



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO – UEMA
CENTRO DE ESTUDOS SUPERIORES DE BALSAS - CESBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE -
PPGAA**

MARIA LUARA ARAGÃO SILVA

**INTENSIDADES DE LUZ, TIPOS DE VEDAÇÃO E CONCENTRAÇÕES DE
SACAROSE NO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO *in vitro* DE PATA
DE VACA (*Bauhinia forficata* Link)**

Balsas – MA
2021

MARIA LUARA ARAGÃO SILVA

INTENSIDADES DE LUZ, TIPOS DE VEDAÇÃO E CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE NO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO *in vitro* DE PATA DE VACA (*Bauhinia forficata* Link)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente – PPGAA/CESBA/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agricultura e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Diego Silva Batista

Coorientadores:

Prof. Dr. Francisco Eduardo Aragão Catunda Junior

Prof^ª. Dr^ª. Thais Roseli Corrêa

Balsas – MA
2021

Silva, Maria Luara Aragão.

Intensidades de luz, tipos de vedação e concentrações de sacarose no crescimento e desenvolvimento *in vitro* de pata de vaca (*Bauhinia fortificata* Link) / Maria Luara Aragão Silva. – Balsas, MA, 2022.

51 f

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente, Centro de Estudos Superiores de Balsas, Universidade Estadual do Maranhão, 2022. Orientador: Prof. Dr. Diego Silva Batista.

1.Fotomixotrófico. 2.Germinação *in vitro*. 3.Metabólitos secundários. 4.Micropropagação. 5.Espécie medicinal. I.Título.

CDU: 633.88-153

Elaborado por Giselle Frazão Tavares - CRB 13/665

MARIA LUARA ARAGÃO SILVA

INTENSIDADES DE LUZ, TIPOS DE VEDAÇÃO E CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE NO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO *in vitro* DE PATA DE VACA (*Bauhinia forficata* Link)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente – PPGAA/CESBA/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agricultura e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Diego Silva Batista

Coorientadores:

Prof. Dr. Francisco Eduardo Aragão Catunda Junior

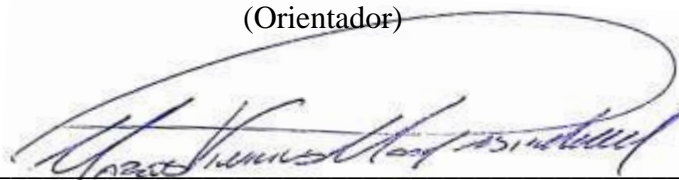
Prof^a. Dr^a. Thais Roseli Corrêa

Aprovada em 28/10/2021

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Diego Silva Batista
Universidade Federal da Paraíba
(Orientador)



Prof. Dr. Marcos Vinícius Marques Pinheiro
Universidade Estadual do Maranhão



Dr. Elyabe Monteiro de Matos
Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual do Maranhão e ao Programa de Pós Graduação em Agricultura e Ambiente, por toda disponibilidade e oportunidade, agregando no meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão, pela bolsa de pesquisa concedida.

Ao meu querido orientador, por toda a paciência, disposição, ensinamentos e um exemplo de pessoa e profissional que eu quero seguir.

A professora Thais que sempre foi um apoio para mim, uma pessoa incrível e solícita, na qual tenho muita admiração.

Ao professor Eduardo Aragão, por todo compartilhamento de conhecimentos e aprendizagens.

Ao professor Odair Monteiro pelo apoio em análises e pesquisas realizadas no laboratório de química da Universidade Federal do Maranhão.

Ao professor Marcos Vinícius Pinheiro pela disponibilidade em transmitir seu conhecimento, sempre prestativo acrescentando muito na formação da minha escrita.

Ao meu querido e amado Justo Bernardo Martinez Flecha, pelo apoio em todos os momentos da minha vida, agradeço pela contribuição na realização desse projeto.

Ao grupo de pesquisa do laboratório de cultura de tecidos vegetais, em especial a TÁCILA, GIVAGO, KARINA e JULIANA por terem tornado os meus dias em São Luís mais divertidos e produtivos.

À minha turma da pós-graduação em Agricultura e Ambiente por compartilharmos momentos de alegria e por toda nossa união.

Às minhas amigas Amanda, Luana, Mayanne e Dayanne pelas palavras de apoio e força, nos meus momentos difíceis.

A todos que de certa forma contribuíram na realização desse trabalho, sou imensamente grata.

RESUMO

Bauhinia forficata Link, é uma espécie propagada em regiões da África, Ásia e a América do Sul, ocorrência nativa no Brasil nas regiões litorâneas Sul e Sudeste, também áreas montanhosas no nordeste brasileiro. Suas folhas são utilizadas na medicina popular no controle da diabetes, o óleo essencial é um eficiente antifúngico natural, possuem ação diurética, hipoglicemia e antioxidante. Esse trabalho objetivou-se avaliar a intensidades de luz, tipos de vedação e concentrações de sacarose adicionadas ao meio de cultura no crescimento e desenvolvimento *in vitro* de pata de vaca (*Bauhinia forficata* Link). Para isso, o experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, esquema fatorial 2x2x3 (duas intensidades de luz – IL, (43 ou 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), dois tipos de vedação (TV), tampas de polipropileno, com membranas (CM) ou sem membranas (SM) e três concentrações de sacarose (CS) de 0, 20 ou 30 g. L⁻¹, totalizando 12 tratamentos e 4 repetições para cada. No experimento foram utilizados três segmentos nodais das plantas germinadas em um frasco de vidro de 350 mL, contendo 50 ML de meio MS, 100 mg L⁻¹ de mio - Inositol; 0,54 μM de ácido naftalenoacético (ANA); sacarose adicionado de acordo ao tratamento (0, 20 e 30 g. L⁻¹); 2 g. L⁻¹ de Phytigel TM® (Sigma-Aldrich). Representando cada frasco uma repetição os quais foram distribuídas e submetidas de acordo com cada tratamento. Aos 45 dias foram avaliados massa fresca da parte aérea (MFPA, mg), massa seca da parte aérea (MSPA, mg), massa fresca da raiz (MFR, mg), massa seca da raiz (MSR, mg), comprimento de planta (CP, mm), largura da folha (LF, mm), comprimento da folha (CF, mm), número de folhas por planta (NF) e número de brotos (NB). Foi observado diferença significativa ($P \leq 0.05$) à medida que aumentava a concentração de sacarose nas variáveis número de brotos (NB), comprimento de planta (CP, mm), massa fresca da parte aérea (MPAF) e massa fresca da raiz (MFR). O tipo de vedação (TV) influenciou na massa fresca e seca da parte aérea e raiz, no comprimento e desenvolvimento da planta ($P \leq 0.05$), sendo observados maiores valores na utilização do tipo de vedação com membranas (CM) quando comparado aos sem membranas (SM) nas variáveis comprimento de planta (CP, mm), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca da raiz (MFR), largura de folha (LF), comprimento de folha (CF) e número de folha (NF). Na Intensidade de Luz (IL) 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentaram maior número de brotos, comprimento de planta (CP), massa fresca da parte aérea (MFPA) e massa fresca da raiz (MFR) quando comparado com Intensidade de Luz (IL) 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Plantas de *Bauhinia forficata* Link cultivadas *in vitro* tiveram uma melhor reposta para crescimento e desenvolvimento de explante com o tipo de vedação com membranas (CM) e intensidade de luz (IL) 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Palavras-chave: Membranas permeáveis, cultivo *in vitro*, fotomixotrófico, luminosidade, trocas gasosas.

ABSTRACT

Bauhinia forficata Link, is a species propagated in regions of Africa, Asia and South America, native to Brazil in the coastal regions of the South and Southeast, also mountainous areas in northeastern Brazil. Its leaves are used in folk medicine to control diabetes, the essential oil is an efficient natural antifungal, it has a diuretic, hypoglycemic and antioxidant action. The objective of this work was to evaluate the light intensities, sealing types and sucrose concentrations added to the culture medium in the *in vitro* growth and development of pata de vaca (*Bauhinia forficata* Link). For this, the experiment was conducted in a completely randomized design, 2x2x3 factorial scheme (two light intensities - IL, (43 or 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), two types of sealing (TV), polypropylene lids, with membranes (CM) or without membranes (SM) and three sucrose concentrations (CS) of 0, 20 or 30 g. L^{-1} , totaling 12 treatments and 4 repetitions for each. The experiment used three nodal segments of the germinated plants in a flask glass of 350 mL, containing 50 ML of MS medium, 100 mg. L^{-1} of myo - Inositol; 0.54 μM of naphthaleneacetic acid (NAA); sucrose added according to the treatment (0, 20 and 30 g. L^{-1}); 2 g. L^{-1} of Phytigel TM® (Sigma-Aldrich). Each bottle represents a repetition which were distributed and submitted according to each treatment. At 45 days, fresh mass of the aerial part (MFPA, mg) was evaluated, shoot dry mass (MSPA, mg), root fresh mass (MFR, mg), root dry mass (MSR, mg), plant length (CP, mm), width leaf ure (LF, mm), leaf length (CF, mm), number of leaves per plant (NF) and number of shoots (NB). Sucrose concentration in the variables number of shoots (NB), plant length (CP, mm), fresh mass of the aerial part (MFPA) and root fresh mass (MFR). The type of seals (TV) influenced the fresh and dry mass of the aerial part and root, the length and development of the plant ($P \leq 0.05$), with higher values being observed in the use of the seal type with membrane (CM) when compared to those without membrane (SM) in the variables plant length (CP), shoot fresh mass (MFPA), root fresh mass (MFR), leaf width (LF), leaf length (CF) and sheet number (NF). In light intensity (IL) 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ showed higher number of shoots, plant length (CP), shoot fresh mass (MFPA) and root fresh mass (MFR) when compared with luminous intensity (IL) 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. *In vitro* cultivated *Bauhinia forficata* Link plants had a better response for growth and explant development with the membrane seal type (CM) and light intensity (IL) 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Keywords: Permeable membranes, *in vitro* culture, photomixotrophic, luminosity, gas exchange.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Número de brotos da espécie *Bauhinia forficata* - pata de vaca, após 45 dias de crescimento in vitro. A – intensidades de luz; B – concentração de sacarose. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). 33
- Figura 2.** Aspecto geral da espécie *Bauhinia forficata* - pata de vaca, após 45 dias de crescimento in vitro, em diferentes intensidades de luz, tipos de vedação e concentrações de sacarose. Barra: 1 mm. 34
- Figura 3.** Comprimento da planta da espécie *Bauhinia forficata* - pata de vaca, após 45 dias de crescimento in vitro. A – Intensidades de luz; B – tipos de vedação; C – concentração de sacarose. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$)..... 35
- Figura 4.** Massa fresca da parte aérea da espécie *Bauhinia forficata* - pata de vaca, após 45 dias de crescimento in vitro. A – intensidades de luz; B – tipos de vedação; C – concentração de sacarose. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). 35
- Figura 5.** Massa seca da parte aérea da espécie *Bauhinia forficata* - pata de vaca, após 45 dias de crescimento in vitro. A – intensidades de Luz; B – tipos de vedação; C – concentração de sacarose. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). 36
- Figura 6.** Massa fresca de raiz da espécie *Bauhinia forficata* - pata de vaca, após 45 dias de crescimento in vitro. A – intensidades de luz; B – tipos de vedação; C – concentração de sacarose. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0.05$). 38
- Figura 7.** Massa seca de raiz da espécie *Bauhinia forficata* - pata de vaca, após 45 dias de crescimento in vitro. A – intensidades de luz; B – tipos de vedação; C – concentração de sacarose. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0.05$). 39
- Figura 8.** Largura de folha da espécie *Bauhinia forficata* - pata de vaca, após 45 dias de crescimento in vitro. A – intensidades de luz; B – tipos de vedação; C – concentração de sacarose. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0.05$). 41
- Figura 9.** Comprimento de folha da espécie *Bauhinia forficata* - pata de vaca, após 45 dias de crescimento in vitro. A – Intensidades de luz; B – tipos de vedação; C – concentrações de sacarose. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0.05$). 42
- Figura 10.** Folha por planta da espécie *Bauhinia forficata* - pata de vaca, após 45 dias de crescimento in vitro. A – tipos de vedação. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0.05$). 43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Resumo da análise de variância com quadrados médios para os efeitos da Intensidades de Luz (IL), tipos de vedação (TV) e concentrações de sacarose (CS) e suas interações na eficiência de crescimento in vitro da espécie *Bauhinia forficata* - pata de vaca. 32
- Tabela 2.** Análise de desdobramento de intensidade de luz e tipos de vedação para massa seca da parte aérea de pata de vaca (*Bauhinia forficata*) aos 45 dias de cultivo in vitro. ... 37
- Tabela 3.** Análise de desdobramento de intensidades de luz e concentrações de sacarose para massa seca da parte aérea de pata de vaca (*Bauhinia forficata*) aos 45 dias de cultivo in vitro. 37
- Tabela 4.** Análise de desdobramento de intensidades de luz e concentrações de sacarose para massa seca de raiz de pata de vaca (*Bauhinia forficata*) aos 45 dias de cultivo in vitro. 39
- Tabela 5.** Análise de desdobramento de tipo de vedação e concentrações de sacarose para massa seca da parte aérea de pata de vaca (*Bauhinia forficata*) aos 45 dias de cultivo in vitro. 40
- Tabela 6.** Análise de desdobramento de intensidades de luz e concentrações de sacarose para largura de folha de pata de vaca (*Bauhinia forficata*) aos 45 dias de cultivo in vitro. 42
- Tabela 7.** Análise de desdobramento de intensidades de luz e concentrações de sacarose para comprimento de folha de pata de vaca (*Bauhinia forficata*) aos 45 dias de cultivo in vitro. 43

SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT	VIII
CAPÍTULO 1 – UMA REVISÃO SOBRE ESPÉCIE <i>BAUHINIA FORFICATA</i> LINK (PATA DE VACA).	13
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. IMPORTÂNCIA DA ESPÉCIE <i>BAUHINIA FORFICATA</i> LINK.....	15
2.2. CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS	16
2.3. A SACAROSE NO CULTIVO <i>IN VITRO</i>	17
2.4. INTENSIDADE E QUALIDADE DE LUZ.....	17
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
CAPÍTULO 2 – INTENSIDADE DE LUZ, TIPOS DE VEDAÇÃO E CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE NO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE PATA DE VACA (<i>BAUHINIA FORFICATA</i> LINK).....	24
RESUMO.....	24
ABSTRACT	25
1. INTRODUÇÃO.....	26
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.1. Material vegetal.....	29
2.2. Germinação <i>in vitro</i>	29
2.3. Indução de crescimento <i>in vitro</i>	29
2.4. Delineamento experimental e parâmetros morfológicos	30
2.5. Análise estatística.....	31
3. RESULTADOS.....	32
4. DISCUSSÃO.....	45
5. CONCLUSÃO.....	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

CAPÍTULO 1 – UMA REVISÃO SOBRE ESPÉCIE *Bauhinia forficata* LINK (PATA DE VACA).

1. INTRODUÇÃO

Bauhinia forficata Link possui componentes biologicamente ativos, com propriedades de importância farmacológica, utilizada principalmente para o tratamento da diabetes e patologias inflamatória (LÓPEZ e SANTOS, 2015). De nome popular pata de vaca, é conhecida popularmente como “insulina vegetal”, com folhas, cascas e flores são utilizadas na medicina popular para o controle principalmente da diabetes; e utilizada como planta diurética, hipercolesterolemiantes e para o controle de cistite, parasitoses intestinais e diabetes (ZACCARON et al., 2014).

A espécie *Bauhinia forficata* Link tem como características, árvore de 5 a 9 metros de altura, tronco espinhoso e ligeiramente estriado de folhas simples coriáceas, aspecto de uma pata de vaca, flores brancas e fruto tipo legume de vagem achatada (SILVA et al., 2020; LORENZI, 1992).

As técnicas para propagação vegetativa consistem numa alternativa para multiplicação de indivíduos, superando as dificuldades de estabelecimento de espécies nativas (WENDELING et al., 2006).

A multiplicação do gênero *Bauhinia* propagadas por germinação de sementes, apresentam certa resistência na fase de desenvolvimento do embrião, alguns tratamentos são indicados para aumentar a taxa de germinação (RAMOS et al., 2019; COSTA et al., 2013; DUARTE et al., 2012; ALVES et al., 2008; LOPES et al., 2007; MARTINELLI-SENEME et al., 2006), utilizando a escarificação mecânica, método realizado para aumentar a taxa de germinação de semente, garantido o crescimento homogêneo de mudas e raízes (BRODANI et al., 2008; LOPES et al., 2007).

O método de propagação por estaquia é amplamente utilizado em plantios comerciais, podendo ser viável na propagação de espécies nativas, este método conserva as características genéticas da árvore matriz para a produção de mudas (MAZZINI, 2012). Entretanto, essa técnica possui como desvantagem, baixa indução de crescimento de raízes em espécies que naturalmente tem baixa capacidade de enraizamento (NEVES et al., 2006). No trabalho realizado por Mazzini et al. (2013) foi evidente a baixa taxa de enraizamento e sobrevivência das estacas semilenhosas da espécie *Bauhinia forficata* Link.

A cultura de tecidos vegetais apresenta elevado potencial de aplicação para a multiplicação de genótipos de espécies florestais brasileiras de interesse (OLIVEIRA et al., 2013). Esse método de micropropagação tem como vantagem, conservação de germoplasma *in vitro*; produção metabólitos secundários de interesse farmacológico e na obtenção de mudas com qualidade fitossanitária superior (CARVALHO, et al., 2012). O êxito desta técnica depende de alguns fatores, dentre estas o meio de cultura, concentrações de sacarose, tipos e concentrações de reguladores de crescimento, intensidade e qualidade de luz e métodos de vedação, sendo determinantes no crescimento e desenvolvimento do material micropropagado (PHILLIPS, et al., 2019; SILVA, et al., 2017).

A intensidade e qualidade de luz são fatores determinantes para o crescimento e desenvolvimento *in vitro* (MACEDO et al., 2011), e com a variação da qualidade de luz, pode-se manipular o crescimento *in vitro* e alterar ou direcionar rotas metabólicas em diversas espécies (BATISTA et al., 2018).

Pelo método tradicional de cultivo *in vitro*, é fornecido sacarose como fonte de carboidrato exógeno no crescimento e desenvolvimento da planta, uma vez que a concentração de CO₂ dentro dos frascos de cultura é reduzida, o que limita o desenvolvimento da planta (XIAO et al., 2011). No cultivo fotomixotrófico *in vitro*, ocorre a diminuição ou até mesmo suprimindo o carboidrato do meio de cultura, a partir do aumento das trocas gasosas entre os frascos de cultura e o ambiente externo (WALTER, 2019). Existem outras vantagens em regular a sacarose do meio de cultura, como por exemplo, o impedimento do rápido crescimento de microrganismos nas culturas, a redução nos custos e o aumento da sobrevivência das plantas durante a etapa de aclimatização em condições *ex vitro* (KOZAI, 2010; XIAO et al., 2011; BATISTA et al., 2017). Na micropropagação em ambiente fotoautotrófico, os fundamentos de controle ambiental para promover a fotossíntese, transpiração e absorção de nutrientes pela planta, são essenciais para seu crescimento, visto que é produzido pelo próprio vegetal adições exógenas no meio de cultura. (XIAO et al., 2011).

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito das intensidades de luz, trocas gasosas e adição de diferentes concentrações de sacarose no meio de cultura com o intuito de micropropagação desta espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância da espécie *Bauhinia forficata* Link

A *Bauhinia forficata* Link conhecida como “pata de vaca” é uma planta amplamente utilizada na medicina tradicional na América do Sul para tratamento de hipoglicemia e diabetes *mellitus* (SALGUEIRO et al., 2013).

O Ministério da Saúde do Brasil tem selecionado a *Bauhinia forficata* Link como uma espécie promissora para o desenvolvimento de novos produtos fitoterápicos. Entretanto, o acesso do usuário a espécie correta não é uma tarefa trivial porque o gênero *Bauhinia* compreende muitas espécies com características macroscópicas semelhantes (ARDILA et al., 2015).

Estudos farmacológicos realizados em diferentes extratos vegetais ou flavonoides purificados em normoglicêmicos e modelos hiperglicêmicos *in vivo* em geral confirmaram a atividade hipoglicêmica, embora alguma evidência contraditória tenha sido encontrada (SALGUEIRO et al., 2013).

Pela presença de compostos bioativos, a *Bauhinia forficata* Link exerce demais atividade benéficas, como antioxidante, antidiabético e hipoglicêmico, anti-inflamatório, antimicrobiano, antitumoral, anticoagulante, com aplicação no tratamento de doenças como câncer, meta- síndrome bolólica, obesidade, osteoporose, Alzheimer e diabetes (SOUZA et al., 2018).

Salgueiro et al. (2013) investigaram os efeitos da *Bauhinia forficata* Link, contra a oxidação, estresse positivo e dano hepático em ratos diabéticos. Os resultados mostraram que o chá de *Bauhinia forficata* Link reduziu o estresse oxidativo, mas altera a glicemia, diferentemente dos estudos anteriores (FORTUNATO et al., 2019).

A *Bauhinia forficata* Link é utilizada para regular o metabolismo de glicose e lipídios, também em distúrbios digestivos, renais e urinários. No entanto nenhuma seleção do quimiotipo promissor com propriedades medicinais foi tentada. Consequentemente, ausência de cultivares aprimoradas dificulta o processamento de culturas novas com potencial medicinal (FORTUNATO et al., 2019).

2.2. Cultura de tecidos vegetais

No cultivo *in vitro* de plantas, é utilizado meio de cultura nutritivo em condições assépticas controladas para propagação, na qual visa o estabelecimento e crescimento de células, tecidos e órgãos. Baseado no princípio de totipotência das células, gerando uma nova planta geneticamente igual a partir de um explante, pode ser gerado célula, tecidos ou órgãos (ESPOSITO-POLESI et al., 2020; ESPINOSA-LEAL et al., 2018; XIAO et al., 2011).

Existem vários métodos para cultura de tecidos, no entanto as técnicas mais utilizadas são a organogênese para produção de órgãos vegetais, feita diretamente por meio de tecidos vegetais das raízes e caules, ou indiretamente, por meio de células desdiferenciação na produção de calos (ESPINOSA-LEAL et al., 2018).

A micropropagação tem sido utilizada para a propagação de diversas espécies de plantas, preferencialmente aquelas com maior dificuldade na produção de mudas, plantas para fins medicinais, conservação de germoplasma, reflorestamento e mudas comerciais (MORAIS et al., 2012; SARASAN et al., 2011).

A técnica de micropropagação consiste de pequenos fragmentos vegetais isolados dos organismos ou obtidas a partir destes, sendo assepticamente cultivadas em um meio de cultura apropriado sob condições favoráveis (AMARAL e SILVA, 2003). Utilizam-se recipientes semi-herméticos e o cultivo se realiza sob condições de iluminação e temperatura controladas.

Um problema comum encontrado no método de convencional de cultivo *in vitro*, são as baixas concentrações de CO₂, o acúmulo de etileno nos frascos fechados, que consequentemente alteram na taxa de multiplicação e desenvolvimento da cultura *in vitro* (WALTER, 2019).

No cultivo de tecidos são fundamentais, para todas as suas técnicas, a assepsia, o explante, o meio nutritivo e os fatores ambientais: luz, temperatura, dióxido de carbono (CO₂) e oxigênio (O₂). Para evitar a contaminação dos meios por impurezas minerais, todos os sais utilizados na sua preparação devem ser de qualidade analítica (BARRUETO CID, 2015).

A cultura de tecidos vegetais oferece diversas vantagens sobre a cultura em campo tradicional, pois é independente de variações geográficas, sazonais e ambientais. Plantas com melhor qualidade fitossanitária e ciclos de crescimento curtos (CARVALHO et al., 2012; DERNARH et al., 2006).

2.3. A sacarose no cultivo *in vitro*

A sacarose tem um papel importante no cultivo *in vitro*, pois fornece energia e carbono percussores para biossíntese de componentes estruturais e funcionais da planta. (GEORGE, et al., 2008; BARRUETO CID, 2015).

A concentração de sacarose adicionada ao meio de cultura pode influenciar no crescimento e desenvolvimento da planta, quando a taxa fotossintética em condições *in vitro* não é otimizada, visto que no sistema de cultivo convencional ocorre uma dependência de sacarose no meio de cultura (RIBEIRO et al., 2009; BARRUETO CID, 2015). Entretanto o alto teor de sacarose no meio de cultura pode reduzir o desenvolvimento fotossintético, promover alteração no estado hídrico, na síntese de clorofila e a expressão de genes relacionados a fotossíntese, ocasionando má formação fisiológica e estrutural na planta (KOZAI et al., 2005).

No estudo realizado por Moritz et al. (2009) com três espécies do gênero *Ocotea* foi verificado que essas plantas apresentaram desenvolvimento lento e mais saudável, na concentração de 30g L⁻¹. Enquanto que nas concentrações de 90 e 120 g L⁻¹ de sacarose causaram uma toxicidade para as plantas, observou que com o aumento da concentração de sacarose, reduziu o número de folhas e comprimento de planta do *Solanum tuberosum* (BANDINELLI, et al., 2013).

No comprimento de raízes de *Miltonia flavescens*, verificou que maiores concentrações de sacarose promoveram comprimentos radiculares maiores em plantas cultivadas por 180 dias, mas não foi observado influência da sacarose com relação ao número de raízes (LEMES, et al., 2016).

A sacarose tem muita importância na cultura de tecidos, pois é uma fonte de carbono para o crescimento e desenvolvimento da planta, quando a taxa fotossintética nas condições *in vitro* não é otimizada (WALTER, 2019).

2.4. Intensidade e qualidade de luz

A luz participa dos processos metabólicos das plantas, o cultivo *in vitro* a qualidade da luz, irradiâncias e o foto período, trazem respostas diferentes para a planta, quando submetidas a diferentes condições de luz (ALVARENGA, et al. 2015; SÁEZ et al. 2013). Utilizada na sala de crescimento de vegetais, a luz estimula o desenvolvimento da planta,

essas condições podem alterar a homeostase da auxina, também regula auxina que coordena o desenvolvimento da planta (LAU E DENG, 2010).

A exposição do material vegetal *in vitro* em intensidades luminosas combinadas com composições espectrais apresentaram multiplicação de brotos de Atemóia (RASAI et al., 1994), a qualidade de luz influenciou no desenvolvimento e crescimento de raízes em mudas de tabaco, peso fresco de brotos e raízes, foram maiores em condição de luz vermelha (MENG, et al., 2015)

A qualidade da luz é importante para regular as vias bioquímicas que controlam o crescimento e a morfogênese (TAIZ et al., 2017). O comprimento de onda, promove o crescimento foliar, acúmulo de carboidratos e alterações anatômicas, aumento da massa fresca dessas plantas (HUNG et al., 2016; MENG, et al., 2015).

A qualidade e intensidade de luz influenciaram na absorção de nutrientes pelas raízes, isso afeta diretamente desenvolvimento e crescimento da planta (SAKURABA e. YANAGISAWA, 2018; MENG, et al., 2015).

A intensidade de luz influenciou no crescimento da espécie *Lippia gracilis*, apresentando plantas vigorosa em todas as intensidades de luz, o comprimento da raiz e folha e massa seca e fresca da parte aérea e raiz aumento, quando submetida a intensidade de $94 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LARRAZINI et al., 2018).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALVES, E.U.; NASCIMENTO, C.D.L.; BRUNO, R.L.A.; ALVES, A.U.; BRAGA JÚNIOR, J.M.; CARDOSO, E. A.; GALINDO, E. A.; SILVA, K. B. (2008). Germinação e vigor de sementes de *Bauhinia divaricata* L. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.18, n.4 p. 960-966.

AMARAL, C.L.F.; SILVA, A.B. (2003). Melhoramento biotecnológico de plantas medicinais: produção de alcaloides e óleos essenciais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Rio de Janeiro, v.30, p. 55-59.

ARDILA, J.A.; FUNARI, C.S.; ANDRADE, A.M.; CAVALHEIRO, A. J.; CARNEIRO, R. L. (2015). Cluster analysis of commercial samples of *Bauhinia* spp. using HPLC-UV/PDA and MCR-ALS/PCA without peak alignment procedure. **Phytochemical Analysis**, São Carlos, v. 26 p. 367–373.

BATISTA, D.S.; CASTRO, K.M.; KOEHLER, A.D.; PORTO, B.N.; SILVA, A.R.; SOUZA, V.C.; TEIXEIRA, M.L.; CARDOSO, M.G.; SANTOS, M.O.; VICCINI, L.F.; OTONI, W.C. (2017). Elevated CO₂ improves growth, modifies anatomy, and modulates essential oil qualitative production and gene expression in *Lippia alba* (Verbenaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Viçosa, v. 128, p. 357-368.

BATISTA, D.S.; FELIPE, S.H.S.; SILVA, T.D.; CASTRO, K.M.; MAMEDES-RODRIGUES, T.C.; MIRANDA, N.A.; RIOS-RIOS, A.M.; FARIA, D.V.; FORTINI, E.A.; CHAGAS, K.; TORRES-SILVA, G.; XAVIER, A.; ARENCIBIA, A.D.; OTONI, W.C. (2018). Light quality in plant tissue culture: does it matter?. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Viçosa, v. 54, p. 195-215.

BANDINELLI, MG BISOGNIN, DA; GNOCATO, FS; MAMBRIN, RB; SAUSEN, D.; NICOLOSO, F.T. (2013). Concentration of salts and sucrose in the MS medium in the in vitro multiplication and acclimatization of potato. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v.31, p.242-247.

BRONDANI, G.E.; SILVA, A.J.C.; ARAUJO, M.A. DE., GROSSI, F.; WENDLING, I.; CARPANEZZI, A.A. (2008). Phosphorus nutrition in the growth of *Bauhinia forficata* L. seedling. **Acta Scientiarum**, Curitiba, vol.30, p. 665-671.

CARVALHO, M. A. de F.; PAIVA, R.; VARGAS, D.P.; PORTO, J.M.P.; HERRERA, R.C.; STEIN, V.C. (2012). Germinação *in vitro* de *Passiflora gibertii* N. E. Brown com escarificação mecânica e ácido giberélico. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 1027-1032.

BARRUETO CID, L.P. (2015). Cultivo *in vitro* de plantas, 4.ed. **Embrapa**, Brasília. 331p. E- book.

COSTA, E.S.; SANTOS NETO, A.L.; COSTA, R.N.; SILVA, J.V.; SOUZA, A.A.; SANTOS, V. R. (2013). Dormência de sementes e efeito da temperatura na germinação de sementes de mororó. **Ciências Agrárias**, Garanhuns, v.56, n.1, p. 19-24.

DUARTE, D.M.; NUNES, U.R. (2012). Crescimento inicial de mudas de *Bauhinia forficata* Link em diferentes substratos. **Revista Cerne**, Lavras, v.18, n.2, p.327-334.

DEBNARH, M.; MALIK C.P, BAISEN O.S. (2006). Micropropagation: a tool for the production of high-quality plant based medicines. **Curret Pharmaceutical Biotechnology**, Jaipur, v. 7, p. 33–49.

ESPOSITO-POLESI, N.P. (2020). Contaminação versus manifestação endofítica: implicações no cultivo *in vitro* de plantas. **Rodriguésia**, Piracicaba, v. 71, p. 1- 15.

ESPINOSA-LEAL, C.A., PUENTE-GARZA, C.A.; GARCÍA-LARA, S. (2018) *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. **Planta**, Monterrey, v. 248, p. 1–18.

FORTUNATO, R. H., BALUZZI V.F., DE DIEGO F., BIAGIONI R. T., ALEJANDRO D. E. (2019). Novel Therapeutic Uses of Legume Crops in Southern South America, Legume Crops - Characterization and Breeding for Improved Food Security, Mohamed Ahmed El-Esawi, IntechOpen.

GEORGE, E.F. (2008). **Propagação de plantas por cultura de tecidos**. 3. ed. Grã-Bretanha: **Exegetics**, p. 479.

HUNG, C.D.; HONG, C.H.; KIM, S.K.; LEE, K.H.; PARK, J.Y.; NAM, M.W.; CHOI, D.H.; LEE, H.I. (2016). LED light for *in vitro* and *ex vitro* efficient growth of economically important highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, Jeollabuk-do v.38, p.152.

KOZAI, T., XIAO, Y., NGUYEN, Q.T., AFREEN, F., ZOBAYED, S.M.A. (2005). Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation systems for large-scale commercialization. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 5, n. 1, p. 23-34.

KOZAI, T. (2010). Photoautotrophic micropropagation – environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, Kashiwa, v. 10, p. 188-204.

LÓPEZ, R.E.S.; SANTOS, B.P. (2015). *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae). **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 9, p. 161-252.

LAZZARINI, L.E.S.; BERTOLUCCI, S.K.K.; PACHECO, F.V.; SANTOS, DOS J.; SILVA, S.T.; CARVALHO, A.A.DE; PINTO, J.E.B.P. (2018). A qualidade e a intensidade da luz afetam o crescimento da planta de *Lippia gracilis* Schauer e os compostos voláteis *in vitro*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. Lavras, v.135, p. 367–379.

LAU OS, DENG XW (2010). Plant hormone signaling lights up:integrators of light and hormones. **Curr Opin Plant Biol**, v.13, p. 571-577.

- LOPES, J. C.; BARBOSA, L.G.; CAPUCHO, M.T. (2007). Germinação de sementes de *Bauhinia* spp. **Floresta**, Curitiba, v.37, n.2, p.265-274.
- LORENZI, H. (1992). Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: **Plantarum**, Nova Odessa, p. 352.
- LEMES, C.S.R.; SORGATO, J.C; SOARES, J.S.; ROSA, Y.B.C.J. (2016). Meios de cultivo e sacarose no crescimento inicial *in vitro* de *Miltonia flavescens*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, p. 499-505.
- MAZZINI, R. B. Propagação vegetativa e produção de mudas de *Bauhinia* spp. **Tese** (Doutorado em produção vegetal) Unesp, Campus de Jaboticabal, São Paulo. 2012.
- MAZZINI, R. B.; PIVETTA, K. F. L.; ROMANI, G. N.; BRENO F. (2013) Propagação vegetativa de *bauhinia* x *blakeana*, uma arbórea ornamental estéril. **Revista Árvore**, v.37, n 2, p. 219-229.
- MACEDO, A.F.; LEAL-COSTA, M.V.; TAVARES, E.S.; LAGE, C.L.S.; ESQUIBEL, M.A. (2011). 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, p. 43-50.
- MARTINELLI-SENEME, A.; POSSAMAI, E.; SCHUTA, L.R.; VANZOLINI, S. (2006). Germinação e sanidade de sementes de *Bauhinia variegata*. **Revista Árvore**, Viçosa, v.30, n.5, p.719-724.
- MENG, L.; SONG, W.; LIU, S.; DONG, J.; ZHANG, Y.; WANG, C.; XU, Y.; WANG, S. (2015). Light quality regulates lateral root development in tobacco seedlings by shifting auxin distributions. **Journal of Plant Growth Regulation**, Qingdao, v.34, p. 574–583.
- MORITZ, A.; DEGENHARDT, J.; DUTRA, LF; HANSEL, FA; LIMA, BH de; FRANCESCHI, C. of R.B.; FRANCISCON, L. (2009) *In vitro* establishment of *Ocotea odorifera*, *O. catharinensis* and *O. porosa*. **Search Brazilian Forestry**, Colombo, v. 59, p. 37-44.
- MORAIS, T.P., LUZ, J.M.Q., SILVA, S.M., RESENDE, R.F., SILVA, A.S. (2012). Aplicações da cultura de tecidos em plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 1, p.110-121.
- NOLETO, L.G.; SILVEIRA, C.E.S. (2004) Micropropagação de Copaíba. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 33, p. 109-120.
- NEVES, T. S.; CARPANEZZI, A. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; MARENCO, R.A. (2006) Enraizamento de corticeira-da-serra em função do tipo de estaca e variações sazonais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 1699-1705.
- OLIVEIRA, L.S.; DIAS, P.C.; BRONDANI, G.E. (2013) Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 33, n. 76, p. 439-453.

PELEGRINI, L.L.; RIBAS, L.L.F.; ZANETTE, F.; KOEHLER, H.S. (2011) Micropropagation of *Ocotea porosa* (Nees & Martius), Barroso. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 9, p. 1527-1523.

PHILLIPS, G.C., GARDA, M. (2019) Plant tissue culture media and practices: an overview. **In Vitro Cellular & Developmental Biology -Plant**, Jonesboro, v. 55, p. 242–257.

RAMOS, S. J., CALDEIRA, C. F., GASTAUER, M., COSTA, D. L. P., FURTINI NETO, A. E., SOUZA, F. B. M., et al. (2019). Native leguminous plants for mineland revegetation in the eastern Amazon: seed characteristics and germination. **New Forests**, Belém, v.50, p. 859–872.

RIBEIRO, A.P.O.; PICOLI, E.A.T.; LANI, E.R.G.; VENDRAME, W.A.; OTONI, W.C. (2009) The influence of flask sealing on *in vitro* morphogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Viçosa, v.45, p. 421–428.

SAÉZ PL, BRAVO L, LATSAGUE MI, TONEATTI MJ, SÁNCHEZ-OLATE M, RÍOS D.G. (2013) Light energy management in micropropagated plants of *Castanea sativa*, effects of photoinhibition. **Plant Science**, Concepción, v.201, p. 12–24.

SARASAN, V.; KITE, G.C.; STEVENSON, P.C. (2011) Applications of phytochemical and *in vitro* techniques for reducing over harvesting of medicinal and pesticidal plants and generating income for the rural poor. **Plant Cell Reports**. Reino Unido, v.30, p. 1163-1172.

SALGUEIRO A.C.F, LEAL CQ, BIANCHINI M.C, PRADO I.O, MENDEZ A.S.L, PUNTEL R.L., FOLMER V, SOARES F.A., AVILA D.S., PUNTEL G.O. (2013). The influence of *Bauhinia forficata* Link subsp. *pruinosa* tea on lipid peroxidation and non-protein SH groups in human erythrocytes exposed to high glucose concentrations. **Journal of Ethnopharmacology**. Uruguiana, v. 148, p. 81–87.

SAKURABA Y, YANAGISAWA S. (2018) Light signalling-induced regulation of nutrient acquisition and utilisation in plants. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 83, p. 123-132.

SOUZA, A.V.; PEREIRA, A.M.S. (2007). Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 103-117.

SILVA, S.T.; BERTOLUCCI, S.K.V.; CUNHA, S.H.B. DA; LAZZARINI, L.E.S.; TAVARES, M.C.; PINTO, J.E.B.P. (2017) Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Lavras, v. 129, p. 501–510.

WENDILING, I.; DUTRA, L.F.; GROSSI, F. (2006) Produção de mudas de espécies lenhosas. **Embrapa Florestas**. Colombo, v. 1, p.1-55.

WALTER, R. (2019). Aplicação da cultura de tecidos no melhoramento de *Capsicum annum*: superação de barreiras pós-zigóticas, produção de genótipos em larga escala e protocolo para obtenção de haploides. Campos dos Goytacazes. **Tese (Doutorado)**, 164p.

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

ZACCARON, C.; REMPEL, C.; STROHSCHOEN, A.A.G.; BOSCO, S.M.D.; MORESCHI, C. (2014). Efeito da planta medicinal *Bauhinia forficata* (Link) nos indivíduos diabéticos tipo 2. **ConScientiae Saúde**, Lajeado, v. 13, n. 2, p. 171-174.

CAPITULO 2 – INTENSIDADE DE LUZ, TIPOS DE VEDAÇÃO E CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE NO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO *in vitro* DE PATA DE VACA (*Bauhinia forficata* Link)

RESUMO

Objetivou-se avaliar as intensidades de luz, tipos de vedação e concentrações de sacarose adicionadas ao meio de cultura no crescimento e desenvolvimento *in vitro* de pata de vaca (*Bauhinia forficata* Link). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, esquema fatorial 2x2x3 (duas intensidades de luz – IL, (43 ou 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), dois tipos de vedação (TV), tampas de polipropileno, com membranas (CM) ou sem membranas (SM) e três concentrações de sacarose (CS) de 0, 20 ou 30 g. L^{-1} , totalizando 12 tratamentos e 4 repetições para cada. Foram utilizados três segmentos nodais das plantas germinadas em um frasco de vidro de 350 mL, contendo 50 ML de meio MS, 100 mg L^{-1} de mio – Inositol, 0,54 μM de ácido naftalenoacético (ANA), 2 g. L^{-1} de Phytigel TM® (Sigma-Aldrich) e sacarose adicionada de acordo ao tratamento (0, 20 e 30 g. L^{-1}), representando cada frasco uma repetição, os quais foram distribuídas e submetidas de acordo com cada tratamento. Aos 45 dias foram avaliados massa fresca da parte aérea (MFPA, g), massa seca da parte aérea (MSPA, g), massa fresca da raiz (MFR, g), massa seca da raiz (MSR, g), comprimento de planta (CP, mm), largura da folha (LF, mm), comprimento da folha (CF, mm), número de folhas por planta (NF) e número de brotos (NB). Foi observado diferenças significativas à medida que aumentava as concentrações de sacarose nas variáveis número de brotos (NB), comprimento de Planta (CP), massa fresca da parte aérea (MPAF) e massa fresca da raiz (MFR). Os tipos de vedações (TV) influenciaram na massa fresca e seca da parte aérea e raiz e no comprimento da planta ($P \leq 0.05$), sendo observados diferenças significativas na utilização do tipo de vedação com membranas (CM) quando comparado aos sem membranas (SM) nas variáveis comprimento de planta (CP), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca da raiz (MFR), largura de folha (LF), comprimento de folha (CF) e número de folha (NF). Na Intensidade de Luz (IL) 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentaram diferenças significativas em número de brotos, comprimento de planta (CP), massa fresca da parte aérea (MFPA) e massa fresca da raiz (MFR) quando comparado com intensidade de luz (IL) 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Plantas de *Bauhinia forficata* Link cultivadas *in vitro* tiveram uma melhor reposta para crescimento e desenvolvimento de explante com o tipo de vedação com membranas (CM) e Intensidade de Luz (IL) 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Palavras-chave: Membranas permeáveis, cultivo *in vitro*, fotomixotrófico, luminosidade, trocas gasosas.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the light intensities, types of seal and sucrose concentrations added to the culture medium in the *in vitro* growth and development of the cow's paw (*Bauhinia forficata* Link). The experiment was conducted in a completely randomized design, 2x2x3 factorial scheme (two light intensities – IL, (43 or 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), two types of sealing (TV), polypropylene lids, with membranes (CM) or without membranes (SM) and three sucrose concentrations (CS) of 0, 20 or 30 g. L⁻¹, totaling 12 treatments and 4 repetitions for each. Three nodal segments of the germinated plants were used in a glass flask of 350 mL, containing 50 ML of MS medium, 100 mg L⁻¹ of myo – Inositol, 0.54 μM of naphthaleneacetic acid (ANA), 2 g. L⁻¹ of Phytigel TM® (Sigma-Aldrich) and sucrose added accordingly to the treatment (0, 20 and 30 g. L⁻¹), each flask representing a repetition, which were distributed and submitted according to each treatment. At 45 days, fresh mass of aerial part (MFPA, g), mass was evaluated shoot dry mass (MSPA, g), root fresh mass (MFR, g), root dry mass (MSR, g), plant length (CP, mm), leaf width (LF, mm), length leaf growth (CF, mm), number of leaves per plant (NF) and number of shoots (NB). Significant differences were observed as the sucrose concentration increased in the number of shoots (NB), plant length (CP, mm), shoot fresh mass (MPAF) and root fresh mass (MFR) variables. The type of seals (TV) influenced the fresh and dry mass of the aerial part and root and the length of the plant ($P \leq 0.05$), with significant differences being observed in the use of the seal type with membranes (CM) when compared to those without membranes (SM) in the variables plant length (CP), shoot fresh mass (MFPA), root fresh mass (MFR), leaf width (LF), leaf length (CF) and sheet number (NF). At Light Intensity (IL) 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ showed significant differences in number of shoots, plant length (CP), shoot fresh mass (MFPA) and root fresh mass (MFR) when compared with Light Intensity (IL) 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. *In vitro* cultivated *Bauhinia forficata* Link plants had a better response for growth and explant development with the membrane seal type (CM) and Light Intensity (IL) 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Keywords: Permeable membranes, *in vitro* culture, photomixotrophic, luminosity, gas exchange.

1. INTRODUÇÃO

Bauhinia forficata Link (Fabaceae), é uma planta leguminosa utilizada na medicina popular para o tratamento diurético, tônico, depurativo, hipoglicemia, no combate a elefantíase e redução da glicosúria (MARTINS et al., 1998). Os componentes biologicamente ativos, como os flavonoides, têm importância nas propriedades farmacológicas no tratamento de diferentes tipos de doenças como diabetes e patologias inflamatórias (LÓPEZ & SANTOS, 2015).

A propagação vegetativa é uma técnica utilizada para produção de plantas comerciais, espécies nativas e com baixa taxa de germinação (OLIVEIRA, 2013). Dentre as técnicas existentes, destacam-se a estaquia, bastante utilizada na produção de mudas florestais, no entanto o enraizamento é um fator que vai interferir na taxa de sobrevivência da planta (HARTMANN et al., 2018; ZHANG et al., 2016; HARTMANN et al., 2002).

A propagação de plantas *in vitro* é uma ferramenta da biotecnologia vegetal que consiste na multiplicação rápida e obtenção de populações homogêneas (COSTA, et al., 2012; KOZAI et al., 2010). Essa técnica possibilita a propagação de espécies selecionadas, livres de contaminação patogênica, podendo ser utilizada como ferramenta de programas de melhoramento genético (WENDLING et al., 2013; CARVALHO et al., 2016). O cultivo convencional *in vitro*, apresentam alterações morfológicas e fisiológicas, como baixo funcionamento dos estômatos, redução da camada de cera epicuticular, responsáveis por perdas durante a aclimatização em condições *ex vitro*, relacionados principalmente a condições heterotróficas como a fonte de luz e carboidratos ao meio de cultura (ECONOMOU e READ, 1987; IBARAKI e NOZAKI, 2005; KOZAI et al., 1991; PRAKASH et al., 2004; REZENDE et al., 2008; SANTANA et al., 2008; SERRET et al., 1997; SILVA, et al. 2008; DIGNART et al., 2009).

O fornecimento de condições ambientais para a propagação *in vitro* fotoautotrófica, crescimento e multiplicação de plantas, consiste principalmente no aumento dos níveis de CO₂, de luminosidade e fonte energético como alimento para o meio de cultivo (GEORGE, 2008). A propagação *in vitro* satisfatória deve manter as condições semelhantes ao ambiente externo, equilibrando as concentrações de CO₂, fluxo de fótonsT, pois tem fundamental influência na morfogênese e no crescimento de células e órgãos vegetais (XIAO, et al., 2011; REUNI e EVENOR, 2007).

Uma das fontes de energia utilizada em cultivo *in vitro* é a sacarose, carboidrato que favorece o desenvolvimento morfológico, diferenciação de órgãos e tecidos (SKRESBY et

al., 2004). A sacarose atua como combustível para sustentar o metabolismo fotomixotrófico, garantindo o desenvolvimento, precursor de carbono ou metabólitos de sinalização, auxiliar a manutenção do potencial osmótico e conservação de água nas células (COUPE et al., 2006; MULLER et al., 2011; GAGO et al., 2014). Mas cada espécie de planta possui diferente exigência de sacarose, sendo necessário avaliar a proporção eficiente para o crescimento e desenvolvimento da planta (BARBOSA et al., 2021).

Em cultivo *in vitro*, maior desenvolvimento da planta pode ocorrer quando utilizado com luz, isto porque ela participa ativamente dos processos metabólicos da planta, sempre que necessário alterar a qualidade de luz, a irradiância e o fotoperíodo (SÁEZ et al., 2013), possibilitando alterar a resposta de crescimento da planta e a produção de metabólitos secundários quando exposto a diferentes condições de luz (ALVARENGA et al., 2015).

Lâmpadas fluorescentes tubulares são tradicionalmente utilizadas em cultivos *in vitro*, elas transmitem espectro que varia entre 350 a 750nm, na qual inclui comprimento de onda de baixa qualidade para crescimento da planta (KIM et al., 2004).

As lâmpadas de diodo emissores de luz (LED) aparecem como alternativa para melhorar a qualidade de luz, por apresentar espectros mais homogêneos, baixa quantidade de emissões térmicas, econômicas, potentes, de fácil instalação e manutenção, maior durabilidade, ocupando menor espaço físico e serem fabricados em comprimentos de ondas (ALVARENGA et al., 2015; GUPTA e JATOTHU, 2013). Em um experimento realizado com a espécie *Stévia rebaudiana* Bertoni, mostrou a eficácia do efeito de diferentes tipos de LED's e comprimento de onda no crescimento *in vitro* dessa planta (Ramírez-MOSQUEDA, et al., 2017). O efeito do fotoperíodo e qualidade de luz para o crescimento da *Cunninghamia lanceolata*, foi eficaz para a micropropagação da espécie, apresentando significativamente maiores valores de altura da planta, comprimento de raiz (XU, et al., 2020).

São vários os métodos de vedação utilizados no cultivo *in vitro*, dentre estas tampas padrão de polipropileno, filmes de alumínio e filmes plásticos transparentes, mas estes métodos apresentam deficiências por causa das reduzidas trocas gasosas, associada a baixa quantidade e qualidade luminosa, são capazes de influenciar diretamente na resposta morfológicas e fisiológica da planta em ambiente *in vitro* (RIBEIRO et al., 2009; SKRESBY et al., 2004), como: redução das taxas de transpiração, fotossíntese e uma alta taxa de respiração, resultando na redução no desenvolvimento da planta (KOZAI, 1997). A ausência da troca de ar entre o ambiente externo e interno, condiciona baixos níveis de CO² e ao acúmulo de etileno nos frascos fechados, reduz as taxas de transpiração e da fotossíntese,

pois diminuía absorção de água e nutrientes, e reduz o crescimento da planta (TANAKA, 2005; CHEN, 2004). Porém, aprimorar a ventilação dos frascos, sem que ocorra a contaminação no meio de cultura, mediante o uso de membranas, permitiriam um maior fluxo de trocas gasosas, reduzir a umidade no frasco e potencializar a absorção de água e nutrientes pela planta (XIAO et al.,2011).

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar duas intensidades de luz, dois tipos de vedações (com ou sem membranas permeáveis) e três concentrações de sacarose, na resposta dos parâmetros morfológicos do cultivo *in vitro* de *Bauhinia forficata* Link.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

As sementes de pata de vaca (*Bauhinia forficata* LINK) foram coletadas no município de Estreito-MA, dentro da área de Viveiro Florestal do Consórcio Estreito Energia (CESTE) no ano de 2019, localizado nas coordenadas geográficas, latitude -5.78333 e longitude -43.25, 5° 46' 60" Sul, 43° 15' 0" Oeste, sendo mantidas em embalagens de papel sob refrigeração a 2 °C, e então foram enviadas para o Laboratório de Cultura de Tecidos, da Universidade Estadual do Maranhão, localizado em São Luís.

2.2. Germinação *in vitro*

No Laboratório de Cultura de Tecidos, da Universidade Estadual do Maranhão, em condições de fluxo laminar, estas sementes foram submetidas à desinfestação, com imersão em álcool de 70% (v/v) por 60 segundos, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio (4 – 6 %) de cloro ativo (v/v) ISOFAR[®], e adição de 2 gotas de Tween 20 ISOFAR[®] por um período de 15 min, seguido de quatro enxagues com água destilada e auto clavada. Foram utilizadas cinco sementes previamente desinfestadas e inoculadas em frascos de vidro de 350 ml de capacidade, contendo 50 ml de meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com 100 mg L⁻¹ de mio-Inositol, solidificado com 2 g L⁻¹ de Phytigel TM[®] (Sigma-Aldrich), pH ajustado para 5,7 ± 0,1 e 20 g L⁻¹ de sacarose. e previamente auto clavados a 120°C, 1,1 Pa por 15 min. Os frascos foram vedados com tampas rígidas de polipropileno.

Os frascos foram mantidos em sala de crescimento durante 30 dias para germinação, foto período de 16 horas de luz, temperatura de 25 ± 1°C e intensidade de luz de 43 μmol m⁻² s⁻¹ a partir de duas lâmpadas de diodos emissores de luz (LEDs branco).

2.3. Indução de crescimento *in vitro*

Após os 30 dias da germinação *in vitro*, foram utilizados segmentos nodais de 1,5 cm, das plantas nas unidades experimentais, estas foram transferidas para frascos de vidro de 350 ml de capacidade, contendo 50 ml de meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG 1962), suplementado com 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 0,54 μM de ácido naftalenoacético

(ANA), e sacarose adicionado de acordo ao tratamento (0, 20 e 30 g L⁻¹), solidificado com 2 g L⁻¹ de Phytigel TM® (Sigma-Aldrich), suplementados com pH ajustado para 5,7 ± 0,1. Os frascos foram tampados com tampas de polipropileno com diferentes vedações, segundo o tratamento (sem ou com membranas).

Os frascos foram mantidos para a sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas de luz, e duas intensidades de luz provenientes de lâmpadas tubulares LEDs 43 μmol m⁻² s⁻¹ (duas lâmpadas) e 70 μmol m⁻² s⁻¹ (quatro lâmpadas).

2.4. Delineamento experimental e parâmetros morfológicos

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2x3, sendo duas intensidades de luz (43 ou 70 μmol m⁻² s⁻¹), dois tipos de vedação (sem membranas ou com membranas) e três concentrações de sacarose (0, 20 e 30 g L⁻¹), totalizando 12 tratamentos e 4 repetições para cada.

Foram utilizados quatro frascos de vidro de 350 ml de capacidade, com três segmentos nodais das plantas germinadas *in vitro*, pata de vaca *Bauhinia forficata* Link, para cada um, sendo representado por cada frasco como uma repetição, totalizando assim 48 unidades experimentais.

Os tipos de vedação consistiram em tampa rígida de polipropileno sem orifícios cobertos por membranas porosas a gases, ou tampa rígida de polipropileno com dois orifícios de 10 mm cada, cobertos com membranas porosas a gases composta por três camadas de fita micro porosa e uma de PTFE (politetrafluoretileno) de 0,05 ± 0,01 mm de espessura, seguindo a metodologia proposta por SALDANHA et al. (2012).

Após 45 dias de cultivo, foram avaliados massa fresca da parte aérea (MFPA, mg), massa seca da parte aérea (MSPA, mg), massa fresca da raiz (MFR, mg), massa seca da raiz (MSR, mg), comprimento de planta (CP, mm), largura da folha (LF, mm), comprimento da folha (CF, mm), número de folhas (NF) e número de brotos (NB).

Para as variáveis de massa seca, o material vegetal permaneceu em estufa com circulação de ar natural a 70 °C por 72 horas, até a obtenção de massa constante. Para medições de comprimento de planta, largura da folha e comprimento da folha foi utilizado um paquímetro digital.

2.5. Análise estatística

Os dados coletados foram submetidos a teste de normalidade e homocedasticidade. As variáveis não normais foram submetidas a transformação de dados, número de folhas (NF), comprimento de folhas (CF), massa fresca da parte aérea (MFPA), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), Comprimento de planta (CP), comprimento da folha (CF), Número de brotos (NB), transformados ($y = \sqrt{x+0,5}$). Posterior a isso, todas as variáveis foram submetidas a análises de variância, avaliado por meio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância para os dados qualitativos e quantitativos.

$$Y_{ijkl} = \mu + IL_i + TV_j + CS_k + (IL \times TV)_{ij} + (IL \times CS)_{ik} + (TV \times CS)_{jk} + (IL \times TV \times CS)_{ijk} + e_{ijkl}$$

Em que: Y_{ijkl} = valor observado da variável que representa a intensidade de luz i , tipo de vedação j , concentração de sacarose k , e repetição l , μ = média geral, IL_i = intensidade de luz i , variando de 1 e 2 (43 e 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), TV_j = tipo de vedação j , de 1 e 2 (Sem membrana e com membrana), CS_k = concentração de sacarose, de 1, 2 e 3 (0, 20 e 30 g L^{-1}), $(IL \times TV)_{ij}$ = efeito da interação entre a intensidade de luz i e tipo de vedação j , $(IL \times CS)_{ik}$ = efeito da interação entre a intensidade de luz i e concentração de sacarose k , $(TV \times CS)_{jk}$ = efeito da interação entre o tipo de vedação j e concentração de sacarose k , $(IL \times TV \times CS)_{ijk}$ = efeito da interação entre a intensidade de luz i , o tipo de vedação j e concentração de sacarose k , e_{ijk} = erro aleatório associado a cada observação.

3. RESULTADOS

A partir da análise de variância foi possível observar diferenças significativas para os fatores isolados intensidades de luz, tipos de vedação e concentrações de sacarose no comprimento da planta, massa fresca da parte aérea e massa seca da parte aérea, massa da raiz fresca e massa seca de raiz, largura da folha e comprimento da folha; no entanto, não houve diferenças significativas para a variável folha por planta. O número de brotos apresentou-se diferença significativa nos fatores isolados de intensidade de luz e concentrações de sacarose. Para folha por planta verificou-se significância nos tipos de vedação (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância com quadrados médios para os efeitos da Intensidades de Luz (IL), tipos de vedação (TV) e concentrações de sacarose (CS) e suas interações na eficiência de crescimento in vitro da espécie *Bauhinia forficata* - pata de vaca.

FV	GL	QM				
		NB	CP	MPAF	MPAS	MRF
Intensidades de Luz (IL)	1	0,3510 ¹	0,5919 ¹	0,0425 ¹	0,0068 ¹	0,0443 ¹
Tipos de Vedação (TV)	1	0,0118 ^{ns}	1,0994 ¹	0,0437 ¹	0,0056 ¹	0,0507 ¹
Concentrações de Sacarose (CS)	2	0,2292 ¹	0,9786 ¹	0,0474 ¹	0,0055 ¹	0,0834 ¹
ILxTV	1	0,0026 ^{ns}	0,0314 ^{ns}	0,0167 ^{ns}	0,0025 ¹	0,0013 ^{ns}
ILxCS	2	0,0469 ^{ns}	0,1703 ^{ns}	0,0099 ^{ns}	0,0021 ¹	0,0107 ^{ns}
TVxCS	2	0,0359 ^{ns}	0,0064 ^{ns}	0,0098 ^{ns}	0,0013 ^{ns}	0,0135 ^{ns}
ILxTVxCS	2	0,0015 ^{ns}	0,2294 ^{ns}	0,0132 ^{ns}	0,0015 ^{ns}	0,0034 ^{ns}
Erro	36	0,0637	0,0910	0,0049	0,0005	0,0059
C.V. (%)		16,82	17,24	8,8	2,99	9,84

FV	GL	QM			
		MRS	LF	CF	F/Planta
Intensidades de Luz (IL)	1	0,0013 ¹	0,8060 ¹	0,1143 ¹	0,5284 ^{ns}
Tipos de Vedação (TV)	1	0,0013 ¹	2,3852 ¹	0,5239 ¹	1,4879 ¹
Concentrações de Sacarose (CS)	2	0,0026 ¹	0,8259 ¹	0,1894 ¹	0,4030 ^{ns}
ILxTV	1	0,0001 ^{ns}	0,0003 ^{ns}	0,0001 ^{ns}	0,0253 ^{ns}
ILxCS	2	0,000 ¹	1,0328 ¹	0,0941 ¹	0,0349 ^{ns}
TVxCS	2	0,0006 ¹	0,3198 ^{ns}	0,0311 ^{ns}	0,0183 ^{ns}
ILxTVxCS	2	0,0001 ^{ns}	0,3198 ^{ns}	0,0112 ^{ns}	0,0030 ^{ns}
Erro	36	0,0001	0,1721	0,0245	0,1613
C.V. (%)		1,5	43,1	13,79	25,1

^{ns} e ¹ indicam não significância ou significância em $p \leq 0,05$. NB – número de brotos; CP – comprimento de planta(cm); MFPA – massa fresca da parte aérea; MSPA(g) – massa seca da parte aérea; MFR(g) – massa

fresca de raiz; MRS (g) – massa seca de raiz; LF – Largura de Folha; CF – comprimento de Folha; NF – número de folhas.

Através da análise de variância observou-se que para as interações: intensidades de luz x tipos de vedação; intensidade de luz x concentração de sacarose; tipos de vedação x concentrações de sacarose e intensidade de luz x tipos de vedação x concentrações de sacarose, não houve diferenças significativas para as variáveis: números de brotos, comprimento da planta, massa fresca da parte aérea, massa da raiz fresca e folhas por planta. No entanto, observou-se diferenças significativas na interação entre os fatores de variação para a massa seca da parte aérea, massa da raiz seca, largura da folha e comprimento da folha (Tabela 1).

Quando verificado os fatores de forma isolada os fatores intensidades de luz e concentrações de sacarose, houve diferença significativa para número de brotos (Tabela 1). A maior intensidade de luz ($70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) promoveu a um aumento do número de brotos, permitindo 33,33% mais número de brotos quando comparados com $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade de luz (Figura 1A). Ainda, a adição de sacarose no meio de cultivo, influenciou em um maior número de brotos; no entanto, o aumento da concentração de sacarose de 20 para 30 g.L^{-1} não apresentou diferenças significativas (Figura 1B).

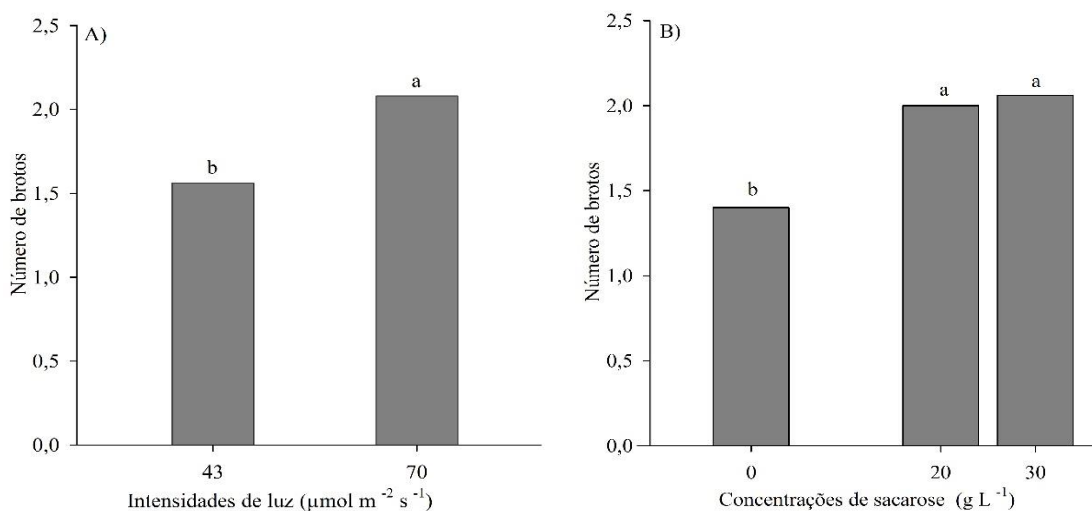


Figura 1. Número de brotos da espécie *Bauhinia forficata* - pata de vaca, após 45 dias de crescimento in vitro. A – intensidades de luz; B – concentração de sacarose. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Verificou-se diferenças significativas no comprimento da planta para os fatores isolados intensidade de luz, tipos de vedação e concentração de sacarose (Tabela 1). Uma diferença de 8,01 e 10,88 mm foi verificada quando submetido a $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de

intensidade de luz (Figura 2 G-L; Figura 3 A) e utilização de vedação com membranas (Figura 2 A-C, 2 G-I; Figura 3 B), respectivamente. A adição de sacarose no meio de cultivo permitiu um aumento significativo no comprimento da planta (Figura 2 A-L; Figura 3 C); no entanto, a concentração de 20 e 30 g.L^{-1} não influenciou no comprimento da planta da espécie *Bauhinia forficata* - pata de vaca (Figura 3 C).

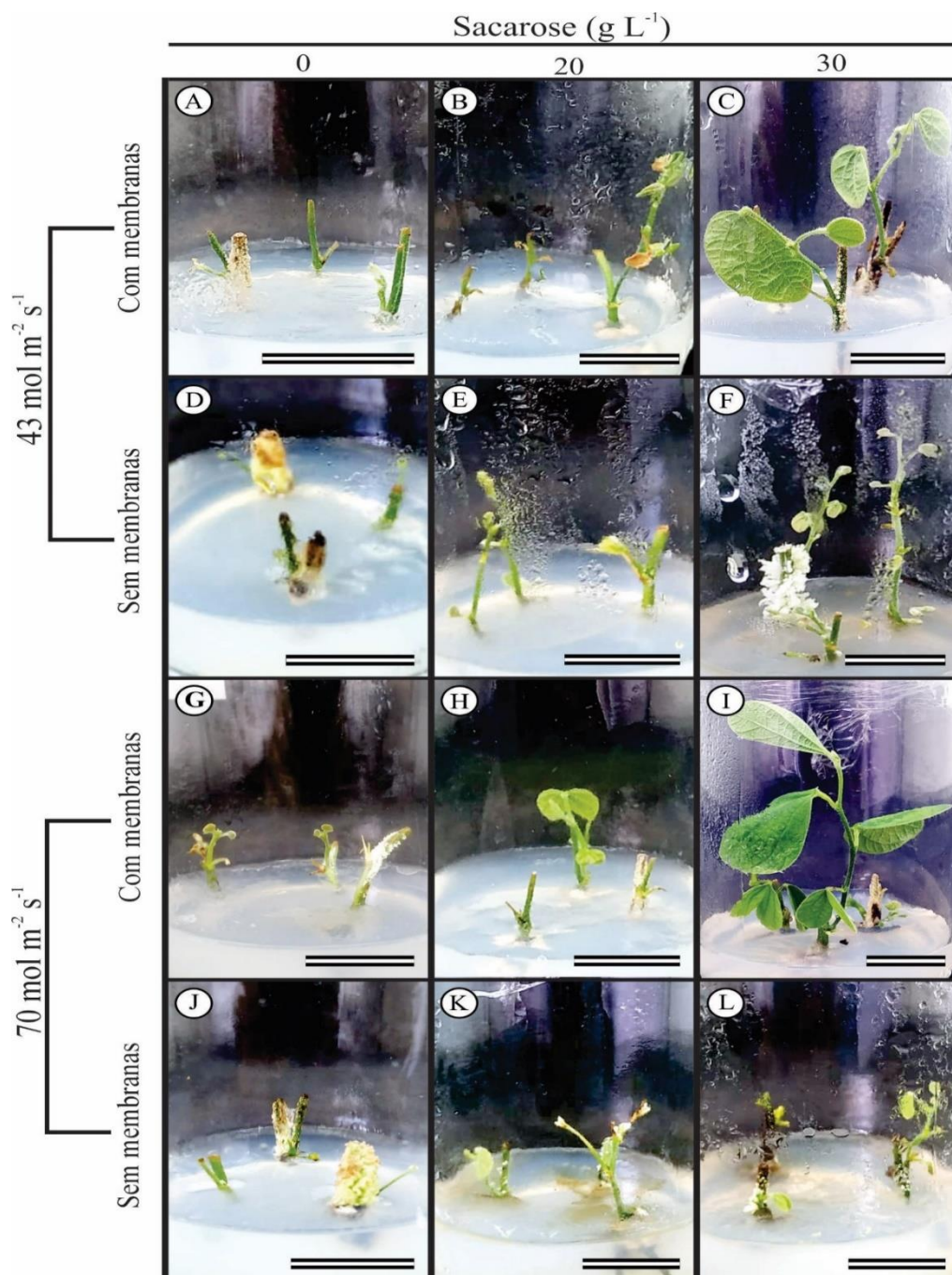


Figura 2. Aspecto geral da espécie *Bauhinia forficata* - pata de vaca, após 45 dias de crescimento in vitro, em diferentes intensidades de luz, tipos de vedação e concentrações de sacarose. Barra: 1 mm.

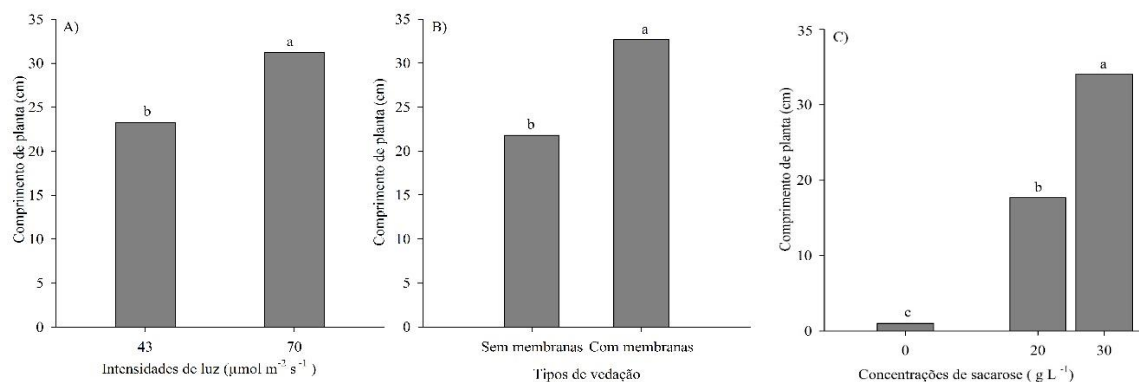


Figura 3. Comprimento da planta da espécie *Bauhinia forficata* - pata de vaca, após 45 dias de crescimento in vitro. A – Intensidades de luz; B – tipos de vedação; C – concentração de sacarose. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

A massa fresca da parte aérea diferiu significativamente quando observados isoladamente os fatores intensidade de luz, tipos de vedação e concentração de sacarose (Tabela 1). Observou-se uma diferença significativa de 2,20 vezes maior massa fresca da parte aérea na intensidade de luz a $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ quando comparado a $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 4 A). Também a utilização de membranas como tipos de vedação permitiu um aumento significativo na massa fresca da parte aérea de 2,25 vezes quando comparado aos tratamentos submetidos sem membranas (Figura 4 B). Já na concentração de sacarose, observou-se um aumento significativo da massa da parte aérea de 4,51 e 5,59 vezes quando adicionado sacarose na concentração de 20 e 30g L^{-1} respectivamente, e comparados com 0g L^{-1} ; no entanto, quando comparado a adição de sacarose na concentração de 20g L^{-1} e 30g L^{-1} não se observou diferenças significativas (Figura 4 C).

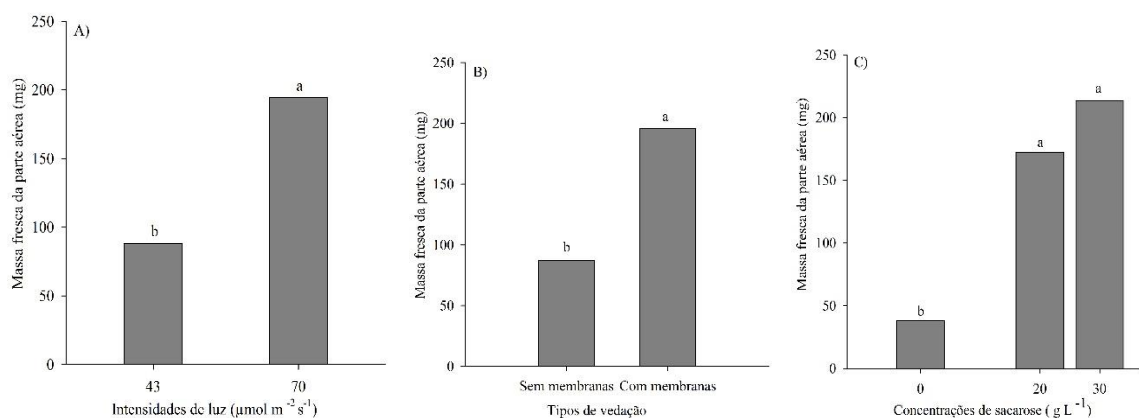


Figura 4. Massa fresca da parte aérea da espécie *Bauhinia forficata* - pata de vaca, após 45 dias de crescimento in vitro. A – intensidades de luz; B – tipos de vedação; C – concentração de sacarose. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

As intensidades de luz, tipos de vedação e concentrações de sacarose influenciaram na massa seca da parte aérea quando verificado cada fator em forma independente (Tabela 1). Observou-se um aumento significativo de 2,38 vezes da massa seca da parte aérea na intensidade de luz com $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e comparado a $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 5 A). A utilização de membranas como tipo de vedação permitiu um aumento de 2,20 vezes de massa seca da parte aérea quando comparado com o tipo de vedação sem membranas (Figura 5 B). Assim também, a adição de sacarose nas concentrações de 20 e 30 g L^{-1} , permitiu um aumento da massa seca da parte aérea em 3,97 e 5,07 vezes respectivamente, quando comparado com 0 g L^{-1} de concentração de sacarose; no entanto, nas concentrações de sacarose entre 20 e 30 g L^{-1} , não apresentaram diferenças significativas (Figura 5 C).

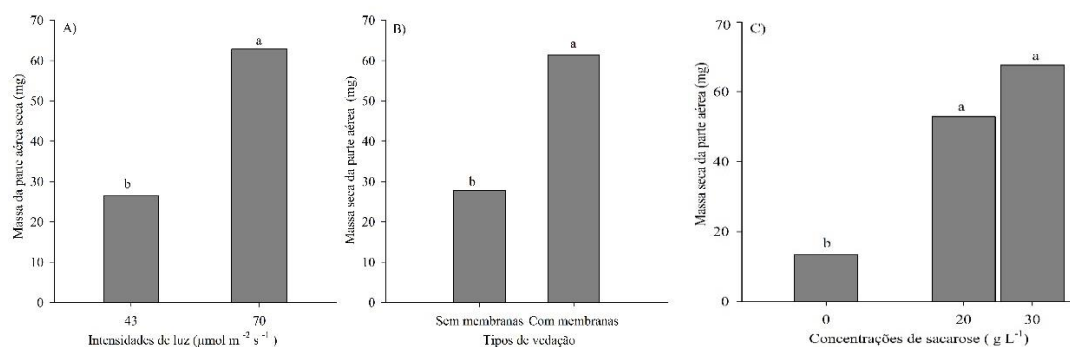


Figura 5. Massa seca da parte aérea da espécie *Bauhinia forficata* - pata de vaca, após 45 dias de crescimento in vitro. A – intensidades de Luz; B – tipos de vedação; C – concentração de sacarose. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Foi possível observar interação significativa entre fatores para intensidade de luz*tipos de vedação na massa seca da parte aérea (Tabela 1). Para intensidade de luz a $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, os tipos de vedação não influenciou na massa seca da parte aérea; no entanto, na intensidade de luz a $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, verificou-se maior massa com a utilização da vedação com membranas quando comparado a vedação sem membranas, apresentando um aumento de massa de 2,64 vezes quando utilizado o tipo de vedação com membrana (Tabela 2).

A utilização do tipo vedação sem membranas não influenciou significativamente na massa seca da parte aérea, quando comparado entre intensidade de luz de 43 ou $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabela 2). No entanto, o aumento da intensidade de luz de 43 para $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, utilizando-se frascos com membranas, houve aumento da massa seca da parte aérea em 2,88 vezes (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de desdobramento de intensidade de luz e tipos de vedação para massa seca da parte aérea de pata de vaca (*Bauhinia forficata*) aos 45 dias de cultivo in vitro.

Tipo de Vedação	Intensidade de Luz ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	
	43	70
	Massa seca da parte aérea (mg)	
Sem Membranas	21,18 aA	34,56 aB
Com Membranas	31,63 bA	91,16 aA
C.V. (%)	8,80	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na fila não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0.05$).

Foi verificado interação significativa entre intensidade de luz x concentração de sacarose para massa seca da parte aérea (Tabela 1). Não houve diferença significativas entre as concentrações de sacarose quando submetidos a intensidade de luz de $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabela 3). No entanto, quando submetidos a $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, foi verificado um aumento da massa seca da parte aérea em 3,99 e 6,31 vezes quando comparados nas concentrações de sacarose de 0 g L^{-1} com 20 g L^{-1} e 30 g L^{-1} respectivamente (Tabela 3).

Quando observado a interação intensidade de luz x concentração de sacarose para a massa seca da parte aérea, não foi verificado diferenças significativas nas concentrações tanto de 0 como 20 g L^{-1} de sacarose, quando comparados entre intensidade de luz de 43 e $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabela 3). No entanto, na concentração de 30 g L^{-1} de sacarose houve um aumento significativo de 3,52 vezes na intensidade de luz a $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e comparado com $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabela 3).

Tabela 3. Análise de desdobramento de intensidades de luz e concentrações de sacarose para massa seca da parte aérea de pata de vaca (*Bauhinia forficata*) aos 45 dias de cultivo in vitro.

Concentrações de Sacarose (g.L^{-1})	Intensidades de luz ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	
	43	70
	Massa seca da parte aérea (mg)	
0	10,01 aA	16,68 aB
20	39,23 aA	66,59 aA
30	29,96 bA	105,31 aA
C.V. (%)	8,80	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na fila não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0.05$).

Maior massa fresca de raiz foi obtido com a utilização de $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 6 A), com membranas (Figura 6 B) e 30 g L^{-1} de concentração de sacarose (Figura 6 C). Um incremento de 2,48 vezes foi obtido quando comparado entre 70 para $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 6 A); assim também, a utilização de membranas permitiu um aumento de 2.77 vezes a massa fresca de raiz quando comparado a sem membranas (Figura 6 B). No entanto, a utilização de

0 e 20 g L⁻¹ de concentração de sacarose não se observou diferenças significativas, mas estes apresentaram diferenças significativas com 30 g L⁻¹ de concentração de sacarose no meio de cultivo (Figura 6 C). A concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose permitiu um aumento de 52 e 24,20 vezes de massa fresca de raiz quando comparado com as concentrações de 0 e 20 g L⁻¹ de sacarose no meio de cultivo respetivamente (Figura 6 C).

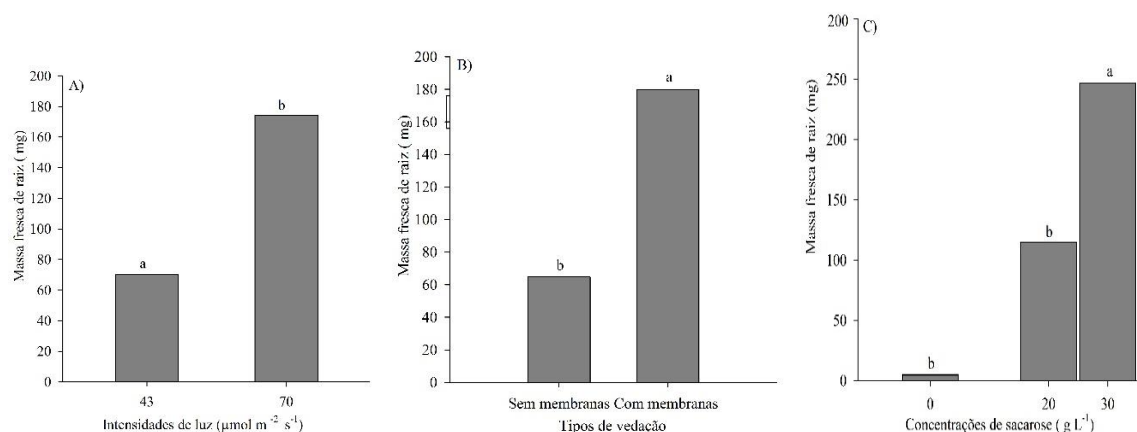


Figura 6. Massa fresca de raiz da espécie *Bauhinia forficata* - pata de vaca, após 45 dias de crescimento in vitro. A – intensidades de luz; B – tipos de vedação; C – concentração de sacarose. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0.05$).

Observou-se diferenças significativas da massa seca de raiz quando submetidos em forma isolada aos tratamentos com diferentes intensidades de luz, tipos de vedação e concentração de sacarose (Tabela 1). Verificou-se um incremento de 2,71 vezes a massa seca de raiz quando submetido a 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e comparado com 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 7 A). Também, a utilização de membranas permitiu um aumento de 1,60 vezes a massa seca de raiz quando comparado com a vedação sem membranas (Figura 7 B). A adição de 20 g L⁻¹ de sacarose não demonstrou diferença significativa quando comparado com 0 g L⁻¹ de sacarose (Figura 7 C); no entanto, as concentrações de sacarose de 0 e 20 g L⁻¹ foram significativos quando comparados com 30 g L⁻¹ de sacarose, apresentando uma diferença de 47,29 e 3,17 vezes maior massa seca da raiz quando comparado com 0 e 20 g L⁻¹ de sacarose (Figura 7 C).

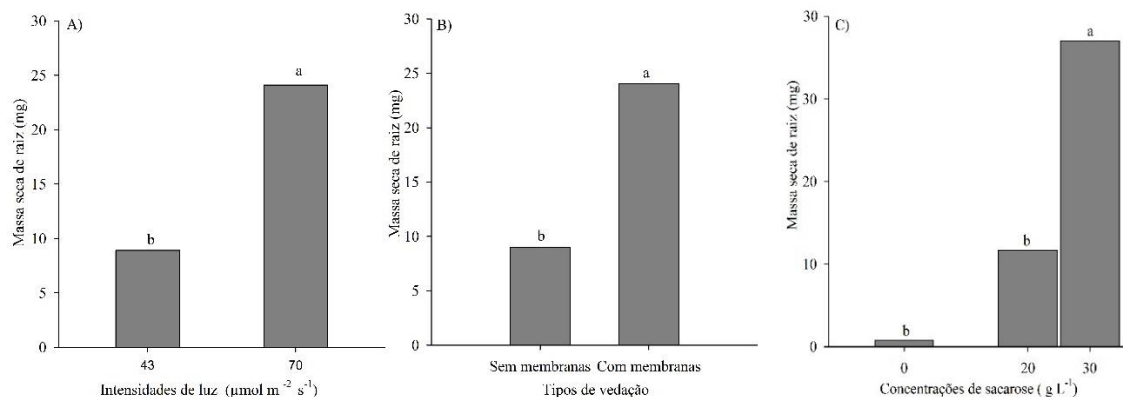


Figura 7. Massa seca de raiz da espécie *Bauhinia forficata* - pata de vaca, após 45 dias de crescimento in vitro. A – intensidades de luz; B – tipos de vedação; C – concentração de sacarose. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0.05$).

Para massa seca de raiz, foi possível observar diferença significativa para intensidade de luz x concentrações de sacarose (Tabela 1). Não foram verificadas diferenças significativas entre intensidade de luz (43 e 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) com concentrações de sacarose de 0 e 20 g L^{-1} ; no entanto, verificou-se diferenças significativas na intensidade de luz entre 43 e 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para a concentração de 30 g L^{-1} de sacarose, obtendo um incremento de 2,41 vezes maior peso com a intensidade de 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em relação a 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabela 4).

Tabela 4. Análise de desdobramento de intensidades de luz e concentrações de sacarose para massa seca de raiz de pata de vaca (*Bauhinia forficata*) aos 45 dias de cultivo in vitro.

Concentrações de Sacarose (g.L^{-1})	Intensidades de Luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	
	43	70
Massa seca de raiz (mg)		
0	0,19 aB	1,38 aB
20	4,80 aAB	18,60 aB
30	21,74 bA	52,35 aA
C.V. (%)	1,50	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na fila não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0.05$).

Quando observado em forma independente as intensidades de luz, foi observado diferenças significativas entre concentrações de sacarose na massa seca de raiz (Tabela 4). Na intensidade de luz de 43 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a concentração de 20 g L^{-1} de sacarose não apresentou diferenças significativas quando comparado com 0 e 30 g L^{-1} de sacarose; no entanto, a concentração de 30 g L^{-1} de sacarose demonstrou uma maior massa seca de raiz (114,42 vezes) quando comparado com a concentração de 0 g L^{-1} de sacarose (Tabela 4). Já na intensidade de luz a 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, as concentrações de 0 e 20 g L^{-1} de sacarose se

apresentaram indiferentes, no entanto, estes dois últimos tratamentos foram diferentes da concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose, demonstrando um incremento significativo de 37,93 e 2,81 vezes maior massa seca de raiz quando comparado com as concentrações de 0 e 20 g L⁻¹ de sacarose respectivamente (Tabela 4).

Para a variável massa seca de raiz, foi possível observar diferenças significativas para a interação tipos de vedação*concentração de sacarose (Tabela 1). Quando observado para os tipos de vedação sem membranas entre as diferentes concentrações de sacarose (0, 20 e 30 g L⁻¹) não demonstraram diferença significativas entre si. No entanto, nos tipos de vedação com membranas na concentração de 0 e 20 g L⁻¹ de sacarose não diferiram; mas, estes demonstraram ser diferentes das plantas mantidas com 30 g L⁻¹ de sacarose, apresentando 133,78 e 3,25 vezes mais massa seca de raiz em relação a 0 e 20 g L⁻¹ de concentração de sacarose, respectivamente (Tabela 5).

Verificando a massa seca de raiz entre tipos de vedação na observação em cada concentração de sacarose, não foram observadas diferenças significativas entre sem membranas e com membranas nas concentrações de 0 e 20 g L⁻¹ de sacarose; no entanto, na concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose foi observado uma diferença de 2,85 vezes das plantas mantidas em frascos com membranas permeáveis a gases (Tabela 5).

Tabela 5. Análise de desdobramento de tipo de vedação e concentrações de sacarose para massa seca da parte aérea de pata de vaca (*Bauhinia forficata*) aos 45 dias de cultivo in vitro.

Concentrações de Sacarose (g.L ⁻¹)	Tipos de Vedação	
	Sem Membranas	Com Membranas
	Massa seca de raiz (mg)	
0	1,15 aA	0,41 aB
20	6,51 aA	16,89 aB
30	19,24 bA	54,85 aA
C.V. (%)	1,50	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na fila não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0.05$).

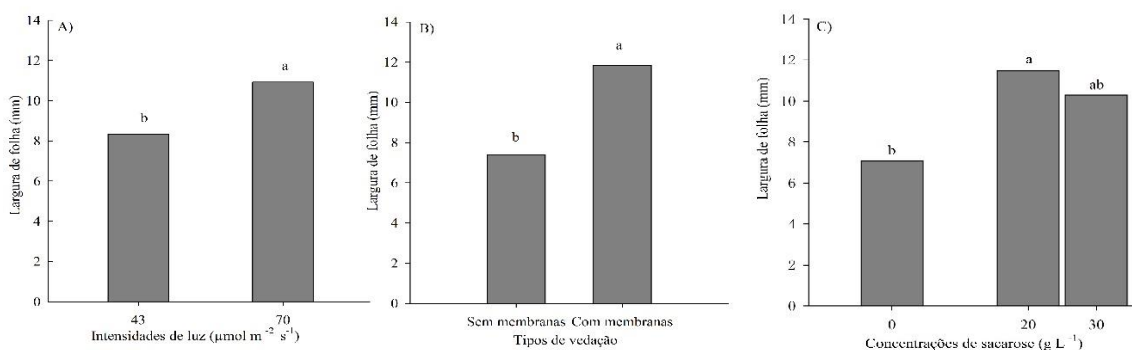


Figura 8. Largura de folha da espécie *Bauhinia forficata* - pata de vaca, após 45 dias de crescimento in vitro. A – intensidades de luz; B – tipos de vedação; C – concentração de sacarose. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0.05$).

Apresentou-se diferença significativa na largura da folha para os fatores intensidades de luz, tipos de vedação e concentração de sacarose em forma independente (Tabela 1). Uma maior largura de folha foi obtida em $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luz, sendo 1,31 vezes maior que $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 8 A). Com a vedação de membranas obteve-se uma diferença de 1,60 vezes quando comparado com a vedação sem membranas (Figura 8 B). Na concentração de 20 g L^{-1} de sacarose demonstrou diferença significativa em relação com 0 g L^{-1} de sacarose, apresentando 1,61 vezes maior largura de folha. Já na concentração de 30 g L^{-1} de sacarose não demonstrou diferença significativa em relação aos tratamentos 0 e 20 g L^{-1} de sacarose (Figura 8 C).

Para a variável largura de folha, foi possível observar diferenças significativas para a interação intensidade de luz*concentração de sacarose (Tabela 1). Na intensidade de luz a $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ não foi observado diferenças significativas entre concentrações de sacarose (Tabela 6). Na intensidade de luz a $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ não foi observado diferença significativa entre as concentrações 20 e 30 g L^{-1} de sacarose; no entanto, estas concentrações foram superiores de 0 g L^{-1} de sacarose (Tabela 6).

Quando observados entre intensidades de luz nas diferentes concentrações de sacarose, não houve diferença significativa na concentração de 0 g L^{-1} de sacarose quando comparado entre 43 e $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabela 6). Na intensidade de luz de $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentou 1,60 e 1,90 vezes maior largura de folha quando comparado com a intensidade de luz a $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, nas concentrações de 20 e 30 g L^{-1} de sacarose, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6. Análise de desdobramento de intensidades de luz e concentrações de sacarose para largura de folha de pata de vaca (*Bauhinia forficata*) aos 45 dias de cultivo in vitro.

Concentrações de Sacarose (g.L ⁻¹)	Intensidades de Luz (μmol m ⁻² s ⁻¹)	
	43	70
	Largura de folha (mm)	
0	6,44 aA	7,75 aB
20	8,85 bA	14,13 aA
30	6,90 bA	13,69 aA
C.V. (%)	43,10	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na fila não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Obteve-se diferenças significativas no comprimento de folha quando observados em forma independente cada fator, intensidades de luz, tipos de vedação e Concentrações de sacarose (Tabela 1). Verificou-se um incremento de 1,06 vezes quando submetido a intensidade de luz de 70 μmol m⁻² s⁻¹ em relação a 43 μmol m⁻² s⁻¹ de intensidade de luz (Figura 9 A). A utilização de vedação com membranas permitiu um aumento de 2,10 vezes o comprimento de folha em relação a vedação sem membranas (Figura 9 B). As concentrações de 20 e 30 g L⁻¹ de sacarose não foram diferentes entre si, mas foram diferentes quando comparado a concentração de 0 g L⁻¹ de sacarose, sendo este último 1,65 e 0,74 vezes de inferior comprimento de folha quando comparado a 20 e 30 g L⁻¹ de sacarose respectivamente (Figura 9 C).

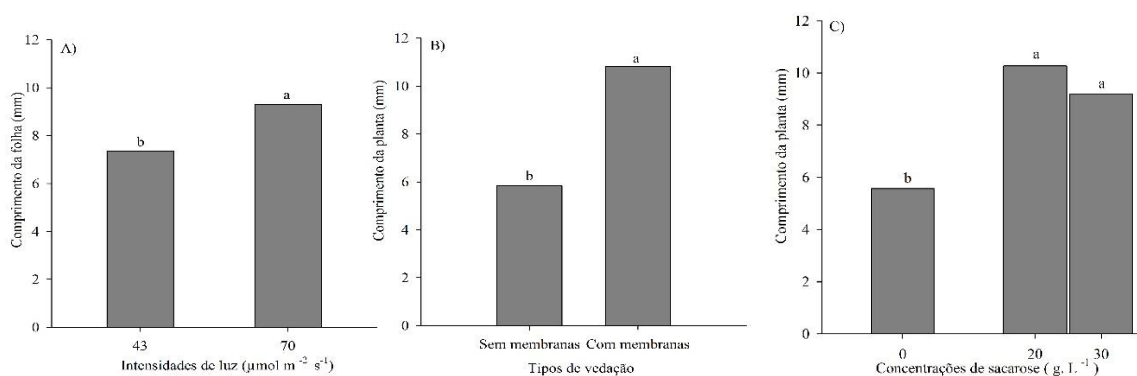


Figura 9. Comprimento de folha da espécie *Bauhinia forficata* - pata de vaca, após 45 dias de crescimento in vitro. A – Intensidades de luz; B – tipos de vedação; C – concentrações de sacarose. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Para a variável comprimento de folha, foi possível observar diferenças significativas para a interação intensidades de luz x concentrações de sacarose (Tabela 1). Não houve diferenças significativas nas concentrações de 0 e 20 g L⁻¹ de sacarose quando comparados entre intensidade de luz de 43 e 70 μmol m⁻² s⁻¹; no entanto, apresentou diferença

significativa de 1,78 vezes maior comprimento para a intensidade de $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, quando comparado com $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabela 7).

Tabela 7. Análise de desdobramento de intensidades de luz e concentrações de sacarose para comprimento de folha de pata de vaca (*Bauhinia forficata*) aos 45 dias de cultivo in vitro.

Concentrações de Sacarose (g.L^{-1})	Intensidades de Luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	
	43	70
	Comprimento de folha (mm)	
0	4,15 aB	6,99 aB
20	11,31 aA	9,23 aAB
30	6,59 bB	11,73 aA
C.V. (%)	13,79	

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na fila não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0.05$).

Na intensidade de luz a $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, não foi observado diferenças significativas entre 0 e 30 g L^{-1} de sacarose; no entanto, estes últimos foram diferentes significativamente quando comparado a 20 g L^{-1} de sacarose, demonstrando um incremento de 2,72 e 1,71 vezes em relação as concentrações de 0 e 30 g L^{-1} de sacarose, respetivamente (Tabela 7). Para a intensidade de luz de $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a concentração com 20 g L^{-1} de sacarose não foi diferente significativamente das concentrações 0 e 30 g L^{-1} de sacarose; no entanto, a concentração de 30 g L^{-1} de sacarose apresentou um aumento significativa de 1,68 vezes em relação a concentração de 0 g L^{-1} de sacarose (Tabela 7).

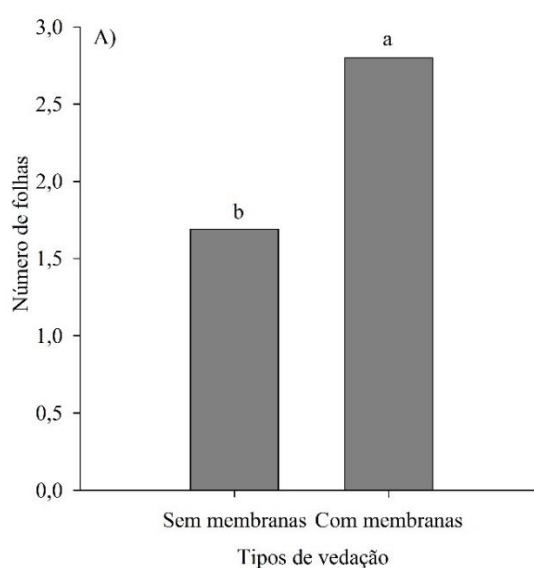


Figura 10. Folha por planta da espécie *Bauhinia forficata* - pata de vaca, após 45 dias de crescimento in vitro. A – tipos de vedação. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0.05$).

Apresentou-se diferença significativa para a variável folha por planta, para os fatores independentes Intensidades de luz e Tipos de vedação (Tabela 1). Foi observado um aumento de folha por planta em 1,35 vezes quando submetido a $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em relação a $43 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 10 A).

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho, através da análise de variância com a utilização de LEDs em diferentes IL, foram observadas maior crescimento e desenvolvimento em NB, CP, MPAF, MPAS, MRF, MRS, LF e CF. Pinheiro et al. (2019) relataram maiores comprimento da planta, enraizamento, aclimação das plantas e multiplicação de brotos de *Alpinia purpurata*, quando utilizadas LED brancas. Gago et al. (2014), observaram incremento de massa seca da plantas com aumento da intensidade de luz., semelhante ao observado por Araújo et al., (2021), quando avaliaram diferentes densidades do fluxo de fótons (20 a 139 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e comprimento de ondas por diodos emissores de luz (LEDs) em *Aeollanthus suaveolens*. A importância da luz deriva de sua relação com a fotossíntese, fotoperíodo e morfogênese, sendo comprimento de onda, densidade de fluxos fotossinteticamente ativos e a duração da exposição da luz, dentre outros, fatores estes capazes de influenciar desenvolvimento e crescimento das plantas (READ & PREECE, 2003; KUMAR & REDDY, 2011).

Diversos estudos evidenciam efeito das trocas gasosas na morfogênese *in vitro* de várias espécies (PARK et al., 2004; RIBEIRO et al., 2009; YOON et al., 2009; ARAGÓN et al., 2010; CHA-UM et al., 2010). Em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) *in vitro*, houve maior crescimento com a utilização de membranas porosas a gases, devido a maior troca de gases ocasionado pela maior ventilação do frasco de cultivo com o meio externo (Saldanha et al., (2012) e Correa et al., (2015, 2016). Neste trabalho foram observadas maiores crescimento do CP, LF, CF, maior NF e maiores pesos da MPAF, MRF, quando submetidos a tratamentos MM e observados na Figura 6, onde as plantas apresentaram visualmente serem mais vigorosa e com melhor desenvolvimento morfogênico quando comparados com o tratamento SM.

Melhores desenvolvimento da morfogênese promovem a planta maior rusticidade e maturidade quando aumentado o peso fresco e seco da planta, isto como consequência de melhores características anatômicas, desenvolvimento do sistema vascular e alta concentração de compostos fenólicos, observados principalmente quando utilizados frascos com membranas que permitem uma maior troca de gases (BATISTA et al., 2017). Ainda, a importância do comprimento da planta radica em que, uma redução do tamanho da mesma junto com menores números de brotos irá produzir menos brotos únicos para a subcultura (MOHAMED & ALSADON, 2010).

Segundo Gonçalves et al. (2007) as diferenças na utilização de frascos com ou sem membranas é devido a que, frascos ventilados facilitam maior perda de água podendo afetar o crescimento devido a mudanças nas características e concentração do meio. Porém, maiores pesos das plantas em vasos ventilados podem ser a consequência de um aumento da concentração de CO₂ e aumento da atividade fotossintética (MOHAMED & ALSADON, 2010).

Observações semelhantes a este trabalho também foram relatadas por Pinheiro et al., (2013) em que cultivares de *Olea europaea* apresentaram maior efetividade para multiplicação de gemas e estabelecimento de brotos *in vitro* com o uso de frascos com membranas, permitindo maiores trocas de gases e conseqüentemente maior crescimento e fisiologia da planta. No trabalho desenvolvido pelos pesquisadores Mohamed & Alsadon (2010), observaram plantas mais curtas, maiores folhas, menor peso fresco da parte aérea e maior peso seco da parte aérea em vasos ventilados com membranas de polipropileno microporosa de 10 mm. Também Batista et al. (2017), relataram estrutura anatômica diferenciadas e mais vigorosas em plantas submetidas a frascos com membranas, apresentando plantas maiores, folhas mais expandidas, maior número de folhas, massa fresca e seca da parte aérea.

No presente trabalho, à medida que houve incremento na concentração de sacarose (0 a 30 g L⁻¹), foi possível observar aumento em NB, CP, MPAF, MPAS, MRF, MRS, LF e CF. Mohamed & Alsadon (2010) também observaram um aumento significativo na altura e peso da parte aérea fresca com o aumento da concentração de sacarose de 10 a 30 g.L⁻¹. Células vegetais, tecidos e culturas de órgãos precisam de sacarose como fonte de carbono (GAGO et al., 2014), para garantir o desenvolvimento, sustentação do metabolismo fotomixotrófico e precursor de metabolitos de sinalização ou carbono (COUPE et al., 2006; MULLER et al., 2011), não influenciando a germinação, mas necessária para o crescimento da planta (WALTER, 2019).

Em análises de inteligência artificial sobre o efeito da sacarose nos parâmetros morfogênicos, Gago et al. (2014) observaram através de um modelo de predição que o aumento da concentração de sacarose tem um forte e independente efeito sobre o comprimento da raiz e comprimento dos brotos, determinando a sobrevivência das plantas.

Gago et al. (2014) observaram interação significativa entre luz e sacarose para o número de folhas e peso seco da planta. O mesmo autor relatou que aumentos significados foram encontrados com um aumento da concentração de sacarose e intensidade de luz (122-138 μmol m⁻².s⁻¹). Neste estudo não foi observado diferenças para a interação (ILxNS) no

NF; no entanto, similar resposta foi obtido para MPAS em relação as observações do autor anterior. Além desses resultados, também foram encontradas diferenças significativas para as variáveis MRS, LF e CF; e não interferiram significativamente nas variáveis NB, CP, MPAF, MRF e NF.

Maior crescimento da planta foi observado na espécie *P. glomerata*, quando submetido a tampas com membranas e incremento de sacarose (SALDANHA et al., 2013). No entanto, nesta pesquisa não foram observadas diferenças significativas para esta variável na interação (TVxNS); mas, contrário ao anterior autor foram observados maiores pesos da MRS. Mohamed & Alsdon (2010), observaram plantas com maior altura quando tratados sem membranas e 30 g.L⁻¹ de sacarose no meio de cultura, diminuição do número de brotos em vasos sem membranas e aumento de 0 a 30 g L⁻¹ de sacarose, apresentando o maior número de brotos e peso seco da planta quando submetidos a vasos com membranas e 20 g.L⁻¹ de sacarose, resultados que não foram observados neste trabalho. Os mesmos autores indicaram que o uso de frascos ventilados com baixa concentração de sacarose pode induzir com sucesso a cultura fotomixotrófica, resultando em maior peso de folha, anatomia da folha e desenvolvimento da planta.

5. CONCLUSÃO

A condição mais indicada para o cultivo *in vitro* de pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* Link), é com a utilização de 30 g L⁻¹ de sacarose no meio de cultura e a vedação com membranas nos frascos para propiciar maiores trocas gasosas, independente da intensidade de luz.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ARAGÓN, C., CARVALHO, L., GONZÁLEZ, J., ESCALONA, M., AMÂNCIO, M. (2010). *Ex vitro* acclimatization of plantain plantlets micropropagated in temporary immersion bioreactor. **Biologia Plantarum**, 54:237-244.

ARAÚJO, D.X.; ROCHA, T.T.; CARVALHO, A.A.; BERTOLUCCI, S.K.V.; MEDEIROS, A.P.R.; RIBEIRO, F.N.S.; BARBOSA, S.M.; PINTO, J.E.B.P. (2021). Photon flux density and wavelength influence on growth, photosynthetic pigments and volatile organic compound accumulation in *Aeollanthus suaveolens* (Catinga-de-mulata) under in vitro conditions. **Industrial Crops and Products.** V168.

BARBOSA, G.G.; TARGA, V.M.I.; OTONI, W.C.; RONDON, J.N.; ARAÚJO COSTA, F.A. (2021). Cultivo in vitro de embrião zigótico de Baru influenciado por tipos de vedações e concentrações de sacarose, **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.4, p. 42390-42408.

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

BATISTA, D.S.; FELIPE, S.H.S.; SILVA, T.D.; CASTRO, K.M.; MAMEDES-RODRIGUES, T.C.; MIRANDA, N.A.; RÍOS-RÍOS, A.M.; FARIA, D.V.; FORTINI, E.A.; CHAGAS, K.; TORRES-SILVA, G.; XAVIER, A.; ARENCIBIA, A.D.; OTONI, W.C. (2018). Light quality in plant tissue culture: does it matter? **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 54:195–215.

CARVALHO, A.C.P.P.; RODRIGUES, A.A.J.; SANTOS, E.O. (2016). Documentos 157. Panorama da produção de mudas micropropagadas no Brasil (2008-2015). Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical**, 36p.

COSTA, D.A. (2012) Aspectos fisiológicos da cana-de-açúcar sob o cultivo *in vitro* em diferentes microambientes. Tese (Doutorado em Botânica) – Recife – PE, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, 82p.

CHA-UM, S.; ULZIIBAT, B.; KIRDMANEE, C. (2010). Effects of temperature and relative humidity during *in vitro* acclimatization, on physiological changes and growth characters of *Phalaenopsis* adapted to *in vivo*. **Australian Journal of Crop Science**, 4:750-756.

CHEN, C. (2004). Humidity in plant tissue culture vessels. **Biosystems Engineering**, v.88, p.231-241.

CORREA, J.P.O.; VITAL, C.E.; PINHEIRO, M.V.M.; BATISTA, D.S.; AZEVEDO, J.F.L.; SALDANHA, C.W.; CRUZ, A.C.F.; DAMATTA, F.M.; OTONI, W.C. (2015). In vitro photoautotrophic potential and ex vitro photosynthetic competence of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen accessions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 121:289–300.

CORREA, J.P.O.; VITAL, C.E.; PINHEIRO, M.V.M; BATISTA, D.S.; SALDANHA, C.W.; CRUZ, A.C.F.; NOTONI, M.M.; FREITAS, D.M.S.; DA MATTA, F.M.; OTONI, W.C. (2016). Induced polyploidization increases 20-hydroxyecdysone content, *in vitro* photoautotrophic growth, and *ex vitro* biomass accumulation in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, 52:45–55.

COUPE, S.A.; PALMER, B.G.; LAKE, J.A.; OVERY, S.A.; OXBOROUGH, K.; WOODWARD, F.I.; GRAY, J.E.; QUICK, W.P. (2006). Systemic signalling of environmental cues in *Arabidopsis* leaves. **Journal of Experimental Botany**. 57:2 329–341.

COUPE, S.A.; PALMER, B.G.; LAKE, J.A.; OVERY, S.A.; OXBOROUGH, K.; WOODWARD, F.I., GRAY, J.E.; QUICK, W.P. (2006). Systemic signalling of environmental cues in *Arabidopsis* leaves. **Journal of Experimental Botany**. 57: 329–341.

DIGNART, S.L.; CASTRO, E.M. de; PASQUAL, M.; FERRONATO, A.; BRAGA, F.T.; PAIVA, R. (2009). Luz natural e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. **Ciência agrotecnológica**. Lavras, v. 33, n. 3, p. 780-787, maio/jun.

ECONOMOU, A.S.; READ, P.E. (1987). Light treatments to improve efficiency of *in vitro* propagation systems. **Hortscience**, Alexandria, v. 22, n. 5, p. 751-754.

FERREIRA, D.F. (2011) Sisvar: A computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35:1039-1042.

GAGO, J.; MARTÍNEZ-NÚÑEZ, L.; LANDÍN, M.; FLEXAS, J.; GALLEGO, P.P. (2014). Modeling the Effects of Light and Sucrose on *In Vitro* Propagated Plants: A Multiscale System Analysis Using Artificial Intelligence Technology. **PLOS ONE** 9, v.8, p. 59-89.

GEORGE, E.F. (2008). **Propagação de plantas por cultura de tecidos**. 3. ed. Grã-Bretanha: Exegetics, 479p.

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

GONCALVES, L.A.; GERALDINE, R.M.; PICOLI, E.A.T.; VENDRAME, W.A.; DE CARVALHO, C.R.; OTONI, W.C. (2007). *In vitro* propagation of *Herreria salsaparilha* Martius (Herreriaceae) as affected by different sealing materials and gaseous exchanges. **Plant Cell Tissue Org. Cult.** v. 92, p. 243–250.

GOVIL, S.; GUPTA, S.C. (1997). Comercialization of plant tissue culture in India. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. V.51, p. 65-73.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D.E.; DAVIES, F.T.; GENEVE, R.L.; WILSON, S.B. (2018). Hartmann and Kester’s Plant propagation: principles and practices. **Ninth edition ed.** NY, NY: Pearson.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JUNIOR, F. T.; GENEVE, R. L. (2002) **Plant propagation: principles and practices**. 7. ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 880 p.

Kim, S.J.; Hahn, E.J.; Heo, J.W.; Paek, K.Y. (2004) Effects of LED'S on net photosynthetic rate, growth and leaf stomata of chrysanthemum plantlets *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v. 101, p.143–151.

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

KOZAI, T. (2010) Photoautotrophic micropropagation – environmental control for promoting photosynthesis. **Propag Ornament Plant**, v. 10, p. 188–20

KOZAI, T.; IWABUCHI, K.; WATANABE, I. (1991). Photoautotrophic and photomixotrophic growth strawberry plantlets *in vitro* and changes in nutrient composition of the medium. **Plant Cell tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 25, p. 107-115.

KOZAI, T.; KUBOTA, C.; BYOUNG, R.J. (1997). Environmental control for the large scale production of plants through *in vitro* techniques. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 51:49-56.

KUMAR, N.; REDDY, M.P. (2011). *In vitro* Plant Propagation: A Review. **Journal of Forest Science**. Vol. 27, No. 2, p. 61-72.

LÓPEZ, R.E. da S.; SANTOS, B.C. dos. (2015). *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae). **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, Vol, 9(3), 161-252, Jul-Set.

MARTINS, R.E.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. (1998). **Plantas Mediciniais**, Ed. UFV : Viçosa, p. 155.

MAYER, J.L.S.; RIBAS, L.L.F.; BONA, C.; QUOIRIN, M. (2008). Anatomia comparada das folhas e raízes de *Cymbidium Hort.* (Orchidaceae) cultivadas *ex vitro* e *in vitro*. **Acta bot. bras.** 22(2): 323-332.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497.

MOHAMED, M.H.; ALSADON, A.A. (2010). Influência da ventilação e da sacarose no crescimento e na anatomia foliar de mudas de batata micropropagadas. **Scientia Horticulturae**. V123:3, pág. 295-300.

MULLER, B.; PANTIN, F.; GÉNARD, M.; TURC, O.; FREIXES, S.; PIQUES, M.; GIBON, Y. (2011). Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs.. **Journal of Experimental Botany**. 62: 1715–1729.

OLIVEIRA, M. C. de; RIBEIRO, J. F. (2013) Enraizamento de estacas de *Euplassa inaequalis* (Pohl) Engl. de mata de galeria em diferentes estações do ano. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 4, p. 991–999.

PARK, S.W.; JEON, J.H.; KIM, S.H.; PARK, Y.M.; ASWATH, C.; JOUNG, H. (2004). Effect of sealed and vented gaseous microenvironment on hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, 99:199-205.

PINHEIRO, M.V.M.; MARTINS, F.B.; Xavier,A.; OTONI, W.O. (2013). Trocas gasosas Influenciam na Morfogênese *in vitro* de duas cultivares de Oliveira (*Olea europaea* L.), **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.37, n.1, p.19.29.

PINHEIRO, M.V.M.; SCHMIDT, A.P.C.; ARAÚJO, G.M.; HOLZ, E.; OTONI, W.C.; SCHMIDT, D. (2019). Impacto da concentração de MS e qualidades de luz no alongamento e enraizamento do gengibre vermelho alpino *in vitro*. **Plant Cell Culture & Micropropagation** v. 15, n. 2, p. 40-48.

PRAKASH, S.; HOQUE, M.I.; BRINKS, T. (2004). Culture media and containers. In: **International Atomic Energy Agency**. Low costs options for tissue culture technology in developing countries. Austria, p. 29-40.

READ, P.E., PREECE, J.E. (2003). Environmental management for optimizing micropropagation. **Acta Hort**, v. 616, p. 129-133.

REZENDE, R.K.S.; PAIVA, L.V.; PAIVA, R.; CHALFUN JÚNIOR, A.; TORGA, P.P.; CASTRO, E.M. de. (2008). Organogênese em capítulos florais e avaliação de características anatômicas da folha de *Gerbera jamesonii* Adlam. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.3, p.821-827.

REUVENI M, EVENOR D. (2007). Sobre o efeito da luz na regeneração de ramos em petúnia. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 89, p. 49–54.

RIBEIRO, A.P.O.; PICOLI, E.A.T.; LANI, E.R.G.; VENDRAME, W.A.; OTONI, W.C. (2009) The influence of flask sealing on *in vitro* morphogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.45, p. 421–428.

SÁEZ, P.L.; BRAVO, L.; LATSAGUE, M.I.; TONEATTI, M.J.; SANCHEZ-OLATE, M.; RIOS, D.G. (2013). Light energy management in micropropagated plants of *Castanea sativa*, effects of photoinhibition. **Plant Sci**, v. 201, p. 12–24.

SALDANHA, C.W.; OTONI, C.G.; AZEVEDO, J.L.F.; DIAS, L.L.C.; RÊGO, M.M.; OTONI, W.C. (2012) 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.

SALDANHA, C.W.; OTONI, C.G.; NOTINI, M.N.; KUKI, K.N.; CRUZ, A.C.F.; NETO, A.R.; DIAS, L.L.C.; OTONI, W.C. (2013). A CO₂-enriched atmosphere improves *in vitro* growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 49, p.433–444.

SANTANA, J.R.F. de; PAIVA, R.; RESENDE, R.K.S.; CASTRO, E.M. de; PEREIRA, F.D.; OLIVEIRA, L.M. (2008). Estímulo do comportamento foto autotrófico durante o enraizamento *in vitro* de *Annona glabra* L., II. Aspectos da anatomia da folha antes da aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.2, p. 640-644.

SERRET, M.D.; TRILLAS, M.I.; MATAS, J.; ARAUS, J.L. (1997). The effect of different closure types, light, and sucrose concentration on carbon isotope composition and growth of *Gardenia jasminoides* plantlets during the micropropagation and subsequent acclimation *ex vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ**, Dordrecht, v. 47, p. 217-230.

SOUZA, A.V.; PEREIRA, A.M.S. (2007). Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.9, n.4, p.103-117.

SILVA, A.B. da; PASQUAL, M.; CASTRO, E.M. de; MIYATA, L.Y.; MELO, L.A. de; BRAGA, F.T. (2008). Luz natural na micropropagação do abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr). **Interciência**, Caracas, v. 33, p. 839-843.

SKREBSKY, E.C.; NICOLOSO, F.T.; FERRÃO, G.E. (2004). Sacarose e período de cultivo *in vitro* na aclimação *ex vitro* de ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen). **Ciência Rural**, 34:1471-1477.

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

WALTER, R. (2019). Aplicação da cultura de tecidos no Melhoramento de *Capsicum annuum*: superação de barreiras pós-zigóticas, produção de genótipos em larga escala e protocolo para obtenção de haploides. **Tese** (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas), Campos dos Goytacazes, RJ, Universidade do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 165p.

WENDLING, I.; BRONDANI, G.E.; BIASSIO, A.; DUTRA, L.F. (2013). Vegetative propagation of adult *Ilex paraguariensis* trees through epicormic shoots. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 35, n. 1, p. 117-125.

YOON, Y.J.; MOBIN, M.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. (2009). Impact of *in vitro* CO₂ enrichment and sugar deprivation on acclamatory responses of Phalaenopsis plantlets to *ex vitro* conditions. **Environmental and Experimental Botany**, 65:183-188.

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

XU, Y.; YANG, M.; CHENG, F.; LIU, S.; LIANG, Y. (2020). Effects of LED photoperiods and light qualities on *in vitro* growth and chlorophyll fluorescence of *Cunninghamia lanceolata*. **BMC Plant Biology**, Guangxi, v.20, p.269.

ZOBAYED, E.A.; ZOBAYED, S.M.A.; KUBOTA, C.; KOZAI, T.; HASEGAWA, O. (1999). Supporting material affects the growth and development of *in vitro* sweet potato plantlets cultured photoautotrophically. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant** volume 35, pages470–474.