial e, conseqüentemente, nas propriedades fotossintéticas, mostrando que a qualidade de luz influencia tanto no crescimento como no desenvolvimento das plantas.

Em conclusão, nossos resultados mostram que as diferentes proporções dos espectros azul e vermelho influenciaram tanto a produção de metabólitos secundários, como o conteúdo de antocianina e 20E, em plantas *in vitro* de *P. glomerata*, sendo ambos aumentados pela proporção de luz 1V:1A. Além disso, o tratamento 1V:1A favoreceu o acúmulo de biomassa e a melhoria de aspectos anatomicos de plantas. No entanto, a taxa fotossintética, ETR, e a produção enzimas do estresse oxidativo foram estimulados em plantas cultivadas na proporção de luz 1V:3A. Este trabalho demonstrando a influência do fator luz e das diferentes combinações das faixas espectrais azul e vermelho na morfofisiologia e produção de 20E em plantas *in vitro* de *P. glomerata*. Ademais, fornece novas perspectivas a respeito da qualidade espectral no ambiente *in vitro* e pode auxiliar na otimização de protocolos de propagação em larga escala de plantas de *P. glomerata*.

## REFERÊNCIAS

Ahmad N, Rab A, Ahmad N (2016) Light-induced biochemical variations in secondary metabolite production and antioxidant activity in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert). *J Photochem Photob B* 154:51-56

Almeida IV, Düsman E, Mattge GI, Toledo F, Reusing AF, Vicentini VEP (2017) *In vivo* antimutagenic activity of the medicinal plants *Pfaffia glomerata* (Brazilian ginseng) and *Ginkgo biloba*. *Genet Mol Res* 16(3). DOI:10.4238/gmr16039785

Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* 53:1331-1341

Alvarenga ICA, Pacheco FV, Silva ST, Bertolucci SKV, Pinto JEBP (2015) *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 122:299-308

Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr Sci* 82:1227-1238

Bach A, Kapczyńska A, Dziurka K, Dziurka M (2018) The importance of applied light quality on the process of shoot organogenesis and production of phenolics and carbohydrates in *Lachenalia* sp. cultures *in vitro*. *S Afr J Bot* 114:14-19

Batista DS, de Castro KM, da Silva AR, Teixeira ML, Sales TA, Soares LI, Cardoso MG, Santos MO, Viccini LF, Otoni WC (2016) Light quality affects *in vitro* growth and essential oil profile in *Lippia alba* (Verbenaceae). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 52:276-282

Batista DS, Dias LLC, Rêgo MMD, Saldanha CW, Otoni WC (2017) Flask sealing on *in vitro* seed germination and morphogenesis of two types of ornamental pepper explants. *Ciência Rural* 47:1-6

Batista DS, Felipe SHS, Silva TD, Castro KMD, Mamedes-Rodrigues TC, Miranda NA, Ríos-Ríos AM, Faria DV, Fortini EA, Chagas K, Torres-Silva G, Xavier A, Arencibia AD, Otoni WC (2018a) Light quality in plant tissue culture: does it matter? *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 54:195-2015

Batista DS, Koehler AD, Romanel E, de Souza VC, Silva TD, Almeida MC, Maciel TEF, Ferreira PRB, Felipe SHS, Saldanha CW, Maldaner J, Dias LLC, Festucci-Buselli RA, Otoni WC (2018b) *De novo* assembly and transcriptome of *Pfaffia glomerata* uncovers the role of photoautotrophy and the P450 family genes in 20-hydroxyecdysone production. *Protoplasma* 1-14. DOI: 10.1007/s00709-018-1322-1

Batista DS, Moreira VS, Felipe SHS, Fortini EA, Silva TD, Chagas K, Louback E, Romanel E, Costa MGC, Otoni WC (2019). Reference gene selection for qRT-PCR in Brazilian-ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] as affected by various abiotic factors. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 1-11. DOI 10.1007/s11240-019-01606-6

Beauchamp C & Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44:276-287

Bian ZH, Yang QC, Liu WK (2015) Effects of light quality on the accumulation of phytochemicals in vegetables produced in controlled environments: a review. *J Sci Food Agri* 95:869-877

Bilger W, Schreiber U, Bock M (1995) Determination of the quantum efficiency of photosystem II and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia* 102:425-432

Binkert M, Kozma-Bognar L, Terecskei K, De Veylder L, Nagy F, Ulm R (2014) UV-B-responsive association of the *Arabidopsis* bZIP transcription factor ELONGATED HYPOCOTYL5 with target genes, including its own promoter. *Plant Cell* 26:4200-4213

Briggs WR & Christie JM (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant blue light receptors. *Trends Plant Sci* 7:204-210

Canamero RC, Bakrim N, Bouly JP, Garay A, Dudkin EE, Habricot Y, Ahmad M (2006) Cryptochrome photoreceptors cry1 and cry2 antagonistically regulate primary root elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 224:995-1003

Chance B & Maehly AC (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Meth Enzymol* 2:764-817

Choi HG, Moon BY, Kang NJ (2015) Effects of LED light on the production of strawberry during cultivation in a plastic greenhouse and in a growth chamber. *Sci Hortic* 189:22-31

Cioć M, Szewczyk A, Żupnik M, Kalisz A, Pawłowska B (2018) LED lighting affects plant growth, morphogenesis and phytochemical contents of *Myrtus communis* L. *in vitro*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 132:433-447

Corrêa JPO, Vital CE, Pinheiro MVM, Batista DS, Azevedo JFL, Saldanha CW, Otoni WC (2015) *In vitro* photoautotrophic potential and *ex vitro* photosynthetic competence of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen accessions. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 121:289-300

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

Cross JM, Von Korff M, Altmann T, Bartzetko L, Sulpice R, Gibon Y, Palacios N, Stitt M (2006) Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiol* 142:1574-1588

Cruz CD (2013) GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Sci* 35:271-276

Daud N, Faizal A, Geelen D (2013) Adventitious rooting of *Jatropha curcas* L. is stimulated by phloroglucinol and by red LED light. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 49:183-190

De Oliveira F (1986). *Pfaffia glomerata* (Martius) Kuntze - the Brazilian ginseng. *Rev Bras Farmacogn* 1:86-92

Del Longo OT, González CA, Pastori GM, Trippi VS (1993) Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell Physiol* 34:1023-1028

Demmig B & Björkman O (1987) Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170:489–504

Edesi J, Pirttilä AM, Häggman H (2017) Modified light spectral conditions prior to cryopreservation alter growth characteristics and cryopreservation success of potato (*Solanum tuberosum* L.) shoot tips *in vitro*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 128:409-421

Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* 212:250-26

Ferreira LT, de Araújo Silva MM, Ulisses C, Camara TR, Willadino L (2017) Using LED lighting in somatic embryogenesis and micropropagation of an elite sugarcane variety and its effect on redox metabolism during acclimatization. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 128:211-221

Festucci-Buselli RA, Contim LAS, Barbosa LCA, Stuart JJ, Otoni WC (2008) Biosynthesis and potential functions of the ecdysteroid 20-hydroxyecdysone – a review. *Botany* 86:978-987

Foster AS (1950) Practical plant anatomy. New York: D. Van Nostrand Co.

Franklin KA & Quail PH (2010). Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *J Exp Bot* 61:11-24

Freitas CS, Baggio CH, Da Silva-Santos JE, Rieck L, De Moraes Santos CA, Correa JRC, Ming LC, Cortez DAG, Marques MCA (2004) Involvement of nitric oxide in the gastroprotective effects of an aqueous extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, Amaranthaceae, in rats. *Life Sci* 74:1167-1179

Funk JL, Larson JE, Ames GM, Butterfield BJ, Cavender-Bares J, Firn J, Laughlin DC, Sutton-Grier AE, Williams L, Wright J (2017) Revisiting the Holy Grail: using plant functional traits to understand ecological processes. *Biol Rev* 92:1156-1173

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

Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 990:87-92

Gibon Y, Blaessing OE, Hannemann J, Carillo P, Höhne M, Hendriks JHM, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M (2004) A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in *Arabidopsis* using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *Plant Cell* 16:3304-3325

Goto E (2012). Plant production in a closed plant factory with artificial lighting. *Acta Horti* 956:37-49

Guo D, Chen F, Inoue K, Blount JW, Dixon RA (2001) Down regulation of caffeic acid 3-O-methyl transferase and caffeoyl CoA 3-O-methyl transferase in transgenic alfalfa: Impacts on lignins structure and implications for the biosynthesis is of G and S lignin. *Plant Cell* 13:73-88

Gupta SD, Sahoo TK (2015) Light emitting diode (LED)-induced alteration of oxidative events during *in vitro* shoot organogenesis of *Curculigo orchoides* Gaertn. *Acta Physiologiae Plantarum* 37:233

Gupta SD & Karmakar A (2017) Machine vision based evaluation of impact of light emitting diodes (LEDs) on shoot regeneration and the effect of spectral quality on phenolic content and antioxidant capacity in *Swertia chirata*. *J Photochem Photobiol B* 174:162-172

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

He J, Qin L, Chong EL, Choong TW, Lee SK (2017) Plant growth and photosynthetic characteristics of *Mesembryanthemum crystallinum* grown aeroponically under different blue-and red-LEDs. *Front Plant Sci* 8:361. DOI: 10.3389/fpls.2017.00361

Hernández R & Kubota C (2016) Physiological responses of cucumber seedlings under different blue and red photon flux ratios using LEDs. *Environ Exper Bot* 121:66-74

Hoffmann AM, Noga G, Hunsche M (2016) Alternating high and low intensity of blue light affects PSII photochemistry and raises the contents of carotenoids and anthocyanins in pepper leaves. *Plant Growth Regul* 79:275-285

Huche-Thelier L, Crespel L, Le Gourriere J, Morel P, Sakr S, Leduc N (2016) Light signaling and plant responses to blue and UV radiations - Perspectives for applications in horticulture. *Environ Exp Bot* 121:22-38

Hung CD, Hong C-H, Kim S-K, Lee K-H, Park J-Y, Nam M-W, Choi DH, LeeH-I (2016) LED light for *in vitro* and *ex vitro* efficient growth of economically important high bush blue berry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Acta Physiologiae Plantarum* 38:1-9

Izzo LG, Arena C, De Micco V, Capozzi F, Aronne G (2019) Light quality shapes morpho-functional traits and pigment content of green and red leaf cultivars of *Atriplex hortensis*. *Sci Horti* 246:942-950

Jain G & Gould KS (2015) Are betalain pigments the functional homologues of anthocyanins in plants?. *Environ Exp Bot* 119:48-53

Jing X, Wang H, Gong B, Liu S, Wei M, Ai X, Li Y, Shi Q (2018) Secondary and sucrose metabolism regulated by different light quality combinations involved in melon tolerance to powdery mildew. *Plant Physiol Biochem* 124:77-87

Kadomura-Ishikawa Y, Miyawaki K, Noji S, Takahashi A (2013) Phototropin 2 is involved in blue light-induced anthocyanin accumulation in *Fragaria × ananassa* fruits. *J Plant Res* 126:847- 857

Kapoor S, Raghuvanshi R, Bhardwaj P, Sood H, Saxena S, Chaurasia OP (2018). Influence of light quality on growth, secondary metabolites production and antioxidant activity in callus culture of *Rhodiola imbricata* Edgew. *J Photochem Photobiol B* 183:258-265

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

Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:137-138

Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, Kagawa T, Wada M, Shimazaki KI (2001) Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* 414:656-660

Kuo TCY, Chen CH, Chen SH, Lu IH, Chu MJ, Huang LC, Lin CY, Chen CY, Lo HF, Jeng ST, Chen LFO (2015) The effect of red light and far-red light conditions on secondary metabolism in agarwood. *BMC Plant Biol* 15:139. DOI: 10.1186/s12870-015-0537-y

Kwon AR, Cui HY, Lee H, Shin H, Kang KS, Park SY (2015) Light quality affects shoot regeneration, cell division, and wood formation in elite clones of *Populus euramericana*. *Acta Physiol Plant* 37:65-74

Li H, Lin Y, Chen X, Bai Y, Wang C, Xu X, Wang Y, Lai Z (2018) Effects of blue light on flavonoid accumulation linked to the expression of miR393, miR394 and miR395 in longan embryogenic calli. *PLoS One* 13:e0191444. DOI: 10.1371/journal.pone.0191444

Li Q & Kubota C (2009) Effects of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce. *Environ Exp Bot* 67:59-64

Lian ML, Murthy HN, Paek KY (2002) Effects of light emitting diodes (LEDs) on the *in vitro* induction and growth of bulblets of *Lilium* oriental hybrid 'Pesaro'. *Sci Hortic* 94:365-370

Lin Y, Li J, Li B, He T, Chun Z (2011) Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* *in vitro*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 105:329-335

Liu M, Xu Z, Guo S, Tang C, Liu X, Jao X (2014) Evaluation of leaf morphology, structure and biochemical substance of balloon flower (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) plantlets *in vitro* under different light spectra. *Sci Hortic* 174:112-118

Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. *Methods* 25:402-408

Long J, Yuan X, Ma C, Du M, Ma X, Wen Z, Ma R, Wang Y, Cao Y (2018) Strongly enhanced luminescence of Sr<sub>4</sub> Al<sub>14</sub> O<sub>25</sub>: Mn<sup>4+</sup> phosphor by co-doping B<sup>3+</sup> and Na<sup>+</sup> ions with red emission for plant growth LEDs. *Royal Soc Chem Adv* 8:1469-1476

- Longcore T, Rodríguez A, Witherington B, Penniman JF, Herf L, Herf M (2018) Rapid assessment of lamp spectrum to quantify ecological effects of light at night. *J Exper Zool Part A: Ecol Inte Physiol* 329:8-9 (419-428)
- Lorenzi H, Matos FJA (2002) Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum
- Loreto F, Tsonev T, Centritto M (2009) The impact of blue light on leaf mesophyll conductance. *J Exp Bot* 60:2283-2290
- Mamadalieva NZ, Böhmendorfer S, Zengin G, Bacher M, Potthast A, Akramov DK, Janibekov A, Rosenau T (2019) Phytochemical and biological activities of *Silene viridiflora* extractives. Development and validation of a HPTLC method for quantification of 20-hydroxyecdysone. *Ind Crop Prod* 129:542-548
- Mamedes-Rodrigues TC, Batista DS, Napoleão TA, Cruz ACF, Fortini EA, Nogueira FTS, Romanel E, Otoni WC (2018) Lignin and cellulose synthesis and antioxidative defense mechanisms are affected by light quality in *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 133:1-14
- Manivannan A, Soundararajan P, Halimah N, Ko CH, Jeong BR (2015) Blue LED light enhances growth, phytochemical contents, and antioxidant enzyme activities of *Rehmannia glutinosa* cultured *in vitro*. *Hortic Environ Biotechnol* 56:105-113
- Martín J, Díaz-Montaña EJ, Asuero AG (2018) Recovery of anthocyanins using membrane technologies: A review. *Crit Rev Anal Chem* 48:143-175
- Mastropasqua L, Tanzarella P, Paciolla C (2016) Effects of postharvest light spectra on quality and health-related parameters in green *Asparagus officinalis* L. *Postharvest Biol Technol* 112:143-151
- Maxwell K & Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J Exp Bot* 51:659-668
- Mazzeo GCCS, Cortez FS, Pusceddu FH, Santos AR, Guimarães LL, Amaral FP, Silva MPO, Toma W (2013) Avaliação da atividade antiulcerogênica e ecotoxicológica do extrato hidroalcoólico 70% obtido a partir das folhas de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen (Amaranthaceae). *Unisant BioSci* 2:75-80
- Miyagi A, Uchimiya H, Kawai-Yamada M (2017) Synergistic effects of light quality, carbon dioxide and nutrients on metabolite compositions of head lettuce under artificial growth conditions mimicking a plant factory. *Food Chem* 218:561-568
- Moheimani NR & Parlevliet D (2013) Sustainable solar energy conversion to chemical and electrical energy. *Renew Sust Energ Rev* 27:494-504
- Monostori I, Heilmann M, Kocsy G, Rakszegi M, Ahres M, Altenbach SB, Szalai G, Pál M, Toldi D, Simon-Sarkadi L, Harnos N, Galiba G, Harnos N (2018) LED lighting–modification of growth, metabolism, yield and flour composition in wheat by spectral quality and intensity. *Front Plant Sci* 9:665. DOI: 10.3389/fpls.2018.00605

- Moura CL, Casemiro LA, Martins CHG, Cunha WR, Silva MLA, Cury AHV (2011) Evaluation of the antimicrobial activity of the plant species *Pfaffia glomerata* against oral pathogens. *Rev Invest* 11:24-28
- Muneer S, Park YG, Jeong BR (2017) Red and blue light emitting diodes (LEDs) participate in mitigation of hyperhydricity *in vitro* grown carnation genotypes (*Dianthus caryophyllus*). *J Plant Growth Regul* 37:370-379
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- Nadalini S, Zucchi P, Andreotti C (2017) Effects of blue and red LED lights on soilless cultivated strawberry growth performances and fruit quality. *Eur J Hortic Sci* 82:12-20
- Nakano Y & Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22:867-880
- Neto AG, Costa JMLC, Belati C, Vinholis AHC, Possebom LS, Da Silva Filho AA, Cunha WR, Carvalho JCT, Bastos JK, Silva MLA (2005) Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. *J Ethnopharmacol* 96:87-91
- Neves CS, Gomes SSL, dos Santos TR, de Almeida MM, de Souza YO, Garcia RMG, Otoni WC, Raposo NBR, Viccini LF, Campos, JMS (2016) “Brazilian ginseng” (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen, Amaranthaceae) methanolic extract: cytogenotoxicity in animal and plant assays. *South Afr J Bot* 106:174-180
- Nhut DT, Takamura T, Watanabe H, Okamoto K, Tanaka M (2003) Responses of strawberry plantlets cultured *in vitro* under super bright red and blue light emitting diodes (LEDs). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 73:43-52
- Noctor G, Reichheld JP, Foyer CH (2018) ROS-related redox regulation and signaling in plants. In *Semin Cell Dev Biol* 80: 3-12
- Ouzounis T, Fretté X, Ottosen CO, Rosenqvist E (2015) Spectral effects of LEDs on chlorophyll fluorescence and pigmentation in *Phalaenopsis* ‘Vivien’ and ‘Purple Star’. *Physiol Plant* 154:314-327
- Oxborough K & Baker NR (1997) Resolving chlorophylla fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components-calculation of qP and Fv’/Fm’ without measuring Fo’. *Photosynth Res* 54:135-142
- Park YG, Oh HJ, Jeong BR (2013) Growth and anthocyanin concentration of *Perilla frutescens* var. *acuta* Kudo as affected by light source and DIF under controlled environment. *Hortic Environ Biotechnol* 54:103-108
- Peters JL, Van Tuinen A, Adamse P, Kendrick RE, Koornneef M (1989) High pigment mutants of tomato exhibit high sensitivity for phytochrome action. *J Plant Physiol* 134:661-666

- Petrella DP, Metzger JD, Blakeslee JJ, Nangle EJ, Gardner DS (2017) Effects of blue light and phenotype on anthocyanin accumulation in accessions and cultivars of rough bluegrass. *Crop Science*, 57:S-209-S217
- Petryk A, Warren JT, Marqués G, Jarcho MP, Gilbert LI, Kahler J, Parvy JP, Li Y, Dauphin-Villemant C, O'Connor MB (2003) Shade is the Drosophila P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13773-13778
- Queiroz AC, Dias TdeL, Da Matta CB, Cavalcante Silva LH, et al. (2014). Antileishmanial activity of medicinal plants used in endemic areas in northeastern Brazil. *Evid Based Complement Alternat Med*. DOI: 10.1155/2014/478290
- Ramírez-Mosqueda MA, Iglesias-Andreu LG, Bautista-Aguilar JR (2017) The effect of light quality on growth and development of *in vitro* plantlet of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Sugar Technol* 19:331-336
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis". *Nat Methods* 9:671-675
- Shin KS, Murthy HN, Heo JW, Hahn EJ, Paek KY (2008) The effect of light quality on the growth and development of *in vitro* cultured *Doritaenopsis* plants. *Acta Physiol Plant* 30:339-343
- Shukla MR, Singh AS, Piunno K, Saxena PK, Jones AMP (2017) Application of 3D printing to prototype and develop novel plant tissue culture systems. *Plant Methods* 13:6-15
- Smith (2000) Phytochromes and light signal perception by plants—an emerging synthesis. *Nature* 407:585-591
- Souza Daniel JF, Alves KZ, Silva Jacques D, Silva e Souza PV, Carvalho MG, Freire RB, Ferreira DT, Freire MFI (2005) Free radical scavenging activity of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pederson (Amaranthaceae). *Indian J Pharmacol* 37:174-178
- Spindler KD, Hönl C, Tremmel CH, Braun S, Ruff H, Spindler-Barth M (2009) Ecdysteroid hormone action. *Cell Mol Life Sci* 66:3837-3850
- Takemiya A, Inoue SI, Doi M, Kinoshita T, Shimazaki KI (2005) Phototropins promote plant growth in response to blue light in low light environments. *Plant Cell* 17:1120-1127
- Terfa MT, Solhaug KA, Gislerød HR, Olsen JE, Torre S (2013). A high proportion of blue light increases the photosynthesis capacity and leaf formation rate of *Rosax hybrida* but does not affect time to flower opening. *Physiol Plant* 148:146-159
- Tokarz K, Makowski W, Banasiuk R, Krolicka A, Piwowarczyk B (2018) Response of *Dionaea muscipula* J. Ellis to light stress in *in vitro*: physiological study. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 134:65-77

- Trabucco GM, Matos DA, Lee SJ, Saathoff AJ, Priest HD, Mockler, TC, Hazen SP (2013) Functional characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase and caffeic acid *O*-methyltransferase in *Brachypodium distachyon*. *BMC Biotechnol* 13:1-18
- Tung HT, Nam NB, Huy NP, Luan VQ, Hien VT, Phuong TTB, Dung TL, Nguyen HL, Nhut DT (2018) A system for large scale production of chrysanthemum using microponics with the supplement of silver nanoparticles under light-emitting diodes. *Sci Horti* 232:153-161
- van Gelderen K, Kang C, Pierik R (2018) Light signaling, root development, and plasticity. *Plant Physiol* 176:1049-1060
- Wang J, Lu W, Tong Y, Yang Q (2016) Leaf morphology, photosynthetic performance, chlorophyll fluorescence, stomatal development of lettuce (*Lactuca sativa* L.) exposed to different ratios of red light to blue light. *Front Plant Sci* 7:250. DOI:10.3389/fpls.2016.00250
- Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol* 144:307-313
- Wittmann C & Pfanz H (2016) The optical, absorptive and chlorophyll fluorescence properties of young stems of five woody species. *Environ Exp Bot* 121:83-93
- Wojciechowska R, Długosz-Grochowska O, Kołton A, Żupnik M (2015) Effects of LED supplemental lighting on yield and some quality parameters of lamb's lettuce grown in two winter cycles. *Sci Horti* 187:80-86
- XiaoYing L, ShiRong G, ZhiGang X, XueLei J, Tezuka T (2011) Regulation of chloroplast ultrastructure, cross-section anatomy of leaves, and morphology of stomata of cherry tomato by different light irradiations of light-emitting diodes. *Hortic Sci* 46:17-221
- Xu HL, Xu Q, Li F, Feng Y, Qin F, Fang W (2012) Applications of xerophytophysiology in plant production-LED blue light as a stimulus improved the tomato crop. *Sci Horti* 148:190-196
- Yang X, Xu H, Shao L, Li T, Wang Y, Wang R (2018) Response of photosynthetic capacity of tomato leaves to different LED light wavelength. *Environ Exp Bot* 150:161-171
- Zha L & Liu W (2018) Effects of light quality, light intensity, and photoperiod on growth and yield of cherry radish grown under red plus blue LEDs. *Hort Environ Biotechnol* 59:511-518
- Zhang Y, Butelli E, Martin C (2014) Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. *Curr Opin Plant Biol* 19:81-90
- Zhang L, Ma G, Yamawaki K, Ikoma Y, Matsumoto H, Yoshioka T, Ohta S, Kato M (2015) Effect of blue LED light intensity on carotenoid accumulation in citrus juice sacs. *J Plant Physiol* 188:58-63
- Zhang Q, Liu M, Ruan J (2017) Metabolomics analysis reveals the metabolic and functional roles of flavonoids in light-sensitive tea leaves. *BMC Plant Biol* 17:64. DOI: 10.1186/s12870-017-1012-8

Zheng L & Van Labeke MC (2017). Long-term effects of red-and blue-light emitting diodes on leaf anatomy and photosynthetic efficiency of three ornamental pot plants. *Front Plant Sci* 8:917. DOI: 10.3389/fpls.2017.00917

Zheng L & Van Labeke MC (2018) Effects of different irradiation levels of light quality on *Chrysanthemum*. *Sci Horti* 233:124-131

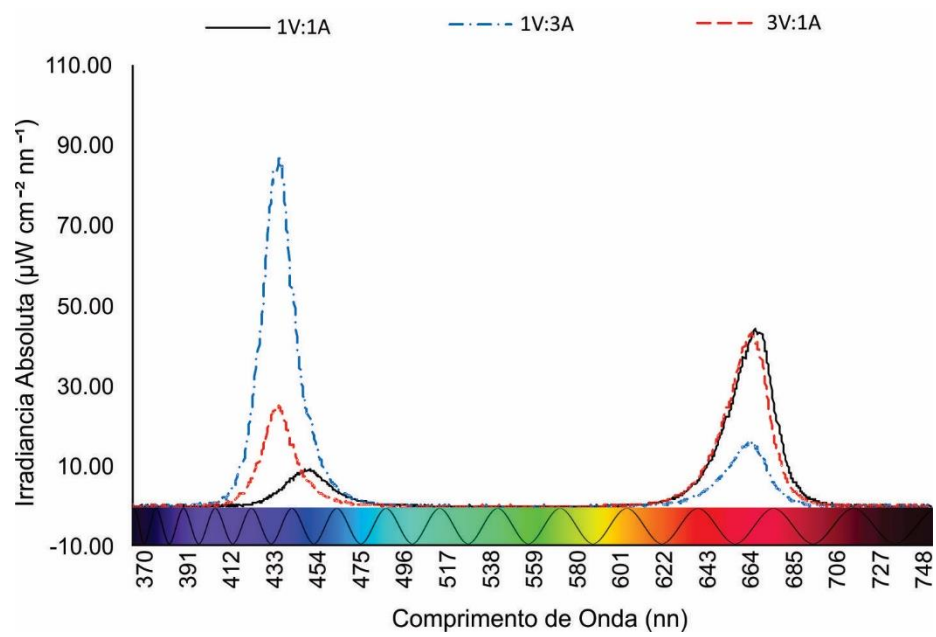
## TABELAS

**Tabela 1.** Variáveis de crescimento de plântulas de *Pfaffia glomerata* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes proporções de luz LED: 1V:1A, 1V:3A e 3V:1A

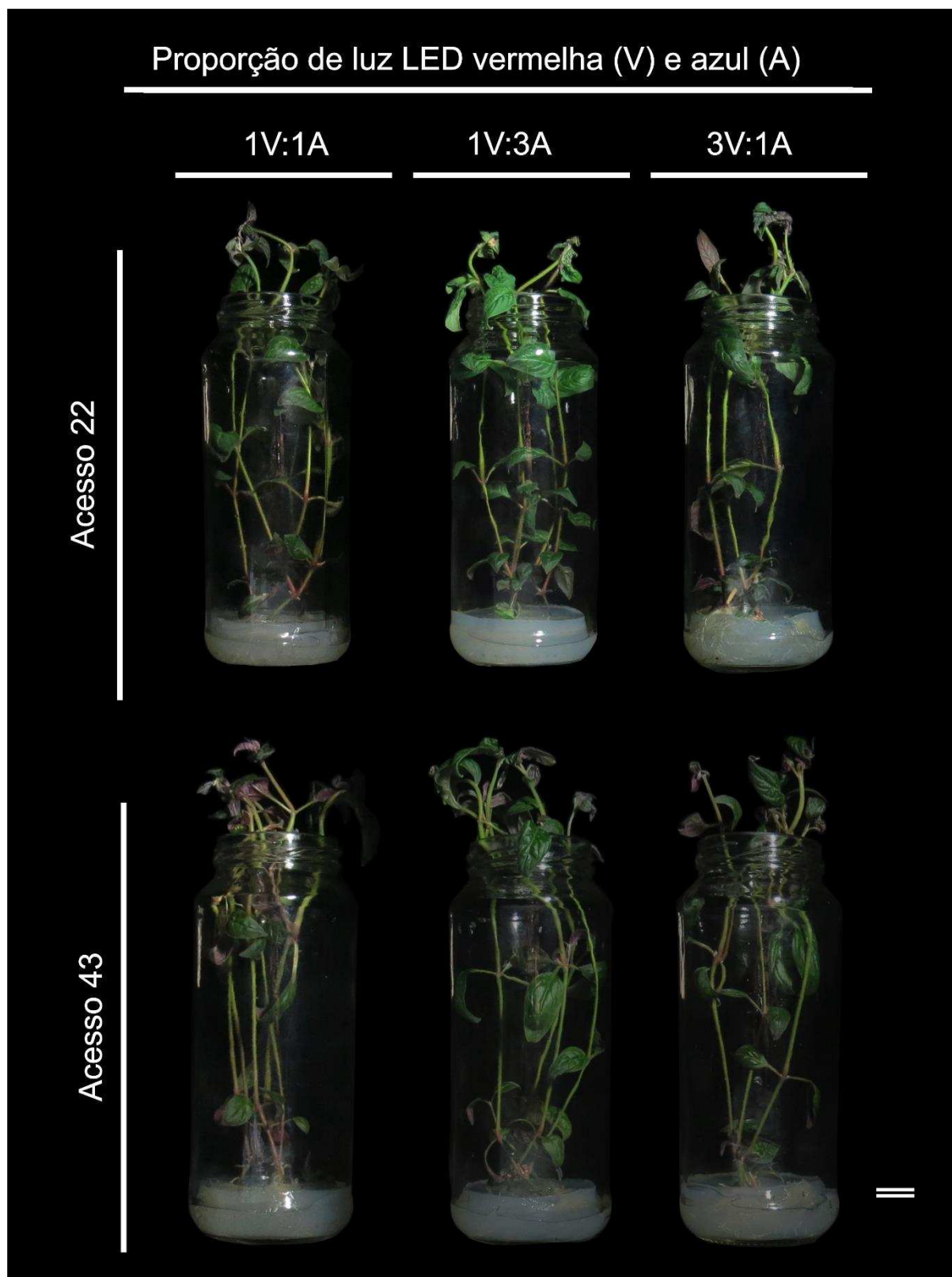
Variáveis de crescimento	Acesso	Proporção de luz LED		
		1V:1A	1V:3A	3V:1A
Comprimento do caule (cm)	Ac22	18.71 Ba	19.91 Aa	20.50 Aa
	Ac43	20.83 Aa	20.62 Aa	21.12 Aa
Comprimento da maior raiz (cm)	Ac22	3.43 Aab	3.92 Aa	2.91 Ab
	Ac43	2.96 Aa	1.91 Bb	2.75 Aab
Massa fresca (g)	Ac22	4.99 Aa	4.60 Aa	5.11 Aa
	Ac43	5.74 Aa	4.70 Aa	4.87 Aa
Massa seca (g)	Ac22	0.46 Ba	0.41 Aa	0.43 Aa
	Ac43	0.58 Aa	0.41 Ab	0.44 Ab
Área foliar (cm <sup>2</sup> planta)	Ac22	24.17 Aa	28.83 Aa	26.34 Aa
	Ac43	26.07 Aa	25.26 Aa	24.34 Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula dentro de uma coluna ou minúscula dentro de uma linha não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados são apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão (n = 4)

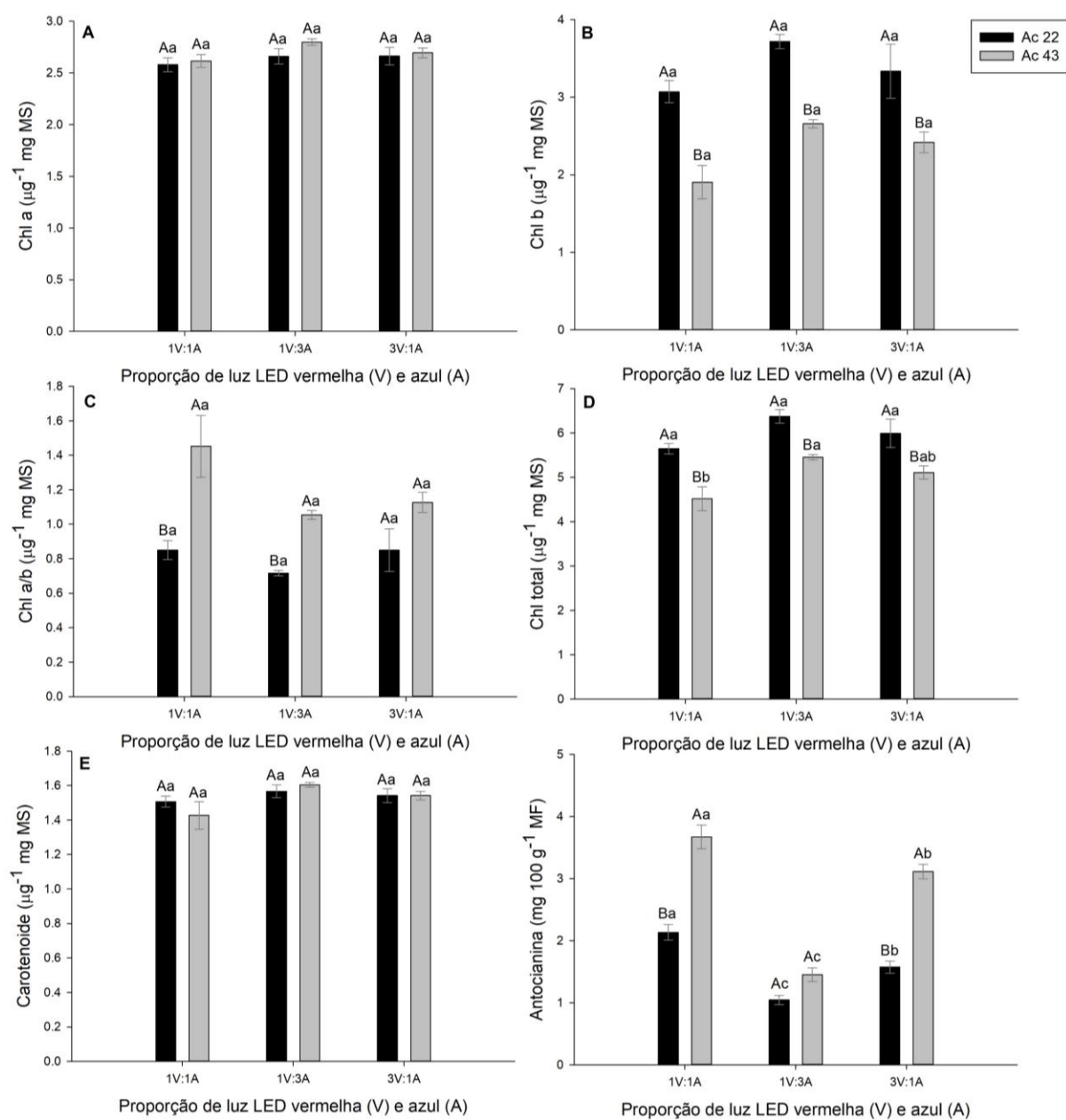
## FIGURAS



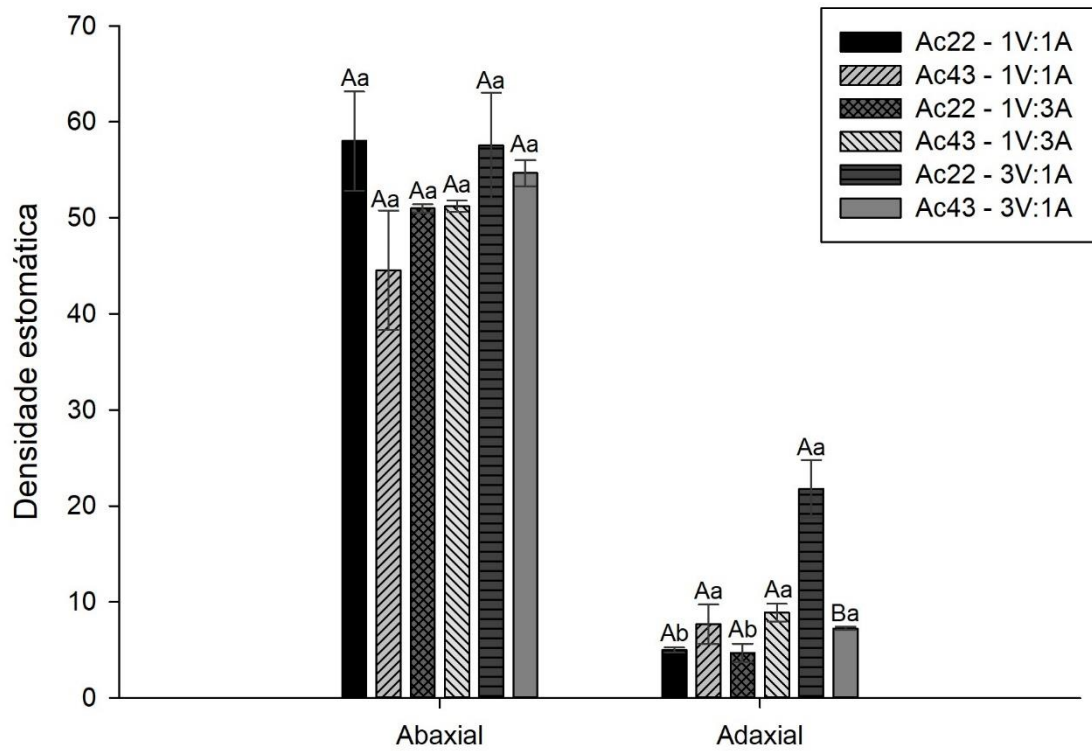
**Figura 1.** Espectro de luz das diferentes proporções de LED vermelha (V) e azul (A).



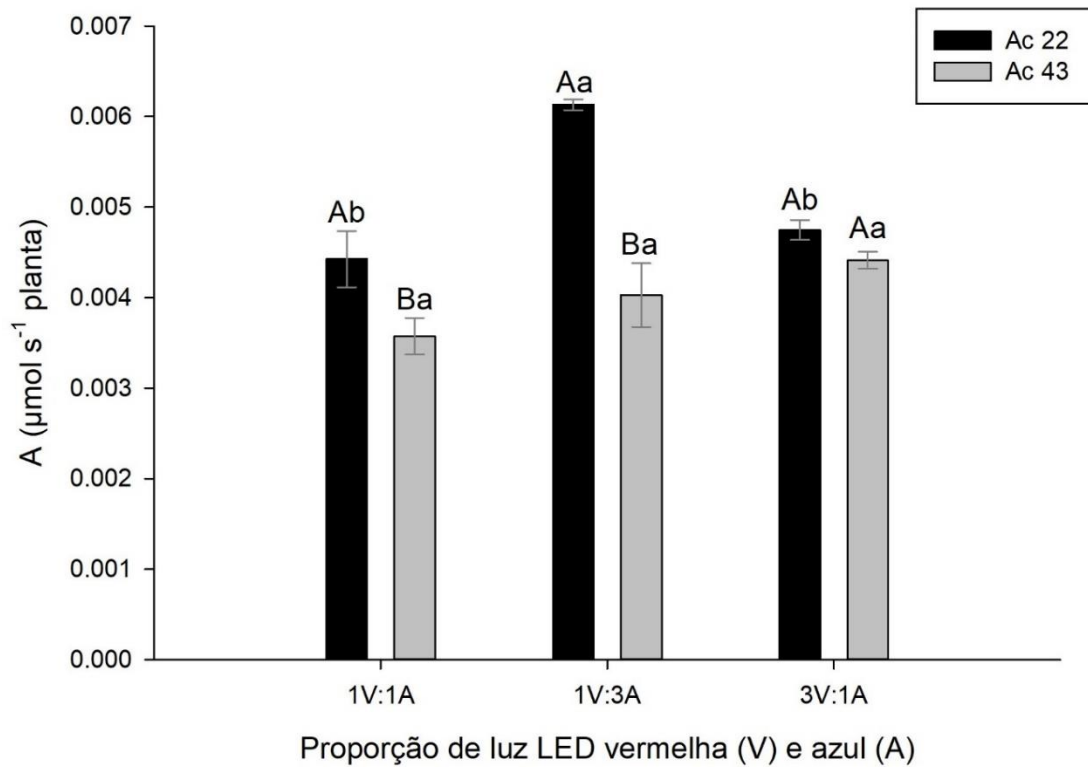
**Figura 2.** Plantas de *Pfaffia glomerata* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes proporções de luz LED: 1V:1A, 1V:3A e 3V:1A. Barra = 2 cm.



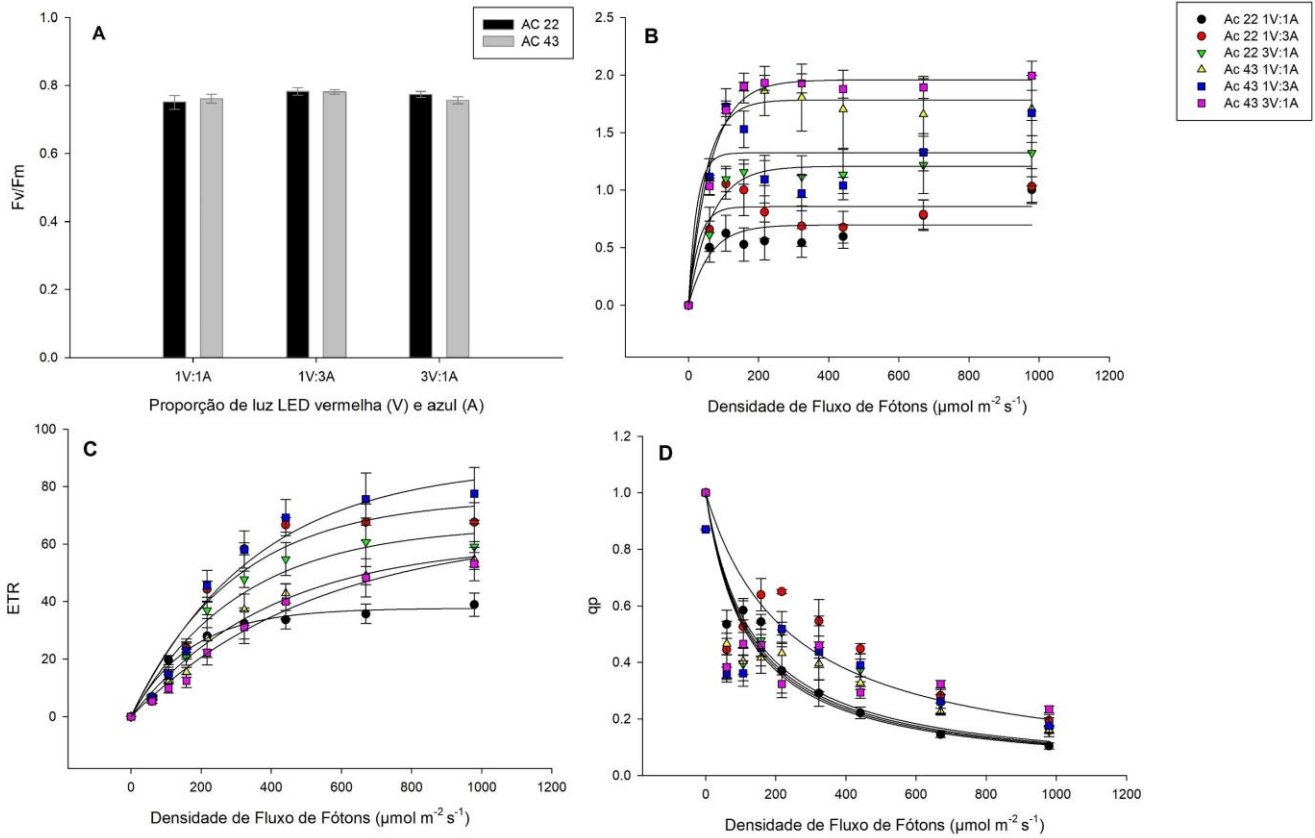
**Figura 3.** Teores de pigmentos de plantas de *Pfaffia glomerata* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes proporções de luz LED: 1V:1A, 1V:3A e 3V:1A. (A) Clorofila *a* ( $\mu\text{g}^{-1} \text{mg MS}$ ); (B) Clorofila *b* ( $\mu\text{g}^{-1} \text{mg MS}$ ); (C) Clorofila *a/b* ( $\mu\text{g}^{-1} \text{mg MS}$ ), (D) Clorofila total ( $\mu\text{g}^{-1} \text{mg MS}$ ), (E) Carotenoides ( $\mu\text{g}^{-1} \text{mg MS}$ ), (F) Antocianinas ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ ). Letras maiúsculas iguais dentro dos acessos e minúsculas iguais dentro das proporções de luz não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão (n = 4).



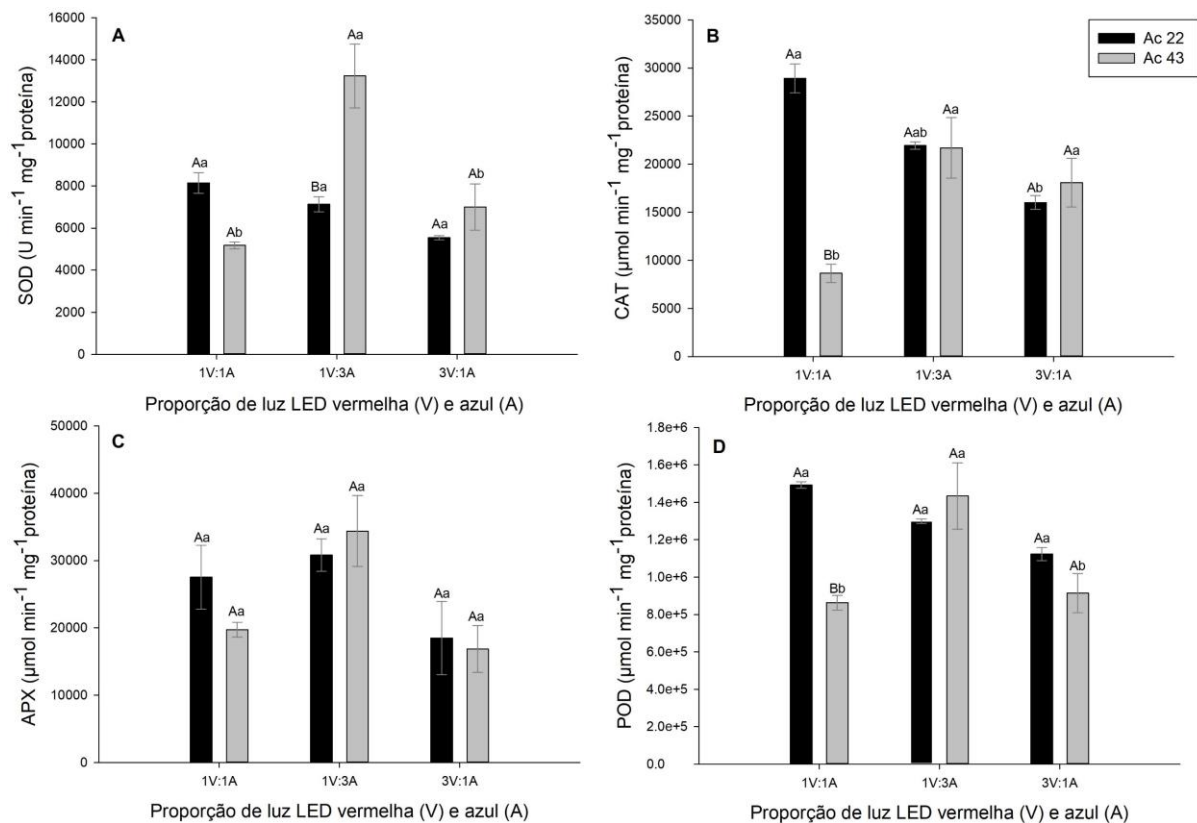
**Figura 4.** Densidade estomática de plantas de *Pfaffia glomerata* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes proporções de luz LED: 1V:1A, 1V:3A e 3V:1A. Letras maiúsculas iguais dentro dos acessos e minúsculas iguais dentro das proporções de luz não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão (n = 3).



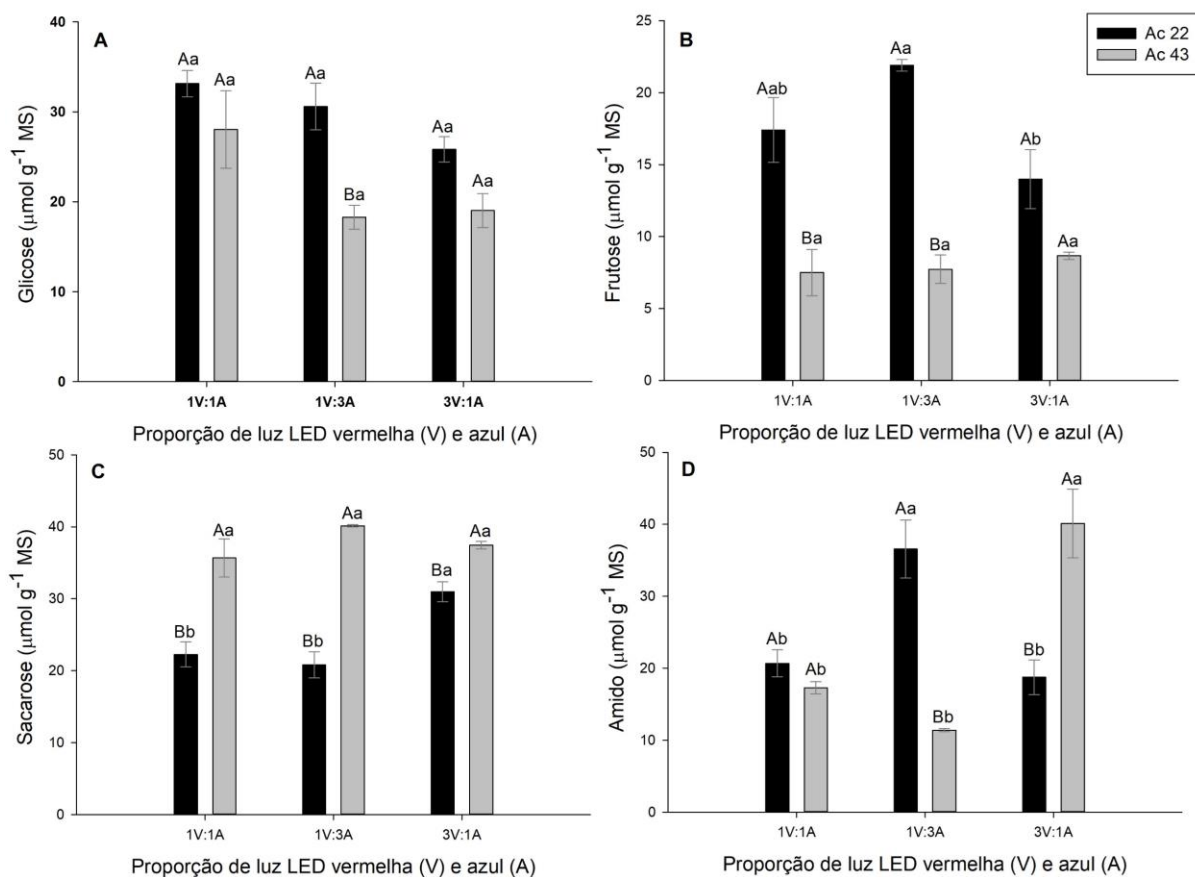
**Figura 5.** Taxa fotossintética ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ planta}^{-1}$ ) de plantas de *Pfaffia glomerata* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes proporções de luz LED: 1V:1A, 1V:3A e 3V:1A. Letras maiúsculas iguais dentro dos acessos e minúsculas iguais dentro das proporções de luz não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão ( $n = 4$ ).



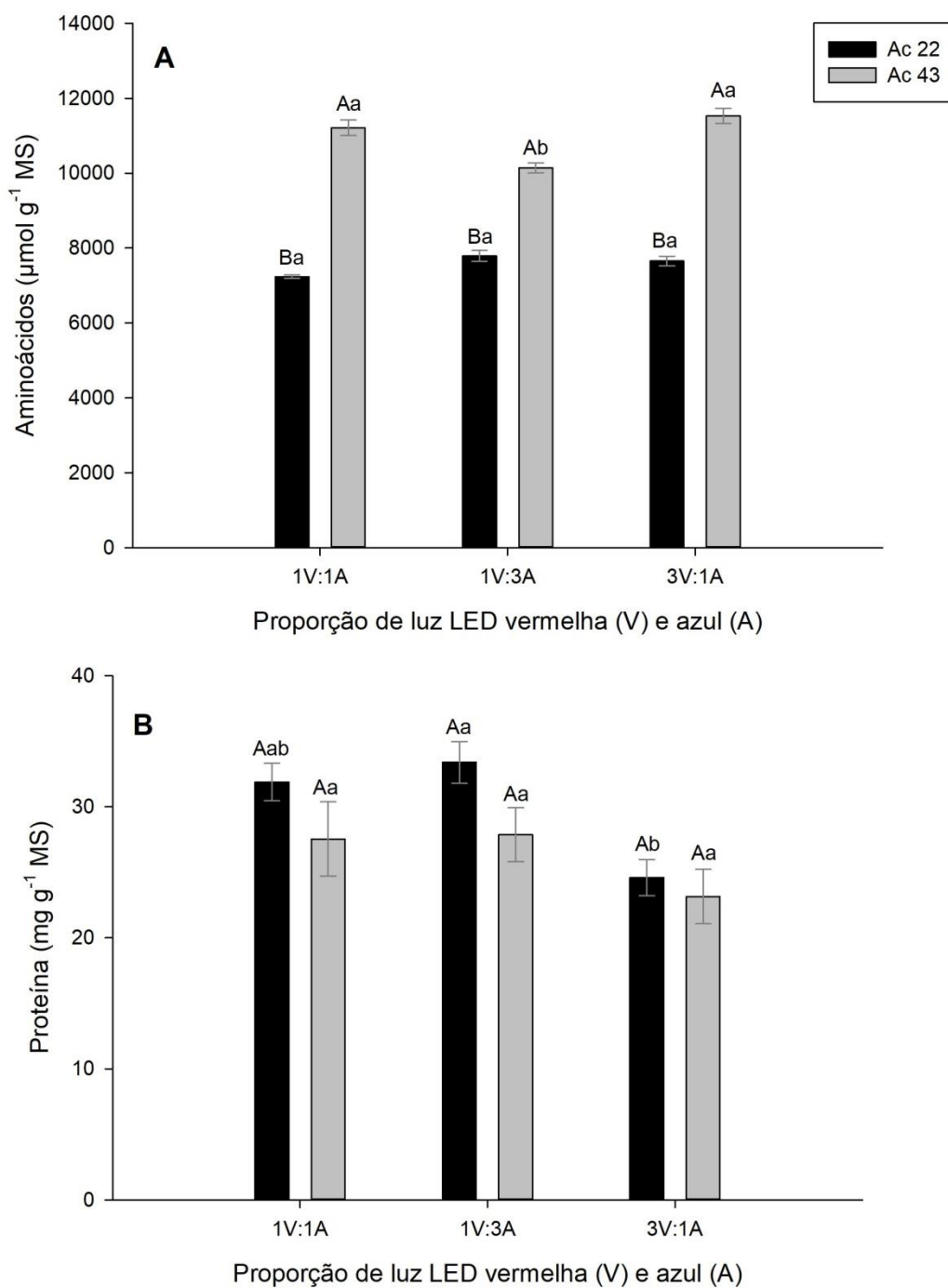
**Figura 6.** Fluorescência da clorofila de plantas de *Pfaffia glomerata* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes proporções de luz LED: 1V:1A, 1V:3A e 3V:1A. (A) Rendimento quântico máximo do PSII ( $F_v/F_m$ ); (B) Gradiente não-fotoquímico (NPQ); (C) Taxa de transporte de elétrons (ETR); (D) Gradiente fotoquímico (qP). Dados apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão ( $n = 4$ ).



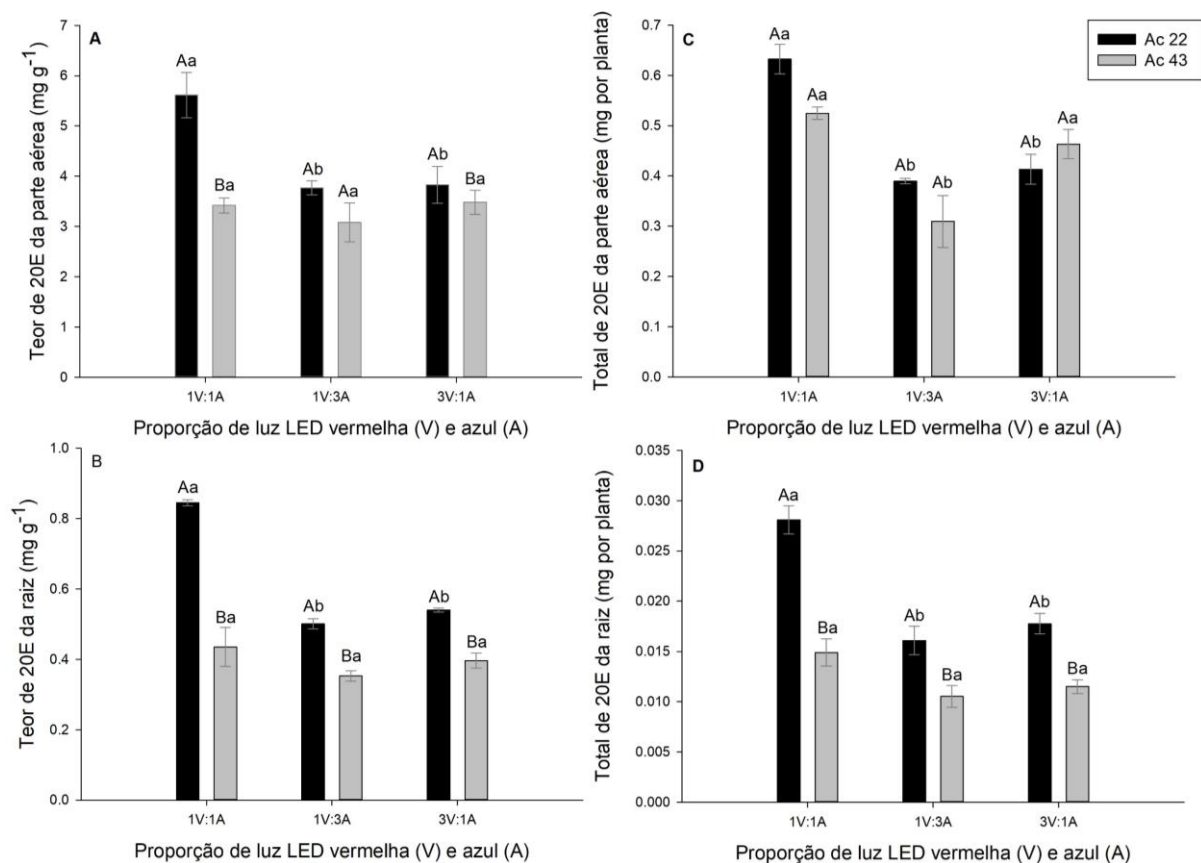
**Figura 7.** A atividade das enzimas antioxidantes em plantas de *Pfaffia glomerata* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes proporções de luz LED: 1V:1A, 1V:3A e 3V:1A. (A) Superóxido dismutase (SOD), (B) Catalase (CAT), (C) Ascorbato peroxidase (APX) e (D) Peroxidases (POD). Letras maiúsculas iguais dentro dos acessos e minúsculas iguais dentro das proporções de luz não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão (n = 3).



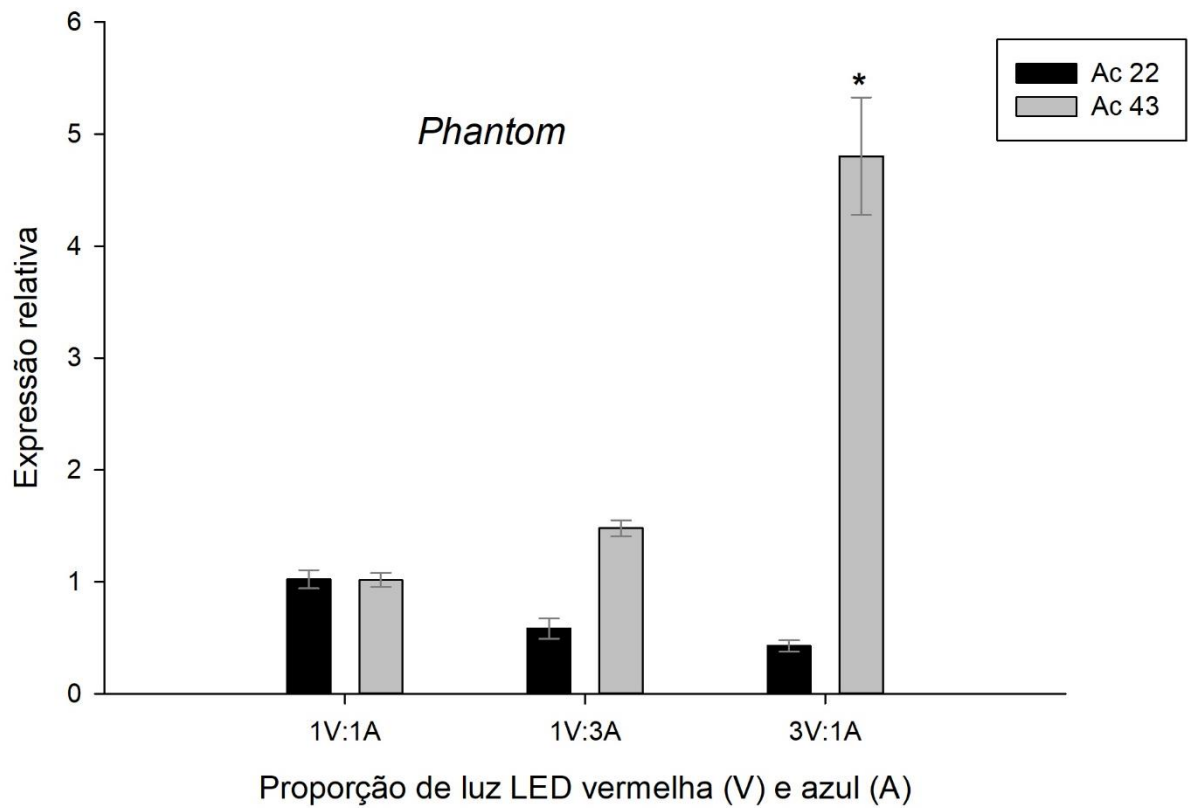
**Figura 8.** Determinação de açúcares de plantas de *Pfaffia glomerata* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes proporções de luz LED: 1V:1A, 1V:3A e 3V:1A. (A) Glicose ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$ ); (B) Frutose ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$ ); (C) Sacarose ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$ ) e (D) Amido ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$ ). Letras maiúsculas iguais dentro dos acessos e minúsculas iguais, dentro das proporções de luz, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão (n = 3).



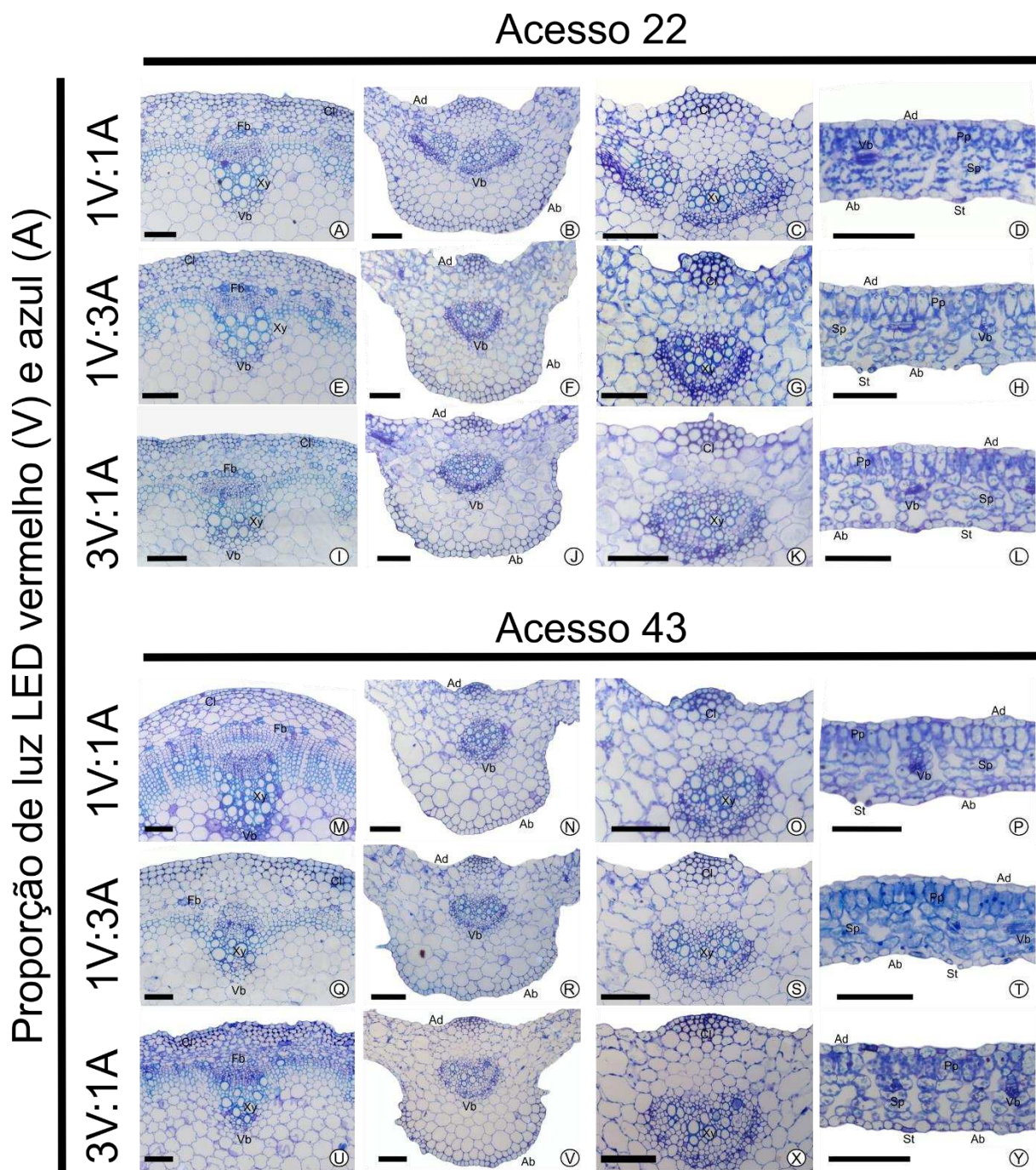
**Figura 9.** Determinação de aminoácidos e proteína de plantas de *Pfaffia glomerata* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes proporções de luz LED: 1V:1A, 1V:3A e 3V:1A. (A) Aminoácido ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MS}$ ) e (B) Proteína ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MS}$ ). Letras maiúsculas iguais dentro dos acessos e minúsculas iguais dentro das proporções de luz não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão ( $n = 4$ ).



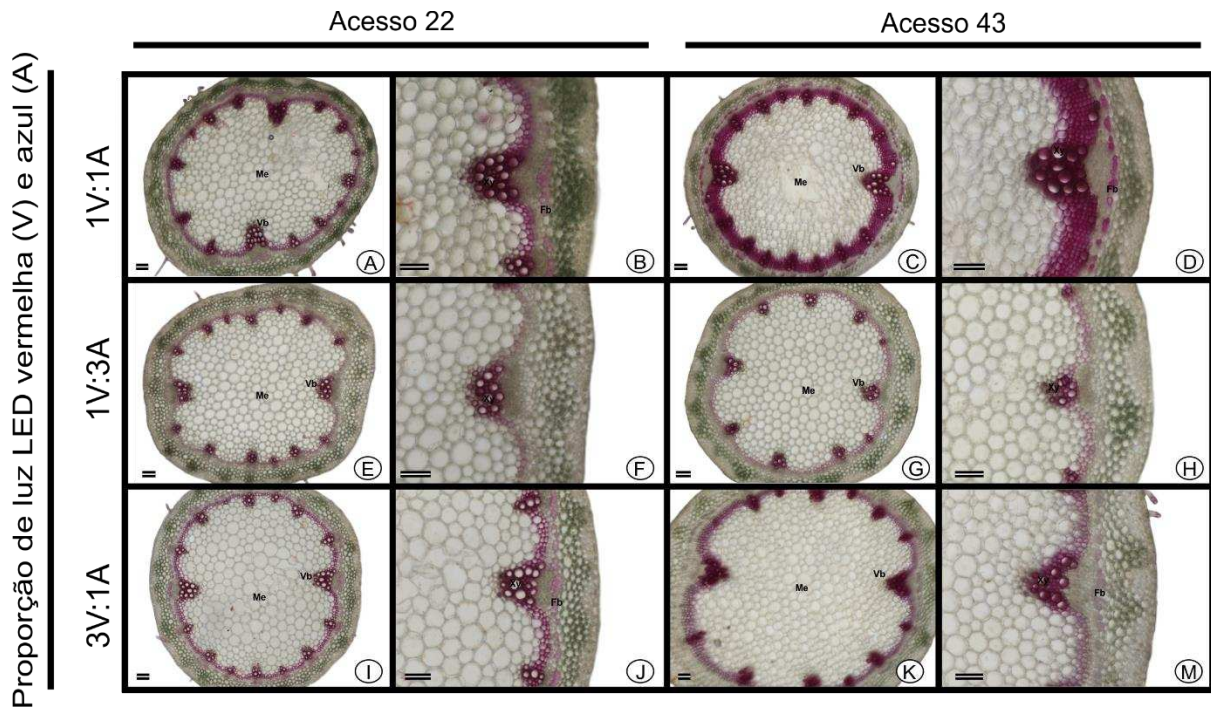
**Figura 10.** Determinação de 20-hidroxiecdisona (20E) de plantas de *Pfaffia glomerata* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes proporções de luz LED: 1V:1A, 1V:3A e 3V:1A. Teor de 20E (mg/g) da parte aérea (A) e raiz (B). Produção de 20E (mg por planta) da parte aérea (C) e raiz (D). Letras maiúsculas iguais dentro dos acessos e minúsculas iguais dentro das proporções de luz não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados apresentados como valores médios  $\pm$  erro padrão (n = 3).



**Figura 11.** Expressão relativa normalizada do gene *Phantom* de plantas de *Pfaffia glomerata* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes proporções de luz LED: 1V:1A, 1V:3A e 3V:1A. Expressão gênica relativa ao gene normalizador *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase*. Valores representam médias  $\pm$  erro padrão (n = 3),  $*=P<0,05$ , pelo teste de Dunnett.



**Figura 12.** Secções transversais da porção mediana de folha e do caule de plantas de *Pfaffia glomerata* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes proporções de luz LED: 1V:1A, 1V:3A e 3V:1A. Detalhes do feixe vascular do caule (A, E, I, M, Q, U). Feixe vascular principal da porção mediana da folha (B, F, J, N, R, V). Detalhes do feixe vascular principal da folha (C, G, K, O, S, X). Detalhes da lâmina foliar (D, H, L, P, T, Y). Abreviaturas: Cl - colênquima; Fb – fibra; Ad - epiderme superfície adaxial; Ab - superfície abaxial da epiderme; St - estômato; Vb - feixe vascular; Pp - parênquima paliçádico e Sp - parênquima esponjoso. Barra = 200  $\mu$ m.



**Figura 13.** Secções transversais da porção mediana do caule de plantas de *Pfaffia glomerata* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes proporções de luz LED: 1V:1A, 1V:3A e 3V:1A. Secções do caule (A, C, E, G, I, K) e detalhes do feixe vascular do caule (B, D, F, H, J, L) Abreviaturas: Fb – fibra; Me - medula; Vb - feixe vascular; Xy - xilema. Barra dupla = 200  $\mu$ m.

## CONCLUSÕES GERAIS

- A quantidade e qualidade da luz no cultivo *in vitro* de *P. glomerata* alteram o teor e a produção de 20E;
- As características morfofisiológicas, assim como a produção de 20E se mostraram genótipo-dependentes;
- O aumento da irradiância promoveu maior desenvolvimento *in vitro* de *P. glomerata*, aumentando também a eficiência fotossintética, o que refletiu no maior acúmulo de biomassa nas plantas.
- A qualidade espectral 1V:3A influenciou na eficiência fotossintética e na atividade das enzimas do estresse oxidativo. Já a igual proporção de luz (1V:1A) favoreceu o desenvolvimento morfoanatômico das plantas e a produção de 20E;
- Este trabalho fornece novas perspectivas a respeito dos efeitos da luz no ambiente *in vitro* e pode auxiliar na otimização de protocolos de bioprospecção e propagação em larga escala de 20E em *P. glomerata*.