



MAYRA CRISTINA MANOEL BALDUINO

**CRESCIMENTO IN VITRO DE *Mentha arvensis* EM
SISTEMAS DE VENTILAÇÃO NATURAL COM DIFERENTES
INTENSIDADES DE FLUXO DE FÓTONS COM OU SEM
SACAROSE**

LAVRAS-MG

2020

MAYRA CRISTINA MANOEL BALDUINO

**CRESCIMENTO IN VITRO DE *Mentha arvensis* EM SISTEMAS DE
VENTILAÇÃO NATURAL COM DIFERENTES INTENSIDADES
DE FLUXO DE FÓTONS COM OU SEM SACAROSE**

Trabalho de conclusão de curso (TCC)
apresentado à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do
curso de Agronomia, para obtenção do
título de Bacharel.

Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Orientador

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Co-orientadora

Pesquisador Dr. Alexandre Alves de Carvalho
Co-orientador

LAVRAS-MG

2020

MAYRA CRISTINA MANOEL BALDUINO

**CRESCIMENTO IN VITRO DE *Mentha arvensis* EM SISTEMAS DE
VENTILAÇÃO NATURAL COM DIFERENTES INTENSIDADES DE
FLUXO DE FÓTONS COM OU SEM SACAROSE**

Trabalho de conclusão de curso (TCC)
apresentado à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do
curso de Agronomia, para obtenção do
título de Bacharel.

APROVADA em 12 de Agosto de 2020.

Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto – UFLA

Pesquisador Dr. Alexandre Alves de Carvalho – UFLA

Doutoranda Thainá de Oliveira – UFLA

Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto
Orientador

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Co-orientadora

LAVRAS-MG

2020

RESUMO

A micropropagação é uma técnica muito utilizada para a produção de plantas em larga escala, livres de doença. A forma de vedação empregada e as concentrações de sacarose interferem nas trocas gasosas e a intensidade luminosa é outro fator que favorece o processo de fotoautotrofismo da planta. Diante disso o presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito de diferentes intensidades de luz utilizando lâmpadas de LEDs com sistema de ventilação natural, suplementado com e sem sacarose no crescimento de *Mentha arvensis in vitro*. Para a condução do trabalho, foram utilizados segmentos nodais de aproximadamente 1 cm, retirados de plantas pré-estabelecidas, estes foram inoculados em frascos contendo 45 mL do meio MS/2, suplementado com ou sem sacarose. Os frascos foram vedados com tampas contendo quatro membranas porosas, e sem adição de membrana (controle), e distribuídos em cinco intensidades de luz (26, 51, 69, 94 e 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com 15 tratamentos com 4 repetições e 3 segmentos por frasco. Após 30 dias, as plântulas foram avaliadas. Observou-se que sistemas de ventilação natural associados a diferentes intensidades de luz influenciaram significativamente no crescimento *in vitro* da espécie. As plantas dispostas na intensidade luminosa de 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentaram um aumento em todos os parâmetros avaliados, à medida que aumentou o número de membranas nas tampas e redução de sacarose. Portanto, é possível reduzir ou até mesmo retirar totalmente a sacarose adicionada ao meio, quando utilizamos sistemas de ventilação natural, para obter crescimento satisfatório da espécie, colaborando também para a aclimatização já que a planta passa de heterotróficas para fotoautotróficas.

Palavras chave: Sistemas alternativos de membranas, fotoautotróficas, plantas medicinais.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	7
2.1. Aspectos botânicos, agronômicos e químicos da espécie.....	7
2.2. Micropropagação.....	8
2.3. Sistemas de ventilação natural no cultivo in vitro de plantas.....	9
2.4. Intensidade luminosa no cultivo in vitro de plantas	11
2.5. Sacarose no cultivo in vitro de plantas	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Fase de estabelecimento in vitro.....	14
3.2. Montagem das membranas porosas utilizadas nas tampas dos recipientes de cultivo ..	14
3.3. Sistema de ventilação natural e intensidade luminosa.....	15
3.6. Análise estatística dos dados	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1. Influência da intensidade luminosa no crescimento de <i>Mentha arvensis</i>	16
4.2. Influência de membranas porosas e sacarose no crescimento de <i>Mentha arvensis</i>	17
4.3. Efeito do sistema de cultivo e intensidades luminosas no cultivo in vitro de <i>Mentha arvensis</i>	19
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
6. CONCLUSÃO.....	22
REFERÊNCIAS	22

1. INTRODUÇÃO

A maior parte dos programas de micropropagação e melhoramento genético de plantas têm como base as técnicas de cultura de tecidos, pois exerce um papel importante na obtenção de material vegetal de qualidade para a indústria farmacêutica e química (MIGUEL; MARUM 2011; PEÑA-RAMÍREZ et al., 2012). A micropropagação apresenta diversas vantagens, dentre elas a obtenção de várias plantas idênticas a partir de um único explante (parte da planta) em pouco tempo e espaço, independentemente da estação do ano e com melhores condições sanitárias e a propagação vegetativa de espécies difíceis de serem propagadas (ERIG; SCHUCH, 2005). Devido à crescente demanda por plantas livres de vírus, com alta qualidade fitossanitária e fisiológica, e também com boa capacidade de síntese de metabólitos secundários, justifica a sua utilização na indústria farmacêutica, mesmo a técnica tendo como desvantagem o custo elevado. (LIMA et al., 2007).

As espécies do gênero *Mentha*, conhecidas popularmente no Brasil como hortelã, são usadas para fins medicinais como analgésico, estomacal e intestinal, estimulante das funções cardíacas, controle da azia, gastrite, cólicas e gases (GRISI et al., 2006). Também são usadas como condimentares na forma de aromatizantes alimentícios e tempero *in natura*. Em algumas espécies o principal constituinte é o mentol, que possui grande aplicação nas indústrias farmacêutica, alimentícia e de cosméticos. No período de julho de 2011 a julho de 2012, as importações do óleo essencial de mentas contabilizaram US\$ 32.321 mil relativos a 1.163 t, contra uma exportação de 42 t (ALICEWEB, 2012). O cultivo *in vitro* pode ser considerada como ferramenta promissora para a preservação de recursos genéticos vegetais, bem como para a propagação comercial de plantas medicinais (ABREU, 2003).

Há vários fatores que podem interferir no desenvolvimento vegetal, no cultivo *in vitro*, como por exemplo, as condições de luz nas salas de crescimento, os componentes do meio de cultura e a umidade dentro do recipiente de cultivo (US-CAMAS et al., 2014). Plantas cultivadas *in vitro* tornam-se dependentes do CO₂ e do açúcar disponíveis no meio de cultivo, portanto são heterotróficas, e com isso, é comum que as plantas oriundas deste tipo de cultivo apresentem anomalias, como mau funcionamento da abertura estomática, ausência de cutícula nas folhas, inabilidade fotossintética, baixo teor de clorofila, parênquima anormal das folhas e

do xilema, baixas trocas gasosas, redução da concentração de CO₂, alta umidade e acumulação de etileno. Devido a esses fatores, a taxa de sobrevivência durante a aclimatização é baixa (HAZARIKA, 2006).

Para tentar reduzir o problema no cultivo *in vitro* tradicional, são propostos sistemas fotoautotróficos e fotomixotróficos (VAHDATI; HASSANKHAH, 2014; CHEN, 2015). Sistemas fotoautotróficos são alcançados com o uso de diferentes tipos de membranas porosas, nos recipientes de cultivo *in vitro*, fazendo com que ocorram maiores trocas gasosas, e aumente o crescimento dos explantes. Além disso, essa modificação do microambiente através das trocas gasosas possibilita a manutenção das concentrações de CO₂ adequadas para que ocorra o estímulo da fotossíntese, o que permite a redução na concentração de etileno e umidade relativa no frasco de cultivo (SALDANHA et al., 2012). Para induzir o crescimento fotoautotrófico torna-se necessário retirar a sacarose do meio de cultura, aumentar a intensidade luminosa e difundir CO₂ e umidade (KOZAI; AFREEN; ZOBAYED; 2005), para que ocorra a fotossíntese, transpiração e acúmulo de matéria seca (ERIG; SCHUCH, 2005). Já nos sistemas fotomixotróficos não se retira totalmente a sacarose do meio de cultura, as plântulas usam de carboidratos endógenos e exógenos ao frasco de cultivo como fonte de energia, diferindo-se assim dos sistemas fotoautotróficos (KOZAI; AFREEN; ZOBAYED; 2005).

As plantas medicinais são de grande importância na saúde mundial, acredita-se que cerca de 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivados de produtos naturais (SOUSA et al., 2008). Por tanto, diante da demanda de muitas espécies e da importância farmacológica, novas formas de propagação têm sido estudadas, como por exemplo, a micropropagação, que se mostra uma excelente alternativa para o desenvolvimento de espécies de interesse econômico (BANDEIRA et al., 2007; MORAIS et al., 2012).

Neste contexto e devido a potencial aplicação medicinal de *Mentha arvensis*, observou-se a necessidade de aperfeiçoar o cultivo *in vitro* desta espécie. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de diferentes intensidades de luz utilizando lâmpadas de LEDs com sistema de ventilação natural, suplementado com e sem sacarose no crescimento de *Mentha arvensis in vitro*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Aspectos botânicos, agrônômicos e químicos da espécie

A família Lamiaceae é composta por cerca de 258 gêneros e 7.886 espécies (The Plant List, 2013). Dando ênfase ao gênero *Mentha* (Lamiaceae) que compreende plantas conhecidas como hortelãs, as quais são muito cultivadas devido à produção de óleos essenciais produzidos

por tricomas glandulares presentes nas folhas e caules das plantas. Esses óleos essenciais são usados comercialmente como aromatizantes de alimentos, agentes flavorizantes, em cosméticos, perfumes e medicamentos (POOVAIAH et al., 2006). A hortelã-japonesa (*Mentha arvensis* L., Lamiaceae), também conhecida como menta-japonesa ou hortelã-do-brasil, é uma planta medicinal e aromática, seu óleo essencial rico em mentol é empregado nas indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias. (PINTO et al., 2011). No entanto, alguns fatores podem comprometer o uso das plantas medicinais para propósitos farmacêuticos, bem como a heterogeneidade dos indivíduos, devido a variabilidades genética e bioquímica (VIEIRA, 2000, 2006), e dificuldade de multiplicação (PEREIRA, 2009).

Para produção agrícola de menta a propagação é preferencialmente vegetativa, sendo realizada por estacas ou estolões (CHAGAS et al., 2008). Protocolos de micropropagação, para espécies medicinais, têm sido estabelecidos (SOUZA et al., 2007; PEREIRA et al., 2008), nas quais a qualidade do material genético e a homogeneidade das plantas são um dos fatores determinantes da sua qualidade.

2.2. Micropropagação

A cultura de tecidos é uma área da biotecnologia vegetal que compreende métodos de propagação e conservação de recursos genéticos vegetais em laboratório, com aplicações em estudos de metabolismo, fisiologia, desenvolvimento e reprodução clonal, massal ou não (LAKSHMANAN et al., 2005). A propagação vegetativa (micropropagação) consiste em multiplicar assexuadamente partes de plantas (células, tecidos, órgãos ou propágulos), originando indivíduos geneticamente idênticos à planta-mãe (WENDLING., 2003). Essas técnicas são possíveis devido à totipotência, capacidade apresentada pelas células vegetais, que podem ser induzidas a voltar ao estado meristemático e redefinir seu padrão de diferenciação celular, viabilizando, desta forma, a formação de novos órgãos ou de uma planta completa (TERMIGNONI, 2005).

A escolha do meio de cultivo adequado de determinada espécie é importante, pois, através dele, tecidos e órgãos são supridos com macronutrientes, micronutrientes e outros produtos orgânicos (KNUDSON, 1946; VACIN WENT, 1949; MURASHIGE & SKOOG, 1962; CAMPOS, 2002) necessários à germinação e ao desenvolvimento in vitro. Caldas et al. (1998) reportam que os mais usados no cultivo in vitro da maioria das espécies são o B5 (Gamborg) e o meio MS (Murashige & Skoog). No caso do cultivo da menta, o meio com a metade da concentração dos sais MS (MS/2) constitui o melhor meio para a micropropagação da espécie através do cultivo de gemas apicais e segmentos nodais. (PINTO et al., 2011).

Dentre os produtos orgânicos utilizados para o enriquecimento dos meios nutritivos, salienta-se a necessidade de suplementação exógena de carboidratos, uma vez que, a baixa concentração de CO₂, em cultivos *in vitro* e a radiação fotossintética inadequada ou insuficiente, dificultam a fotossíntese das plantas e acarretam na necessidade de açúcares, que forneçam energia e carbonos precursores para a biossíntese de componentes estruturais e funcionais, como oligossacarídeos, aminoácidos, e outras moléculas que são fundamentais para o crescimento de espécies submetidas a esse tipo de cultivo (PASQUAL, 2001). A fonte e dose de açúcares no meio de cultura também podem interferir no desenvolvimento *in vitro* de algumas espécies medicinais. (MORAIS et al., 2012) No caso do cultivo de *Melissa officinalis* L., melhores resultados são obtidos em meios de cultura contendo 30 g L⁻¹ de sacarose (RIBEIRO et al., 2007b). Já do manjericão (*Ocimum basilicum* L.), o número de folhas é estimulado pela adição de qualquer fonte de carboidratos (sacarose, glicose ou maltose) na concentração de 20 g L⁻¹ (RIBEIRO et al., 2007a).

Para que se obtenha um desenvolvimento adequado do explante, deve-se levar em consideração outros fatores e não apenas o tipo de meio utilizado, é necessário que se adicionem ao meio de cultura, além de nutrientes e vitaminas presentes no meio, reguladores de crescimento, cujas concentração e composição são fatores determinantes no crescimento e padrão de desenvolvimento da maioria dos sistemas de cultura de tecidos (CALDAS et al., 1998).

Justifica-se a micropropagação de espécies medicinais devido à crescente demanda da indústria farmacêutica por plantas indexadas, livres de vírus, com alta qualidade fitossanitária e fisiológica bem como, com a capacidade de síntese de metabólitos secundários potencializada, através do melhoramento genético, embora tenha um custo elevado. (LIMA ET AL., 2007).

2.3. Sistemas de ventilação natural no cultivo *in vitro* de plantas

No sistema convencional de propagação *in vitro*, os explantes crescem sob condições heterotróficas, o que pode gerar estresses que irão refletir no padrão da planta. Nesse sistema os recipientes são mantidos fechados, afim de evitar contaminação por microrganismos, prevenindo a desidratação das plantas e do meio de cultivo (SCHUELTER et al., 2015; KOZAI; KUBOTA, 2001). As plantas possuem fotossíntese limitada e não apresentam cloroplastos totalmente funcionais, devido a forma de cultivo. Essas condições podem influenciar as características anatômicas, fisiológicas e morfológicas, como hiperhidricidade e atraso no crescimento das plantas (ALVAREZ et al., 2012; IAREMA et al., 2012). As plantas se tornam

incapazes de suportar o estresse quando são transferidas para condições *ex vitro*, devido as características anatômicas e fisiológicas que se desenvolvem de forma deficiente, resultando em uma alta taxa de mortalidade (ALVAREZ et al., 2012; CHANDRA et al., 2010).

Um dos problemas decorrentes das condições do cultivo *in vitro* é a hiperidricidade que é um importante distúrbio morfofisiológico observado durante o cultivo *in vitro* de plantas (FERNADEZ-GARCIA et al., 2011), caracterizado pela retenção excessiva de água no interior das células e tecidos (VASCONCELOS et al., 2012; TIAN et al., 2017), e que pode ser evitado mediante controle e ajuste de vários fatores como as trocas gasosas com o ambiente (VASCONCELOS et al., 2012). Ivanova e Staden (2010) constataram em seu trabalho que as trocas gasosas entre o ambiente *in vitro* e o ambiente exterior é um fator que pode controlar ou reduzir a hiperidricidade em *Aloe polyphylla* cultivada *in vitro*.

O grande desafio desse sistema de ventilação, segundo Xiao et al. (2011), é aumentar a taxa de ventilação da cultura e ao mesmo tempo manter o meio livre de patógenos e melhorando as condições do ambiente *in vitro*, para assim reduzir as diferenças entre os ambientes *in vitro* e o *ex vitro*. Resultados obtidos por Saldanha et al. (2013) mostram os efeitos das trocas gasosas na morfogênese *in vitro*, além das possibilidades de uso de membranas alternativas e materiais eficientes para promover o crescimento *in vitro* de plantas.

A fotossíntese e o crescimento de plantas *in vitro* são promovidos consideravelmente com o aumento da concentração de CO₂ no vaso durante o cultivo fotoautotrófico (IBARAKI; NOZAKI, 2005). Ao permitir trocas gasosas no frasco de cultivo, beneficia-se o crescimento *in vitro* das plantas, diminuindo perdas após a transferência destas para as condições *ex vitro* (MOREIRA et al., 2013). Promovendo um aumento na porcentagem de sobrevivência das plantas e auxiliando no processo de aclimatização (CHAUM et al., 2011).

Kozai et al. (2010) afirmaram que simplesmente através da utilização de tampas com filtros é possível permitir a troca gasosa entre o explante e o ambiente, sendo uma forma de ventilação natural. Saldanha et al. (2012) desenvolveram membranas artesanalmente, como alternativa mais econômica as membranas comerciais que possuem alto custo para manutenção, as mesmas são feitas de uma combinação de fita microporosa e politetrafluoroetileno (PTFE), e apresentam sucesso na propagação *in vitro* promovendo um aumento das trocas gasosas.

Kiferle et al. (2014) investigaram o efeito da ventilação na fotossíntese, respiração, evolução do etileno e produção de ácido rosmarínico em *Ocimum basilicum L.*, confirmando que há uma relação entre o ambiente de cultivo *in vitro* (recipiente, meio de cultura, trocas gasosas, etc) e o metabolismo da plântula, concluindo que pode haver aumento da taxa fotossintética da planta.

2.4. Intensidade luminosa no cultivo *in vitro* de plantas

A energia luminosa é um dos fatores mais importante no crescimento e desenvolvimentos das plantas (FUKUDA, 2013). A luz influencia na síntese e produção de metabólitos primários e secundários, nos aspectos morfoanatômicos e fisiológicos (COSTA et al., 2009; KOPSELL; SAMS, 2013). Além disso, as plantas utilizam a luz como fonte de energia no processo fotossintético e respondem a essa energia luminosa de acordo com a intensidade, comprimento de onda e fotoperíodo (MUNEER et al., 2014).

Considerado a luz o principal fator ambiental que controla o crescimento, o desenvolvimento e o metabolismo das plantas, que são afetadas pela irradiância em todos os estádios do seu crescimento (COSTA et al., 2012; COSTA; CHAGAS, 2014). A dependência das plantas à luz é um processo complexo, que envolve a ação combinada de fotorreceptores que controlam estádios variados no desenvolvimento (BRAGA et al., 2009).

No crescimento e desenvolvimento *in vitro*, a intensidade e qualidade luminosa são fatores importantes (MACEDO et al., 2011). A taxa de fotossíntese é limitada pela disponibilidade de luz (intensidade luminosa baixa); ao passo que o excesso de luz pode levar a ocorrência da fotoinibição que é caracterizada por ser um conjunto complexo de processos moleculares onde há a inibição da fotossíntese (TAIZ et al., 2017). As plantas têm diferentes respostas de crescimento e também na produção de metabólitos secundários quando expostas a diferentes condições de luz em uma cultura *in vitro* (ALVARENGA et al., 2015). Segundo Dong et al. (2014) e Samuolienė et al. (2013) um dos desafios da cultura de tecidos, é fornecer de maneira controlada intensidades de luz, em quantidade e qualidade satisfatórias para o desenvolvimento das plantas.

Normalmente em salas de crescimento, a intensidade luminosa fornecida para as culturas *in vitro* é baixa, mas quando objetiva-se induzir o autotrofismo das plantas cultivadas *in vitro*, pode se tornar necessário o aumento da intensidade luminosa, especialmente quando se pretende utilizar meio de cultivo desprovido de sacarose (KOZAI; NGUYEN, 2003).

Os laboratórios de cultura de tecidos há muito tempo vêm usando fontes de luz artificial em sua produção. A fonte de luz tradicional é a luz branca fluorescente, porém essas lâmpadas possuem um espectro amplo e heterogêneo, que podem comprometer o crescimento das plantas (ALVARENGA et al., 2015; YEH; CHUNG, 2009). As luzes LED (Diodos Emissores de luz) surgiram como tecnologia útil ao serem usadas para promover o crescimento das plantas no ambiente controlado, aumentando a produtividade (BATISTA et al., 2018). O uso de LED tem sido proposto como fonte luminosa para ambientes controlados, pois permitem o controle da

composição espectral e o ajuste da intensidade da luz (LAZZARINI et al., 2017; ROCHA et al., 2013; YEH; CHUNG, 2009). Também torna possível regular e controlar os aspectos fisiológicos da planta, como o crescimento, fotomorfogênese e ou fotossíntese (GUPTA; JATOTHU, 2013); Além de apresentar vantagens em comparação com a fonte de luz tradicional, uma vez que os LEDs têm uma vida longa, especificidade de comprimento de onda e largura de banda estreita, permitindo a visualização da influência de uma faixa de comprimento de onda específica no desenvolvimento da planta (LIN et al., 2011; YEH; CHUNG, 2009).

A faixa do espectro mais importante para os vegetais é conhecida como radiação fotossinteticamente ativa (400 a 700 nm), que indica a porção aproximada da radiação solar que é utilizada pelas plantas. Por exemplo, a luz com comprimentos de onda superiores a 680 nm é muito menos eficiente que a luz com comprimentos de onda mais curtos (TAIZ et al., 2017). O uso de LED permite obter espectro específico e regular os níveis de radiação fotossinteticamente ativos para o cultivo de cada espécie *in vitro* (GUPTA; JATOTHU, 2013).

A produção de metabólitos secundários das plantas é influenciada pela luz, por meio da atividade da fenilalanina amônia-liase que é uma enzima presente na rota de produção dos compostos fenólicos (BACH et al., 2018). Há relatos na literatura dos efeitos da intensidade da luz no crescimento e metabolismo secundário de plantas cultivadas *in vitro*. Andrade et al. (2017) confirmaram que o uso de LED afeta o crescimento das plântulas *Hyptis suaveolens L.* e seus caracteres morfológicos, e ainda que a produção de constituintes voláteis é altamente influenciada pelo tipo de condições de crescimento.

No trabalho de Lazzarini et al. (2018) com *Lippia gracilis Schauer*, confirmaram que a luz é fundamental para o seu cultivo *in vitro*, afetando tanto o seu crescimento quanto a produção de compostos voláteis, que as diferentes condições de luz alteram o perfil dos constituintes voláteis qualitativamente e quantitativamente. Em relação ao cultivo *in vitro* de *A. millefolium*, Alvarenga et al. (2015) observaram que a luz é crítica para seu cultivo, afetando o crescimento e a produção de compostos voláteis, de forma quantitativa e qualitativa, mostrando que ao manipular a luz ambiente, pode-se favorecer a síntese de compostos de interesse.

2.5. Sacarose no cultivo in vitro de plantas

O cultivo *in vitro* de determinada espécie vegetal pode ser afetado por vários fatores, dentre eles, a composição do meio de cultura (REIS et al., 2009). Na cultura de tecidos, o fornecimento de uma fonte de carbono se torna necessária nos meios de cultura devido à heterotrofia das células cultivadas (YASEEN et al., 2013); que está ligado ao fato de que os

frascos utilizados, são fechados com tampas que restringem o processo de trocas gasosas, mantendo alta umidade relativa do ar e baixa concentração de CO₂, juntamente com a baixa intensidade luminosa do ambiente, fazendo com que as plantas se tornem dependentes do açúcar presente no meio. O açúcar, o qual é adicionado ao meio de cultura, é a principal ou única fonte de carbono e energia para o crescimento das plantas *in vitro*, suprimindo a baixa ou negativa taxa fotossintética de plantas (KOZAI; KUBOTA, 2001).

A fonte e dose de açúcar no meio de cultura podem interferir no desenvolvimento *in vitro* de algumas espécies medicinais (MORAIS et al., 2012). Petrova et al. (2015) relataram em seu estudo que o crescimento de *Arnica montana L.* e a produção de produtos primários e metabólitos secundários sofreu influência ao testarem diferentes fontes de carbono. Estudos *in vitro* utilizam amplamente a sacarose como fonte de carbono, que geralmente é considerada a melhor fonte de carboidrato para o crescimento e a diferenciação celular (MOSALEEYANON; CHA-UM; KIRDMANEE, 2004).

O sistema fotoautotrófico, caracterizado pela ausência de sacarose no meio de cultivo, surgiu na busca de reduzir problemas do cultivo *in vitro* e beneficiar a produção de mudas, estimulando as plantas ao comportamento autotrófico e a desenvolverem com eficiência seu aparato fotossintético (XIAO et al., 2011). Plantas cultivadas em sistema heterotrófico desenvolvem tecidos com maior teor de água, brotos e folhas pouco desenvolvidas, e ainda com desordens anatômicas e fisiológicas que não possibilitam que o aparato fotossintético opere normalmente (CHA-UM et al., 2011; XIAO et al., 2011), por isso a necessidade de testar a retirada de sacarose do meio de cultivo.

Ainda que no cultivo com ausência de sacarose, se torne necessário uma maior intensidade de luz e maior concentração de CO₂ para assim promover a fotossíntese das plantas, os custos de produção de plantas micropropagadas podem ser reduzidos significativamente (KOZAI; NGUYEN, 2003). Além do mais, as plantas que são cultivadas *in vitro*, no meio isento de açúcar, a contaminação pode ser consideravelmente reduzida (microorganismos se multiplicam rapidamente no meio contendo açúcar, na maioria dos casos).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais, do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais, situada nas coordenadas geográficas 21° 14' 40''S, 44° 57' 50''O, a 918 m de altitude.

Para a realização dos experimentos, foram retirados explantes de plântulas da espécie *M. arvensis*, já estabelecidas *in vitro* em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com metade da concentração de sais, mantidas em sala de crescimento com fotoperíodo de 16h, sob lâmpada fluorescente com intensidade de $39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, à temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.1. Fase de estabelecimento in vitro

Segmentos nodais (1 cm) de *Mentha arvensis* foram utilizados como explantes para o estabelecimento e lavados em água corrente por 30 minutos. Em seguida, foram imersos em solução de hipoclorito de sódio comercial a 50% e mantidos sob agitação constante, por 15 minutos, seguido de cinco lavagens em água destilada autoclavada. Os explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo a metade da força do MS [14] - ($1/2\text{MS}$) suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose, pH (5,7+0,1), fotoperíodo de 16 h luz/8 h escuro, intensidade luminosa de $39 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$. As plântulas estabelecidas com idade de 30 dias foram multiplicadas no mesmo meio de estabelecimento e mantidas nas mesmas condições de cultivo para formação de um estoque de plântulas que foram usadas nos experimentos. (OLIVEIRA et al, 2020)

3.2. Montagem das membranas porosas utilizadas nas tampas dos recipientes de cultivo

As membranas de politetrafluoroetileno, foram confeccionadas de acordo com Saldanha et al. (2012). As mesmas consistiam de 4 camadas, sendo a primeira de fita microporosa bege Cremer®, a segunda de politetrafluoroetileno Amanco® e a terceira também de fita microporosa bege Cremer®. As três camadas foram cortadas em quadrados de 1 cm² (Figuras 1B, 1C, 1D e 1E, respectivamente). Após recortados, os quadrados foram distribuídos separadamente sobre a face colável da fita microporosa bege Cremer®, totalizando as quatro camadas. Por fim, as camadas foram cortadas homoganeamente em quadrados e coladas sobre os furos de 1,0 cm de diâmetro presentes nas tampas dos recipientes de cultivo (Figuras 1F, 1G, 1H, 1I e 1J, respectivamente).

Figura 1 – Esquema para a montagem das membranas porosas manufactured nas tampas dos recipientes de cultivo (A-J).



Fonte: Duarte (2016).

3.3. Sistema de ventilação natural e intensidade luminosa

Segmentos nodais (± 1 cm), foram excisados de plântulas cultivadas in vitro e inoculadas sob fluxo laminar asséptico, três segmentos por frasco, em frascos de 250 mL, contendo 40 mL de meio de cultura MS com metade da concentração de sais, suplementado com 15g/L de sacarose ou sem adição, 6 g L⁻¹ Agar (Himedia®, tipo I), e pH $5,7 \pm 0,1$.

Os frascos foram autoclavados com o meio de cultivo a 125°C por 20 minutos à 1,2 atm. Foram utilizados o sistema de cultivo convencional (SC) e o sistema de ventilação natural com 4 membrana porosas (SVN4). Após a inoculação, os frascos foram levados para uma sala de crescimento e distribuídos em cinco intensidades luminosas (26, 51, 69, 94 e 130 $\mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$) obtidas com lâmpadas LEDs, em fotoperíodo de 16h e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Um total de quinze tratamentos, sendo três sistemas de cultivo (sistema convencional com sacarose e SVN com quatro membranas suplementado ou não com sacarose) e cinco intensidades de luz (26, 51, 69, 94 e 130 $\mu\text{m m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Após 30 dias as plântulas foram avaliadas quanto ao comprimento da parte aérea (comprimento do broto), biomassa seca do caule (BSC), da folha (BSF), da raiz (BSR), total (BST) e área foliar total (AFT).

Para determinar a matéria seca das plântulas, a secagem foi feita em estufa com circulação forçada a 40°C até atingir peso constante. A área foliar foi feita através de quatro plantas representativas de cada tratamento, sendo uma planta de cada repetição, foi estimada através do software WinFOLIA™ (Regent instruments Inc.). Em cada plântula foi retirado folhas do terço médio e distribuídas no scanner EPSON PERFECTION V700 PIATO.

3.6. Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$), utilizando-se o software R e o pacote estatístico ExpDes (Ferreira; Cavalcanti; Nogueira, 2013). Após verificada a significância das variáveis pelo teste F, as médias das variáveis de crescimento, área foliar, biomassa seca do caule, da folha, da raiz e total foram comparadas pelo teste de Scott- Knot a 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Influência da intensidade luminosa no crescimento de *Mentha arvensis*.

As plântulas *in vitro*, independente do sistema de cultivo, acumularam maior matéria seca em todos os parâmetros avaliados com o aumento da intensidade luminosa. Plântula cultivada na maior intensidade luminosa ($130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) obteve um acúmulo de matéria seca total de 53,21 mg plântula⁻¹ e na menor de 11,67 mg plântula⁻¹, isto corresponde 4,56 a mais do que na menor intensidade ($26 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). No entanto, não houve diferença significativa para comprimento do broto. As plântulas cultivadas nas menores intensidades demonstraram caules mais finos e um estiolamento.

Resultados semelhantes foram encontrados com a espécie *Momordica grosvenori* Swingle *in vitro*, maior peso seco e fresco das plântulas foram relatados nas maiores intensidades luminosas (ZHANG et al., 2009). Silva, 2013 também obteve melhores resultados com maiores intensidades luminosas, em espécie *Aloysia triphylla*. Para comprimento do broto, não foram observados resultados significativos. Resultados semelhantes foram observados em estudo realizado com *Deffenbachia* cultivar camille, em que as plântulas cultivadas *in vitro* apresentaram maior área foliar na maior intensidade de luz (EL-MAHROUK et al., 2015).

A resposta da plântula com diferentes intensidades luminosas, ao acúmulo de matéria seca, é muito dependente do genótipo. Sáez et al (2012) reportaram a importância da intensidade luminosa para o crescimento e no processo fotossintético das plantas. Em situações em que há decréscimo na intensidade luminosa, pode ocorrer redução na atividade fotossintética. Por outro lado, a alta intensidade de luz pode ocasionar fotoinibição, que é um conjunto complexo de

processos moleculares, definidos como a inibição da fotossíntese pelo excesso de luz, sendo reversível nos seus estádios iniciais (TAIZ et al., 2017).

Tabela 1 – Influência da intensidade luminosa (26, 51, 69, 94, 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) no crescimento *in vitro* de *Mentha arvensis*.

Intensidade luminosa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	CB (cm)	AFT (cm^2)	BSC	BSF	BSR	BST
		 mg plântula ⁻¹			
26	3,26 a	5,04 c	2,73 b	6,69 c	2,25 b	11,67 c
51	3,51 a	9,64 b	4,95 b	16,12 b	5,22 b	26,29 b
69	2,88 a	13,75 a	5,29 b	21,69 b	7,20 b	34,18 b
94	3,41 a	10,15 b	5,51 b	16,60 b	6,04 b	28,00 b
130	2,86 a	14,11 a	7,78 a	34,05 a	11,38 a	53,21 a

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0.05$); comprimento do broto (CB); biomassa seca do caule (BSC); folha (BSF); raiz (BSR); total (BST); área foliar total (AFT).

4.2. Influência de membranas porosas e sacarose no crescimento de *Mentha arvensis*.

Em experimento preliminar não ocorreu crescimento do explante com a utilização da tampa sem filtro (convencional) e sem sacarose. Analisando apenas o sistema de cultivo, independente da intensidade luminosa, observa que os frascos sem o filtro na tampa suplementado com 1,5% de sacarose obtiveram as menores biomassas seca das plântulas.

A utilização de membranas porosas possibilita o aumento de trocas gasosas, o que resulta em um aumento nos parâmetros de crescimento das plantas, isso ocorre graças à elevação da concentração de CO_2 dentro do frasco, a redução na concentração de etileno e nos níveis de umidade relativa, fatores que promovem o crescimento da plântula (ZOBAYED et al., 2002; XIAO et al., 2011). Saldanha et al (2012) encontraram resultados semelhantes ao estudarem *Pfaffia glomerata*, onde as melhores respostas de crescimento *in vitro* foram observadas ao aumentar a concentração de CO_2 no meio de cultivo. Esses resultados podem estar associados ao aumento da disponibilidade de CO_2 no frasco, que resulta no aumento da fotossíntese. Observou-se que no sistema com membranas os valores de área foliar foram maiores, independente da presença ou ausência de sacarose. Resultados semelhantes foram encontrados por Iarema et al. (2012) observaram que no cultivo *in vitro* de *Pfaffia glomerata*

houve um aumento nos índices de área foliar e número de folhas, ao utilizarem uma ou duas membranas porosas, independente da presença ou ausência de sacarose.

A sacarose interfere em vários processos importantes, principalmente fotossintéticos. Quando disponibilizado sacarose exógena a planta deixa de abrir os estômatos, não faz tantas trocas gasosas porque é desnecessário, e isso interfere diretamente na taxa fotossintética. Segundo Souza et al. (2014) quanto maior a área foliar, maior a taxa fotossintética das plantas.

Em relação ao teor de sacarose, os tratamentos onde utilizou as membranas porosas com quatro filtros, não houve diferença significativa. Quando se utiliza membranas porosas, a plântula passa de heterotrófica para autotrófica, onde não necessita que disponibilize a sacarose, pois consegue metabolizar o seu nutriente.

Martins et al. (2015) reportaram o impacto da sacarose e da troca gasosa em plântulas de *Billbergia zebrina* propagadas *in vitro*. Onde as condições fotoautotróficas induziram plântulas de *B. zebrina* a crescerem e se desenvolverem sem desordens anatômicas e fisiológicas, e ainda interferem positivamente no crescimento da plântula *ex vitro*. Em outro trabalho, com *Miltonia flavescens*, obteve a maior massa fresca total calculada (0,30g) em meio MS 1/2 suplementado com 25g L⁻¹ de sacarose, sendo que concentrações do açúcar superiores a esta reduziram a biomassa (LEMES., 2016), isso explica porque diminuir as concentrações de sacarose, desde que adicionado membranas porosas para que possa haver as trocas gasosas. No entanto, comprimento do broto não diferiu do SVN4 suplementado com sacarose (Tabela 2).

Tabela 2 – Influência de membranas porosas e sacarose no cultivo *in vitro* de *Mentha arvensis*.

Sistema de cultivo	CB	AFT	BSC	BSF	BSR	BST
	(cm)	(cm ²) mg plântula ⁻¹			
SC e 1,5% sacarose	3,29 a	8,20 b	3,26 c	12,27 b	3,28 b	18,81 b
SVN4 e 0% sacarose	2,41 b	12,09 a	5,10 b	22,22 a	8,98 a	36,19 a
SVN4 e 1,5% sacarose	3,69 a	12,73 a	7,87 a	25,71 a	8,35 a	41,92 a

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0.05$). SC: sistema de cultivo convencional; SVN4: sistema de ventilação natural com 4 filtros; comprimento do broto (CB); área foliar total (AFT); biomassa seca do caule (BSC); folha (BSF); raiz (BSR); total (BST);

4.3. Efeito do sistema de cultivo e intensidades luminosas no cultivo *in vitro* de *Mentha arvensis*

A luz é fator muito importante para o crescimento das plântulas *in vitro*. As diferentes intensidades de fluxo de fótons com ou sem sacarose afetaram significativamente a biomassa seca das plântulas. Segundo Larcher (2004), plantas que crescem sob forte radiação possuem metabolismo mais ativo e desenvolvem folhas espessas, proporcionando maior produção de matéria seca.

A intensidade de luz de $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ demonstrou ser a melhor para o desenvolvimento das plântulas. Comparando a matéria seca total no sistema de cultivo sem as membranas porosas (SC) suplementado com 1,5% de sacarose (25,79 mg plântula⁻¹) e o sistema com quatro filtros (SVN4) sem sacarose (70,15 mg plântula⁻¹), ambos na intensidade de $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, o ganho foi de 2,7 vezes a mais sem açúcar e quatro filtros. Isto mostra que a plântula de *M. arvensis* desenvolve bem no sistema fotoautotrófico. Porque aumenta o acúmulo de CO₂ no interior do frasco possibilitando o crescimento fotoautotrófico e melhora o funcionamento dos estômatos. Com isto obtém-se uma plântula mais vigorosa facilitando o processo de aclimatização da plântula. Quando o meio foi suplementado com sacarose no SVN4 ocorreu uma perda na biomassa seca total de 10%. Andrade et al. (2017) encontraram resultados semelhantes, ao avaliar o efeito de reguladores de crescimento e diferentes intensidades luminosas, no crescimento de plântulas *Hyptis suaveolens in vitro* e na produção de compostos voláteis, mostrando que a maior intensidade de luz favorece o crescimento e a morfogênese. Estes resultados podem ser explicados devido à taxa de fotossíntese, que ocorre de maneira ineficiente em situações de baixa luminosidade (TAIZ et al., 2017).

A folha é um órgão importante na realização de fotossíntese e maior área foliar pode ocorrer maior acúmulo de matéria seca. Neste caso, a área foliar em SVN4 sem sacarose foi de 1,71 vezes a mais do que SC com sacarose. Assim, todos os órgãos da plântula foram beneficiados no acúmulo de matéria seca no SVN4 sem sacarose, onde a biomassa seca de folha foi 2,21, do caule 3,03 e da raiz 4,94 a mais do que SC com sacarose. Shin et al. (2013) reportaram que o crescimento fotoautotrófico *in vitro* poder ser promovido aumentando a concentração de CO₂ e a intensidade da luz. Saldanha et al. (2013) encontraram resultados semelhantes, ao avaliarem os efeitos da ventilação forçada e do enriquecimento de CO₂ no crescimento e desenvolvimento de *Pfaffia glomerata*, quando cultivada *in vitro* em meio de cultura sem sacarose, o enriquecimento de CO₂ apresentou um aumento no número de folhas e na área foliar. Em outro trabalho, Sáez et al. (2012) em seu trabalho com *Castanea sativa*,

verificaram que a cultura sob luz intensa ($150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e ventilação natural aumentou a capacidade de resposta dos estômatos, e aumentou a capacidade das plantas em controlar a perda de água. Isso pode favorecer a aclimatização às condições *ex vitro*, evitando dessecações excessivas das plantas micropropagadas após o transplante e tornando mais favorável a sua adaptação.

Quanto ao comprimento de broto, associado a todos os fatores de cultivo, os maiores comprimentos foram com menores intensidades de luz (Tabela 3). Este resultado pode ser explicado devido ao aumento da dominância apical (TAIZ & ZEIGER 2017). Assim, corrobora para maiores níveis de auxina, em decorrência do decréscimo de fotoassimilados e a luz age, portanto, como um sinal para induzir uma mudança na forma da plântula. E possibilita, de maneira eficiente, que a planta capte energia luminosa e converta essa energia nos açúcares, proteínas e lipídeos essenciais e necessários ao crescimento, por isso ocorre o estiolamento. As plântulas de *Mentha arvensis* obtiveram melhores desenvolvimento nas maiores intensidades luminosa, com maiores biomassas e área foliar, e nas menores intensidades caules mais finos e estiolados como pode ser observado na (Figura 1 e Tabela 3).

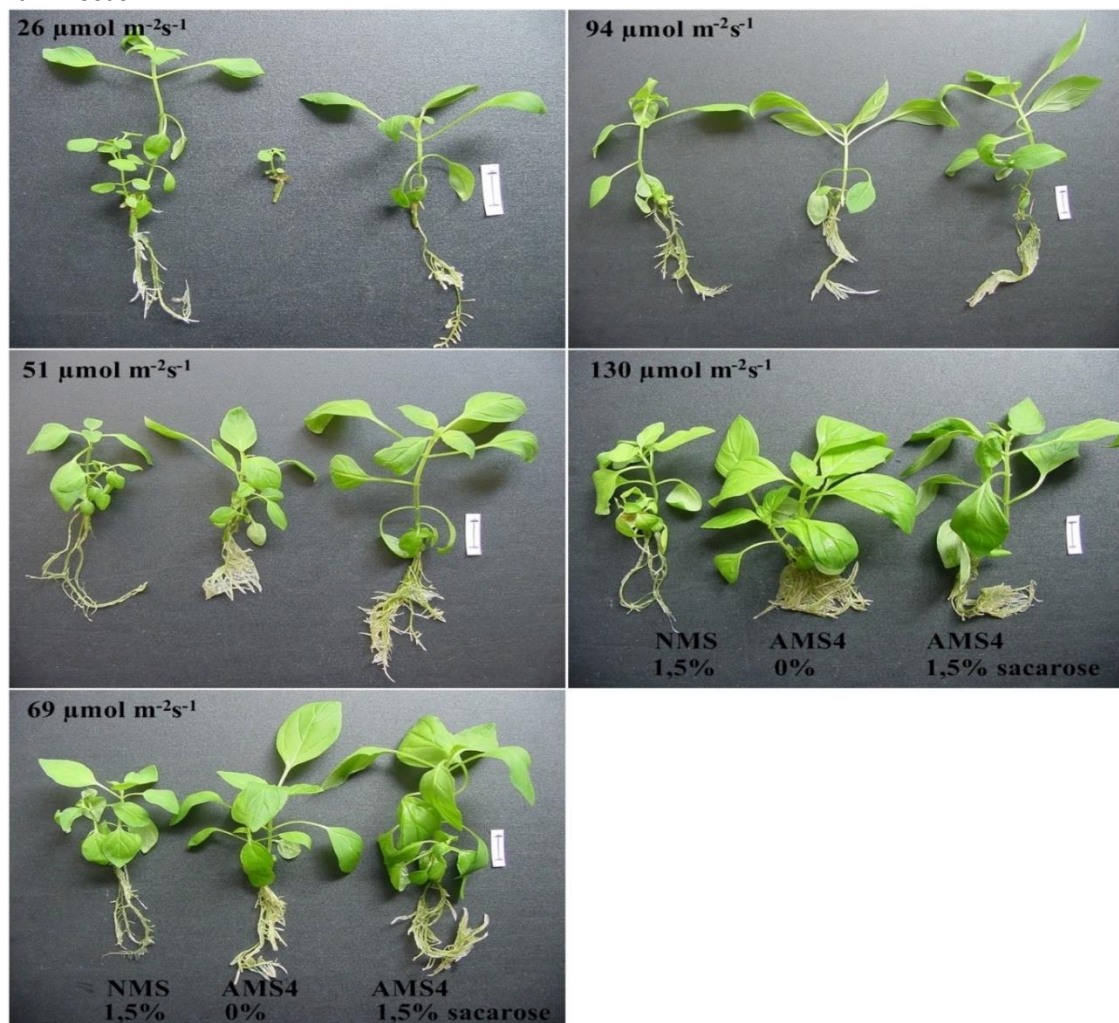
Tabela 3 – Efeito do sistema de cultivo (convencional – SC e quatro filtros – SVN4), com ou sem sacarose e cultivados em diferentes intensidades luminosas no crescimento *in vitro* de *Mentha arvensis*.

Sistema de cultivo	Intensidade luminosa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	CB (cm)	AFT (cm^2)	BSC (mg)	BSF (mg)	BSR (mg)	BST (mg) mg plântula ⁻¹
SC e	26	4,27 a	4,21 c	2,73 c	5,60 f	2,13 f	10,47 g	
1,5% sacarose	51	2,77 c	8,67 b	2,70 c	9,13 f	2,49 f	14,32 g	
	69	2,78 c	9,91 b	3,70 c	15,73 d	3,88 e	23,31 f	
	94	4,02 b	9,39 b	3,94 c	12,10 e	4,10 e	20,14 f	
	130	2,59 c	8,82 b	3,23 c	18,78 d	3,78 e	25,79 e	
SVN4 e	26	-	-	-	-	-	-	
0% sacarose	51	3,05 c	8,26 b	3,35 c	16,10 d	4,35 e	23,80 f	
	69	2,06 d	15,39 a	3,48 c	17,65 d	7,75 d	28,88 e	
	94	1,98 d	9,68 b	3,78 c	13,48 e	5,10 e	21,94 f	

	130	2,55 c	15,05 a	9,80 a	41,65 a	18,70 a	70,15 a
SVN4 e	26	2,26 d	5,86 c	2,73 c	7,78 f	2,37 f	12,88 g
1,5% sacarose	51	4,73 a	12,00 b	8,80 b	23,13 c	8,81 d	40,74 d
	69	3,80 b	15,95 a	8,70 b	31,69 b	9,98 c	50,37 c
	94	4,23 a	11,40 b	8,80 b	24,22 c	8,92 d	41,94 d
	130	3,45 b	18,46 a	10,31 a	41,73 a	11,65 b	63,68 b

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0.05$); SC: sistema de cultivo convencional; SVN4: sistema de ventilação natural com 4 filtros; comprimento do broto (CB); biomassa seca do caule (BSC); folha (BSF); raiz (BSR); total (BST); área foliar total (AFT).

Figura 1 – Crescimento *in vitro* de *Mentha arvensis* sob diferentes sistema de cultivo e intensidades luminosas.



Fonte: José Eduardo Brasil (2019).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi obtido resultados satisfatórios e poderia se pensar na possibilidade em se fazer um novo trabalho utilizando os tratamentos com maiores e menores médias juntamente com cinco tratamentos controles (por ser cinco intensidades de luz) e avaliar clorofila e fração volátil.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que o uso de SVN com 4 membranas, sem adição de sacarose e associado a maior intensidade luminosa ($130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) obteve maior área foliar e aumento de biomassa seca de *Menta arvensis* no cultivo *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ABREU, I. N. de; PINTO, J. E. B. P.; BETOLUCCI, S. K. V. et al. Propagação *in vivo* e *in vitro* de *Cissus sicyoides*, uma planta medicinal. **Acta Amazonica, Manaus**, v. 33, n. 1, p. 1-7, jan./mar. 2003.
- ALICEWEB – Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior. 2012, 31 de outubro. **Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior**. Disponível em <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>
- ALVARENGA, I. C. A.; PACHECO, F. V.; SILVA, S. T.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J. E. B. P. *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 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.
- ANDRADE, H. B. et al. Effect of plant growth regulators, light intensity and LED on growth and volatile compound of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit *in vitro* plantlets. **Acta Horticulturae**, v. 1155, p. 277–284, 2017.
- BACH, A. et al. The importance of applied light quality on the process of shoot organogenesis and production of phenolics and carbohydrates in *Lachenalia* sp. cultures *in vitro*. **South African Journal of Botany**, v. 114, p. 14–19, 2018.
- BANDEIRA, J. M. et al. Diferentes tipos de vedações dos frascos e concentrações de sacarose na micropropagação de *thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 472-474, 2007.
- BATISTA, D. S.; et al. Light quality in plant tissue culture: does it matter? **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 54, n. 3, p. 195-215, 2018

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A (eds). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: **Embrapa-SPI/Embrapa-CNPB**, 1998. p. 87-132

CHAGAS, J. H.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; NALON, F. H. Produção de mudas de hortelã-japonesa em função da idade e de diferentes tipos de estaca. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 21572163, 2008.

CHANDRA, S. *et al.* Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 9, p. 1199–1205, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10529-010-0290-0>>.

CHA-UM, S. *et al.* Promoting root induction and growth of *in vitro* macadamia (*Macadamia tetraphylla* L. 'Keauu') plantlets using CO₂-enriched photoautotrophic conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 106, n. 3, p. 435, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11240-011-9940-8>>.

CHEN, Chiachung. Application of growth models to evaluate the microenvironmental conditions using tissue culture plantlets of *Phalaenopsis Sogo Yukidian 'V3'*. **Scientia Horticulturae**, v. 191, p. 25-30, 2015.

COSTA, A. G. et al. Crescimento vegetativo e produção de óleo essencial de hortelã-pimenta cultivada sob malhas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 4, p. 534– 540, 2012.

COSTA, A. G.; CHAGAS, J. H. Níveis de sombreamento e tipos de malha no crescimento e produção de óleo essencial de hortelã-pimenta. **Horticultura Brasileira**, v. 32, p. 194–199, 2014.

DESCHAMPS, C.; PINTO, J. E. B. P. Enraizamento *in vitro* de microestacas e micropropagação de gemas axilares de sarandi (*Sebastiania schottiana* MUELL. ARG.). **Ciência Rural**, v. 25, p. 389-393, 1995

DONG, Chen et al. Low light intensity effects on the growth, photosynthetic characteristics, antioxidant capacity, yield and quality of wheat (*Triticum aestivum* L.) at different growth stages in BLSS. **Advances in Space Research**, Saint-Mandé, v. 53, n. 11, p. 1557-1566, Jun. 2014.

EL-MAHROUK, M. E. et al. Effect of photosynthetic photon flux density on growth, photosynthetic competence and antioxidant enzymes activity during *ex vitro* acclimatization of *Dieffenbachia* cultivars. **Plant Growth Regulation**, v. 79, n. 1, p. 29–37, 2015.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 961-965, 2005.

FERREIRA, E. B., CAVALCANTI, P. P., NOGUEIRA, D. A. ExpDes: **Experimental Designs pacakge**. R package version 1.1.2. 2013.

FERNANDEZ-GARCIA, N. et al. ROS as biomarkers of hiperhydricit. In: GUPTA, D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. **London Local: Sciences Publishers**, 2011. Cap.12, p. 249-272.

FUKUDA, N. Advanced light control technologies in protected horticulture: A review of morphological and physiological responses in plants to light quality and its application. **Journal of Developments in Sustainable Agriculture**, v. 8, n. 1, p. 32–40, 2013.

GRISI MCM; SILVA DB; ALVES RBN; GRACINDO LAMB; VIEIRA RF. 2006. Avaliação de genótipos de Menta (*Mentha spp*) nas condições do Distrito Federal, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 8: 33-39.

GUPTA, S. D.; JATOTHU B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) *in vitro* plant growth and morphogenesis. **Plant Biotechnology**, p. 211–220, 2013.

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

IVANOVA, M.; STADEN, J. V. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schonland ex Pillans. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 60, n. 2, p. 143-150, Mar. 2010.

IAREMA, Lourdes et al. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 110, n. 2, p. 227-238, 2012.

IBARAKI, Y.; NOZAKI, Y. Estimation of light intensity distribution in a culture vessel. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 80, n. 1, p. 111–113, 2005.

KIFERLE, C. et al. *In vitro* culture of sweet basil: gas exchanges, growth, and rosmarinic acid production. **Biologia Plantarum**, v. 58, p. 601-610, 2014.

KNUDSON, L. A. New nutrient solution for germination of orchid seeds. **American orchid Society Bulletin**, v.15, p.214-217, 1946

KOPSELL, D. A.; SAMS, C. E. Increases in Shoot Tissue Pigments, Glucosinolates, and Mineral Elements in Sprouting Broccoli after Exposure to Short-duration Blue Light from Light Emitting Diodes. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 138, n. 1, p. 31–37, 2013.

KOZAI, Toyoki. Photoautotrophic Micropropagation - Environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 10, n. 4, p. 188–204, 2010.

KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A. Photoautotrophic (sugar free medium) micropropagation and transplant production system. 1. ed. **The Netherlands: Springer**, 316 p., 2005.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, Saitama City, v.114, p.525-537, 2001.

KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T. Photoautotrophic Micropropagation of Woody and Tropical Plants. In: Jain S.M., Ishii K. (eds) Micropropagation of Woody Trees and Fruits. **Forestry Sciences**, v. 75, p. 757–781, 2003.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; AITKEN, K. S.; GROF, C. L. P.; BONNETT, G. H.; SMITH, R. S. Invited review: sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 41, p. 345363, 2005

LARCHER, Walter. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: RiMa. 531p. 2004.

LAZZARINI, L. E. S. et al. Quality and intensity of light affect *Lippia gracilis* Schauer plant growth and volatile compounds in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 0, p. 1-13, 2018.

LAZZARINI, L. E. S.; PACHECO, F. V.; SILVA, S. T.; COELHO, A. D.; MEDEIROS, A. P. R.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J. E. B. P.; SOARES, J. D. R. Uso de diodos emissores de luz (LED) na fisiologia de plantas cultivadas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 16, n. 2, p. 137–144, 2017.

LEMES, C. S. R.; SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J.; Meios de cultivo e sacarose no crescimento inicial *in vitro* de *Miltonia flavescens*. **Ciência Rural**, v.46, n.3, mar, p. 1-7, 2016.

LIN, Y. et al. Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of *Dendrobium officinale* *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, n. 3, p. 329–335, 2011.

LIMA, C. S. M. et al. Influência de fitoreguladores no crescimento *in vitro* de partes aérea de *Mentha viridis*. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.2, p.669-71, 2007.

MACEDO, A. F. et al. The effect of light quality on leaf production and development of *in vitro*-cultured plants of *Alternanthera brasiliana* Kuntze. **Environmental and Experimental Botany**, v. 70, n. 1, p. 43–50, 2011.

MARTINS, J. P. R. et al. Impacts of photoautotrophic and photomixotrophic conditions on *in vitro* propagated *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 123, n. 1, p. 121–132, 2015.

MIGUEL, C.; MARUM, L. An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 11, p. 3713-3725, 2011.

MORAIS, T. P. et al. Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 110-121, 2012.

MOREIRA, A. L. et al. *Cattleya walkeriana* growth in different micropropagation systems. **Ciência rural**, v. 43, p.1804-1810, 2013.

MOSALEEYANON, K.; CHA-UM, S.; KIRDMANEE, C. Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets *in vitro* under a CO₂-enriched

condition with decreased sucrose concentrations in the medium. **Scientia Horticulturae**, v. 103, n. 1, p. 51–63, 2004.

MUNEER, S.; KIM, E. J.; PARK, J. S.; LEE, J. H. Influence of green, red and blue light emitting diodes on multiprotein complex proteins and photosynthetic activity under different light intensities in lettuce leaves (*Lactuca sativa L.*). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 3, p. 4657–4670, 2014.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant**, v. 15, p. 473-497, 1962.

Oliveira, T. et al. Elicitação com quitosana no crescimento e nos compostos voláteis de *Mentha arvensis in vitro*. **Scientia Plena**, v. 16, num. 4, p. 01-09, 2020.

PASQUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, p. 201-214, 2001.

PEÑA-RAMÍREZ, Y. et al. Tissue culture methods for the clonal propagation and genetic improvement of Spanish red cedar (*Cedrela odorata*). **Plant Cell Culture Protocols**, p. 129141, 2012.

PEREIRA, F. D.; PINTO, J. E. B. P.; ROSADO, L. D. S.; RODRIGUES, H. C. A.; BERTOLUCCI, S. K. V.; LAMEIRA, A. O. Micropropagation of the fiber-rich Amazonian species *Ananas erectifolius* (Bromeliaceae). **HortScience**, v. 43, p. 2134-2137, 2008.

PEREIRA, A. M. S. Recursos genéticos e conservação de plantas medicinais do cerrado. PEREIRA, A.M.S. **Cultura de Tecidos de plantas medicinais**. 2009.

PINTO, J. E. B. P. et al. Crescimento *in vitro* de hortelã-japonesa em função de diferentes concentrações de sais e de número e tipo de explante. **Rev. Ci. Agra.**, v.54, n.3, p.267-273, Set/Dez 2011.

POOVAIAH, C.R.; WELLER, S.C.; JENKS, M.A. Adventitious shoot regeneration of scotch spearmint (*Mentha x gracilis* Sole) *in vitro*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.42, p.354-8, 2006.

REIS, É. S. et al. Content and chemical composition of the essential oil of *Melissa officinalis L. in vitro* under the influence of the culture medium. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 2, p. 331–335, 2009.

ROCHA, P. S. G.; OLIVEIRA, R. P.; BASTOS, C. R.; SCIVITTARO, W. B. Diodos emissores de luz (LEDs) na micropropagação de amoreira-preta cv . Tupy. **Horticultura Argentina**, v. 32, n. 79, p. 14–19, 2013.

SÁEZ, P. L. et al. Increased light intensity during *in vitro* culture improves water loss control and photosynthetic performance of *Castanea sativa* grown in ventilated vessels. **Scientia Horticulturae**, v. 138, p.7-16, 2012.

- SALDANHA, C. W. et al. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 110, n. 3, p. 413-422, 2012.
- SALDANHA, C. W. et al. A CO₂ - enriched atmosphere improves *in vitro* growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng .) Pedersen]. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 49, p. 433-444, 2013.
- SCHUELTER, A. R.; LUZ, C. L.; SCHERER, A. M.; SOUZA, C. S.; STEFANELLO, S. Disponibilidade de luz, tipo de vedação e de frasco na germinação e crescimento inicial *in vitro* de plântulas de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 3, p. 183–190, 2015
- SHIN, K. S.; PARK, S. Y.; PAEK, K. Y. Sugar metabolism, photosynthesis, and growth of *in vitro* plantlets of *Doritaenopsis* under controlled microenvironmental conditions. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 49, n. 4, p. 445–454, 2013.
- SILVA, G. M. DA. Micropropagação e produção de constituintes voláteis *in vitro* de *Aloysia triphylla* (L' Hérit) Britton. 2013. 113 p. **Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras**, Lavras, 2013.
- SOUZA, F. C. F et al. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 4, p. 642-654, 2008.
- SOUZA, G. S.; SILVA, J. S.; OLIVEIRA, U. C.; NETO, R. B. S.; SANTOS, A. R. Crescimento vegetativo e produção de óleo essencial de plantas de alecrim cultivadas sob telas coloridas. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 3, p. 232–239, 2014.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2017.
- TIAN, J.; CHENG, Y.; KONG, X.; LIU, M.; JIANG, F.; WU, Z. Induction of reactive oxygen species and the potential role of NADPH oxidase in hyperhydricity of garlic plantlets *in vitro*. **Protoplasma**, v. 254, p. 379-388, 2017.
- TERMIGNONI, R.R. **Cultura de Tecidos Vegetais**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 182 p., 2005.
- The Plant List (2013). Versão 1.1. Publicado na Internet; <http://www.theplantlist.org/> (acessado em julho/2020).
- US-CAMAS, R. et al. *In vitro* culture: an epigenetic challenge for plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, London, v. 118, n. 2, p. 187-201, 2014
- VAHDATI, K.; HASSANKHAH, A. Developing a photomixotrophic system for micropropagation of *Persian walnut*. **Acta Hortic**. v. 1050, p. 181-187, 2014.
- VASCONCELOS, A. G. V. DE et al. Hiperidricidade: uma desordem metabólica. **Ciência Rural**, v. 42, n. 5, p. 837–844, 2012.

VIEIRA, M. L. C. Conservação de Germoplasma *in vitro*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, n. 14, 2000.

VIEIRA, M. L. C. Conservação de germoplasma *in vitro*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, D.F., v. 3, n. 14, 2006. p. 18-20.

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

YASEEN, M.; et al. Review: role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. **Molecular Biology Reports**, v. 40, p. 2837–2849, 2013.

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.; ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Multiple shoot induction and leaf and flower bud abscission of *Annonacultures* as affected by types of ventilation. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 69, n. 2, p. 155-165, 2002.

ZHANG, M.; ZHAO, D.; MA, Z.; LI, X.; XIAO, Y. Growth and photosynthetic capability of *momordica grosvenori* plantlets grown photoautotrophically in response to light intensity. **HortScience**, v. 44, n. 3, p. 757–763, 2009.