



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

RUSTIFICAÇÃO *in vitro* DE *Lippia grata* Schauer:
ILUMINAÇÃO DE LÂMPADAS LED X VENTILAÇÃO NATURAL

Discente: Eng. Jhonatan Rafael Zárate Salazar

Orientadora: Dr^a. Cláudia Ulisses de Carvalho Silva

Co-orientadoras: Dr^a. Lilia Gomes Willadino

Dr^a. Marciana Bizerra de Moraes

RECIFE – PE

2018

JHONATAN RAFAEL ZÁRATE SALAZAR

**RUSTIFICAÇÃO *in vitro* DE *Lippia grata* Schauer:
ILUMINAÇÃO DE LÂMPADAS LED X VENTILAÇÃO NATURAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, Área de concentração Taxonomia, Fisiologia e Ecologia dos Ecossistemas do Nordeste na Linha de pesquisa em Biotecnologia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Botânica.

RECIFE – PE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Nome da Biblioteca, Recife-PE, Brasil

Z36r Zárte-Salazar, Jhonatan Rafael

Rustificação *in vitro* de *Lippia grata* Schauer: Iluminação de lâmpadas LED x ventilação natural / Jhonatan Rafael Zárte Salazar. – 2018.

64 f. : il.

Orientadora: Cláudia Ulisses de Carvalho Silva.

Coorientadoras: Lilia Gomes Willadino, Marciana Bizerra de Morais.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Programa de Pós-Graduação em Botânica, Recife, BR-PE, 2018.

Inclui referências.

1. Hiperidricidade 2. Diodos emissores de luz 3. Cultura de tecidos vegetais
I. Silva, Cláudia Ulisses de Carvalho, orient. II. Willadino, Lilia Gomes, coorient.
III. Morais, Marciana Bizerra de, coorient. IV. Título

CDD 581

JHONATAN RAFAEL ZÁRATE SALAZAR

**Rustificação *in vitro* de *Lippia grata* Schauer:
Iluminação de lâmpadas LED x ventilação natural.**

Tese defendida em ____/____/____ e _____ pela banca examinadora:

*Dra. Cláudia Ulisses de Carvalho Silva – Presidente
(Universidade Federal Rural de Pernambuco)*

*Dra. Terezinha Rangel Camara
(Universidade Federal Rural de Pernambuco)*

*Dra. Marina Medeiros de Araújo Silva
(Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Rondônia)*

*Dra. Ana Virgínia de Lima Leite - Suplente
(Universidade Federal Rural de Pernambuco)*

*Dra. Maria Jaislanny Lacerda e Medeiros Nogueira – Suplente
(Universidade Federal do Piauí)*

Recife, 2018

À minha filha amada
Valentina Sofia Zárate dos Santos
por ser a representação
do amor de Deus na minha vida;
Ao meu querido pai: *El Maestro Pepe*,
José Gilbert Zárate Guerrero
por confiar em mim em todo momento.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por me permitir atingir os meus sonhos no amor e tempo Dele;

À Lic. Vanessa Cristiane dos Santos por me compreender e apoiar no percurso do mestrado e sobretudo por presentear-me o privilégio de ser pai de uma menina maravilhosa, a maior bênção que já recebi na minha vida;

À Dr^a. Cláudia Ulisses por todo o apoio científico e pessoal. A sua confiança depositada em mim foi fundamental para a conclusão deste trabalho;

À Dr^a. Marciana Bizerra de Moraes pelas suas acertadas contribuições científicas;

Às Dr^a(s) Lilia Willadino & Terezinha Camara pelos seus valiosos conselhos;

A Lindomar Souza & Luiz Palhares Neto por serem peças fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho de investigação;

À Mirela Santos pelo seu apoio imensurável expressado na sua amizade e companheirismo sincero que em todo momento motivou-me a prosseguir neste processo acadêmico;

A Leonardo Silva, Natália Corte Real & Pedro Bezerra, pela sua bonita amizade;

A Cihelio Alves, Maiana dos Reis & Igor Barbosa assim como a todas aquelas pessoas que conheci no percurso do mestrado e que fizeram do caminho mais agradável de percorrer;

Ao Flavio Lozano Isla por ser parte do início desta extraordinária experiência acadêmica;

Ao Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo apoio institucional e ensinamentos científicos dos professores;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos;

A todos os membros da família do LCTV, imensamente grato!

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 <i>Lippia grata</i> Schauer, Família Verbenaceae	14
Figura 2 Etapas da micropropagação <i>in vitro</i>	16

CAPÍTULO II: ARTÍGO CIENTÍFICO

Figura 1 Distribuição espectral de energia relativa dos sistemas de iluminação.....	55
Figura 2 Classificação qualitativa da expansão da lâmina foliar.....	56
Figura 3 Características qualitativas visuais das plantas de <i>L. grata</i> aos 45 dias de cultivo <i>in vitro</i>	57
Figura 4 Teores de carboidratos e proteínas solúveis totais em plantas de <i>L. grata</i> aos 45 dias de cultivo <i>in vitro</i>	58
Figura 5 Teores dos pigmentos cloroplastídicos em plantas de <i>L. grata</i> aos 45 dias de cultivo <i>in vitro</i>	59
Figura 6 Seções transversais da nervura principal de <i>L. grata</i>	60
Figura 7 Análises de Componentes Principais (ACP).....	61

LISTA DE TABELA

CAPÍTULO II: ARTÍGO CIENTÍFICO

Tabela 1 Parâmetros de biométricos aos 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> de <i>L. grata</i> sob diferentes espectros de luz associados à ventilação dos frascos.	53
Tabela 2 Coeficientes da correlação de Pearson para os parâmetros biométricos e bioquímicos das plantas de <i>L. grata</i> aos 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> submetido a diferentes sistemas de iluminação associado a condições de ventilação.	54

SUMÁRIO

RESUMO	9
CAPÍTULO I	10
1. Introdução Geral	11
2. Revisão de Literatura.....	13
2.1 <i>Lippia grata</i> Schauer.....	13
2.2 Cultivo <i>in vitro</i> de plantas	15
2.2.1 Controle da iluminação no cultivo <i>in vitro</i>	16
2.2.2 Controle da ventilação no cultivo <i>in vitro</i>	18
2.2.3 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>L. grata</i>	20
3 Referências bibliográficas	22
CAPÍTULO II.....	30
Rustificação <i>in vitro</i> de <i>Lippia grata</i> Schauer: Iluminação de lâmpadas LED x ventilação natural	30
Resumo	32
Introdução	33
Materiais e Métodos.....	35
Resultados	37
Discussão	41
Conclusões	44
Referências bibliográficas.....	45
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
NORMAS DA REVISTA.....	64

RESUMO

Lippia grata Schauer é uma espécie aromática, endêmica do Nordeste brasileiro e de reconhecida importância medicinal devido à atividade anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana presentes em seus óleos essenciais, fazendo dela um recurso natural promissor no tratamento de doenças. O cultivo *in vitro* poderia tornar mais eficiente o uso de suas potencialidades medicinais sem a necessidade de afetar seu habitat natural por ações antropogênicas. Nesse sentido, o presente trabalho de investigação objetivou avaliar com enfoque morfofisiológico e bioquímico, plantas de *L. grata* cultivadas *in vitro* sob o uso de lâmpadas LED's associadas à ventilação natural nos frascos. As unidades experimentais foram constituídas por segmentos nodais de *L. grata*, com 1 cm de comprimento, retirados abaixo da gema apical e inoculadas em frascos contendo 10 mL de meio nutritivo MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, gelificado com 2,5 g L⁻¹ phytigel e pH ajustado a 5,7. A ventilação natural dos frascos foi controlada por meio de dois tipos de vedação, parcial (com ventilação) e total (sem ventilação), distribuídos aleatoriamente em quatro diferentes sistemas de iluminação, LVA 5:1= LED Vermelha e Azul (5:1); LVA 1:1= LED Vermelha e Azul (1:1); LB= LED Branco e FL= Lâmpada Fluorescente, calibradas em 60 μmol m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa dentro de uma sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, 80±5% de umidade relativa e temperatura de 25±2°C, durante 45 dias, conduzidas sob um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com um arranjo fatorial 4x2, com 3 repetições, sendo cada repetição 15 unidades experimentais. No 45º dia, as plantas foram analisadas em função dos seus parâmetros biométricos, bioquímicos e histológicos. Nesse sentido, evidenciamos que a ventilação natural dos frascos reduz em 62% a incidência de folhas hiperídricas em todos os sistemas de iluminação apresentando plantas de maior tamanho e folhas mais expandidas, ademais nessas condições as plantas reduziram sua massa fresca em 27% evidenciando indiretamente o efeito do intercâmbio gasoso. Os parâmetros bioquímicos das plantas também foram influenciados positivamente pela ventilação natural dos frascos uma vez que os teores dos pigmentos cloroplásticos e teores de carboidratos solúveis totais aumentaram em 46% e 115%, respectivamente. Ademais, sob um enfoque histológico observamos que houve uma maior organização celular da epiderme e do parênquima cortical da nervura principal das folhas, situação que não foi observada em plantas com condições sem ventilação. A influência dos sistemas de iluminação também foi destacável, em especial do LED Branco uma vez que apresentou plantas com menor número de folhas hiperídricas mesmo em frascos sem ventilação o qual se traduz em um maior número de folhas normais aliás de exibir maior número de brotos e raízes. Assim mesmo, o LED Branco associado a condições de ventilação natural foi o único sistema de iluminação que promoveu expressivos aumentos nos teores de clorofila *a*; clorofila *b*; clorofila totais (*a+b*); carotenoides; carboidratos solúveis totais; e sacarose em 87%; 143%; 102%; 76%; 223% e 116%, respectivamente, comparado com o obtido em condições sem ventilação. Perante isto, concluímos que existe um efeito sinérgico no uso de lâmpadas LED Brancas associadas a condições de ventilação natural dos frascos no cultivo *in vitro* de *L. grata* uma vez que contribuem na redução nos sintomas de hiperidricidade e estimulam uma maior atividade metabólica expressada através do aumento dos teores em seus parâmetros bioquímicos.

Palavras-chave: Diodos emissores de luz · Hiperidricidade · Cultura de tecidos vegetais · Ventilação natural.

CAPÍTULO I

Introdução geral e revisão de literatura

1. Introdução Geral

Lippia grata Schauer, conhecida popularmente como alecrim-da-chapada e alecrim-de-tabuleiro, é uma espécie da família Verbenaceae, com ampla distribuição em áreas da Floresta Tropical Sazonal Seca (BITU et al., 2015; CRUZ et al., 2014). Esta espécie é reconhecida pela sua importância medicinal devido aos óleos essenciais presentes nas folhas, constituídos principalmente de derivados fenólicos como timol e carvacrol (BITU et al., 2012). Neste sentido, os óleos essenciais apresentam comprovada atividade antifúngica e antimicrobiana (ALBUQUERQUE et al., 2006; BITU et al., 2014) com amplo uso no tratamento de doenças dermatológicas, queimaduras e infecções da garganta (GOMES; NOGUEIRA; MORAES, 2011).

Com a finalidade de contribuir com a conservação e o aproveitamento dos recursos vegetais de importância econômica e de uso popular, a biotecnologia tem proporcionado diversas técnicas que possibilitam o estudo de plantas com um enfoque celular e molecular (GEORGE; HALL; KLERK, 2008). Dentre essas técnicas, o cultivo *in vitro* de plantas tem sido importante pela sua aplicação versátil em estudos botânicos e agrônômicos, que em condições convencionais seria impossível conseguir em curtos períodos e em espaços físicos reduzidos, grandes quantidades de plantas com características fisiológicas e morfológicas satisfatórias (CANHOTO, 2010; STEFANO; ROSARIO, 2003).

No cultivo *in vitro*, as plantas são condicionadas a microambientes com altos níveis de umidade, baixa luminosidade e trocas gasosas reduzidas como consequência dos cuidados que evitam a contaminação por agentes externos (GEORGE; HALL; KLERK, 2008) de tal forma que condições *in vitro* podem provocar desordens morfofisiológicas manifestadas comumente em folhas hiperhídricas (KLERK; DRIES; KRENS, 2017), assim como o ineficiente funcionamento estomático e a redução do teor da cera epicuticular (APÓSTOLO; BRUTTI; LLORENTE, 2005) que se traduz no aumento da probabilidade de morte das plantas no processo de aclimatização (CHANDRA et al., 2010). No entanto, este efeito poderia ser reduzido perante uma iluminação mais eficiente para as plantas e maior ventilação nos frascos de cultivo *in vitro*, promovendo a formação de tecidos mais organizados e consequentemente mais funcionais (DECCETTI et al., 2008; WU; KUO; CHEN, 2018).

No que corresponde ao controle da luz a favor do bom desenvolvimento das plantas *in vitro*, o uso de fontes de iluminação eficientes, como as luzes LED (*Light Emission Diode*),

vem sendo estudadas, pois oferecem um maior tempo de vida útil, cerca de 100 vezes maior, comparado com lâmpadas fluorescentes utilizadas frequentemente nas salas de crescimento (IBARAKI, 2016; ROCHA et al., 2010). Ademais, os LED's apresentam alta eficiência com baixa emissão de calor, grande versatilidade nas combinações das fontes de luz e ausência de substâncias tóxicas (OLIVEIRA; BASTOS, 2013; SHARAKSHANE, 2016), além de oferecer comprimentos de onda específicos relacionados ao bom funcionamento fotossintético, tornando-se alvo de estudos no cultivo *in vitro* de plantas (SHIN et al., 2008). Dentre essas pesquisas, se têm reportado que o uso de lâmpadas LED está significativamente relacionado ao incremento da quantidade de clorofila e carotenoides nos tecidos das plantas, assim como, maior área foliar e maior número brotos, o que atingiria maiores taxas de multiplicação *in vitro* (LIU et al., 2014; NHUT et al., 2015).

O uso de sistemas de iluminação eficientes e condições de ventilação dos frascos de cultivo podem ser fundamentais para estimular o metabólico bioquímico das plantas em condições *in vitro* que as preparem para aumentar suas chances de aclimatização. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da iluminação LED associado a condições de ventilação natural dos frascos no crescimento e desenvolvimento *in vitro* de plantas de *L. grata*.

2. Revisão de Literatura

2.1 *Lippia grata* Schauer

Lippia grata (Figura 1), é uma espécie da família Verbenaceae, distribuída na Floresta Tropical Sazonal Seca, conhecida popularmente como alecrim-de-tabuleiro e alecrim-da-chapada, assim também é uma planta reconhecida pelas suas propriedades medicinais (BITU et al., 2015; CRUZ et al., 2014). Estudos recentes baseados em características quantitativas morfológicas e moleculares tem-na denominado como espécie representativa do grupo B da *Lippia* Secção *Goniostachyum*¹, estabelecendo como sinônimos às espécies *L. gracilis* Schauer, *L. dumetorum* Herzog, *L. laxibracteata* Herzog e *L. hickenii* (O'LEARY et al., 2012).

Trata-se de uma espécie aromática endêmica do Nordeste brasileiro, própria da vegetação do semiárido e de terrenos bem drenados, com ocorrência nos estados do Piauí, Bahia, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco, assim como em regiões específicas da Venezuela e da Argentina (Figura 1G) (O'LEARY et al., 2012; PESSOA et al., 2005). A espécie está classificada como um subarbusto de caule quebradiço, folhas pubescentes, inflorescências frondosas com brácteas apicais fusionadas de coloração branca e frutos contendo sementes com reduzido índice de germinação. Ademais, em condições naturais pode atingir até os três metros de altura (O'LEARY et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2011; MATOS et al., 1999).

Uma característica importante de *L. grata* radica no óleo essencial originado do metabolismo secundário que se acumula nos tricomas glandulares das folhas. Este óleo essencial apresenta como princípio ativo compostos fenólicos de timol e carvacrol com (BITU et al., 2012) os quais são aproveitados pela indústria farmacêutica uma vez que apresenta comprovada atividade antimicrobiana, onde o 60% do óleo extraído possui propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (ALBUQUERQUE et al., 2006; BITU et al., 2014; PESSOA et al., 2005).

Em muitos casos, popularmente as folhas e flores de *L. grata* são usadas na forma de infusão, administradas oralmente ou através de emplastos para o tratamento de doenças dermatológicas (GOMES; NOGUEIRA; MORAES, 2011; PESSOA et al., 2005).

¹ Compreende de plantas que se distinguem pelas numerosas inflorescências axilares e brácteas florais. As espécies ocorrem nos Neotrópicos, do México ao norte da Argentina.

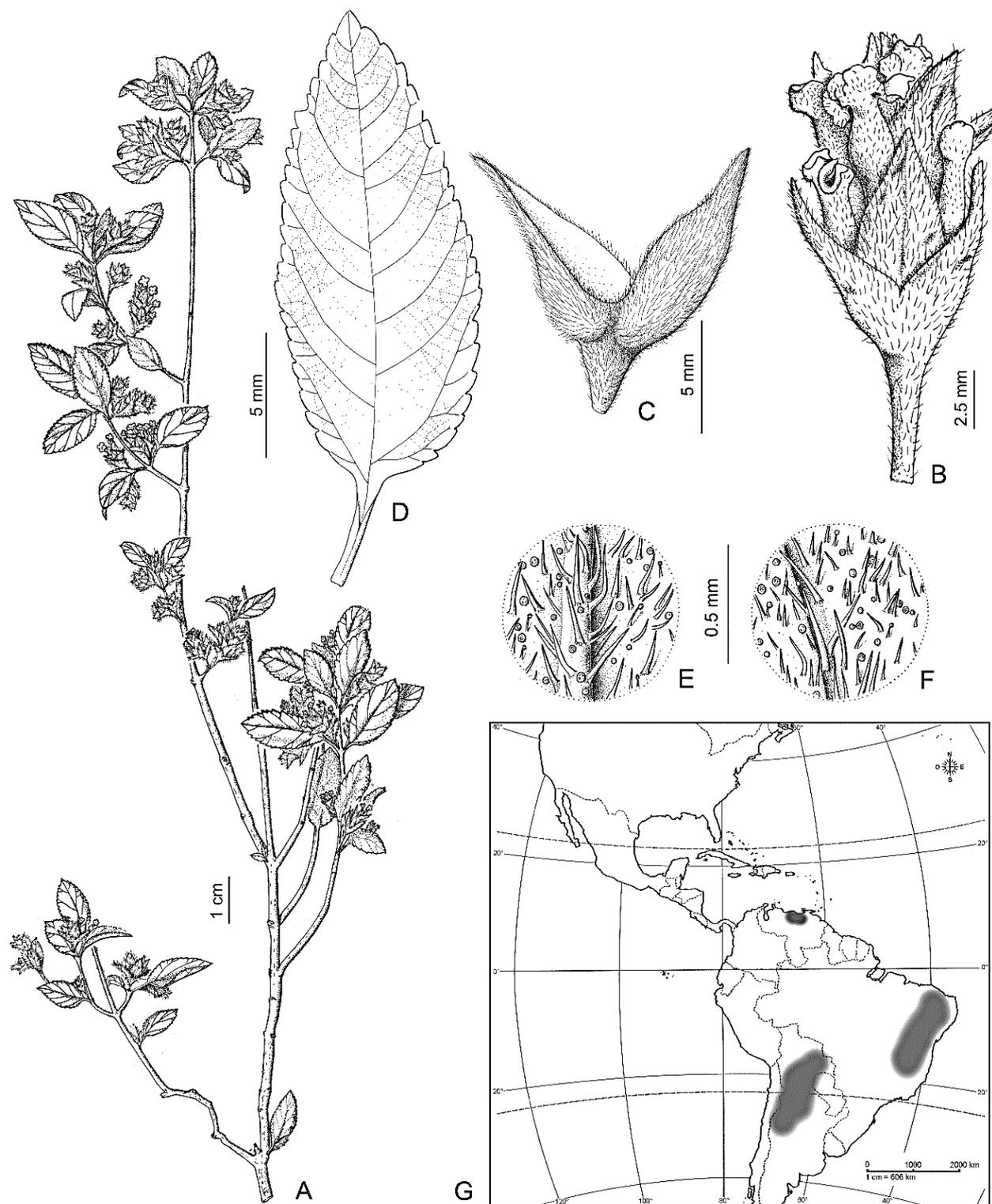


Figura 1. *Lippia grata* Schauer, Família Verbenaceae. A: aspecto geral da planta; B: detalhe de inflorescência; C: brácteas apicais fundidas na inflorescência; D: folha, superfície adaxial; E: pubescência da folha, superfície abaxial; F: pubescência das folhas, superfície adaxial; G: distribuição geográfica. De *Schinini 19563* (CTES). Ilustração e legenda autorizada por Nataly O'Leary (O'Leary *et al.*, 2012).

Nesse sentido, o óleo essencial das folhas de *L. grata* devido ao seu potencial bioativo e de importância medicinal (SOARES; TAVARES-DIAS, 2013) faz desta espécie um recurso promissor com potencialidades consideradas inclusive anticancerígenas (FERRAZ, 2013). De modo que sob um enfoque ecológico e econômico seria importante prevenir o impacto antropogênico do habitat natural desta espécie, mas promovendo a obtenção de grandes quantidades de plantas em períodos curtos que permitam seu aproveitamento extrativo, tal propósito seria favorecido por técnicas biotecnológicas como as do cultivo *in vitro* de plantas (GEORGE; HALL; KLERK, 2008).

2.2 Cultivo *in vitro* de plantas

O cultivo *in vitro* de plantas é um conjunto de técnicas biotecnológicas baseadas no princípio da totipotência celular², a qual é a base fundamental da regeneração de plantas por meio do cultivo de células vegetais (FREITAS, 2014). Esse princípio consiste em que cada célula vegetal possui o potencial genético para regenerar uma planta inteira em resposta a um estímulo que promova a sua divisão celular e reprogramação genética (LOYOLA-VARGAS; VÁZQUEZ-FLOTA, 2006). Assim, dentro das técnicas do cultivo *in vitro*, a micropropagação conhecida também como clonagem *in vitro* (CANHOTO, 2010), tem sido uma estratégia fundamental para a propagação de plantas com problemas de reprodução sexual, importância ecológica e econômica, já que a partir de um explante cultivado asépticamente num meio nutritivo em condições controladas de luminosidade e temperatura, conseguem-se obter grandes quantidades de plantas com alta fidelidade genética (SHARMA, 2017). Esta técnica apresenta quatro etapas (Figura 2) propostas por Murashige em 1974, (1) Estabelecimento asséptico; (2) Multiplicação; (3) Enraizamento e (4) Aclimatização, as quais ainda seguem vigentes nos protocolos de micropropagação.

O sucesso do cultivo *in vitro* de plantas, radica no controle dos fatores abióticos (*e.g.* nutricionais e luminosos) e bióticos (*e.g.* genéticos e hormonais), uma vez que são responsáveis de promover plantas saudáveis com vigor fisiológico e com o potencial quando o enfoque é sua multiplicação em larga escala (GEORGE; HALL; KLERK, 2008). No entanto, também dependerá de outras séries de fatores como: época do ano, local de coleta, idade ontogênica, estágio de desenvolvimento e assepsia dos explantes assim como o controle da entrada de agentes externos ao interior dos frascos de cultivo (CANHOTO, 2010; COSTA et al., 2007;

² Conceito proposto pelo fisiologista Haberlandt em 1902.

GEORGE; HALL; KLERK, 2008), sendo isto último um fator associado à presença de sintomas de hiperhidricidade, que dependendo da espécie, traz como consequência efeitos negativos no crescimento e desenvolvimento principalmente na fase de multiplicação e enraizamento que evidentemente reduziria suas chances de aclimatização (CHANDRA et al., 2010; WU; KUO; CHEN, 2018).

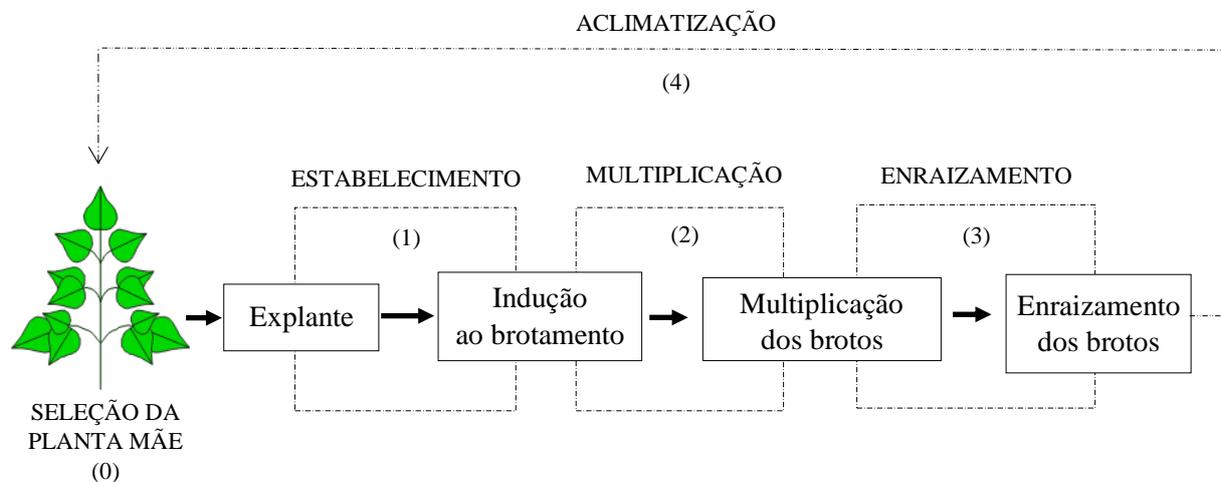


Figura 2. Etapas da micropropagação no cultivo *in vitro* de plantas. Esquema elaborado por ZÁRATE-SALAZAR (2018) baseado nos conceitos de MURASHIGE (1974).

2.2.1 Controle da iluminação no cultivo *in vitro*

O controle da iluminação das plantas deve considerar três fatores essenciais: o fotoperíodo (tempo de exposição), a densidade de fluxo de fótons (quantidade) e os comprimentos de onda (qualidade) (IBARAKI, 2016), já que sinergicamente apresentam comprovada influência na espessura foliar, na diferenciação das células do mesofilo, no desenvolvimento dos feixes vasculares, na eficiência do mecanismo dos estômatos e na biossíntese de metabólitos secundários (LEFSRUD; KOPSELL; SAMS, 2008; NHUT et al., 2015; ROCHA et al., 2010).

Nesse sentido, - dependendo da espécie- a iluminação dos ambientes de cultivo *in vitro* precisam estar regulados em função às necessidades das plantas uma vez que processos fotossintéticos e fotomorfogênicos ocorrem entre 20 - 70 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ de densidade de fluxo fotossintéticos ativos (YEH; CHUNG, 2009) e 400 - 700 nm de comprimento de onda (TAIZ et al., 2017), respectivamente, os quais em consequência estimulam o crescimento e desenvolvimento de folhas, brotos e raízes, ademais de contribuir à síntese de óleos essenciais

de algumas plantas medicinais (ENDO; ARAKI; NAGATANI, 2015; MENGIN et al., 2017; SOUZA et al., 2008).

Dentre os sistemas de controle da iluminação, as lâmpadas fluorescentes têm sido frequentemente utilizadas nas salas de crescimento *in vitro* (ROCHA et al., 2010), no entanto, com os avanços biotecnológicos surgiram evidências que elas não seriam convenientes para o crescimento vegetal já que fornecem comprimentos de onda (entre 350 a 750 nm) com similaridade espectral que limitam a produção de cloroplastos e como consequência menor produção de pigmentos cloroplastídicos influenciando negativamente o metabolismo fotossintético (DARKO et al., 2014; MANIVANNAN et al., 2015; VICTÓRIO et al., 2007). Ademais, as lâmpadas fluorescentes apresentam compostos tóxicos como mercúrio e fósforo que contribuem à poluição do ar, solo, lençóis freáticos, rios, chuvas, animais e o homem, comprometendo a cadeia alimentar, de modo que atualmente é classificada como um contaminante químicos ambiental (HOBHOM et al., 2017; MIKAEVA; MIKAEVA; GORBUNOV, 2017).

Ao contrário, os sistemas de iluminação com lâmpadas LED (do inglês, *Light Emission Diode*) têm ganho maior aceitação devido à elevada eficiência de conversão fotoelétrica, emissão de comprimentos de onda específicos, baixa produção de calor, flexibilidade de cores, regulação da quantidade e qualidade da luz, maior período de vida útil (100 vezes mais que lâmpadas fluorescentes) e sobretudo pela ausência de substâncias tóxicas (FUJIWARA, 2016; LAZZARINI et al., 2017). Por essas vantagens, os LED's nas últimas décadas estão sendo implementados e avaliadas em salas de crescimento *in vitro* com resultados superiores do convencional (CARDARELLI; PIZZINELLI, 2017; KYOUNG-RAN; SEUNG-YEOB, 2017; PONCETTA et al., 2017).

Nesse sentido, a implementação de LED's facilitou a regulação da quantidade (número de LED's por unidade de área) e qualidade (cor do LED) da luz nos sistemas de iluminação (FUJIWARA, 2016), permitindo a regulação dos comprimentos de onda em luz vermelha (620 – 750 nm) onde se evidenciou maior desenvolvimento do aparato fotossintético e acumulação de amido (WU et al., 2007), assim como maior comprimento das brotações e alongamento celular (NHUT et al., 2015); e quando regulado em luz azul (450 – 490 nm) estimulou o desenvolvimento dos cloroplastos, síntese de clorofilas, abertura de estômatos e fotomorfogênese (MANIVANNAN et al., 2015; NHUT et al., 2015).

Experimentos com iluminação LED têm sido testados em diversas espécies com respostas fisiológicas esclarecedoras. Por exemplo, em orquídeas do gênero *Doritaenopsis* por meio do uso de lâmpadas LED's, em proporções de azul e vermelho, promoveram o incremento dos teores de pigmentos fotossintéticos e crescimento das plantas aumentando a taxa de multiplicação dos explantes (SHIN; PARK; PAEK, 2014). Em plântulas *in vitro* de *Achillea millefolium* L. sob LED's azuis, apresentaram um aumento na quantidade de raízes (comprimento e peso), além de maiores acúmulos de matéria seca da parte aérea (ALVARENGA et al., 2015). Em *Jatropha curcas* L. os LED vermelhos induziram o enraizamento em 65% dos brotos conferindo assim uma resposta favorável deste tipo de iluminação na indução de enraizamento em condições *in vitro* (DAUD; FAIZAL; GEELEN, 2013).

Em plantas de *Rehmannia glutinosa*, os LED's azul induziram a defesa antioxidante e foi diretamente correlacionada com o aprimoramento de compostos fitoquímicos (MANIVANNAN et al., 2015). Em *Scrophularia takesimensis*, os LED's vermelhos induziram a presença de calos na base dos brotos (JEONG; SIVANESAN, 2015). De acordo com Nhut *et al.* (2015) a formação de plantas foi mais eficaz quando os calos embriogênicos foram cultivados sob a combinação de 60% de LED vermelho e 40% de LED azul, com uma média de 11,21 plântulas por explante. Em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), foi observado que as melhores taxas de multiplicação e parâmetros de crescimento foram favorecidas pela qualidade e quantidade de luz emitida pelos espectros de luz com 80% LED vermelho + 20% LED azul, com $80 \mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$ (FERREIRA *et al.*, 2017).

Diante do exposto, as plantas cultivadas *in vitro* podem apresentar diferentes respostas fisiológicas dependendo das fontes de iluminação de modo que as plantas alcancem características morfológicas e fisiológicas mais adequadas que garantam a aclimatização com reduzidos índices de mortalidade.

2.2.2 Controle da ventilação no cultivo *in vitro*

As plantas -explantes- quando cultivadas em condições *in vitro*, são expostas a um microambiente único dentro de recipientes fechados e assépticos, que se caracterizam principalmente por apresentar reduzido intercâmbio gasoso (GEORGE; HALL; KLERK, 2008), alta umidade relativa, baixa luminosidade e altos teores de carboidratos e sais minerais no meio nutritivo (CANHOTO, 2010). Porém, como estas condições *in vitro* são diferentes daquelas encontradas num ambiente *ex vitro*, elas favorecem o desenvolvimento

morfofisiológico de algumas anormalidades (COSTA, 2012) as quais maiormente estão associadas à reduzida ventilação e elevada umidade relativa interna dos recipientes de cultivo (MOHAMED; ALSADON, 2010). Assim, os efeitos negativos morfofisiológicos se expressam geralmente nas plantas com excessivos espaços intercelulares no parênquima paliçádico, redução do teor de cera epicuticular (CHANDRA et al., 2010) e presença de sintomas de hiperhidricidade (HAZARIKA; BORA, 2010).

Nesse sentido, a hiperhidricidade se define como uma desordem morfofisiológica decorrente do elevado teor de água no interior das células e tecidos (KEVERS et al., 2004; SAHER et al., 2004), cujos sintomas nas plantas estão caracterizados por apresentar um aspecto translúcido, com órgãos de coloração verde pálido, entrenós mais curtos e desenvolvimento de microbrotos com folhas pequenas, grossas, frágeis e enrugadas (KLERK; DRIES; KRENS, 2017; VASCONCELOS et al., 2012), ademais de evidenciar a desorganização dos tilacoides, menor número de cloroplastos e como consequência menores teores de pigmentos cloroplastídicos (LIU et al., 2017). Então, as plantas com sintomas de hiperhidricidade geralmente apresentaram um mal funcionamento do mecanismo estomático reduzindo seu teor da cera epicuticular nas folhas e como consequência reduzindo também as possibilidades de aclimatização -transição *in vitro/ex vitro*- pela falta do controle das plantas na regulação da perda de água na transpiração em condições *ex vitro* (BERILLI et al., 2011; GIRARDI; PESCADOR, 2010; SHIN; PARK; PAEK, 2014).

Com o alvo de reduzir os efeitos negativos supracitados, se têm experimentado o cultivo *in vitro* em condições mixotróficas ou autotróficas uma vez que a fonte nutricional, principalmente sacarosa, é reduzida ou eliminada do meio nutritivo, porém em compensação promovendo o intercâmbio gasoso por meio da ventilação (natural ou forçada) no interior dos frascos (HAZARIKA, 2003; MOHAMED; ALSADON, 2010) favorecendo assim o metabolismo autônomo das plantas, estimulando maior fixação de CO₂, maior regulação osmótica e portanto maior desenvolvimento vegetal incrementando as chances de sobrevivência quando submetidas em condições de aclimatização (KOZAI, 2010; XIAO; NIU; KOZAI, 2011)

Em plantas de *Gevuina avellana* (ALVAREZ et al., 2012) se observou que em condições de ventilação sob uma intensidade luminosa de 40 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ não apresentam diferenças significativas em seus teores de pigmentos cloroplastídicos e carboidratos solúveis

totais quando submetidas em condições sem ventilação e sob $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa.

A suplementação de CO_2 (ventilação forçada) associado ao aumento da intensidade luminosa revelaram que as plantas de *Doritaenopsis* otimizam as chances de sobrevivência durante o processo de transferência a condições de aclimatização (SHIN; PARK; PAEK, 2014).

Em *Solanum tuberosum* a ventilação dos frascos mesmo com uma menor concentração de sacarosa ($< 30\text{g/L}$) no meio nutritivo promoveu o aumento do entrenós por planta e estimulou o incremento de clorofila *a*, clorofila *b* e clorofilas totais (MOHAMED; ALSADON, 2010). No entanto, outros efeitos positivos já tinham sido reportados para esta espécie uma vez que a ventilação forçada e natural incrementou o peso fresco das plântulas 2,4 vezes mais que quando cultivadas sem ventilação (KUBOTA; KOZAI, 1992).

Segundo Lai et al. (2005) a hiperidricidade em culturas de filhotes de *Scrophularia yoshimurae* pode ser evitada por troca gasosa. Por outro lado, em *Ipomaea batatas* e *Nicotiana tabacum* os estômatos foram mais funcionais em condições de ventilação forçada (ZOBAYED et al., 2000; ZOBAYED; ARMSTRONG; ARMSTRONG, 2001)

2.2.3 Cultivo *in vitro* de *L. grata*

L. grata e as espécies que atualmente as sinonimizam como *L. gracilis*, *L. dumetorum*, *L. laxibracteata* e *L. hickenii* (O'LEARY et al., 2012), nas últimas duas décadas, não apresentam protocolos de cultivo *in vitro* em micropropagação que tenham sido publicados em artigos científicos, à exceção de uma nota prévia publicada para *L. gracilis* (MARINHO et al., 2011) e artigos publicados para espécies presentes em outros grupos da Secção *Goniostachyum* como *L. citriodora* (PAPAFOTIOU et al., 2017), *L. alba* (LUZ et al., 2014), *L. graveolens* (CASTELLANOS-HERNÁNDEZ et al., 2013), *L. filifolia* (PEIXOTO et al., 2006) e *L. micromera* (CAPOTE et al., 1999).

Esta falta de protocolos de micropropagação para *L. grata* e espécies do gênero *Lippia*, não têm sido por falta de interesse científico, senão porque na maioria de vezes o enfoque tem abordado dois alvos principais:

- a. Taxonômico, uma vez que o gênero *Lippia* apresenta mais de 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores com ampla distribuição geográfica que abrange desde o Sul de México até o Norte da Argentina, de modo que a busca inicial dos

pesquisadores foi entender e agrupar às espécies segundo suas características botânicas e de ocorrência geográfica (BITU et al., 2015; O'LEARY et al., 2012; PASCUAL et al., 2001; SCHERWINSKI-PEREIRA et al., 2010);

- b. Medicinal e extrativa, devido aos princípios ativos presentes nos óleos essenciais contidos nas folhas, as quais apresentam comprovada atividade antimicrobianas e potencial bioativo no tratamento de doenças dermatológicas, parasitológicas e inclusive anticancerígenas (BITU et al., 2012, 2014; LEMOS et al., 1990; PASCUAL et al., 2001; PESSOA et al., 2005; RAGAGNIN et al., 2014; SANTOS et al., 2015, 2016; TREVISAN et al., 2016; VERAS et al., 2013).

No entanto, em base às observações de Palhares Neto et al.³ do grupo de pesquisa do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais⁴ (LCTV) evidenciaram uma incidência acima do 90% de sintomas de hiperhidricidade em plantas de *Lippia grata* estabelecidas *in vitro*, cujas respostas têm sido associadas à falta de ventilação dos frascos e ao sistema de iluminação fluorescente. Nesse sentido, se planteou a seguinte pergunta científica: A ventilação dos frascos quando associado a um sistema de luz LED permitiria reduzir a incidência da hiperhidricidade no cultivo *in vitro* de plantas de *L. grata*?

³ Trabalho intitulado “Controlling hyperhydricity in micropropagated plants of *Lippia gracilis* (Verbanaceae), a native species of a dry seasonal tropical forest with pharmacological potential”, submetida à revista *Brazilian Journal of Botany*, 2017.

⁴ Laboratório do Departamento de Química Agrícola da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

3 Referências bibliográficas

ALBUQUERQUE, C. C. DE et al. Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 49, n. 4, p. 527–535, jul. 2006.

ALVARENGA, I. C. A. et al. In vitro culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 122, n. 2, p. 299–308, 2015.

ALVAREZ, C. et al. Effects of light and ventilation on physiological parameters during in vitro acclimatization of *Gevuina avellana* mol. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 110, n. 1, p. 93–101, 2012.

APÓSTOLO, N.; BRUTTI, C.; LLLORENTE, B. Leaf anatomy of *Cynara scolymus* L. in successive micropropagation stages. In Vitro Cellular and Development Biology - Plant, v. 41, n. 3, p. 307–313, 2005.

BERILLI, S. DA S. et al. Avaliação do desenvolvimento de diferentes tamanhos de mudas micropropagadas de abacaxizeiro, após aclimação. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 33, n. 1, p. 208–214, 2011.

BITU, V. et al. Phytochemical screening and antimicrobial activity phytochemical of essential oil from *Lippia gracilllis*. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 22, n. 1, p. 69–75, fev. 2012.

BITU, V. D. C. N. et al. Chemical composition of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer leaves and its potential as modulator of bacterial resistance. Natural Product Research Taylor & Francis, , 2014.

BITU, V. DE C. N. et al. Effect of Collection Time on Composition of Essential Oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae) Growing in Northeast Brazil. Journal of Essential Oil-Bearing Plants, v. 18, n. 3, p. 647–653, 2015.

CANHOTO, J. M. Biotecnologia vegetal: da clonagem de plantas à transformação genética. Imprensa d ed. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 2010.

CAPOTE, A. et al. Linked references are available on JSTOR for this article : Micropropagación y regeneración de plantas in vitro de oreganillo *Lippia micromera* Schauer , in DC . var . helleri (Britt .). Revista del Jardín Botánico Nacional, v. 20, p. 139–142, 1999.

CARDARELLI, M.; PIZZINELLI, V. In vitro culture of *Aloe arborescens* shoots using light-emitting diodes. *Acta Horticulturae*, n. 155, p. 409–414, mar. 2017.

CASTELLANOS-HERNÁNDEZ, O. A. et al. In vitro clonal propagation and regeneration of the commercially important plant Mexican oregano (*Lippia graveolens*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v. 49, n. 5, p. 620–625, jun. 2013.

CHANDRA, S. et al. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology Letters*, v. 32, n. 9, p. 1199–1205, maio 2010.

COSTA, F. H. DA S. et al. Efeito de agentes geleificantes alternativos no meio de cultura no cultivo in vitro de abacaxizeiro e bananeira. *Ciencia e Agrotecnologia*, v. 31, n. 1, p. 41–46, 2007.

COSTA, D. A. DA. Aspectos fisiológicos da cana-de-açúcar sob o cultivo in vitro em diferentes microambientes. [s.l.] Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2012.

CRUZ, E. M. D. O. et al. Water deficit and seasonality study on essential oil constituents of *Lippia gracilis* Schauer germplasm. *Scientific World Journal*, v. 2014, p. 9, 2014.

DARKO, E. et al. Photosynthesis under artificial light: the shift in primary and secondary metabolism. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, mar. 2014.

DAUD, N.; FAIZAL, A.; GEELEN, D. Adventitious rooting of *Jatropha curcas* L. is stimulated by phloroglucinol and by red LED light. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, v. 49, n. 2, p. 183–190, 2013.

DECCETTI, S. F. C. et al. Effect of the culture environment on stomatal features, epidermal cells and water loss of micropropagated *Annona glabra* L. plants. *Scientia Horticulturae*, v. 117, n. 4, p. 341–344, 2008.

ENDO, M.; ARAKI, T.; NAGATANI, A. Tissue-specific regulation of flowering by photoreceptors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 73, n. 4, p. 829–839, nov. 2015.

FERRAZ, R. P. C. Potencial anticâncer do óleo essencial das folhas de *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). [s.l.] Sistemas de bibliotecas da Universidade Federal de Sergipe, 2013.

FREITAS, E. DE O. Embriogênese somática e análises morfoanatômicas e por citometria de fluxo em açazeiro (*Eurterpe oleracea* Mart.). [s.l.] Universidade de Brasília, 2014.

FUJIWARA, K. Basics of LEDs for Plant Cultivation. In: (LED) Lighting for Urban Agriculture. [s.l.] Springer Singapore, 2016. p. 377–393.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A; KLERK, G.-J. DE. Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008. v. 1

GIRARDI, C. .; PESCADOR, R. Acclimation of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its relation to endogenous carbohydrates. Brazilian Journal of Medicinal Plants, v. 12, n. 1, p. 62–72, 2010.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. Eclética Química, v. 36, n. 1, p. 64–77, 2011a.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* schauer. Ecletica Química, v. 36, n. 1, p. 64–77, 2011b.

HAZARIKA, B. N. Acclimatization of tissue-cultured plants. Current Science, v. 85, n. 12, p. 1704–1712, 2003.

HAZARIKA, B. N.; BORA, A. Hyperhydricity - A bottleneck to micropropagation of plants. Acta Horticulturae, n. 865, p. 95–101, jun. 2010.

HOBOHM, J. et al. Recycling oriented comparison of mercury distribution in new and spent fluorescent lamps and their potential risk. Chemosphere, v. 169, p. 618–626, fev. 2017.

IBARAKI, Y. Lighting Efficiency in Plant Production Under Artificial Lighting and Plant Growth Modeling for Evaluating the Lighting Efficiency (LED) Lighting for Urban Agriculture. SingaporeSpringer Singapore 2016.

JEONG, B. R.; SIVANESAN, I. Direct adventitious shoot regeneration, in vitro flowering, fruiting, secondary metabolite content and antioxidant activity of *Scrophularia takesimensis* Nakai. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 123, n. 3, p. 607–618, 2015.

KEVERS, C. et al. Hyperhydricity of micropropagated shoots: A typically stress-induced change of physiological state. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 77, n. 2, p. 181–191, 2004.

KLERK, G. J. M.; DRIES, N. VAN DEN; KRENS, F. A. Hyperhydricity: Underlying mechanisms. *Acta Horticulturae*, v. 1155, p. 269–275, 2017.

KOZAI, T. Photoautotrophic micropropagation—environmental control for promoting photosynthesis. *Prop Ornam Plants*, v. 10, p. 188–204, 2010.

KUBOTA, C.; KOZAI, T. Growth and Net Photosynthetic Rate of *Solanum tuberosum* in Vitro under Forced and Natural Ventilation. *HortScience*, v. 27, n. 12, p. 1312–1314, 1992.

KYOUNG-RAN, Y.; SEUNG-YEOB, L. Effects of Light-emitting Diodes on In Vitro Growth of Virus-free Sweet Potato Plantlets. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*, v. 35, n. 4, 2017.

LAI, C.-C. et al. Hyperhydricity in shoot cultures of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels. *Journal of plant physiology*, v. 162, n. 3, p. 355–361, 2005.

LAZZARINI, L. E. S. et al. Uso de diodos emissores de luz (LED) na fisiologia de plantas cultivadas. *Scientia Agraria Paranaensis*, v. 16, n. 1983–1471, p. 137–144, 2017.

LEFSRUD, M. G.; KOPSELL, D. A.; SAMS, C. E. Irradiance from distinct wavelength light-emitting diodes affect secondary metabolites in kale. *HortScience*, v. 43, n. 7, p. 2243–2244, 2008.

LEMOES, T. L. G. et al. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. *Phytotherapy Research*, v. 4, n. 2, p. 82–84, 1990.

LIU, M. et al. Evaluation of leaf morphology, structure and biochemical substance of balloon flower (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) plantlets in vitro under different light spectra. *Scientia Horticulturae*, v. 174, n. 1, p. 112–118, 2014.

LIU, M. et al. Effects of multiple factors on hyperhydricity of *Allium sativum* L. *Scientia Horticulturae*, v. 217, p. 285–296, 2017.

LOYOLA-VARGAS, V. M.; VÁZQUEZ-FLOTA, F. An Introduction to Plant Cell Culture. In: *Plant Cell Culture Protocols*. Second Edition. Totowa, New York: [s.n.], v. 318p. 3–8.

LUZ, J. M. Q. et al. Estabelecimento in vitro e aclimatização de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 16, n. 2 suppl 1, p. 444–449, 2014.

MANIVANNAN, A. et al. Blue LED light enhances growth, phytochemical contents, and

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

MARINHO, M. J. M. et al. Estabelecimento de protocolo para micropropagação de *Lippia gracilis* Schauer. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 13, n. 2, p. 246–252, 2011.

MATOS, F. J. DE A. et al. Medicinal plants of northeast brazil containing thymol and carvacrol -- *Lippia sidoides* Cham. and *Lippia gracilis* H.B.K. (Verbenaceae). Journal of Essential Oil Research, v. 11, n. 6, p. 666–668, 1999.

MENGIN, V. et al. 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 & Environment, v. 40, n. 11, p. 2608–2627, ago. 2017.

MIKAEVA, A. S.; MIKAEVA, S. A.; GORBUNOV, A. A. Improving the quality and sustainability of fluorescent lamps. Spravochnik. Inzhenernyi zhurnal, p. 53–56, nov. 2017.

MOHAMED, M. A.-H.; ALSADON, A. A. Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. Scientia Horticulturae, v. 123, n. 3, p. 295–300, jan. 2010.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. Annual review of plant physiology, v. 25, n. 1, p. 135–166, 1974.

NHUT, D. T. et al. Responses of strawberry plantlets cultured in vitro under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 73, n. 1, p. 43–52, 2003.

NHUT, D. T. et al. Light-emitting diodes and their potential in callus growth, plantlet development and saponin accumulation during somatic embryogenesis of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. Biotechnology and Biotechnological Equipment, v. 29, n. 2, p. 299–308, 2015.

O'LEARY, N. et al. Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbenaceae) usgin the phylogenetic species concept. Botanical Journal of the Linnean Society, v. 170, n. 1847, p. 197–219, 2012.

OLIVEIRA, A. C. L. et al. Produção de mudas de dois genótipos de alecrim-de tabuleiro (*Lippia gracilis* Schauer) em função de fertilizante mineral, calcário, substratos e recipientes. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 13, n. 1, p. 35–42, 2011.

OLIVEIRA, R. P.; BASTOS, C. R. Diodos Emissores de Luz (LEDs) na micropropagação de amoreira-preta cv . Tupy. n. 55, p. 14–19, 2013.

PAPAFOTIOU, M. et al. In vitro propagation of *Lippia citriodora*. Acta Horticulturae, n. 1155, p. 327–330, mar. 2017.

PASCUAL, M. E. et al. Lippia: Traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. Journal of Ethnopharmacology, v. 76, n. 3, p. 201–214, 2001.

PEIXOTO, P. H. P. et al. In vitro propagation of endangered *Lippia filifolia* Mart. and Schauer ex Schauer. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, v. 42, n. 6, p. 558–561, nov. 2006.

PESSOA, O. D. L. et al. Antibacterial activity of the essential oil from *Lippia aff. gracillis*. Fitoterapia, v. 76, n. 7–8, p. 712–714, 2005.

PONCETTA, P. et al. In vitro propagation of red raspberry under light-emitting diodes (LEDs). Acta Horticulturae, n. 1155, p. 369–374, mar. 2017.

RAGAGNIN, R. C. G. et al. Effect of salt stress on the growth of *Lippia gracilis* Schauer and on the quality of its essential oil. Acta Botanica Brasilica, v. 28, n. 3, p. 346–351, 2014.

ROCHA, P. S. G. DA et al. Diodos emissores de luz e concentrações de BAP na multiplicação in vitro de morangueiro. Ciência Rural, v. 40, n. 9, p. 1922–1928, 2010.

SAHER, S. et al. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: The role of oxidative stress. Physiologia Plantarum, v. 120, n. 1, p. 152–161, 2004.

SANTOS, I. G. DE A. et al. Amebicidal activity of the essential oils of *Lippia* spp. (Verbenaceae) against *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. Parasitology Research, v. 115, n. 2, p. 535–540, 2015.

SANTOS, C. P. DOS et al. Harvest time and geographical origin affect the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. Industrial Crops and Products, v. 79, p. 205–210, 2016.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. et al. Tissue culture storage of Brazilian medicinal plants germplasm. Acta Horticulturae, v. 860, n. Isbmap 2009, p. 211–214, 2010.

SHARAKSHANE, A. White LED Lighting for Plants. LED Lighting for Urban Agriculture, nov. 2016.

SHARMA., H. Role of growth regulators in micropropagation of woody plants - a review. *International Journal of Advanced Research*, v. 5, n. 2, p. 2378–2385, fev. 2017.

SHIN, K. S. et al. The effect of light quality on the growth and development of in vitro cultured *Doritaenopsis* plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 30, n. 3, p. 339–343, 2008.

SHIN, K. S.; PARK, S. Y.; PAEK, K. Y. Physiological and biochemical changes during acclimatization in a *Doritaenopsis* hybrid cultivated in different microenvironments in vitro. *Environmental and Experimental Botany*, v. 100, p. 26–33, 2014.

SOARES, B. V; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu Potencial Bioativo e Importância na Medicina Veterinária e Aquicultura. *Biota Amazônia*, v. 3, n. 1, p. 109–123, jun. 2013.

SOUZA, J. R. P. DE et al. Desenvolvimento da espinheira-santa sob diferentes intensidades luminosas e níveis de poda. *Horticultura brasileira*, v. 26, n. 1, p. 40–44, 2008.

STEFANO, M.; ROSARIO, M. Effects of Light Quality on Micropropagation of Woody Species. In: JAIN, S. M.; ISHII, K. (Eds.). . *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2003. p. 3–35.

TAIZ, L. et al. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. [s.l.] Artmed Editora, 2017.

TREVISAN, M. T. S. et al. Composition of essential oils and ethanol extracts of the leaves of *Lippia* species: Identification, quantitation and antioxidant capacity. *Records of Natural Products*, v. 10, n. 4, p. 485–496, 2016.

VASCONCELOS, A. G. V. DE et al. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. *Ciência Rural*, v. 42, n. 5, p. 837–844, 2012.

VERAS, H. N. H. et al. Enhancement of aminoglycosides and β -lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the Thymol. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 10, p. S2790–S2795, 2013.

VICTÓRIO, C. P. et al. Qualidade de Luz e Produção de Pigmentos Fotossintéticos em Plantas In Vitro de *Phyllanthus tenellus* Roxb. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 5, p. 213–215, 2007.

WU, H.-C.; KUO, M.-L.; CHEN, C.-M. Promotion of Vegetative Growth in Force-ventilated *Protea cynaroides* L. Explants Cultured in Modified Temporary Immersion Culture Vessels. *HortScience*, v. 53, n. 2, p. 231–235, Fev. 2018.

WU, M. C. et al. A novel approach of LED light radiation improves the antioxidant activity of pea seedlings. *Food Chemistry*, v. 101, n. 4, p. 1753–1758, 2007.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell Tissue Organ culture*, p. 105:149-158, 2011.

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

ZOBAYED, S. M. A. et al. Water Control and Survival of *Ipomoea batatas* Grown Photoautotrophically under Forced Ventilation and Photomixotrophically under Natural Ventilation. *Annals of botany*, v. 86, n. 3, p. 603-61-, 2000.

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

CAPÍTULO II

Rustificação *in vitro* de *Lippia grata* Schauer:
Iluminação de lâmpadas LED x ventilação natural

1 **Rustificação *in vitro* de *Lippia grata* Schauer:**
2 **Iluminação de lâmpadas LED x Ventilação natural.**

3 ZÁRATE-SALAZAR, JHONATAN RAFAEL¹; SOUZA, LINDOMAR MARIA¹; MORAIS,
4 MARCIANA BIZERRA DE²; GOUVEIA-NETO, ARTUR³; WILLADINO, LILIA⁴;
5 ULISSES, CLÁUDIA^{5,6}

6

7

8

9

10

11

12

13

14

- 15 1. Programa de Pós-graduação em Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco
16 (UFRPE), Recife, PE 52171-900, Brasil.
- 17 2. Programa de Pós-graduação em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Rio Grande
18 do Norte, Mossoró, RN 59.610-210, Brasil.
- 19 3. Professor Titular Livre do Instituto de Física, Universidade Federal de Alagoas, Maceió,
20 AL 57072-900, Brasil.
- 21 4. Professora Senior do Departamento de Tecnologia Rural, Universidade Federal Rural de
22 Pernambuco (UFRPE), Recife, PE 52171-900, Brasil.
- 23 5. Professora do Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco
24 (UFRPE), Recife, PE 52171-900, Brasil.
- 25 6. Autor correspondente: claulisses@gmail.com.

26

**Rustificação *in vitro* de *Lippia grata* Schauer:
Iluminação de lâmpadas LED x Ventilação natural.**

Resumo

O presente trabalho objetivou avaliar com um enfoque morfofisiológico e bioquímico plantas de *Lippia grata* Schauer cultivadas *in vitro* sob o uso de lâmpadas LED's associadas à ventilação natural dos frascos de cultivo. Segmentos nodais abaixo da gema apical com 1 cm de comprimento de plantas estabelecidas de *L. grata* foram inoculados em frascos contendo meio nutritivo MS suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, 2,5 g L⁻¹ de phytigel e ajustado a pH 5,7. Feita a inoculação, com o intuito de controlar a ventilação natural dos frascos, utilizou-se dois tipos de vedação, parcial (com ventilação) e total (sem ventilação), os quais foram distribuídos aleatoriamente em quatro sistemas de iluminação: LED Vermelha e Azul (5:1); LED Vermelha e Azul (1:1); LED Branca; e Lâmpadas Fluorescente com intensidade luminosa de 60 μmol m⁻² s⁻¹. Os explantes foram mantidos em condições de sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, com 80±5% de umidade relativa e temperatura de 25±2°C, durante 45 dias, sob um delineamento inteiramente casualizado com arranjo fatorial 4x2 (n=45). Os parâmetros biométricos, bioquímicos e anatômicos foram analisados no 45º dia. A ventilação natural foi determinante na redução do número de folhas hiperídricas em um 62%, promoveu o aumento dos teores de pigmentos cloroplásticos e carboidratos solúveis totais em 46% e 115%, respectivamente, assim mesmo histologicamente evidenciou uma maior organização celular da epiderme e do parênquima cortical da nervura principal das folhas. Entre os sistemas de iluminação o LED Branco apresentou plantas com menor número de folhas hiperídricas mesmo em frascos sem ventilação com maior número de brotos e raízes. O LED Branco associado a condições de ventilação natural foi o único sistema de iluminação que promoveu expressivos aumentos nos teores de clorofila *a*; clorofila *b*; clorofila totais (*a+b*); carotenoides; carboidratos solúveis totais; e sacarose em 87%; 143%; 102%; 76%; 223% e 116%, respectivamente, comparado às condições sem ventilação. Perante isto, concluímos que existe um efeito sinérgico no uso de lâmpadas LED Brancas associadas a condições de ventilação natural dos frascos no cultivo *in vitro* de *L. grata* uma vez que contribuem na redução nos sintomas de hiperidricidade e estimulam uma maior atividade metabólica expressada através do aumento dos teores em seus parâmetros bioquímicos.

Palavras-chave: Diodos emissores de luz · Hiperidricidade · Cultura de tecidos vegetais · Mixotrofia.

59 **Introdução**

60 *Lippia grata* Schauer é uma espécie da família Verbenaceae, originária do Nordeste
61 brasileiro com ampla distribuição na Floresta Tropical Sazonal Seca (Bitu et al. 2015; Cruz et
62 al. 2014). Recentemente foi sinonimizada com outras 4 espécies; *L. gracilis* Schauer, *L.*
63 *dumetorum* Herzog, *L. laxibracteata* Herzog e *L. hickenii* no grupo B da *Lippia* Seção
64 *Goniostachium* (O’Leary et al. 2012). Trata-se de uma espécie aromática, conhecida
65 popularmente como alecrim-da-chapada ou alecrim-de-tabuleiro, que apresenta importância
66 medicinal e asséptica devido às propriedades químicas de seus óleos essenciais, constituídos
67 principalmente dos derivados fenólicos, timol e carvacrol, presentes nos tricomas das folhas
68 (Santos et al. 2016; Bitu et al. 2014).

69 As propriedades dos óleos essenciais apresentam comprovada atividade antifúngica e
70 antimicrobiana no controle de contaminantes biológicos (Albuquerque et al. 2006; Pessoa et
71 al. 2005). Ademais, apresenta reconhecida atividade farmacológica no tratamento de doenças
72 dermatológicas, parasitárias e desordens respiratórias (Trevisan et al. 2016; Gomes, Nogueira,
73 e Moraes 2011; Matos et al. 1999). Nesse sentido, na busca pelo aproveitamento eficiente dos
74 óleos essenciais, com reduzido impacto das ações antropogênicas, se faz conveniente a
75 aplicação de técnicas biotecnológicas como o cultivo *in vitro* de tecidos vegetais que
76 promovam a preservação e propagação de plantas de interesse econômico e ecológico, como
77 *L. grata*, com alta fidelidade genética, conforme tem sido descrito para outras espécies
78 (Ferreira et al. 2016; Maluta et al. 2013; George, Hall, e Klerk 2008).

79 Entre as técnicas que agrupa o cultivo de tecidos *in vitro*, destaca-se a micropropagação,
80 uma técnica que permite obter em curtos períodos e em espaços físicos reduzidos, grandes
81 quantidades de plantas (Sharma. 2017; Xiao, Niu, e Kozai 2011). Suas aplicações são versáteis
82 e de grande utilidade em estudos botânicos e agrônômicos (Ferreira et al. 2017; Saini et al.
83 2016), inclusive em estudos celulares e moleculares de plantas de importância econômica e de
84 uso popular (Ferreira et al. 2017; Alvarenga et al. 2015; Paek, Murthy, e Zhong 2014; Liu et
85 al. 2014). No entanto, o desenvolvimento das plantas nessas condições artificiais, submetidas
86 a microambientes com altos percentuais de umidade, baixa irradiância luminosa e reduzida
87 taxa de trocas gasosas, muitas vezes favorece a incidência de algumas anormalidades
88 morfofisiológicas, como a hiperidricidade (Alvarez et al. 2012; Hazarika e Bora 2010), um
89 distúrbio morfofisiológico decorrente do elevado teor de água no interior das células e tecidos
90 associada à alta umidade relativa e a reduzida troca gasosa (Hazarika e Bora 2010).

91 Neste contexto, o controle das condições do ambiente *in vitro* se faz necessário a fim
92 de evitar a ocorrência de anormalidades e o comprometimento da produção de mudas. No
93 controle das condições internas dos recipientes de cultivo, devem ser consideradas a escolha
94 do tipo de recipiente, os mecanismos de ventilação associados aos tipos de fechamento ou
95 vedação, a regulação dos compostos que constituem o meio nutritivo (Hazarika e Bora 2010;
96 Debergh 2003) bem como a incorporação de compostos químicos que favoreçam a perda de
97 água nas células (Gao et al. 2017). No controle das condições externas, o controle da
98 iluminação associada à regulação da sua intensidade (fluxo de fótons) e qualidade
99 (comprimentos de onda) também contribui para a formação de tecidos vegetais mais
100 organizados e conseqüentemente mais funcionais (Darko et al. 2014; Liu et al. 2014), devido a
101 sua participação fundamental dos processos fotomorfogênicos (Liu et al. 2014; Yeh e Chung
102 2009).

103 O adequado controle da iluminação em condições *in vitro* regula o crescimento, no que
104 diz respeito à diferenciação das células do mesófilo, desenvolvimento dos feixes vasculares,
105 eficiência no mecanismo de abertura e fechamento dos estômatos e biossíntese de metabólitos
106 secundários (Ma et al. 2010; Ouyang et al. 2003). Nesse sentido, o uso de luzes LED's (diodos
107 emissores de luz) em comparação às lâmpadas fluorescentes convencionais, são sistemas
108 eficientes (Sharakshane 2016) uma vez que proporcionam maior controle da quantidade e
109 qualidade de luz com uma maior eficiência energética (superior ao 50%) e estar livre de
110 substâncias tóxicas que contaminam o meio ambiente (Mikaeva e Gorbunov 2017; Yeh e
111 Chung 2009).

112 Portanto, o uso de lâmpadas LED's associado à ventilação natural dos frascos de cultivo
113 poderiam contribuir à rusticificação de plantas em condições *in vitro*, uma vez que ambos os
114 fatores podem favorecer o desenvolvimento e crescimento de plantas *in vitro*, permitindo
115 aumentar as chances de sobrevivência durante a aclimatização (Sharakshane 2016; Chandra et
116 al. 2010). Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da iluminação
117 LED, associado à ventilação natural dos frascos durante o crescimento de plantas de *Lippia*
118 *grata* Schauer cultivadas *in vitro*.

119

120

121

122 **Materiais e Métodos**

123 *Local experimental*

124 O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais
125 (LCTV) localizado na Área de Química Agrícola do Departamento de Química, da
126 Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil.

127 *Inoculação dos explantes*

128 Segmentos nodais de 1 cm de comprimento abaixo da gema apical foram inoculados
129 em frascos contendo 10 mL de meio nutritivo MS (Murashige e Skoog 1962) com pH ajustado
130 a 5,7, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 2,5 g L⁻¹ phytigel como agente gelificante.
131 Ditos frascos foram fechados com dois tipos de vedação e distribuídos em quatro sistemas de
132 iluminação durante 45 dias em sala de crescimento com 80±5% de umidade relativa,
133 temperatura de 25±2°C e fotoperíodo de 16 horas.

134 *Ventilação dos frascos*

135 A ventilação natural dos frascos foi controlada por meio de dois tipos de vedação.
136 Vedação parcial (com ventilação): as aberturas dos frascos foram cobertas com papel filtro
137 UNIFIL® C40 e imediatamente com papel alumínio com um furo central de 0,5 cm de
138 diâmetro; Vedação total (sem ventilação): as aberturas dos frascos apenas foram cobertas com
139 papel alumínio, mas sem furo central.

140 *Sistemas de Iluminação*

141 O controle da iluminação foi realizado por quatro sistemas de iluminação constituídos
142 por LVA 5:1 = LED Vermelho e Azul (5:1); LVA 1:1 = LED Vermelho e Azul (1:1); LB =
143 LED Branco; e FL= Lâmpadas Fluorescentes, o quais foram calibrados a 60 μmol m⁻² s⁻¹ de
144 intensidade luminosa. Ademais, de cada sistema se registrou o espectro de luz típico com
145 espectrógrafo (Model USB2000, Ocean Optics, USA) (Figura 1:A-D).

146 *Delineamento experimental*

147 O experimento foi conduzido sob um delineamento inteiramente casualizado (DIC)
148 com arranjo fatorial 4x2, com 3 repetições (15 unidades experimentais por repetição). A
149 unidade experimental foi constituída por um frasco de cultivo contendo um segmento nodal
150 inoculado em 10 mL do meio nutritivo supracitado.

151 *Análises biométricas*

152 Foram contabilizados o número de brotos, de raízes, de folhas totais e hiperídricas.
153 Ademais, mensurou-se a massa fresca (g) e a altura de planta (cm), com balança analítica
154 (Model AUY220, Shimadzu, Japan) e o Software de Imagem ImageJ (Schneider, Rasband, e
155 Eliceiri 2012), respectivamente.

156 *Quantificação de carboidratos solúveis totais e sacarose*

157 O teor de carboidratos solúveis totais e sacarose foram determinados a partir de um
158 único extrato. Foi utilizado 0,1 g de folhas frescas que foram maceradas em 12,6 ml de etanol
159 a 80%. O extrato foi filtrado em tela de náilon para tubos de ensaio e em seguida armazenado
160 em refrigerador (10°C) até o momento das análises. A mensuração dos teores de carboidratos
161 solúveis totais foi realizada de acordo metodologia proposta por Yemm e Willis (1954), com
162 adaptações de Neto e Barreto (2011). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 620
163 nm e o teor de carboidratos solúveis totais foi expresso em mg g^{-1} MF. O teor de sacarose foi
164 mensurado conforme proposto por Handel (1968). As leituras foram realizadas em
165 espectrofotômetro a 620 nm e o teor de sacarose foi expresso em mg g^{-1} MF.

166 *Quantificação de proteínas solúveis totais*

167 Amostras de folhas (0,1 g) foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 100
168 mM (pH 7,5) contendo 1% de polivinilpirrolidona (PVP) e 1 mM de ácido
169 etilenodiaminotetracético (EDTA). Após centrifugação a $10.000 \times g$ e 4 °C durante 15 min, o
170 sobrenadante obtido foi utilizado para a quantificação espectrofotométrica da proteína solúvel
171 total, seguindo o método de Bradford (1976), com albumina de soro bovino (BSA) como
172 padrão, e a quantificação foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis a 595 nm.

173 *Análise do teor de pigmentos cloroplastídicos*

174 As análises de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides foram realizada macerando 0,05 g
175 de folhas frescas em acetona ao 80%. Após a centrifugação ($10.000 \times g$), o sobrenadante foi
176 utilizado para a quantificação dos pigmentos, por meio de um espectrofotômetro UV-Vis a 663
177 e 647 nm para as clorofilas e 470 nm para os carotenoides. A concentração de pigmentos foi
178 calculada de acordo com as equações de Lichtenthaler e Wellburn (1983).

179

180 *Avaliação qualitativa*

181 Uma vez que não foi possível mensurar a área foliar, qualificou-se a expansão da lâmina
182 foliar em função do tamanho do seu comprimento, as quais foram classificadas com notas: 1
183 quando o comprimento foi menor igual a um centímetro (≤ 1); 2 quando o comprimento estava
184 entre um e três centímetros ($< 1:3 >$); e 3 quando o comprimento foi maior igual a três
185 centímetros (≥ 3) (Figura 2).

186 *Análise histológica*

187 Amostras de folhas inteiras foram coletadas e fixadas em FAA 50 (formaldeído 50%:
188 ácido acético glacial 50%: etanol 50%), na proporção de 1:1:1, desidratadas em série etanólica
189 ascendente (70-100%) e infiltradas em parafina, de acordo com Johansen (1940). O material
190 foi seccionado em micrótomo rotativo para a obtenção de cortes e corados com azul de Alcian
191 e safranina (Kraus e Arduin 1997). As lâminas foram analisadas em microscópio Olympus
192 CH30 e registradas digitalmente com câmera fotográfica.

193 *Análise estatística*

194 As variáveis biométricas e bioquímicas foram analisadas estatisticamente com o
195 software R (R CORE TEAM, 2017). A análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey
196 ($P \leq 0,05$) com pacote *agricolae* (Mendiburu 2017), as análises multivariadas dos componentes
197 principais com os pacotes *FactorMineR* (Lê, Josse, e Husson 2008) e *factoextra* (Kassambara
198 e Mundt 2017), respectivamente. A correlação de Pearson, com o pacote *corrplot* (Wei e Simko
199 2017) e os histogramas com o software estatístico GraphPad Prism 6[®] (2012). As médias da
200 variável qualitativa, expansão da lâmina foliar, foi avaliada pelo teste não-paramétrico de
201 Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$).

202 **Resultados**

203 *Parâmetros de crescimento*

204 Plantas desenvolvidas em condições *in vitro* sem ventilação exibiram maiores sintomas
205 de hiperidricidade uma vez que apresentaram maior proporção de folhas hiperídricas pequenas
206 (< 1 cm de comprimento) com aspecto translúcido e enrugado acompanhado de uma alta
207 incidência de microbrotos (Figura 3B), como o evidenciou a sua alta correlação positiva entre
208 elas ($r=0,86$; Tabela 2). No entanto, quando submetidas a ventilação natural (Tabela 1), em

209 média, estes sintomas se reduziram em 62% em todos os sistemas de iluminação, apresentando
210 plantas com folhas mais expandidas e bem mais desenvolvidas (Figura 3A). Ademais,
211 evidenciamos que a ventilação natural das plantas, independente do sistema de iluminação,
212 reduziu em média o 27% da massa fresca e um aumento da expansão da lâmina foliar delas.

213 Com relação aos sistemas de iluminação, o LED Branco mesmo sob condições *in vitro*
214 sem ventilação apresentou plantas com menor número de folhas hiperídricas (14,33) o qual
215 significaria maior número de folhas normais, nesse sentido também exibiu maior número de
216 brotos (3,92), raízes (4,50), massa fresca (0,33 g) e altura de planta (2,17 cm), situação que não
217 foi observada nos outros sistemas de iluminação (Tabela 1). A correlação de Pearson entre
218 parâmetros biométricos permitiu confirmar os efeitos dos sintomas de hiperidricidade nas
219 plantas em condições *in vitro* sem ventilação uma vez que evidenciamos uma correlação forte
220 e positiva entre o número de folha hiperídricas com o número de folhas totais ($r=0,95$) e o
221 número de brotos ($r=0,85$) (Tabela 2).

222 *Teores de carboidratos e proteínas solúveis totais*

223 Os teores de carboidratos solúveis totais e sacarose foram influenciados positivamente
224 pela ventilação natural *in vitro* em todos os sistemas de iluminação (Figura 4:A e B). No
225 entanto, o nível proteico não evidenciou alterações significativas acentuadas (Figura 4C).
226 Nesse sentido, em condições de ventilação natural os teores de carboidratos solúveis totais
227 encontradas nas folhas foram de 626,51 mg g⁻¹ MF no LED Branco; 458,76 mg g⁻¹ MF no LED
228 Vermelho e Azul (5:1); 377,20 mg g⁻¹ MF no LED Vermelho e Azul (1:1); e 351,26 mg g⁻¹ MF
229 nas Lâmpadas Fluorescentes, que quando comparadas ao obtido nas folhas desenvolvidas em
230 condições *in vitro* sem ventilação, representando um aumento do 223%; 60%; 61%; e 80%,
231 respectivamente (Figura 4A).

232 Seguindo a mesma lógica, os teores de sacarose produzidos nas folhas sob condições
233 de ventilação natural *in vitro* igualmente apresentaram uma tendência aumentativa, porém com
234 um ordenamento diferente entre os sistemas de iluminação, sendo desta vez 247,96 mg g⁻¹ MF
235 no LED Vermelho e Azul (5:1); 198,77 nas Lâmpadas Fluorescentes; 162,70 mg g⁻¹ MF no
236 LED Branco; e 161,54 no LED Vermelho e Azul (1:1) representando, neste caso, um aumento
237 do 171%; 187%; 116% e 20%, respectivamente (Figura 4B). Com respeito às correlações de
238 Pearson (Tabela 2), os teores de carboidratos solúveis totais reportaram correlações negativas
239 com o número de folhas totais ($r= -0,86$); número de folhas hiperídricas ($r= -0,75$); número de
240 brotos ($r= -0,70$); e número de raízes ($r= -0,64$) e correlações positivas com os teores da

241 clorofila *a* ($r= 0,72$); clorofila *b* ($r= 0,68$); clorofilas totais ($a+b$) ($r= 0,86$); e carotenoides ($r =$
242 $0,67$).

243 *Teores dos pigmentos cloroplastídicos*

244 As condições de ventilação natural *in vitro* influenciaram significativamente o aumento
245 dos pigmentos cloroplastídicos nas plantas em todos os sistemas de iluminação (Figura 5:A-
246 D), destacando-se principalmente o LED Branco uma vez que foram encontrados altos teores
247 de clorofila *a* ($1,24 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$); clorofila *b* ($0,56 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$); clorofilas totais ($a+b$) ($1,79 \text{ mg}$
248 $\text{g}^{-1} \text{ MF}$) e carotenoides ($412,94 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$) que comparado aos teores encontrado nas folhas
249 em condições *in vitro* sem ventilação, significou um aumento de aproximadamente 87%;
250 143%; 102% e 76%, respectivamente (Figura 5:A-D). Por outro lado, o efeito contrário foi
251 observado nas lâmpadas fluorescentes, já que em condições *in vitro* com ventilação natural
252 comparado às condições sem ventilação, as plantas apresentaram uma redução do 44%; 16% e
253 30% dos teores de clorofila *a* ($0,42 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$); clorofilas totais ($a+b$) ($0,96 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$) e
254 carotenoides ($220,36 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$), respectivamente (Figura 5: A;C;D). No entanto, apenas
255 apresentou um aumento do 34% em clorofila *b* ($0,55 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$) (Figura 5B). Por último,
256 apesar que a razão clorofila *a* e *b* (Chl *a/b*) não tenha seguido uma tendência marcante entre a
257 interação dos dois fatores em estudo (Figura 5E), calculando a média da razão Chl *a/b* das
258 duas condições de ventilação em cada sistema de iluminação, o ordenamento de maior a menor
259 foi a seguinte: LED Branco com 2,59; LED Vermelho e Azul (1:1) com 2,09; LED Vermelho
260 e Azul (5:1) com 2,03 e Lâmpadas Fluorescentes com 1,30.

261 *Análises histológicas*

262 Visto que não foi possível determinar diferenças histológicas qualitativas entre os
263 sistemas de iluminação para cada condição de ventilação *in vitro* (com e sem ventilação). De
264 modo geral, focamos nas diferenças histológicas qualitativas da nervura principal das folhas
265 desenvolvidas em condições de ventilação natural e aquelas desenvolvidas sem ventilação *in*
266 *vitro*. Nesse sentido, identificamos que as seções transversais da nervura principal das folhas
267 de *L. gracilis* (Figura 6:A-F) apresentaram um formato convexo/côncavo, sistema vascular em
268 arco aberto com feixes unilaterais e epiderme uniestratificada com células poligonais de
269 paredes retas ou onduladas na fase adaxial e abaxial. Observamos também a presença de
270 cutícula delgada, bem como de tricomas tectores e glandulares distribuídos aleatoriamente em
271 ambas epidermes foliares.

272 Ademais, subjacente à epiderme foram observadas células do parênquima cortical
273 envolvendo o sistema vascular. Sob estas observações foram constatadas diferenças
274 qualitativas na organização celular dos tecidos foliares de plantas formadas em tubos com
275 ventilação natural, apresentando uniformidade na morfologia das células dos tecidos
276 epidérmicos, parenquimáticos e vasculares (Figura 6A-C), enquanto que as folhas provenientes
277 de plantas cultivadas em tubos sem ventilação, as folhas apresentaram sintomas de
278 hiperidricidade, como enrolamento do limbo foliar e aspecto vítreo (Figura 3B),
279 comportamento esse compatível com o que foi observado na organização dos tecidos foliares
280 do parênquima cortical (Figura 6:D-F) com células apresentando tamanhos irregulares,
281 paredes celulares onduladas e a camada cuticular aparentemente mais delgada. Os feixes
282 vasculares se mostraram irregulares, inclusive em algumas amostras apresentaram o floema
283 colapsado (Figura 6E) demonstrando a influência direta da ventilação, que foi determinante
284 para o crescimento da espécie em condições *in vitro*, conforme os parâmetros fisiológicos e
285 bioquímicos atrelados ao desenvolvimento da planta (Figuras 4 e 5).

286 *Análise multivariada*

287 A análise de componentes principais (ACP) (Figura 7) revelou que aproximadamente
288 67,8% da variação encontrada no presente estudo pode ser explicada pelos parâmetros de
289 crescimento e os parâmetros bioquímicos. De forma geral, observamos que a primeira
290 dimensão agrupou aos tratamentos em função das condições de ventilação, enquanto a segunda
291 dimensão os discriminou em função dos sistemas de iluminação LED e Fluorescente. Nesse
292 sentido, os sistemas de iluminação LED Branco, LED Vermelho e Azul (1:1) e LED Vermelho
293 e Azul (5:1) associados a condições de ventilação natural foram agrupados no primeiro
294 componente pelos teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofilas totais (*a+b*), carotenoides e
295 carboidratos solúveis totais, as quais apresentaram um maior aporte à variância e uma
296 correlação negativa perante o aumento da incidência de folhas hiperídricas.

297 As Lâmpadas Fluorescentes associadas a condições sem ventilação apresentaram uma
298 influência diretamente proporcional ao número de folhas hiperídricas e os teores de pigmentos
299 fotossintéticos, porém, quando associado a condições de ventilação natural esta influência foi
300 inversamente proporcional. Segundo o que se observou no ACP, a interação do LED Branco
301 associada a condições de ventilação natural promoveram uma maior influência no aumento nos
302 teores dos pigmentos fotossintéticos como clorofila totais (*a+b*), carboidratos e uma evidente
303 redução de folhas hiperídricas.

304 **Discussão**

305 O ambiente de cultivo *in vitro* convencional é caracterizado pela elevada umidade
306 relativa do ar, baixos níveis de irradiância, concentrações de gases e baixas concentrações de
307 CO₂ as quais promovem anormalidades morfofisiológicas como a hiperidricidade (Alvarez et
308 al. 2012; Hazarika e Bora 2010). Neste trabalho, a má formação do tecido e desorganização
309 celular produto da hiperidricidade nas condições convencionais *in vitro* seria consequência da
310 falta de ventilação natural (Liu et al. 2017; Saher et al. 2004). No entanto, uma vez que as
311 condições de ventilação são favoráveis as plantas experimentam um maior desenvolvimento e
312 um aspecto bem mais saudável com uma maior expansão das folhas, portanto, maior
313 quantidade de estômatos, maior difusão de CO₂ para o mesófilo foliar e, conseqüentemente,
314 maior a taxa fotossintética (Wu, Kuo, e Chen 2018; Alvarez et al. 2012), tal como foi conferido
315 nos nossos resultados.

316 O incremento marcante dos pigmentos cloroplastidiais por efeitos da ventilação natural
317 dos frascos de cultivo, sugerem um aumento na capacidade fotossintética, corroborando com
318 dados obtidos por outros autores que avaliaram eficiência da ventilação nos frascos de cultivo
319 (Alvarez et al. 2012; Iarema et al. 2012; Mohamed e Alsdon 2010; Kitaya et al. 2005). Este
320 aumento provocado pela ventilação natural foi ainda mais evidente quando associada aos
321 sistemas de iluminação LED, em que ocorreu um maior estímulo do crescimento das plantas
322 com melhor qualidade, e como consequência um melhor metabolismo expressado nos
323 marcantes aumentos dos teores de clorofilas totais ($a+b$), clorofila a , clorofila b e carotenoides,
324 semelhante ao que foi observado na micropropagação de amoreira (Rocha, Oliveira, e
325 Scivittaro 2013) e videira (Poudel, Kataoka, e Mochioka 2008), batata (Mohamed e Alsdon
326 2010). Em contrapartida, os pigmentos cloroplastidiais apresentaram uma correlação negativa
327 inferior ao 60% com o número de folhas hiperídricas (Tabela 2).

328 A razão Chl a/b é um bom indicador do efeito positivo de uma adequada iluminação
329 expressada no bom metabolismo fotossintético das plantas uma vez que esta razão se encontre
330 próxima a três (Streit et al. 2005) como foi evidenciado, neste trabalho, para o sistema de
331 iluminação LED Branco.

332 O incremento significativo na produção de carotenoides, aponta a ativação de moléculas
333 antioxidantes não enzimáticas, uma vez que os carotenoides possuem a função de preservação
334 dos fotossistemas através do mecanismo eficiente de dissipação do excesso energia em forma
335 de calor, evitando o excesso de energia luminosa e formação de moléculas instáveis, como o

336 oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o que elimina efeitos deletérios nos cloroplastos (Tian et al. 2016; Das
337 e Roychoudhury 2014). Sendo assim, os carotenoides exerceram o importante papel de
338 fotoproteção do sistema fotossintético, portanto plantas com maior atividade antioxidante por
339 efeitos das concentrações dos carotenoides poderiam apresentar maiores chances no processo
340 de aclimatização (Lin et al. 2013; Cassana et al. 2008).

341 O aumento da atividade fotossintética resulta em maior produção de fotoassimilados
342 (Kozai 2010), o que justifica a maior produção de carboidratos observados nas plantas
343 cultivadas sob ventilação natural. Os carboidratos são acumulados com a finalidade principal
344 de regulação osmótica, favorecendo a manutenção do turgor celular. Nas plantas, o açúcar
345 significa fornecimento de energia mediante o processo de oxidação biológica com função de
346 fornecer energia às células e esqueletos de carbono para a síntese de outros compostos celulares
347 (Darko et al. 2014; Girardi e Pescador 2010). Neste contexto, em condições de vedação parcial
348 esses compostos podem ter sido acumulados devido ao aumento na sua biossíntese ou pela
349 degradação de moléculas maiores, como amido (Santelia e Lawson 2016). Assim, o menor
350 número de raízes resultante deste tipo de vedação pode também ser um indicativo do
351 investimento da planta nos tecidos fotossintetizantes, em que a fotossíntese seria o principal
352 caminho para a absorção de carbono e produção de energia (Alvarez et al. 2012). A menor
353 proporção nos teores foliares de carboidratos, em condições sem ventilação, pode ser atribuída
354 à utilização destes pelas plantas, para a manutenção e o crescimento, uma vez que, a menor
355 disponibilidade e fixação de CO_2 , interfere no aparato fotoquímico (Decetti et al. 2008),
356 conforme observado, e como consequência na atividade fotossintética. Assim para suprir a alta
357 demanda por fotoassimilados, a planta torna essas reservas disponíveis para os drenos.

358 Os efeitos benéficos do uso de LEDs na micropropagação de plantas já foram relatados
359 para várias espécies, onde a qualidade do espectro de luz pode contribuir para as diferentes
360 respostas de crescimento em plantas cultivadas *in vitro*, com melhorias no crescimento,
361 desenvolvimento e na produção de compostos do metabolismo primário e secundário (Ferreira
362 et al. 2017; Manivannan et al. 2015; Sabzalian et al. 2014; Rocha, Oliveira, e Scivittaro 2013;
363 Ma et al. 2010; Lefsrud, Kopsell, e Sams 2008; Poudel, Kataoka, e Mochioka 2008). A luz,
364 neste sentido, é um sinal ambiental primordial para o desenvolvimento das plantas,
365 desempenhando um papel fundamental, direta ou indiretamente na regulação do
366 desenvolvimento e crescimento vegetal (Alvarenga et al. 2015; Nhut et al. 2015; Stefano e
367 Rosario 2003).

368 De acordo com Jao e Fang (2004) a mistura da cor vermelha (620 – 750 nm), verde (525-
369 555 nm) e azul (450 – 490 nm) permite fornecer as plantas uma fonte de luz ajustada às
370 necessidades delas, uma vez que a luz vermelha está associada ao desenvolvimento do aparato
371 fotossintético e acumulação de amido, ademais também ao comprimento das brotações e
372 alongamento das células nas espécies vegetais (Wu et al. 2007; Nhut et al. 2015). A luz azul à
373 síntese de clorofilas, desenvolvimento do cloroplasto, abertura de estômatos e fotomorfogênese
374 (Nhut et al. 2015; Manivannan et al. 2015). Agora, segundo Folta e Maruhnich (2007) indicam
375 que os sistemas sensoriais da luz verde das plantas ajusta o desenvolvimento e o crescimento
376 na orquestração com sensores vermelhos e azuis.

377 O espectro relativo do sistema de iluminação LED Branco foi o único que apresentou
378 comprimentos de onda nas regiões do vermelho, azul e verde (Figura 1). Nesse sentido, sugere-
379 se que as respostas encontradas nas plantas de *L. grata* por efeito do LED Branco associado à
380 ventilação natural, seriam favoráveis do ponto de vista biométrico e bioquímico como
381 consequência da sinergia dos três comprimentos de onda intrínsecos deste sistema de
382 iluminação uma vez que existem evidências que o uso proporcional entre estes comprimentos
383 de onda favorecem o metabolismo das plantas com respostas ao nível biométrico e bioquímico
384 (Alvarenga et al. 2015; Jeong e Sivanesan 2015; Daud, Faizal, e Geelen 2013).

385 A redução da incidência dos sintomas de hiperhidricidade sob condições de ventilação
386 natural evidenciou claramente que estas anormalidades morfofisiológicas podem ser
387 controladas no cultivo *in vitro*, sendo reduzidas ou prevenidas, conforme foi verificado por
388 Mohamed e Alsadon (2010) e Deccetti et al. (2008). O fornecimento de ventilação dos frascos
389 de cultivo permitem o enriquecimento de trocas gasosas e reduzem a umidade relativa,
390 estimulando o aumento da transpiração, a absorção de água e nutrientes pelo explante,
391 influenciando diretamente no desenvolvimento vegetativo (Kozai 2010), tal como foi
392 verificado neste trabalho.

393 Os estudos histológicos também evidenciaram o efeito negativo da vedação total uma
394 vez que a organização celular da epiderme e das células do parênquima cortical foram
395 claramente afetadas em plantas com sintomas de hiperhidricidade. Segundo, Hazarika e Bora
396 (2010); Apel e Hirt (2004); e Kevers et al. (2004) estas alterações podem afetar às estruturas
397 dos estômatos e à organização celular do mesofilo comprometendo os processos fisiológicos
398 vitais como a fotossíntese. Ademais, a ineficiência do mecanismo estomático poderia acarretar
399 a desidratação dos tecidos e levar à morte da planta na etapa da aclimatização (Liu et al. 2014;
400 Vieira et al. 2015; Palma et al. 2011; Chandra et al. 2010; Deccetti et al. 2008).

401 **Conclusões**

402 Os sistemas de iluminação LED associado às condições de ventilação natural promove
403 o aumento dos teores de pigmentos cloroplastídicos e carboidratos solúveis totais em até mais
404 do 100% e reduz em 50% a incidência de folhas com sintomas de hiperhidricidade;

405 A ventilação natural dos frascos de cultivo favorece o desenvolvimento normal das
406 células da epidermes, parênquima cortical e feixes vasculares presentes na nervura principal
407 das folhas, reduzindo consideravelmente o aparecimento de tecidos hiperídricos;

408 O sistema de iluminação LED Branco promove a menor incidência de folhas
409 hiperídricas, favorecendo o aumento de folhas normais, brotos e raízes. Foi o único sistema de
410 iluminação que esteve mais associado aos altos teores de clorofilas e carboidratos solúveis
411 totais, ademais conseguiu um equilíbrio da razão clorofilas a e b (Chl *a/b*) próximo ao observado
412 em condições naturais de boa iluminação;

413 As Lâmpadas Fluorescentes em condições sem ventilação são responsáveis da
414 incidência de plantas com sintomas de hiperhidricidade, apresentando folhas frágeis com
415 baixos teores bioquímicos, induzindo a desorganização celular da epiderme e do parênquima
416 cortical da nervura principal das folhas;

417 Existe efeito um efeito sinérgico entre os sistemas de iluminação e a ventilação natural
418 dos frascos de cultivo, promovendo o crescimento e desenvolvimento normal de plantas de *L.*
419 *grata* no cultivo *in vitro* que podem aumentar as chances de sobrevivência em fase de
420 aclimatização.

421

422 **Agradecimentos**

423 Ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela
424 concessão da bolsa de estudos, ao Laboratório de Cultivo de Tecidos Vegetais (LCTV), ao
425 Programa de Pós-graduação em Botânica (PPGB- UFRPE) e ao Luiz Palhares Neto pelo apoio
426 no percurso do experimento.

427

428

429

430

431 **Referências bibliográficas**

- 432 Albuquerque, Cynthia Cavalcanti de, Terezinha Rangel Camara, Rosa de Lima Ramos
433 Mariano, Lilia Willadino, Cristiano Marcelino Júnior, and Cláudia Ulisses. 2006.
434 “Antimicrobial Action of the Essential Oil of *Lippia gracilis* Schauer.” *Brazilian Archives*
435 *of Biology and Technology* 49 (4). FapUNIFES (SciEL): 527–35. doi:10.1590/s1516-
436 89132006000500001.
- 437 Alvarenga, Ivan Caldeira Almeida, Fernanda Ventorim Pacheco, Sâmia Torres Silva, Suzan
438 Kelly Vilela Bertolucci, and José Eduardo Brasil Pereira Pinto. 2015. “In Vitro Culture of
439 *Achillea millefolium* L.: Quality and Intensity of Light on Growth and Production of
440 Volatiles.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 122 (2): 299–308. doi:10.1007/s11240-
441 015-0766-7.
- 442 Alvarez, Carolina, Patricia Sáez, Katia Sáez, Manuel Sánchez-Olate, and Darcy Ríos. 2012.
443 “Effects of Light and Ventilation on Physiological Parameters during in Vitro
444 Acclimatization of *Gevuina avellana* Mol.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 110 (1):
445 93–101. doi:10.1007/s11240-012-0133-x.
- 446 Apel, Klaus, and Heribert Hirt. 2004. “Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress,
447 and Signal Transduction.” *Rev. Plant Biol. I* (55:373-99): 31.
448 doi:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701.
- 449 Bitu, Vanessa De Carvalho Nilo, Heberly Di Tarso Fernandes Fecundo, José Galberto Martins
450 Da Costa, Henrique Douglas Melo Coutinho, Fabíola Fernandes G. Rodrigues, Nathalia
451 Matos De Santana, Marco Antônio Botelho, and Irwin R. Alencar Menezes. 2014.
452 “Chemical Composition of the Essential Oil of *Lippia gracilis* Schauer Leaves and Its
453 Potential as Modulator of Bacterial Resistance.” *Natural Product Research*. Taylor &
454 Francis. doi:10.1080/14786419.2013.867343.
- 455 Bitu, Vanessa de Carvalho Nilo, José Galberto Martins da Costa, Fabíola Fernandes G.
456 Rogrigues, Aracélio Viana Colares, Henrique Douglas Melo Coutinho, Marco Antônio
457 Botelho, Aline da Costa Portela, Nathalia Matos de Santana, and Irwin R. Alencar
458 Menezes. 2015. “Effect of Collection Time on Composition of Essential Oil of *Lippia*
459 *gracilis* Schauer (Verbenaceae) Growing in Northeast Brazil.” *Journal of Essential Oil-*
460 *Bearing Plants* 18 (3): 647–53. doi:10.1080/0972060X.2014.935043.
- 461 Bradford, Marion M. 1976. “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram
462 Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.” *Analytical*
463 *Biochemistry* 72 (1–2): 248–54. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- 464 Cassana, Francine Ferreira, Eugenia Jacira, Bolacel Braga, Marcos Antonio Bacarin, and
465 Antelmo Ralph Falqueto. 2008. “Atividade Fotoquímica Máxima do Fotosistema II em
466 Plantas de Batata-Doce Cultivadas In Vitro e Aclimatizadas.” *Revista Brasileira de Agr*,
467 46–51. <https://goo.gl/z78uGd>.

468

- 469 Chandra, Sheela, Rajib Bandopadhyay, Vijay Kumar, and Ramesh Chandra. 2010.
470 “Acclimatization of Tissue Cultured Plantlets: From Laboratory to Land.” *Biotechnology*
471 *Letters* 32 (9). Springer Nature: 1199–1205. doi:10.1007/s10529-010-0290-0.
- 472 Cruz, Elizangela Mércia De Oliveira, Jéssika Andreza Oliveira Pinto, Saymo Santos Fontes,
473 Maria De Fátima Arrigoni-Blank, Leandro Bacci, Hugo César Ramos De Jesus, Darlison
474 De Alexandria Santos, Péricles Barreto Alves, and Arie Fitzgerald Blank. 2014. “Water
475 Deficit and Seasonality Study on Essential Oil Constituents of *Lippia gracilis* Schauer
476 Germplasm.” *Scientific World Journal* 2014: 9. doi:10.1155/2014/314626.
- 477 Darko, E, P Heydarizadeh, B Schoefs, and M R Sabzalian. 2014. “Photosynthesis under
478 Artificial Light: The Shift in Primary and Secondary Metabolism.” *Philosophical*
479 *Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, March. The Royal Society.
480 doi:10.1098/rstb.2013.0243.
- 481 Das, Kaushik, and Aryadeep Roychoudhury. 2014. “Reactive Oxygen Species (ROS) and
482 Response of Antioxidants as ROS-Scavengers during Environmental Stress in Plants.”
483 *Frontiers in Environmental Science* 2. *Frontiers*: 53. doi:10.3389/fenvs.2014.00053.
- 484 Daud, Norhayati, Ahmad Faizal, and Danny Geelen. 2013. “Adventitious Rooting of *Jatropha*
485 *curcas* L. Is Stimulated by Phloroglucinol and by Red LED Light.” *In Vitro Cellular and*
486 *Developmental Biology - Plant* 49 (2): 183–90. doi:10.1007/s11627-012-9486-4.
- 487 Debergh, Pierre C A. 2003. “Micropropagation, Hyperhydricity.” In *Encyclopedia of Cell*
488 *Technology*. American Cancer Society. doi:10.1002/0471250570.spi077.
- 489 Deccetti, Soami Fernanda Caio, Angela Maria Soares, Renato Paiva, and Evaristo Mauro de
490 Castro. 2008. “Effect of the Culture Environment on Stomatal Features, Epidermal Cells
491 and Water Loss of Micropropagated *Annona glabra* L. Plants.” *Scientia Horticulturae* 117
492 (4): 341–44. doi:10.1016/j.scienta.2008.05.020.
- 493 Ferreira, Lais Tomaz, Marina Medeiros de Araújo Silva, Carla Renata de Macêdo, and Lilia
494 Willadino. 2016. “Fonte de Luz e Concentração de Sacarose no Cultivo In Vitro da Cana-
495 de-Açúcar (RB 867515).” *Plant Cell Culture & Micropropagation* 12 (Rb 867515): 46–
496 52.
- 497 Ferreira, Lais Tomaz, Marina Medeiros de Araújo Silva, Cláudia Ulisses, Terezinha Rangel
498 Camara, and Lilia Willadino. 2017. “Using LED Lighting in Somatic Embryogenesis and
499 Micropropagation of an Elite Sugarcane Variety and Its Effect on Redox Metabolism
500 during Acclimatization.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 128 (1). Springer
501 Netherlands: 211–21. doi:10.1007/s11240-016-1101-7.
- 502 Folta, Kevin M., and Stefanie A. Maruhnich. 2007. “Green Light: A Signal to Slow down or
503 Stop.” *Journal of Experimental Botany* 58 (12): 3099–3111. doi:10.1093/jxb/erm130.
- 504 Gao, Hongyang, Pinsan Xu, Jiawei Li, Huining Ji, Lijia An, and Xiuying Xia. 2017. “AgNO₃
505 Prevents the Occurrence of Hyperhydricity in *Dianthus chinensis* L. by Enhancing Water
506 Loss and Antioxidant Capacity.” *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 53
507 (6). Springer Nature: 561–70. doi:10.1007/s11627-017-9871-0.

- 508 George, Edwin F, Michael a Hall, and Geert-Jan de Klerk. 2008. Plant Propagation by Tissue
509 Culture 3rd Edition Volume 1. Plant Propagation by Tissue Culture. Vol. 1. Dordrecht:
510 Springer Netherlands. doi:<https://doi.org/10.1007/s11240-008-9357-1>.
- 511 Girardi, C.G, and R Pescador. 2010. “Acclimation of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and
512 Its Relation to Endogenous Carbohydrates.” Brazilian Journal of Medicinal Plants 12 (1):
513 62–72. doi:10.1590/S1516-05722010000100010.
- 514 Gomes, S. V. F., P. C. L. Nogueira, and V. R. S. Moraes. 2011. “Aspectos Químicos e
515 Biológicos do Gênero *Lippia* Enfatizando *Lippia gracilis* Schauer.” Eclética Química 36
516 (1): 64–77. doi:10.1590/S0100-46702011000100005.
- 517 Hahn, Eun-joo, Toyoki Kozai, and Kee-yoeup Paek. 2000. “Blue and Red Light-Emitting
518 Diodes with or without Sucrose and Ventilation Affect In Vitro Growth of *Rehmannia*
519 *glutinosa* Plantlets.” Journal of Plant Biology 43 (4): 247–50. doi:10.1007/BF03030425.
- 520 Handel, Emile van. 1968. “Direct Microdetermination of Sucrose.” Analytical Biochemistry
521 22 (2). Elsevier BV: 280–83. doi:10.1016/0003-2697(68)90317-5.
- 522 Hayashi, M., K. Fujiwara, T. Kozai, M. Tateno, and Y. Kitaya. 1995. “Effects of Lighting
523 Cycle on Daily CO₂ Exchange and Dry Weight Increase of Potato Plantlets Cultured in
524 Vitro Photoautotrophically.” Acta Horticulturae, no. 393: 213–18.
525 doi:10.17660/ActaHortic.1995.393.25.
- 526 Hazarika, B N, and A Bora. 2010. “Hyperhydricity - A Bottleneck to Micropropagation of
527 Plants.” Acta Horticulturae, no. 865 (June). International Society for Horticultural Science
528 (ISHS): 95–101. doi:10.17660/actahortic.2010.865.11.
- 529 Iarema, Lourdes, Ana Cláudia Ferreira da Cruz, Cleber Witt Saldanha, Leonardo Lucas
530 Carnevalli Dias, Roberto Fontes Vieira, Evelyn Jardim de Oliveira, and Wagner Campos
531 Otoni. 2012. “Photoautotrophic Propagation of Brazilian Ginseng [*Pfaffia glomerata*
532 (Spreng.) Pedersen].” Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 110 (2). Springer:
533 227–38. doi:10.1007/s11240-012-0145-6.
- 534 Jao, Ruey Chi, and Wei Fang. 2004. “Effects of Frequency and Duty Ratio on the Growth of
535 Potato Plantlets In Vitro Using Light-Emitting Diodes.” HortScience 39 (2): 375–79.
- 536 Jeong, Byoung Ryong, and Iyyakkannu Sivanesan. 2015. “Direct Adventitious Shoot
537 Regeneration, In Vitro Flowering, Fruiting, Secondary Metabolite Content and
538 Antioxidant Activity of *Scrophularia takesimensis* Nakai.” Plant Cell, Tissue and Organ
539 Culture 123 (3). Springer Netherlands: 607–18. doi:10.1007/s11240-015-0864-6.
- 540 Johansen, Donald Alexander. 1940. Plant Microtechnique. McGraw-Hil. New York and
541 London.
- 542 Kassambara, Alboukadel, and Fabian Mundt. 2017. “Factoextra: Extract and Visualize the
543 Results of Multivariate Data Analyses.” <https://cran.r-project.org/package=factoextra>.
- 544

- 545 Kevers, Claire, Thierry Franck, Reto J. Strasser, Jacques Dommès, and Thomas Gaspar. 2004.
546 “Hyperhydricity of Micropropagated Shoots: A Typically Stress-Induced Change of
547 Physiological State.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77 (2): 181–91.
548 doi:10.1023/B:TICU.0000016825.18930.e4.
- 549 Kitaya, Yoshiaki, Yoshitaka Ohmura, Chieri Kubota, and Toyoki Kozai. 2005. “Manipulation
550 of the Culture Environment on In Vitro Air Movement and Its Impact on Plantlets
551 Photosynthesis.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 83 (3). Springer: 251–57.
552 doi:10.1007/s11240-005-6839-2.
- 553 Kozai, Toyoki. 2010. “Photoautotrophic Micropropagation—environmental Control for
554 Promoting Photosynthesis.” *Prop Ornament Plants* 10. Citeseer: 188–204.
- 555 Kraus, Jane Elizabeth, and Marcos Arduin. 1997. *Manual Básico de Métodos Em Morfologia*
556 *Vegetal*. Edur Seropédica.
- 557 Lê, Sebastien, Julie Josse, and François Husson. 2008. “FactoMineR: An R Package for
558 Multivariate Analysis.” *J. of Statistical Software* 25 (1): 1–18. doi:10.18637/jss.v025.i01.
- 559 Lefsrud, Mark G., Dean A. Kopsell, and Carl E. Sams. 2008. “Irradiance from Distinct
560 Wavelength Light-Emitting Diodes Affect Secondary Metabolites in Kale.” *HortScience*
561 43 (7): 2243–44. <https://goo.gl/5i9Yrs>.
- 562 Lichtenthaler, Hk, and Ar Wellburn. 1983. “Determinations of Total Carotenoids and
563 Chlorophylls B of Leaf Extracts in Different Solvents.” *Biochemical Society Transactions*
564 11 (1955): 591–92. doi:10.1042/bst0110591.
- 565 Lin, Kuan Hung, Meng Yuan Huang, Wen Dar Huang, Ming Huang Hsu, Zhi Wei Yang, and
566 Chi Ming Yang. 2013. “The Effects of Red, Blue, and White Light-Emitting Diodes on
567 the Growth, Development, and Edible Quality of Hydroponically Grown Lettuce (*Lactuca*
568 *sativa* L. Var. *Capitata*).” *Scientia Horticulturae* 150. Elsevier B.V.: 86–91.
569 doi:10.1016/j.scienta.2012.10.002.
- 570 Liu, Mengxi, Zhigang Xu, Shirong Guo, Canming Tang, Xiaoying Liu, and Xuelei Jao. 2014.
571 “Evaluation of Leaf Morphology, Structure and Biochemical Substance of Balloon
572 Flower (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) Plantlets In Vitro under Different Light
573 Spectra.” *Scientia Horticulturae* 174 (1). Elsevier B.V.: 112–18.
574 doi:10.1016/j.scienta.2014.05.006.
- 575 Liu, Min, Fangling Jiang, Xiangyu Kong, Jie Tian, Zexiu Wu, and Zhen Wu. 2017. “Effects of
576 Multiple Factors on Hyperhydricity of *Allium sativum* L.” *Scientia Horticulturae* 217.
577 Elsevier B.V.: 285–96. doi:10.1016/j.scienta.2017.02.010.
- 578 Ma, Zengqiang, Shishang Li, Meijun Zhang, Shihao Jiang, and Yulan Xiao. 2010. “Light
579 Intensity Affects Growth, Photosynthetic Capability, and Total Flavonoid Accumulation
580 of *Anoectochilus* Plants.” *HortScience* 45 (6): 863–67. <https://goo.gl/2BKKmF>.
- 581
- 582

- 583 Maluta, Felipe Aarão, Stevan Ricardo Bordignon, Monica Lanzoni Rossi, Glaucia Maria Bovi
584 Ambrosano, and e. Paulo Hercílio Viegas Rodrigues. 2013. “Cultivo In Vitro de Cana-de-
585 Açúcar Exposta a Diferentes Fontes de Luz.” *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 48 (9):
586 1303–7. doi:10.1590/S0100-204X2013000900015.
- 587 Manivannan, Abinaya, Prabhakaran Soundararajan, Nur Halimah, Chung Ho Ko, and Byoung
588 Ryong Jeong. 2015. “Blue LED Light Enhances Growth, Phytochemical Contents, and
589 Antioxidant Enzyme Activities of *Rehmannia glutinosa* Cultured In Vitro.” *Horticulture
590 Environment and Biotechnology* 56 (1): 105–13. doi:10.1007/s13580-015-0114-1.
- 591 Matos, Francisco José de A, Maria Iracema L Machado, Afrânio A Craveiro, Jose Wilson
592 Alencar, and Maria Goretti De V Silva. 1999. “Medicinal Plants of Northeast Brazil
593 Containing Thymol and Carvacrol -- *Lippia sidoides* Cham. and *Lippia gracilis* H.B.K.
594 (Verbenaceae).” *Journal of Essential Oil Research* 11 (6): 666–68.
595 doi:10.1080/10412905.1999.9711990.
- 596 Mendiburu, Felipe. 2017. “Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research.”
597 <https://cran.r-project.org/package=agricolae>.
- 598 Mikaeva, A S, and A A Gorbunov. 2017. “Improving the Quality and Sustainability of
599 Fluorescent Lamps.” *Spravochnik. Inzhenernyi Zhurnal*, November. Izdatel Spektr, LLC,
600 53–56. doi:10.14489/hb.2017.11.pp.053-056.
- 601 Mohamed, M.A.-H., and A.A. Alsadon. 2010. “Influence of Ventilation and Sucrose on
602 Growth and Leaf Anatomy of Micropropagated Potato Plantlets.” *Scientia Horticulturae*
603 123 (3): 295–300. doi:10.1016/j.scienta.2009.09.014.
- 604 Murashige, Toshio, and Folke Skoog. 1962. “A Revised Medium for Rapid Growth and Bio
605 Assays with Tobacco Tissue Cultures.” *Physiologia Plantarum* 15: 12.
606 doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- 607 Neto, Egídio Bezerra, and Levy Paes Barreto. 2011. *Análises Químicas E Bioquímicas Em*
608 *Plantas*. Edited by Antônio Marcelo Freitas Athayde Cavalcanti. Universidade Federal Rural
609 de Pernambuco. Recife.
- 610 Nhut, Duong Tan, Nguyen Phuc Huy, Ngo Thanh Tai, Nguyen Ba Nam, Vu Quoc Luan, Vu
611 Thi Hien, Hoang Thanh Tung, Bui The Vinh, and Tran Cong Luan. 2015. “Light-Emitting
612 Diodes and Their Potential in Callus Growth, Plantlet Development and Saponin
613 Accumulation during Somatic Embryogenesis of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv.”
614 *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 29 (2): 299–308.
615 doi:10.1080/13102818.2014.1000210.
- 616 O’Leary, Nataly, Ss Denham, Frg Salimena, and Me Mûlgura. 2012. “Species Delimitation in
617 *Lippia* Section *Goniostachyum* (Verbenaceae) Usgin the Phylogenetic Species Concept.”
618 *Botanical Journal of the Linnean Society* 170 (1847): 197–219. doi:10.1111/j.1095-
619 8339.2012.01291.x.
- 620

- 621 Ouyang, Jie, Xiaodong Wang, Bing Zhao, and Yuchun Wang. 2003. “Light Intensity and
622 Spectral Quality Influencing the Callus Growth of *Cistanche deserticola* and Biosynthesis
623 of Phenylethanoid Glycosides.” *Plant Science* 165 (3): 657–61. doi:10.1016/S0168-
624 9452(03)00255-3.
- 625 Paek, Kee Yoeup, Hosakatte Niranjana Murthy, and Jian Jiang Zhong. 2014. “Production of
626 Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology.” *Production of*
627 *Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology*, 1–709.
628 doi:10.1007/978-94-017-9223-3.
- 629 Palma, Denise, Adilson Ricken Schuelter, Suzana Stefanello, and Andréa Maria Teixeira
630 Fortes. 2011. “Aspectos Morfofisiológicos e Controle da Hiperhidricidade na
631 Morphophysiological Aspects and Hyperhydricity Control in Plant Tissue.” *Revista*
632 *Brasileira de Agrociência* 17 (2–4): 174–84. <https://goo.gl/ZJtGz4>.
- 633 Pessoa, O. D L, C. B M De Carvalho, J. O V L Silvestre, M. C L Lima, R. M. Neto, F. J A
634 Matos, and T. L G Lemos. 2005. “Antibacterial Activity of the Essential Oil from *Lippia*
635 *Aff. gracillis*.” *Fitoterapia* 76 (7–8): 712–14. doi:10.1016/j.fitote.2005.07.004.
- 636 Poudel, Puspa Raj, Ikuo Kataoka, and Ryosuke Mochioka. 2008. “Effect of Red- and Blue-
637 Light-Emitting Diodes on Growth and Morphogenesis of Grapes.” *Plant Cell, Tissue and*
638 *Organ Culture* 92 (2): 147–53. doi:10.1007/s11240-007-9317-1.
- 639 Rocha, Paulo Sérgio Gomes da, Roberto Pedroso de Oliveira, and Walkyria Bueno Scivittaro.
640 2013. “Uso de LEDs na Multiplicação e Enraizamento LED In Vitro de Framboeseras.”
641 *Pesquisa Agropecuária Gaúcha* 19: 98–105. <https://goo.gl/Uo4YXh>.
- 642 Sabzalian, Mohammad R., Parisa Heydarizadeh, Morteza Zahedi, Amin Boroomand, Mehran
643 Agharokh, Mohammad R. Sahba, and Benoît Schoefs. 2014. “High Performance of
644 Vegetables, Flowers, and Medicinal Plants in a Red-Blue LED Incubator for Indoor Plant
645 Production.” *Agronomy for Sustainable Development* 34 (4): 879–86.
646 doi:10.1007/s13593-014-0209-6.
- 647 Saher, Shady, Abel Piqueras, Eladio Hellin, and Enrique Olmos. 2004. “Hyperhydricity in
648 Micropropagated Carnation Shoots: The Role of Oxidative Stress.” *Physiologia*
649 *Plantarum* 120 (1): 152–61. doi:10.1111/j.0031-9317.2004.0219.x.
- 650 Saini, Himanshu, Inder Dev Arya, Sarita Arya, and Reetu Sharma. 2016. “In Vitro
651 Micropropagation of Himalayan Weeping Bamboo, *Drepanostachyum falcatum*”.
652 *American Journal of Plant Sciences* 7 (7): 1317–24. doi:10.4236/ajps.2016.79126.
- 653 Santelia, Diana, and Tracy Lawson. 2016. “Rethinking Guard Cell Metabolism.” *Plant*
654 *Physiology* 172 (3). *Am Soc Plant Biol*: 1371–92. doi:10.1104/pp.16.00767.
- 655
- 656
- 657

- 658 Santos, Clesivan Pereira dos, Jéssika Andreza Oliveira Pinto, Cleverton Alves dos Santos,
659 Elizangela Mércia Oliveira Cruz, Maria de Fátima Arrigoni-Blank, Thiago Matos
660 Andrade, Darlisson de Alexandria Santos, Péricles Barreto Alves, and Arie Fitzgerald
661 Blank. 2016. "Harvest Time and Geographical Origin Affect the Essential Oil of *Lippia*
662 *gracilis* Schauer." *Industrial Crops and Products* 79. Elsevier B.V.: 205–10.
663 doi:10.1016/j.indcrop.2015.11.015.
- 664 Schneider, Caroline A, Wayne S Rasband, and Kevin W Eliceiri. 2012. "NIH Image to ImageJ:
665 25 Years of Image Analysis." *Nature Methods* 9 (7). Springer Nature: 671–75.
666 doi:10.1038/nmeth.2089.
- 667 Sharakshane, Anton. 2016. "White LED Lighting for Plants." LED Lighting for Urban
668 Agriculture, November. Cold Spring Harbor Laboratory. doi:10.1101/215095.
- 669 Sharma., Hemant. 2017. "Role of Growth Regulators in Micropropagation of Woody Plants -
670 a Review." *International Journal of Advanced Research* 5 (2). International Journal Of
671 Advanced Research: 2378–85. doi:10.21474/ijar01/3421.
- 672 Stefano, Morini, and Muleo Rosario. 2003. "Effects of Light Quality on Micropropagation of
673 Woody Species." In *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, edited by S Mohan
674 Jain and Katsuaki Ishii, 3–35. Dordrecht: Springer Netherlands. doi:10.1007/978-94-010-
675 0125-0_1.
- 676 Streit, Nivia Maria, Liana Pedrolo Canterle, Marta Weber do Canto, and Luísa Helena
677 Hycheki Hecktheuer. 2005. "As Clorofilas." *Ciência Rural* 35 (3): 748–55.
678 doi:10.1590/S0103-84782005000300043.
- 679 Tian, Ye, Gilberto Garcia, Qian Bian, Kristan K Steffen, Larry Joe, Suzanne Wolff, Barbara J
680 Meyer, and Andrew Dillin. 2016. "Mitochondrial Stress Induces Chromatin
681 Reorganization to Promote Longevity and UPR Mt." *Cell* 165 (5). Elsevier: 1197–1208.
682 doi:10.1016/j.cell.2016.04.011.
- 683 Trevisan, M.T.S., R.A. Marques, M.G.V. Silva, D. Scherer, R. Haubner, C.M. Ulrich, and R.W.
684 Owen. 2016. "Composition of Essential Oils and Ethanol Extracts of the Leaves of *Lippia*
685 Species: Identification, Quantitation and Antioxidant Capacity." *Records of Natural*
686 *Products* 10 (4): 485–96. <https://goo.gl/7LGbQH>.
- 687 Vieira, Leila do Nascimento, Hugo Pacheco de Freitas Fraga, Karina Goulart dos Anjos,
688 Catarina Corrêa Puttkammer, Ramon Felipe Scherer, Dorival Almeida da Silva, and
689 Miguel Pedro Guerra. 2015. "Light-Emitting Diodes (LED) Increase the Stomata
690 Formation and Chlorophyll Content in *Musa acuminata* (AAA) 'Nanicão Corupá' In
691 *Vitro Plantlets*." *Theoretical and Experimental Plant Physiology* 27 (2): 91–98.
692 doi:10.1007/s40626-015-0035-5.
- 693 Wei, Taiyun, and Viliam Simko. 2017. "R Package 'corrplot': Visualization of a Correlation
694 Matrix." <https://github.com/taiyun/corrplot>.
- 695

- 696 Wu, How-Chiun, Mei-Ling Kuo, and Chia-Min Chen. 2018. "Promotion of Vegetative Growth
697 in Force-Ventilated *Protea cynaroides* L. Explants Cultured in Modified Temporary
698 Immersion Culture Vessels." *HortScience* 53 (2). American Society for Horticultural
699 Science: 231–35. doi:10.21273/hortsci12513-17.
- 700 Wu, Ming Chang, Chi Yao Hou, Chii Ming Jiang, Yuh Tai Wang, Chih Yu Wang, Ho Hsien
701 Chen, and Hung Min Chang. 2007. "A Novel Approach of LED Light Radiation Improves
702 the Antioxidant Activity of Pea Seedlings." *Food Chemistry* 101 (4): 1753–58.
703 doi:10.1016/j.foodchem.2006.02.010.
- 704 Xiao, Yulan, Genhua Niu, and Toyoki Kozai. 2011. "Development and Application of
705 Phoautotrophic Micropropagation Plant System." *Plant Cell Tissue Organ Culture*,
706 105:149-158. doi:10.1007/s11240-010-9863-9.
- 707 Yeh, Naichia, and Jen Ping Chung. 2009. "High-Brightness LEDs-Energy Efficient Lighting
708 Sources and Their Potential in Indoor Plant Cultivation." *Renewable and Sustainable
709 Energy Reviews* 13 (8): 2175–80. doi:10.1016/j.rser.2009.01.027.
- 710 Yemm, E W, and A J Willis. 1954. "The Estimation of Carbohydrates in Plant Extracts by
711 Anthrone." *Biochemical Journal* 57 (3). Portland Press Ltd.: 508–14.
712 doi:10.1042/bj0570508.
- 713
- 714
- 715
- 716
- 717
- 718
- 719

Tabela 1 Parâmetros biométricos aos 45 dias de cultivo *in vitro* de *Lippia grata* Schauer submetido a diferentes sistemas de iluminação associado a condições de ventilação.

Ventilação x Sistema de iluminação		Nº de folhas totais	Nº de folhas hiperídricas	Nº de brotos	Nº de raízes	Massa fresca (g)	Altura de planta (cm)	Expansão da lâmina foliar*
Sem ventilação	LED Vermelha 83%	20,50 ±0,14 bA	18,50 ±0,14 aA	3,74 ±0,01 bA	3,22 ±0,11 bA	0,43 ±0,02 aA	1,36 ±0,02 dB	2,75 aA
	LED Vermelha 50%	23,65 ±0,20 aA	19,83 ±0,10 aA	3,22 ±0,02 cA	3,15 ±0,20 bA	0,23 ±0,01 cA	1,81 ±0,04 bA	1,78 cB
	LED Branca	21,17 ±0,10 bA	14,33 ±0,19 bB	3,92 ±0,05 bA	4,50 ±0,29 aA	0,33 ±0,01 bA	2,17 ±0,03 aA	1,67 dB
	Fluorescente Branca	23,00 ±0,19 aA	19,56 ±0,25 aA	4,83 ±0,10 aA	4,50 ±0,17 aA	0,29 ±0,01 bA	1,65 ±0,03 cB	2,33 bB
Com ventilação	LED Vermelha 83%	12,40 ±0,23 cB	7,25 ±0,43 bB	2,22 ±0,02 bB	2,37 ±0,02 bB	0,30 ±0,02 aB	1,55 ±0,02 bA	2,55 aB
	LED Vermelha 50%	13,25 ±0,14 bB	3,63 ±0,51 cB	1,94 ±0,04 cB	2,83 ±0,10 abB	0,18 ±0,01 cB	1,55 ±0,02 bB	1,93 cA
	LED Branca	12,35 ±0,14 cB	6,63 ±0,79 bB	2,50 ±0,10 aB	3,06 ±0,06 aB	0,24 ±0,01 bB	1,65 ±0,03 bB	2,30 bA
	Fluorescente Branca	14,45 ±0,20 aB	9,50 ±0,29 aB	2,30 ±0,06 abB	3,25 ±0,14 aB	0,21 ±0,01 bcB	2,56 ±0,06 aA	2,55 aA
CV (%)		1,72	5,60	3,21	8,11	1,08	3,11	-

Letras diferentes, minúsculas para os sistemas de iluminação e maiúsculas para as condições de ventilação, indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. Média \pm SE ($n = 3$). (*) Variável qualitativa, teste de Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$).

Tabela 2 Coeficientes da correlação de Pearson para os parâmetros biométricos e bioquímicos das plantas de *L. grata* aos 45 dias de cultivo *in vitro* submetido a diferentes sistemas de iluminação associado a condições de ventilação.

	NF	FH	NB	NR	MF	AL	CB	SC	PT	CHLA	CHLB	CHLT	RAB	CAR
NF	1													
FH	0,95***	1												
NB	0,86***	0,85***	1											
NR	0,65***	0,54**	0,80***	1										
MF	0,41*	0,53**	0,58**	0,24n.s.	1									
AL	0,01n.s.	-0,04n.s.	-0,08n.s.	0,29n.s.	-0,36n.s.	1								
CB	-0,86***	-0,75***	-0,70***	-0,64***	-0,32n.s.	-0,20n.s.	1							
SC	-0,80***	-0,70***	-0,87***	-0,79***	-0,46*	0,09n.s.	0,67***	1						
PT	0,07n.s.	-0,09n.s.	-0,28n.s.	-0,04n.s.	-0,65***	0,38n.s.	0,04n.s.	0,04n.s.	1					
CHLA	-0,53**	-0,55**	-0,37n.s.	-0,38n.s.	-0,28n.s.	-0,49*	0,72***	0,35n.s.	0,13n.s.	1				
CHLB	-0,70***	-0,61**	-0,56**	-0,42*	-0,50*	0,00n.s.	0,68***	0,46*	-0,05n.s.	0,24n.s.	1			
CHLT	-0,70***	-0,69***	-0,52**	-0,48*	-0,42*	-0,41*	0,86***	0,47*	0,09n.s.	0,94***	0,57**	1		
RAB	0,09n.s.	-0,03n.s.	0,10n.s.	0,11n.s.	0,11n.s.	-0,21n.s.	0,02n.s.	-0,04n.s.	0,22n.s.	0,54**	-0,64***	0,23n.s.	1	
CAR	-0,53**	-0,59**	-0,39n.s.	-0,31n.s.	-0,49*	-0,47*	0,67***	0,27n.s.	0,18n.s.	0,89***	0,50*	0,93***	0,25n.s.	1

‘Significância’

*** Significativo nos níveis de 0,001

** Significativo nos níveis de 0,01

* Significativo nos níveis de 0,05

n.s. Não significativo

‘Parâmetros biométricos’

NF=N° de folhas totais;

FH= N° de folhas hiperídricas;

NB= N° de brotos;

NR= N° de raízes;

MF= Massa fresca (g);

AL= Altura de planta (cm).

‘Parâmetros bioquímicos’

CB=Carboidratos solúveis totais (mg g⁻¹ MF);

SC= Sacarose (mg g⁻¹ MF);

PT=Proteínas solúveis totais (mg g⁻¹ MF);

CHLA=Clorofila *a* (mg g⁻¹ MF);

CHLB= Clorofila *b* (mg g⁻¹ MF);

CHLT=Clorofilas totais (*a+b*) (mg g⁻¹ MF);

RAB=Razão de clorofila *a/b* (mg g⁻¹ MF);

CAR=Carotenoides (mg g⁻¹ MF).

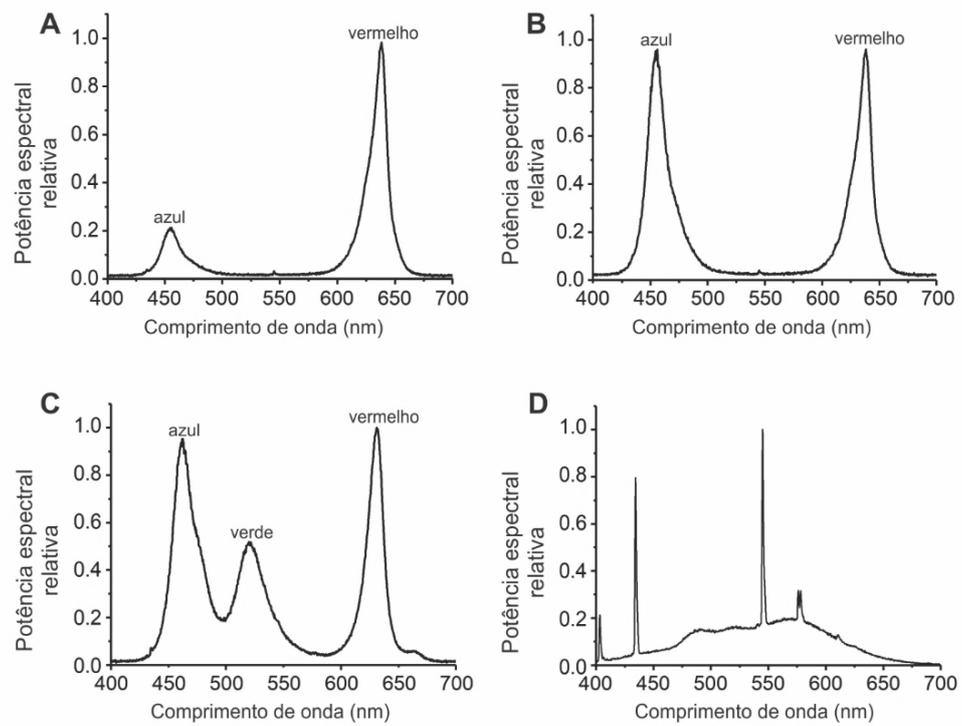


Figura 1 Distribuição espectral de energia relativa dos sistemas de iluminação LED e fluorescente. A= LED Vermelha e Azul (5:1); B=LED Vermelha e Azul (1:1); C= LED Branca; D= Fluorescente branca.

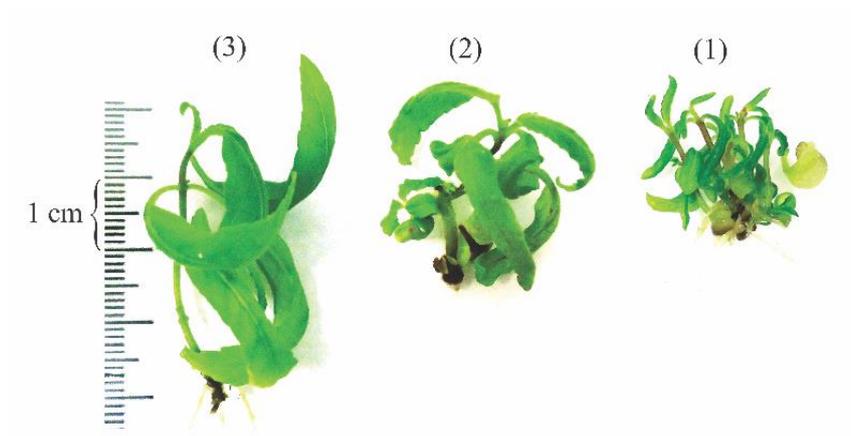


Figura 2 Classificação qualitativa da expansão da lâmina foliar. (3) maior a três centímetros; (2) intermediário entre um e três centímetros; (1) menor que um centímetro.

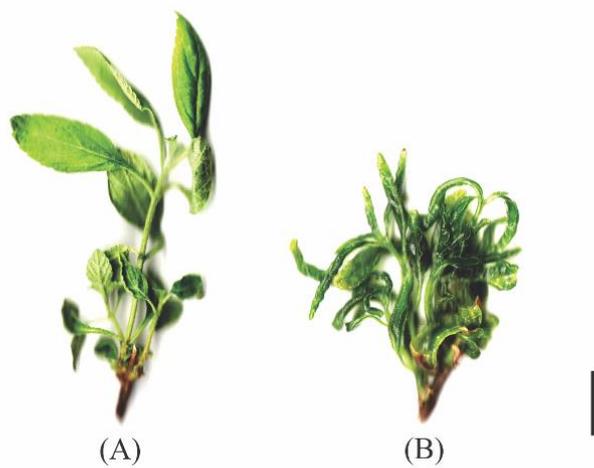


Figura 3 Características qualitativas visuais das plantas de *L. grata* aos 45 dias de cultivo in vitro desenvolvidas com ventilação natural (A) e sem ventilação (B). Barra=1 cm.

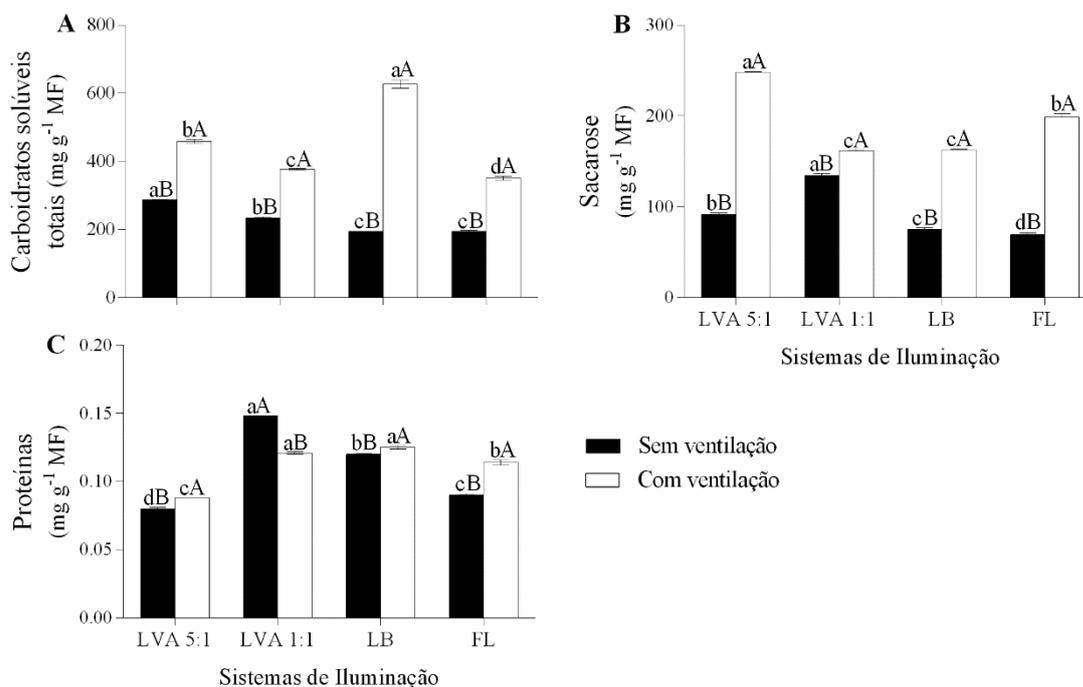


Figura 4 Teores de carboidratos e proteínas solúveis totais em plantas de *L. grata* aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Letras diferentes, minúsculas para os sistemas de iluminação e maiúsculas para as condições de ventilação, indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. Média \pm SE ($n = 3$).

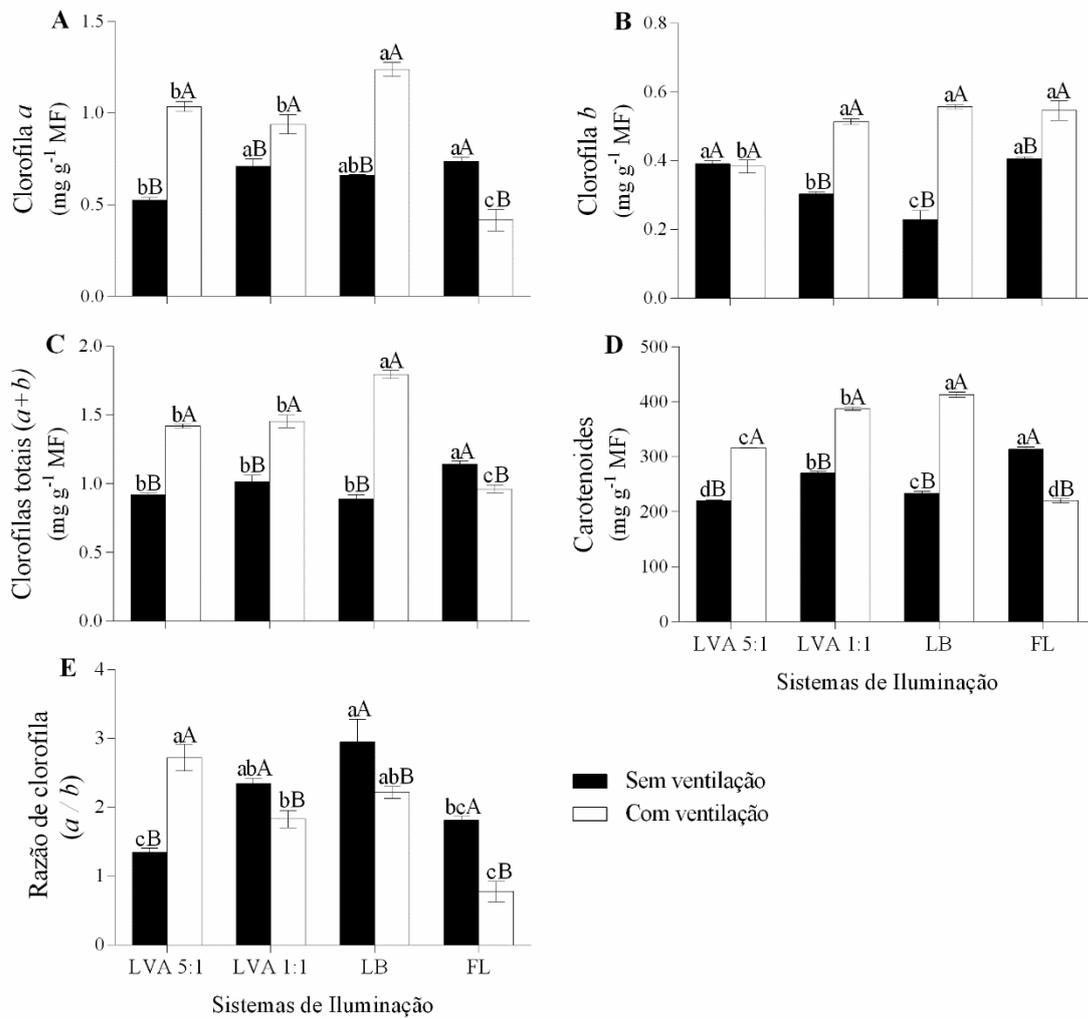


Figura 5 Teores dos pigmentos cloroplásticos em plantas de *L. grata* aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Letras diferentes, minúsculas para os sistemas de iluminação e maiúsculas para as condições de ventilação, indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. Média \pm SE ($n = 3$).

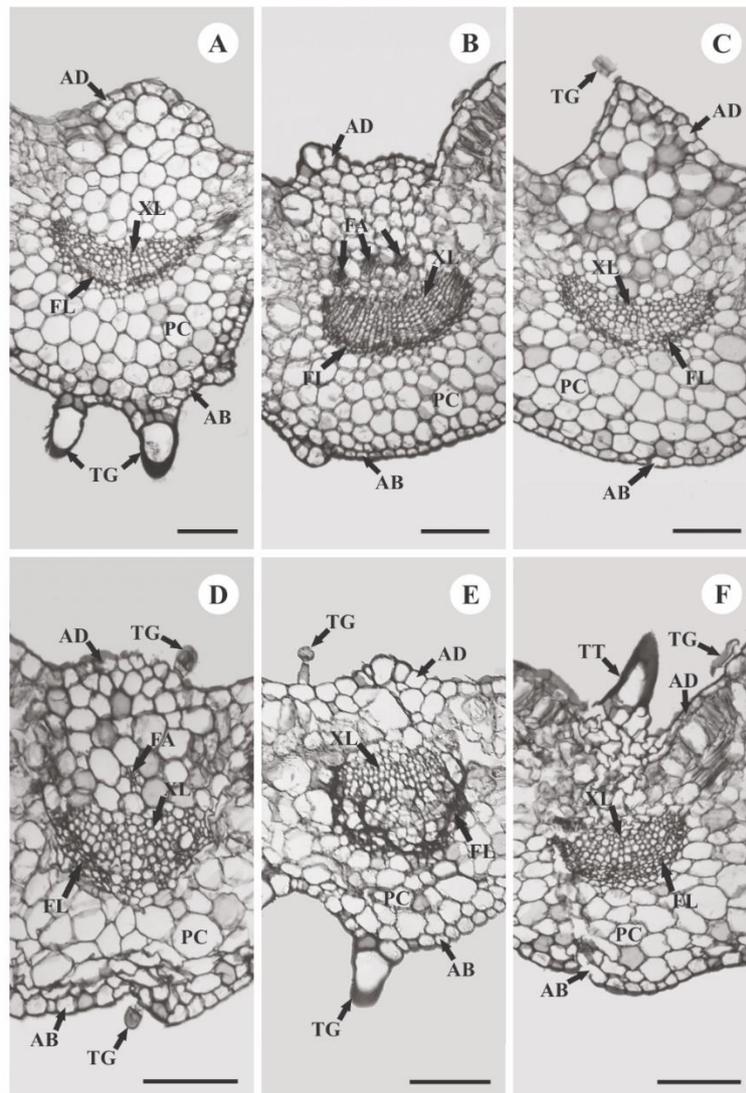


Figura 6 Seções transversais da nervura principal das folhas de *L. grata* desenvolvidas com ventilação natural (A-C) e sem ventilação (D-E), respectivamente. AD = epiderme adaxial; AB= epiderme abaxial; FL= floema; XL= xilema; FA= feixes acessórios; PC= parênquima cortical; TT = tricoma tector; TG= tricoma glandular. Barras: 10 μ m.

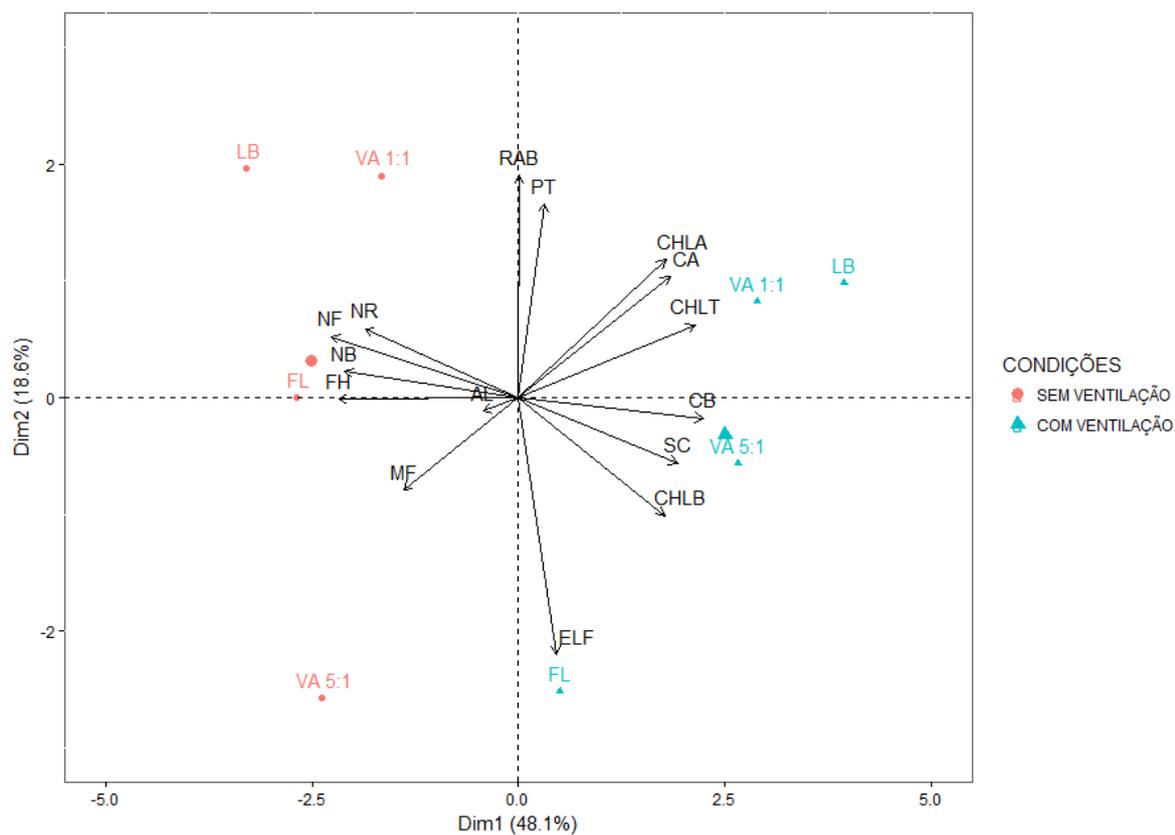


Figura 7 Análises de Componentes Principais (ACP). NF: número de folhas totais; FH: número de folhas hiperhídricas; NB: número de brotos; NR: número de raízes; MF: Massa fresca; AL: altura de planta; ELF: expansão da lâmina foliar; CHLA: clorofila *a*; CHLB: clorofila *b*; CHLT: clorofilas totais ($a+b$); RAB: razão de clorofilas (a/b); CA: carotenoides; CB: carboidratos solúveis totais; SC: sacarose; e PT: proteínas solúveis totais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos, observamos que:

O uso da ventilação dos frascos (ou tubos de ensaio) por meio da vedação parcial, descritas neste experimento, para o cultivo *in vitro* de *Lippia gracilis* Schauer pode reduzir até mais do 50% da incidência de folhas hiperhídricas e como consequência estimular a produção de pigmentos cloroplastídicos assim como de teores de carboidratos solúveis totais até em 100% os quais poderiam aumentar as chances de sobrevivência em condições de aclimatização uma vez que seriam plantas com maior atividade fotossintética e regulação osmótica;

Os sistemas de luzes LED proporcionaram maior regulação da relação de clorofilas *a* e *b*, em comparação com a luz fluorescente, de modo que evidenciaria uma maior atividade e organização fotossintética das plantas em condições *in vitro*. Ademais, conferimos que as luzes LED foram muito mais sinérgicas com a vedação parcial, destacando-se nesse sentido o LED Branco;

Em experimentos similares, seria recomendável testar a sobrevivência das plantas em fase de aclimatização de modo que permita confirmar o efeito da rustificação das plantas por efeito da ventilação dos frascos.

NORMAS DA REVISTA

Nome da revista:

In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant (IVP)

Link de acesso:

<https://goo.gl/kycxUW>

Qualis-CAPES:

B1 em Biodiversidade.