

**REDE CENTRO-OESTE DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E  
BIODIVERSIDADE**

**PHOTON FLUX DENSITY AND WAVELENGTHS ALTER THE  
MORPHOPHYSIOLOGICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS OF  
*Anacardium othonianum* RIZZ. *in vitro***

Márcio Rosa

*Doctor Scientiae*

RIO VERDE  
GOIÁS – BRASIL  
2020

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR  
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES  
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**       Dissertação       Tese

**2. Identificação da Tese ou Dissertação:**

Nome completo do autor: Márcio Rosa

Título do trabalho: Photon flux density and wavelengths alter the morphophysiological and chemical characteristics of *Anacardium othonianum* Rizz. *in vitro*

**3. Informações de acesso ao documento:**

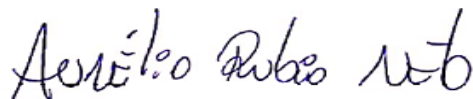
Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do autor<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:



Assinatura do orientador<sup>2</sup>

Data: 19/03/2020

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

<sup>2</sup> A assinatura deve ser escaneada.

**MÁRCIO ROSA**

**PHOTON FLUX DENSITY AND WAVELENGTHS ALTER THE  
MORPHOPHYSIOLOGICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS OF  
*Anacardium othonianum* RIZZ. *in vitro***

Orientador:

**Prof. Aurélio Rubio Neto**

Co-orientador:

**Prof. Paulo Sérgio Pereira**

Tese apresentada à Universidade Federal de Goiás como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Rio Verde  
Goiás – Brasil  
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Rosa, Márcio

Photon flux density and wavelengths alter the morphophysiological and chemical characteristics of *Anacardium othonianum* Rizz. in vitro [manuscrito] / Márcio Rosa. - 2020. xiv, 90 f.

Orientador: Prof. Dr. Aurélio Rubio Neto; co-orientador Dr. Paulo Sérgio Pereira.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, Goiânia, 2020.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, lista de tabelas.

1. Caju-de-árvore-do-cerrado. 2. Taxa fotossintética. 3. Flavonoides. 4. Irradiância. 5. Qualidade de luz. I. Rubio Neto, Aurélio, orient. II. Título.

CDU 60



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E  
BIODIVERSIDADE  
Rua 235, S/N - Setor Universitário - Goiânia/GO CEP 74605-050  
Fone (62) 3209.6362  
email: [pgbb.goias@gmail.com](mailto:pgbb.goias@gmail.com)

**ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE MÁRCIO ROSA** -  
Aos vinte dois dias do mês de janeiro do ano de 2020 (22/01/), às 09:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. Aurélio Rubio Neto, Fabiano Guimarães Silva, José Eduardo Brasil Pereira Pinto, Ricardo Motta Miranda e Priscila Ferreira Batista para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada no Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: "**Photon flux density and wavelengths alter the morphophysiological and chemical characteristic of *Anacardium othonianum* Rizz. in vitro**", em nível de DOUTORADO, área de concentração em BIOTECNOLOGIA, de autoria de MÁRCIO ROSA, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo orientador do discente, Prof. Dr. AURÉLIO RUBIO NETO, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou o Candidato sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da tese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1181/2013 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando o candidato **Aprovado** ou **Reprovado**:

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. Aurélio Rubio Neto

Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva

Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

Prof. Dr. Ricardo Motta Miranda

Profa. Dra. Priscila Ferreira Batista

**Aprovado / Reprovado**

Aprovado

Aprovado

Aprovado

Aprovado

Aprovado

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato Habilitado (Habilitado ou não Habilitado), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE, na área de concentração em BIOTECNOLOGIA, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 12h 30min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, HELOÍSA DE SOUSA VIEIRA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

Prof. Dr. Aurélio Rubio Neto (IF Goiano)

Profa. Dr. Fabiano Guimarães Silva (IF Goiano)

Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto (UFLA)

Prof. Dr. Ricardo Motta Miranda (UFRRJ)

Profa. Dra. Priscila Ferreira Batista (IF Goiano)

Secretária da Pós-Graduação:

*Aurélio Rubio Neto*

*José Eduardo Brasil Pereira Pinto*

*Priscila Ferreira Batista*

*Helôisa de Sousa Vieira*

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus avós Francisco e Sebastiana (in memoriam), e aos meus tios (pais de coração) José Domingos e Isabel, pelo apoio desde as primeiras letras e por serem referências de retidão de conduta.*

## AGRADECIMENTOS

À Santíssima Trindade por permitir esta dádiva, por me guiar e me amparar nos momentos mais desafiadores desta jornada.

À Nayanne, minha esposa, pela paciência, cumplicidade, pela doce companhia e pelo auxílio direto em algumas análises laboratoriais.

Aos familiares, especialmente meus pais Geraldo e Maria, aos tios José Domingos e Isabel e meus irmãos Marco Antônio, Marilza, Leide Mara e Rafayane, pelas palavras e atos de apoio em toda as fases do doutoramento.

Aos professores Aurélio Rubio Neto e Fabiano Guimarães Silva agradeço pela oportunidade, por incentivar o meu crescimento profissional e pelas orientações e ensinamentos concedidos para realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais Agda, Aldo, Alan Castro, Anielly, Elisvane, Luciana, Mariluz, Ana Cláudia, Estênio, Valéria, Jeisa, Vanessa, Janniffer Custódio, Jenifer, Tainara, Ana Cristina, Érica Alves, Maíza, Érica Letícia, Thales, Bruno, Ana Luiza, Diego, Rauander, Paulo Dornelles, Lucas Loram, Roniel, Layara, Mariângela, Daiane, Daniele, Kaique, Rhayf, Marcelo, Waldere, Ana Luiza, Amanda, Fernanda, Maria Eduarda, Luan, Winona e Cíntia os quais tive a oportunidade de dividir tantos momentos de alegria que guardarei na memória! Em especial ao Vinícius de Oliveira Marques por todo apoio na implantação e avaliação dos experimentos, pela dedicação e amizade.

Ao Prof. Alan Carlos Costa, pelos ensinamentos e disponibilização da estrutura do Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal, e a todos os seus integrantes pela colaboração, em especial à Priscila, Luciana Minervina, Adinam, Gabriel, Roberto e Fábila.

À professora Juliana de Fátima Sales e à Dra. Kelly Telles do Nascimento pela disponibilização da estrutura do Laboratório de Sementes do IFGoiano e pelo apoio na realização das análises bioquímicas

Aos membros da banca examinadora, professores Ricardo Motta Miranda, José Eduardo Brasil Pereira Pinto, Priscila Ferreira Batista pela disponibilidade em contribuir para a melhoria deste trabalho e para minha formação.

À Dra. Altina Lacerda e aos professores Paulo Sérgio Pereira e Érika Crispim (IFGoiano – Campus Iporá) pelas orientações e apoio nas avaliações cromatográficas.

À Universidade de Rio Verde (UniRV) pelo apoio e concessões, em especial aos Professores (as) Helemi Guimarães, Eduardo Garcia Frasseto, Mozaniel Batista, Laura

Bonifácio, Ricardo Francischini, Alessandro Guerra, Antônio Joaquim Bráz, os servidores Sueli Prado, Neusa, Henrique Cardoso, Carmen Bonini, Aline, Cristina, Vinícius, Rízzia, Mayzze, Edimário, e a todos os estudantes que compartilharam esse sonho comigo.

A Rede Pró Centro–Oeste de Pós-graduação, Pesquisa e Inovação, a Universidade Federal de Goiás e ao Instituto Federal Goiano pela colaboração e estruturação deste programa de Pós-Graduação. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), pela bolsa de estudos e auxílio financeiro.

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

Márcio Rosa, filho de Geraldo Francisco Rosa e Maria do Socorro dos Santos, nasceu no dia 15 de junho de 1980, na cidade de Rio Verde, Goiás. Em dezembro de 1998, concluiu o curso Técnico em Agropecuária pela Escola Agrotécnica Federal de Rio Verde – GO, que mais tarde viria a se tornar o Câmpus Rio Verde do IFGoiano.

Em julho de 2000, ingressou no curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas da Universidade de Rio Verde (Fesurv – atual UniRV), graduando-se em agosto de 2004.

Em julho de 2009, ingressou no mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias do Instituto Federal Goiano – Campus de Rio Verde, concluindo-o em agosto de 2011, sob a orientação do Professor Alan Carlos Costa.

Em fevereiro de 2012, foi contratado como professor substituto temporário na Universidade de Rio Verde e em 2015 foi aprovado no concurso público para professor adjunto desta instituição, impulsionando-o a candidatar-se a uma vaga no curso de doutorado.

Em fevereiro de 2016 ingressou como estudante de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade da Rede Pró-Centro-Oeste de Pós-Graduação, Pesquisa e Inovação, tendo como unidade tituladora a Universidade Federal de Goiás, sob a orientação do Dr. Aurélio Rubio Neto.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 <i>Anacardium othonianum</i> Rizzini.....	2
2.2 Influência da intensidade da luz no cultivo <i>in vitro</i> .....	4
2.3 Influência da qualidade de luz no cultivo <i>in vitro</i> .....	6
3. REFERÊNCIAS .....	20
4. OBJETIVOS .....	31
4.1 Objetivo geral .....	31
4.2 Objetivos específicos.....	31
CAPÍTULO I .....	32
Variations in photon flux density alter the morphophysiological and chemical characteristics of <i>Anacardium othonianum</i> Rizz. <i>in vitro</i> .....	33
CAPÍTULO II.....	49
Impacto da qualidade da luz sobre as respostas morfofisiológicas e bioquímicas de <i>Anacardium othonianum</i> Rizzini <i>in vitro</i> .....	49
CONCLUSÃO GERAL .....	90

## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO GERAL

**Tabela 1** Materiais vegetais a base de *Anacardium othonianum* Rizzini e suas diversas aplicações..... 3

**Tabela 2** Relação cronológica de alguns trabalhos e respostas morfofisiológicas de plântulas cultivadas *in vitro* sob diferentes intensidades e qualidades de luz no período de 2012 a 2019...9

### CAPÍTULO II. Impacto da qualidade da luz sobre as respostas morfofisiológicas de *Anacardium othonianum* Rizzini *in vitro*

**Tabela 1** Clorofila *a* (Cl *a*), clorofila *b* (Cl *b*), carotenoides (Car), razão entre clorofilas *a* e *b*, clorofila total (Cl *t*) e índice de feofitinação (IF) em *Anacardium othonianum* Rizz.; aos 50 dias de cultivo *in vitro* em função de diferentes qualidades de luz..... 59

**Tabela 2** Índices Dualex de flavonóis (FLAV), antocianinas (ANT) e de balanço de nitrogênio (IBN) em plântulas de *Anacardium othonianum* Rizz. aos 50 dias de cultivo *in vitro* em função de diferentes qualidades de luz..... 60

**Tabela 3** Características da fluorescência da clorofila. Rendimento quântico máximo de fotoquímica primária ( $\phi$  Po), rendimento quântico de dissipação de energia na forma de calor ( $\phi$ Do), rendimento quântico de transporte de elétrons ( $\psi$ Eo), absorção de energia luminosa por centro de reação (ABS/RC), fluxo de transporte de elétrons (além da Qa-) por centro de reação em  $t = 0$  (Eto/RC), dissipação de energia na forma de calor por centro de reação (Dio/RC) e índice de desempenho fotossintético ( $PI_{ABS}$ )..... 65

**Tabela 4** Efeito de diferentes qualidades de luz na espessura foliar de plântulas de *A. othonianum* cultivadas *in vitro*: espessura do mesofilo (Mes Th), epiderme adaxial (Ad ep), espessura do parênquima clorofiliano (Chl P Th), parênquima esponjoso (Spong P), parênquima paliádico (Palisade P) e epiderme abaxial (Ab Ep)..... 69

**Tabela 5** Efeito de diferentes qualidades de luz nas características estomáticas de *A. othonianum in vitro*: densidade estomática abaxial (Ab St Dens), densidade estomática adaxial (Ad St Dens), diâmetro polar abaxial (Ab Pol D), diâmetro equatorial abaxial (Ab Pol D), razão entre diâmetro polar e equatorial abaxial (Ab Pol/Eq), diâmetro polar adaxial (Ad Pol D),

diâmetro equatorial adaxial (Ad Pol D), razão entre diâmetro polar e equatorial adaxial (Ad Pol /Eq)..... 70

**Tabela 6** Características biométricas de plântulas de *A. othonianum* Rizz. aos 50 dias de cultivo *in vitro* em função de diferentes qualidades de luz. Número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), número de brotações (BROT), número de raízes (NR), área foliar (AF), massa seca foliar (MSF), massa seca total (MST) e área folia específica (AFE)..... 73

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

<b>Figura 1.</b> Folhas, frutos e pseudofrutos (A) e planta adulta de <i>Anacardium othonianum</i> Rizzini(B).	Foto:	Valéria	Ferreira	Oliveira.
..... 3				

### CAPÍTULO I. Variations in photon flux density alter the morphophysiological and chemical characteristics of *Anacardium othonianum* Rizz. *in vitro*

<b>Fig. 1</b> Images of the <i>Anacardium othonianum</i> Rizz. seedlings after 50 days of <i>in vitro</i> culture under different photon flux densities (bar = 2 cm).....	36
<b>Fig. 2</b> Heights of seedlings (a), numbers of leaves and shoots (b), leaf area (c), leaf dry weight (d), specific leaf area (e) and total dry weight (f) of <i>Anacardium othonianum</i> Rizz. cultured <i>in vitro</i> , as a function of the photon flux density. The data are the means and standard errors (n = 6). *p < 0.05; **p < 0.01.....	37
<b>Fig. 3</b> Photomicrographs of leaf cross sections from <i>Anacardium othonianum</i> Rizz. cultured <i>in vitro</i> for 50 days (a), the region between ribs at photon flux densities of 12 (b), 25 (c), 50 (d), 100 (e) and 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (f) CS Secretory channel, Ad ep adaxial and Ab ep abaxial epidermis, Cl P chlorophyll parenchyma, PP palisade parenchyma and SP spongy parenchyma. 100 $\mu\text{m}$ bar (b–f).....	38
<b>Fig. 4</b> Thickness of the chlorophyll parenchyma (a), cuticle thickness (b), adaxial (Ep ad) and abaxial epidermis (Ep ab) (c) and adaxial (Sd ad) and abaxial (Sd ab) (d) leaves of <i>Anacardium othonianum</i> Rizz. cultured <i>in vitro</i> under different photon flux densities. The data are the means and standard error (n = 4). Significance: **p < 0.01.....	39
<b>Fig. 5</b> Pearson correlation heatmap obtained between variables at 50 days of <i>in vitro</i> cultivation of <i>A. othonianum</i> subjected to different flow densities. LA leaf area, TDW total dry weight, LDW leaf dry weight, SLA specific leaf area, CLP chlorophyll parenchyma, StD stomatal density, FvFm potential quantum yield, YII effective quantum yield, ETR electron transport rate, YNPQ and YNO regulated nonphotochemical and unregulated dissipation yields, respectively, MDA malondialdehyde, POX nonspecific peroxidase, CAR carotenoides, CHL total chlorophyll, PI pheophytinization index, GA gallic acid, RUT rutina, QUE quercitrin. Significance: *(p ≤ 0.05), ** (p ≤ 0.01).....	40
<b>Fig. 6</b> Concentration of chlorophyll a and b (a), carotenoids (b), ratio between chlorophyll a	

and *b* (c) and pheophytinization index, PI (d) in *Anacardium othonianum* Rizz. seedlings cultured *in vitro*, as a function of the photon flux density. The data are the means and standard error (n = 5). Significance: \*\* $p < 0.01$ ..... 41

**Fig. 7** Potential quantum yield of photosystem II, Fv/Fm (a), effective quantum yield,  $\Phi$ PSII (b), electron transport rate, ETR (c) and regulated nonphotochemical,  $\Phi$ NPQ and unregulated dissipation yields,  $\Phi$ NO (d) in the leaf tissues of *Anacardium othonianum* Rizz. cultured *in vitro*, as a function of different photon flux densities. The data are the means and standard errors (n = 4). Significance: \* $p < 0.05$ ..... 42

**Fig. 8** Activity of the nonspecific peroxidase, POX (a) and the concentration of malondialdehyde, MDA (b) in the leaf tissues of *Anacardium othonianum* Rizz. cultured *in vitro*, as a function of the photon flux density. The data are the means and standard errors (n = 4). Significance: \* $p < 0.05$ ..... 42

**Fig. 9** Concentration and yield of gallic acid (a, b, respectively), quercitrin (c, d) and rutin (e, f) in the leaf tissues of *Anacardium othonianum* Rizz. cultured *in vitro* under different photon flux densities. The data are the means and standard errors (n = 4). Significance: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ..... 43

**Fig. 10** Concentration (a) and yield (b) of vitexin in the leaf tissues of *A. othonianum* Rizz. cultured *in vitro* as a function of different photon flux densities. The data are the means and standard errors (n = 4). ns = difference not statistically significant according to the F test ( $p > 0.05$ )..... 44

**Supplementary figure** Chlorophyll fluorescence images. Potential quantum yield of PSII (Fv/Fm), effective quantum yield of PSII ( $\Phi$ PSII), regulated energy dissipation yield ( $\Phi$ NPQ), nonregulated energy dissipation yield ( $\Phi$ NO) and apparent electron transport rate (ETR) as measured at steady state ( $11 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in the leaves of *Anacardium othonianum* Rizz *in vitro*. The false color code below the images ranges from 0.000 (black) to 1,000 (pink)..... 48

## CAPÍTULO II. Impacto da qualidade da luz sobre as respostas morfofisiológicas e bioquímicas de *Anacardium othonianum* Rizzini *in vitro*

**Figura 1.** Distribuição relativa dos espectros dos LEDs utilizados no cultivo *in vitro* de *Anacardium othonianum* Rizzini..... 53

**Figura 2.** Atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) em tecidos foliares de plântulas de *Anacardium othonianum* Rizz. cultivadas *in vitro*, em função de diferentes qualidades de luz. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de t (LSD)

( $p \leq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão das médias..... 61

**Figura 3.** Transientes da fluorescência da clorofila *a* (Curva OJIP), realizado em folhas de *Anacardium othonianum* Rizz. aos 50 dias de cultivo *in vitro* em função de diferentes qualidades de luz. Intensidade de fluorescência (a). Fluorescência relativa variável (b)..... 62

**Figura 4.** Diferenças cinéticas de fluorescência relativa de *Anacardium othonianum* durante as etapas 0 a K =  $\Delta VOK = VOK$  (tratamento) - VOK (controle)(a); 0 a J =  $\Delta VOJ = VOJ$  (tratamento) - VOJ (controle) (b); e 0 a I =  $\Delta VOI = VOI$  (tratamento) VOI (controle) (c). Controle: branca..... 64

**Figura 5.** Taxa fotossintética ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) de plântulas de *Anacardium othonianum* Rizz. aos 50 dias de cultivo *in vitro* em função de diferentes qualidades de luz. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de t (LSD) ( $p \leq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão das médias. <sup>ns</sup> = não significativo..... 67

**Figura 6** Fotomicrografias das seções transversais das folhas de *Anacardium othonianum* Rizz. cultivadas *in vitro* por 50 dias (Barra: 500 $\mu\text{m}$ ), e região entre nervuras nas diferentes qualidades de luz (Barra: 100  $\mu\text{m}$ ). Canal secretor (C S), epidermes adaxial (Ad ep) e abaxial (Ab ep), parênquima clorofiliano (Cl P), parênquima paliçádico (PP) e parênquima esponjoso (S P).....68

**Figura 7.** Concentração de malondialdeído – MDA (a), atividade das enzimas superóxido dismutase - SOD (b), catalase - CAT (c) e ascorbato peroxidase - APX (d) em tecidos foliares de plântulas de *Anacardium othonianum* Rizz. cultivadas *in vitro*, em função de diferentes qualidades de luz. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de t (LSD) ( $p \leq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão das médias. <sup>ns</sup> = não significativo...71

**Figura 8.** Correlações de Pearson representada em *heatmap* obtidas entre as variáveis aos 50 dias de cultivo *in vitro* de *A. othonianum* submetido as diferentes qualidades de luz. Significância: \* ( $p \leq 0,05$ ), \*\* ( $p \leq 0,01$ ). CLA clorofila *a*, CLB clorofila *b*, AB razão *cla/clb*, CAR carotenoides, FLV flavonóis, ANT antocianinas, PN taxa fotossintética líquida, DioRC dissipação de energia na forma de calor por centro de reação, PIABS índice de performance fotossintético, MSF massa seca foliar, MT massa seca total, CLP parênquima clorofiliano, AFE área foliar específica, DNS densidade estomática, FUN funcionalidade estomática (Razão diâmetro polar/equatorial), PAL fenilalanina amônia-liase, MDA malondialdeído, SOD superóxido dismutase, APX ascorbato peroxidase. Significância: \* ( $p \leq 0.05$ ), \*\* ( $p \leq 0.01$ )....74

## RESUMO

ROSA, Márcio, Universidade Federal de Goiás, janeiro de 2020. **A densidade de fluxo de fótons e o comprimento de onda alteram as características morfofisiológicas e químicas de *Anacardium othonianum* Rizz. *in vitro*.** Orientador: Aurélio Rubio Neto. Coorientador: Paulo Sérgio Pereira.

*Anacardium othonianum* Rizzini é uma espécie nativa do Cerrado com grande potencial biotecnológico. A seleção da intensidade e da qualidade espectral, pode representar alternativa para otimizar as características fisiológicas e produtivas desta espécie no cultivo *in vitro* favorecendo sua propagação. Nesse contexto, objetivou-se definir as melhores condições de luminosidade para otimizar as características morfofisiológicas e o estímulo de vias biossintéticas de metabólitos secundários em *A. othonianum* nas condições *in vitro*. Para tanto, o trabalho se dividiu em dois ensaios: 1 – Determinação de qual a melhor intensidade de luz (12, 25, 50, 100 e 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e 2 – Determinação da melhor qualidade espectral, por meio da utilização de diodos emissores de luz, LEDs (luz branca, azul, verde, vermelha e azul+vermelha 1:1). Em cada experimento os segmentos nodais foram cultivados em frascos de 250 mL com meio MS 50%, contendo ágar, com adição de 30  $\mu\text{M}$  de benzilaminopurina (BAP), 3% de sacarose, sob fotoperíodo de 16h. Após 50 dias de cultivo as plântulas foram submetidas a avaliações de pigmentos, eficiência fotossintética, biometria, análises anatômicas, enzimáticas e cromatográficas. Este trabalho é o primeiro relato com uma abordagem fisiológica sobre a influência da intensidade e da qualidade de luz em *A. othonianum in vitro*. Verificou-se que irradiâncias em torno de 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , sob luz branca ou associação de azul/vermelha são as mais satisfatórias para a manutenção da homeostase das plantas, para o estímulo ao fotoautotrofismo e para a ativação das vias de biossíntese de compostos fenólicos.

**Palavras-chave:** Caju-de-árvore-do-cerrado; taxa fotossintética, flavonoides, irradiância, qualidade de luz

## ABSTRACT

ROSA, Márcio, Universidade Federal de Goiás. January, 2020. **Photon flux density and wavelengths alter the morphophysiological and chemical characteristics of *Anacardium othonianum* Rizz. *in vitro***. Advisor: Aurélio Rubio Neto. Co-advisor: Paulo Sérgio Pereira.

*Anacardium othonianum* Rizzini is a native Cerrado species with great biotechnological potential. The selection of intensity and spectral quality may represent an alternative to optimize the physiological and productive characteristics of this species *in vitro* culture favoring its propagation. In this context, the objective was to define the best light conditions to optimize morphophysiological characteristics and stimulation of biosynthetic pathways of secondary metabolites in *A. othonianum* under *in vitro* conditions. Therefore, the work was divided into two tests, 1 - Determination of the best light intensity (12, 25, 50, 100 and 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and 2 - Determination of the best spectral quality, using LEDs (white, blue, green, red and blue + 1: 1 red). In each experiment the nodal segments were cultivated in 250 mL flasks with 50% MS medium containing agar, with 30  $\mu\text{M}$  benzylaminopurine (BAP), 3% sucrose added under 16h photoperiod. After 50 days of treatment imposition, the seedlings were submitted to pigment, photosynthetic efficiency, biometrics, anatomical, enzymatic and chromatographic analyzes. This paper is the first report with physiological approach on the influence of light intensity and quality on *A. othonianum in vitro*. It was found that irradiance around 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  under white light or blue / red association are the most satisfactory for the maintenance of plant homeostasis, the stimulation of photoautotrophism and the activation of biosynthesis pathways. phenolic compounds.

**Keywords:** Cashew; photosynthetic rate, flavonoids, irradiance, light quality.

# 1. INTRODUÇÃO GERAL

O Cerrado possui uma grande biodiversidade, no entanto, devido à recente intensificação das atividades antropogênicas, este bioma, está relacionado como um dos principais *hotspots* ecológicos do mundo. Assim, o conhecimento das técnicas de propagação e o comportamento ecofisiológico das espécies vegetais podem contribuir para a preservação e a exploração sustentável. Entre essas espécies, *Anacardium othonianum* Rizzini, conhecido popularmente como caju-de-árvore-do-cerrado tem despertado a atenção devido ao seu potencial econômico.

Assim, uma alternativa para a otimização do aproveitamento dos recursos vegetais é a utilização de técnicas de cultura de tecidos vegetais. Esta ferramenta da biotecnologia vegetal permite o estabelecimento, manipulação e desenvolvimento, sob condições artificiais e controladas, de células, tecidos ou órgãos e é muito útil para a regeneração de plantas geneticamente homogêneas, rejuvenescidas, isenta de pragas e doenças e sem as limitações impostas pela sazonalidade (Chandra et al., 2010).

A propagação *in vitro* de *A. othonianum* já é uma realidade (Assis et al., 2015), mas ainda são necessários ajustes para otimizar seu fotoautotrofismo para fins de aclimatização *ex vitro*. Fatores bióticos e abióticos podem causar alterações genéticas e fisiológicas nas plantas, bem como promover o aumento ou diminuição de substâncias bioativas (Verma e Shukla, 2015; Cassola et al., 2019). Entre os fatores abióticos pode-se destacar a luz, a qual é determinante tanto para o processo fotossintético quanto para a fotomorgênese.

Alta irradiância aumenta a taxa fotossintética, a absorção de água e nutrientes em razão da maior transpiração nas folhas e fixação de CO<sub>2</sub> com conseqüente maior acúmulo de biomassa (Ríos-Ríos et al., 2019). Entretanto, o excesso de energia luminosa pode danificar ou inativar o fotossistema II, causando fotoinibição (Sáez et al., 2016). Nesse sentido, o ajuste da luminosidade pode promover a competência fotossintética e o crescimento, bem como concentrar metabólitos de interesse biotecnológico.

Além da intensidade, a qualidade da luz é um dos mais importantes fatores que afetam o crescimento e o desenvolvimento de plantas *in vitro* de diferentes espécies (Liu et al., 2014). De acordo com o comprimento de onda de luz, por mais discreto que ele seja, a planta desencadeia repostas particulares. A resposta é controlada por fotorreceptores que ativam as vias de transdução de sinal e resultam em alterações na expressão gênica, acarretando em alterações fisiológicas e/ou bioquímicas (Landi et al., 2019).

A luz azul (400-500 nm) pode regular o fototropismo, a expansão foliar, o crescimento

do caule e o acúmulo de antocianinas. A luz vermelha (660 nm) controla germinação, os cloroplastos, o crescimento de caule e pecíolo, e ambos os comprimentos exercem influência na floração e na expressão gênica (Carvalho e Folta, 2014). Ultimamente, vem aumentando o interesse pela luz verde (Chen et al., 2019), pois alguns relatos indicam que embora essa essa faixa espectral tenha menos impacto sobre as clorofilas, é reconhecido o seu papel sobre os fotoreceptores e sua atuação sobre a morfologia e fisiologia das plantas, incluindo crescimento foliar, condutância estomática, alongamento caulinar e produção de metabólitos secundários (Johkan et al., 2012; Gazolla et al., 2017).

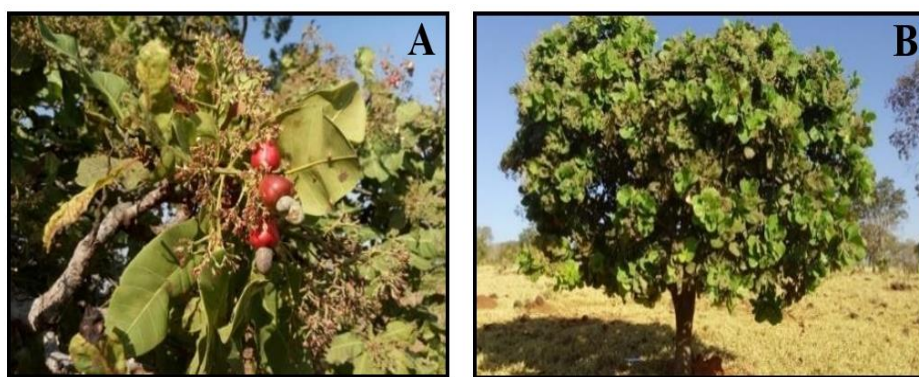
Considerando as condições ambientais em que *A. othonianum* é naturalmente encontrada propõe-se a hipótese de que plântulas desta espécie respondam positivamente a intensidades luminosas superiores àquelas que habitualmente são utilizadas no sistema de propagação *in vitro*. Além disso, a seleção de faixas espectrais adequadas pode otimizar, tanto a propagação, bem como ativar vias biossintéticas de metabólitos importantes.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 *Anacardium othonianum* Rizzini**

O Cerrado é a segunda maior formação vegetal brasileira e consiste em uma fonte inestimável de recursos biológicos, pouco explorados e de elevado potencial econômico. Têm grande número de espécies vegetais com propriedades medicinais, frutíferas e ornamentais, dentre elas *Anacardium othonianum* Rizzini (Agostini-Costa et al., 2006). Porém, a expansão agrícola do Brasil tem subestimado o potencial de uso dos organismos nativos deste domínio (Vieira et al., 2016).

*A. othonianum* conhecido popularmente como caju-de-árvore-do-cerrado é caracterizado como um ecótipo de *A. occidentale* L, possui folhas mais coriáceas, onduladas e subsésseis, assim como pseudofruto menor e mais ácido do que o ecótipo da região de restinga (Figura 1A) (Mitchell e Mori, 1987; De Andrade et al., 2019). Distingue-se das demais espécies do gênero do Cerrado: *A. humile*, *A. nanum* e *A. corymbosum*, pelo seu porte arbóreo com 3 a 6 m de altura (Fig. 1B) (Silva et al., 2008).



**Figura 1.** Folhas, frutos e pseudofrutos (A) e planta adulta de *Anacardium othonianum* Rizzini (B). Foto: Valéria Ferreira Oliveira.

O *A. othonianum* tem grande potencial para exploração alimentar e econômica, podendo ser fonte de alimento *in natura*, utilizado em diversos setores industriais, e ampla aplicação na medicina tradicional no tratamento de várias doenças (Tabela 1).

**Tabela 1.** Materiais vegetais a base de *Anacardium othonianum* Rizzini e suas diversas aplicações.

Material	Forma de uso	Utilização	Referências
Árvore	Planta inteira	Pomares comerciais; recuperação de áreas degradadas; conservação de áreas nativas;	Assis et al., 2010.
Pseudofruto (pedúnculo)	Polpa	<i>In natura</i> ; sucos; licores; doces; iogurte; aguardente;	Naves et al., 2016; Souza e Silva, 2015; Fonseca et al., 2014; Alves et al., 2013; Gonçalves et al., 2009; Correa et al., 2008.
Fruto (amêndoa)	Castanha; Matéria-prima	<i>In natura</i> ; amêndoas; óleos; indústria química (materiais plásticos, isolantes e vernizes); produção de mudas.	Alves et al., 2016; Agostini-Costa et al., 2006.

Folha	Extrato	Antimicrobiano; expectorante; anti- inflamatório; antidiarreica.	Curado et al., 2016; Arcanjo, 2015; Bessa et al., 2013.
Caule	Casca (Extrato)	Anti-inflamatório;	Arcanjo, 2015.

---

Apesar das diversas aplicações atribuídas ao *A. othonianum* a exploração racional dessa espécie e sua propagação, vêm sendo inviabilizada por problemas como a alta perecibilidade do pseudofruto, variações em seu amadurecimento, bem como a sua sazonalidade de produção (Assis et al., 2015). Neste sentido, metodologias alternativas às convencionais, como a micropropagação, têm sido utilizadas para superá-las.

O cultivo *in vitro*, por meio da micropropagação, tem sido considerado uma ferramenta promissora para a preservação de recursos vegetais e para a produção comercial de mudas, permitindo com que se obtenham plantas saudáveis, homogêneas, uniformes, com alto vigor fisiológico, e que podem ser multiplicadas abundantemente ao longo de todo o ano (Chandra et al., 2010). Para o sucesso no cultivo *in vitro* é importante o aperfeiçoamento das interações entre os fatores abióticos (nutricionais, luminosos, temperatura) e os fatores bióticos (genéticos, hormonais) justificando trabalhos que verifiquem as diferentes respostas das plantas frente a esses fatores para uma melhor adequação do cultivo *in vitro*.

## 2.2 Influência da intensidade da luz no cultivo *in vitro*

A luz influencia diretamente e indiretamente na regulação de crescimento e desenvolvimento das plantas, através da produção de energia pela fotossíntese, e também atuando na fotomorfogênese (Carvalho e Folta, 2014). Geralmente no ambiente de cultivo *in vitro* são utilizadas baixas irradiâncias (Tab. 2), em torno de  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Singh et al., 2017). O aumento da densidade de fluxo de fótons pode aumentar a competência fotossintética *in vitro* (Kubota et al., 2001). Isto pode ser observado em alguns trabalhos (Fuentes et al., 2005; Shin et al., 2013; Ríos-Ríos et al., 2019). Um aumento na irradiância pode resultar numa rápida expansão de folhas novas com características autotróficas, potencializando a melhoria das taxas de sobrevivência (Donnelly e Vidaver, 1984).

Em *Cocos nucifera* L. melhores respostas fisiológicas foram observadas em 400 do que

em  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fuentes et al., 2005) enquanto em *Acer saccharum* Marsh, a densidade de fluxo de fótons fotossintéticos de apenas  $4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  foi suficiente para proporcionar melhores respostas (Singh et al., 2017). Eckstein et al. (2012) verificaram que irradiâncias de 100 e  $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  promoveram maior crescimento em *Arabidopsis thaliana*, do que em  $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mas sob 250 houve sinal de estresse luminoso. Segundo Fuentes et al (2005), mesmo com maior estresse *in vitro* as plantas provenientes de maiores irradiâncias estariam mais aptas para o processo de aclimatização. Entretanto, isso pode não ocorrer. Plantas de *Capsicum chinense* Jacq sob  $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  se desenvolveram melhor tanto *in vitro* quanto na aclimatização do que aquelas sob  $255 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Barrales-Lopez et al., 2015).

Assim, aumento da intensidade luminosa no ambiente *in vitro* pode promover indução do fotoautotrofismo (Sáez et al., 2016) e maior pressão aos sistemas de defesa em resposta aos estímulos luminosos, pois se a irradiância exceder à necessidade fotossintética pode ocorrer fotoinibição (Adams et al., 2013). A fotoinibição é caracterizada pela degradação da proteína D1 no centro de reação do fotossistema II (PSII), interferindo no transporte de elétrons, reduzindo a máxima eficiência quântica (Santos et al., 2013). Sob condições de excesso de absorção de luz, o lúmen do cloroplasto se acidifica, o que reduz a cadeia de transporte de elétrons e a excitação acumula energia no cloroplasto, o que pode levar a à geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), como superóxido e peróxido de hidrogênio. A acumulação de ERO pode levar à peroxidação lipídica (Asada, 1992; Pinolla e Bassi, 2018).

A eliminação das EROs fica a cargo de enzimas antioxidantes e de compostos químicos de baixo peso molecular, tais como o tocoferol, a glutathiona, o ascorbato e os carotenoides (Szymańska et al., 2017; Pinnola e Bassi, 2018). Os principais componentes da maquinaria antioxidante das plantas são as enzimas e os compostos de baixo peso molecular. Dentre as enzimas, a superóxido dismutase (SOD) é um grande *scavenger* de  $^1\text{O}_2$  e o transforma em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$ . A ascorbato peroxidase (APX) utiliza o ácido ascórbico como substrato para detoxificar  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$ , enquanto a catalase (CAT) e/ou a peroxidase não específica (POX) decompõem  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ . A ação conjunta dessas enzimas elimina o perigo potencial de  $^1\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduzindo a produção de EROs (Yonghua et al., 2005; Brunetti et al., 2015).

Adicionalmente, outras classes de compostos fotoprotetores, nomeadamente compostos fenólicos e carotenoides, podem mitigar a formação de ERO, atuam como antioxidantes (Brunetti et al., 2015). Os carotenoides contribuem para a fotossíntese colhendo e transferindo energia luminosa para clorofilas em uma região do espectro, onde a absorção de clorofila é

menor. Na ausência de carotenoides, excesso de luz terá efeitos negativos sobre proteínas e membranas. Por meio do ciclo das xantofilas (violaxantina-anteraxantina-zeaxantina) o excesso de energia absorvida é dissipada na forma de calor (*quenching* não-fotoquímico – NPQ), o que limita a formação de clorofila triplete e impede a produção de EROs (Agati et al., 2013; Ouzounis et al., 2015; Szymańska et al., 2017).

Já os compostos fenólicos como os flavonoides além de absorver comprimentos de onda mais curtos, também atuam como antioxidantes atenuando os efeitos danosos das EROs e regulam a sinalização de moléculas envolvidas na fotoproteção (Agati et al., 2013). Esses compostos possuem uma série de propriedades medicinais que se estendem de ação antimicrobiana a antitumoral (Nijveldt et al., 2001). Visto que tanto a intensidade quanto a qualidade de luz atuam sobre a biossíntese destes compostos o manejo da luminosidade *in vitro* representa estratégia interessante para otimizar a produção destes fitoquímicos.

### **2.3 Influência da qualidade de luz no cultivo *in vitro***

Além da intensidade da luz, a sua composição espectral é igualmente importante. Alterações na composição espectral da luz afetam os processos fisiológicos e dependendo da espécie, torna-se um estimulador ou estressor (Ouzounis et al., 2015). A maioria dos processos fotobiológicos dos vegetais é influenciada pela faixa de comprimento de onda de 380 nm até 740 nm, esse intervalo do espectro é a principal fonte de energia para a fotossíntese e que determinam os padrões de crescimento (Taiz et al., 2017). A percepção e a indução de respostas específicas dependem da interação das faixas com fotorreceptores. Dentre os fotorreceptores vegetais os principais grupos de fotorreceptores são os fitocromos, os criptocromos e as fototropinas (Carvalho e Folta, 2014).

Os fitocromos (phyA, phyB, phyC, phyD, phyE) são sensíveis às luzes vermelha (600 a 700 nm); e vermelho-distante (700 a 800 nm); e exibem a capacidade de se interconverter entre as formas Pr e Pfr. A luz vermelha desencadeia mudanças conformacionais, tanto no cromóforo do fitocromo como na proteína. Os fitocromos podem mudar rapidamente potenciais de membrana e fluxos de íons e regular a expressão gênica por uma vasta gama de elementos modulares (Ouzounis et al., 2015)

Os criptocromos são receptores de luz azul (400 a 500 nm), sendo identificados dois tipos Cry1 e Cry2. A molécula do criptocromo sofre uma reação redox intramolecular após a absorção de um quantum de luz azul que altera a conformação da apoproteína do receptor e

inicia a cascata de sinalização (Liscum et al., 2003; Möglich et al., 2010). A luz azul estimula o criptocromo (Cry1), que regula positivamente a transcrição de genes para a síntese de clorofila (Li et al., 2009). Os fitocromos e criptocromos também podem atuar como fotorreceptores de luz verde (Folta e Maruhnich, 2007).

As fototropinas medeiam respostas à luz azul; são conhecidos dois tipos em *Arabidopsis*, PHOT 1 e 2, as quais são sensíveis a intensidades de luz azul diferentes e sobrepostas. Cada uma tem dois cromóforos mononucleotídico de flavina (FMN) que podem induzir mudanças conformacionais. Em contraste com outros fotorreceptores, que atuam principalmente no núcleo, as fototropinas são direcionadas para a membrana plasmática (Galvão e Fankhauser, 2015). As fototropinas medeiam a acumulação de cloroplastos e as respostas de evitamento à luz fraca e forte. A luz azul, detectada pelas fototropinas, provoca a ativação das H<sup>+</sup>-ATPases da membrana plasmática e, por fim, regula a abertura estomática (Inouea e Kinoshita, 2017).

Dentro da faixa do visível ainda há os fotorreceptores de luz azul da família zeitlupe (ZTL) relacionados a regulação e à percepção do comprimento do dia (fotoperiodismo) e dos ritmos circadianos, mas que diferentes das fototropinas possui apenas um cromóforo FMN. Estes fotorreceptores também absorvem na faixa do UVA, 315 a 400 nm (Galvão e Fankhauser, 2015).

Geralmente, no cultivo *in vitro*, utiliza-se fontes de luz artificiais. Desta forma lâmpadas fluorescentes, vem sendo comumente utilizadas no cultivo *in vitro*, por emitirem fótons em ampla faixa espectral (entre 350 a 750 nm) (Ramírez-Mosqueda et al., 2017). No entanto, nos últimos anos tem sido proposta a utilização de lâmpadas de diodo emissor de luz (LEDs), devido a esse sistema apresentar vantagens comparadas ao sistema convencional (lâmpadas fluorescentes), como a elevada eficiência de conversão fotoelétrica, baixa emissão de calor, pelo longo período de vida, pela massa e pelo volume pequeno, além de possibilitar a utilização do espectro de luz com comprimentos de ondas específicos (Nhut et al., 2015; Lazzarini et al., 2017).

Assim, a oportunidade de selecionar comprimentos de onda específicos permite o estudo de respostas a fotorreceptores correspondentes, bem como oportuniza o estímulo de rotas biossintéticas para a produção de fitoquímicos de interesse comercial. Trabalhos com intensidade e qualidade de luz em plântulas *in vitro* vêm demonstrando diferentes respostas morfológicas e fisiológicas, podendo variar de acordo com as espécies estudadas (Batista et al., 2018). Diante disso, a seguir é apresentada a compilação de alguns trabalhos recentes

relacionados às respostas morfofisiológicas de diferentes espécies (Tabela 2).

**Tabela 2.** Relação cronológica de alguns trabalhos e respostas de plântulas cultivadas *in vitro* sob diferentes intensidades e qualidades de luz no período de 2012 a 2019.

Espécie	Título	Avaliação de luminosidade (Intensidade e/ou qualidade de luz)	Observações	Referência
<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	Sugar and light effects on the condition of the photosynthetic apparatus of <i>Arabidopsis thaliana</i> cultured <i>in vitro</i>	Foram testadas irradiâncias de 25, 100 e 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sob lâmpadas fluorescentes	O melhor crescimento ocorreu sob 100 e 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mas com estresse evidente sob a maior irradiância.	Eckstein et al., 2012
<i>Doritaenopsis</i> sp.	Sugar metabolism, photosynthesis, and growth of <i>in vitro</i> plantlets of <i>Doritaenopsis</i> under controlled microenvironmental conditions	Foram testadas irradiâncias de 40 e 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Irradiância mais alta favoreceu os índices de fluorescência da clorofila e a taxa fotossintética, bem como o crescimento em condições fotoautotróficas e fotomixotróficas.	Shin et al., 2013
<i>Piper aduncum</i> L.	Optimization of the protocol for the <i>in vitro</i> cultivation of <i>Piper aduncum</i> L.	Intensidade de 17, 37, 48 e 73 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sob lâmpadas fluorescentes, e qualidade espectral com LED: azul, vermelho, branco; 72% azul + 28% vermelho, 28% azul + 72% vermelho, 50% azul + 50% vermelho.	As brotações tiveram comprimento máximo quando cultivadas com menos de 17 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e maior comprimento radicular e biomassa sob 73 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Os LEDs vermelhos foram mais favoráveis ao crescimento.	Silva et al., 2014

<i>Platycodon grandiflorum</i> (Jacq.)	Evaluation of leaf morphology, structure and biochemical substance of balloon flower ( <i>Platycodon grandiflorum</i> (Jacq.) A. DC.) plantlets <i>in vitro</i> under different light spectra	Efeito da qualidade de luz com lâmpadas fluorescentes brancas e LED azul; vermelho; azul+vermelho 3:1; azul+vermelho 1:1 e azul+vermelho 1:3, sob $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	A luz azul e associação de azul+vermelho 3:1 promoveram melhores índices morfoanatômicos e fisiológicos.	Liu et al., 2014
<i>Scrophularia takesimensis</i> Nakai	Direct adventitious shoot regeneration, <i>in vitro</i> flowering, fruiting, secondary metabolite content and antioxidant activity of <i>Scrophularia takesimensis</i> Nakai.	Efeito da qualidade de luz: LEDs azuis, vermelhos e lâmpadas fluorescentes brancas sob $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .	Os LEDs vermelhos promoveram maior crescimento, enquanto a luz azul induziu maior produção de harpagoside, seguido de fluorescente branca.	Jeong et al., 2015
<i>Capsicum chinense</i> Jacq.	Improved <i>in vitro</i> rooting and acclimatization of <i>Capsicum chinense</i> Jacq. plantlets	$28$ e $255 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com lâmpadas fluorescentes.	Irradiância menor favorece o enraizamento e a aclimatização	Barrales-López et al., 2015
<i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch.	Blue LED light enhances growth, phytochemical contents, and antioxidant enzyme activities of <i>Rehmannia glutinosa</i> cultured <i>in vitro</i>	Efeito da qualidade de luz: LEDs azuis, vermelhos e lâmpadas fluorescentes brancas sob $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .	Os LEDs favoreceram o crescimento em relação à lâmpada fluorescente branca. Os LEDs azuis induziram a linha de defesa antioxidante o que correlacionou com o incremento de fitoquímicos.	Manivannan et al., 2015

<i>Panax vietnamensis</i> Ha et Grushv	Light-emitting diodes and their potential in callus growth, plantlet development and saponin accumulation during somatic embryogenesis of <i>Panax vietnamensis</i> Ha et Grushv	Efeito da qualidade de luz: lâmpadas fluorescentes brancas e LED amarelo, azul, branco, verde, vermelho e associação vermelho + azul (90:10), (80:20), (70:30), (60:40), (50:50) (40:60), (30:70), (20:80) e (10:90), sob intensidade de 20-25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	A associação de vermelho + azul favoreceu o crescimento e desenvolvimento, enquanto lâmpadas fluorescentes brancas e LEDs vermelhos promoveram maior cúmulo de saponinas.	Nhut et al., 2015
<i>Achillea millefolium</i> L.	<i>In vitro</i> culture of <i>Achillea millefolium</i> L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles	Efeitos das intensidades de 13, 27, 35, 47 e 69 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sob lâmpadas fluorescentes e qualidade espectral com fluorescente branca e LED: azul, branco, verde, vermelho.	LEDs azuis proporcionaram o maior acúmulo de matéria seca, número de raízes, porcentagem de enraizamento e sobrevivência. A irradiância de 27 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi a mais promissora.	Alvarenga et al., 2015
<i>Anthurium andreanum</i> Lind	Light emitting diodes improve <i>in vitro</i> shoot multiplication and growth of <i>Anthurium andreanum</i> Lind	Efeito da qualidade de luz: LED azul, branco, vermelho, azul + vermelho e lâmpada fluorescente branca sob 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .	O maior número de brotações foi obtido nos LEDs azul + vermelho, enquanto o maior crescimento e conteúdo de clorofila foi obtido sob LEDs azuis.	Martínez-Estrada et al., 2016

<i>Saccharum</i> spp.;	The effect of spectral light quality on <i>in vitro</i> culture of sugarcane	Efeito da qualidade de luz: LEDs 70% de luz azul e 30% de luz vermelha em $72 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , A: V = 50:50 em $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; A:V = 30:70, $53 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; branco, $77 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e lâmpada fluorescente, $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .	A combinação de LEDs azuis/vermelhos em igual proporção, foi eficaz para o desenvolvimento das plantas. Adicionalmente, melhorou a qualidade fisiológica das mudas.	Silva et al., 2016
<i>Vaccinium corymbosum</i> L.	LED light for <i>in vitro</i> and <i>ex vitro</i> efficient growth of economically important highbush blueberry ( <i>Vaccinium corymbosum</i> L.).	Efeito da qualidade de luz com lâmpadas fluorescentes brancas e LED azul, vermelho, azul 20% + vermelho 80%, azul 50% + vermelho 50%, a $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .	Os LEDs azuis promoveram maiores acúmulos de clorofilas nas folhas, enquanto, LEDs vermelhos inibiram o acúmulo, mas estimularam as brotações e a rizogênese. LEDs mistos, sobretudo azul e vermelho 1:1, favoreceram o aumento da biomassa da parte aérea e da raiz.	Hung et al., 2016
<i>Mouriri elliptica</i> (Mart.)	<i>In vitro</i> culture of <i>Mouriri elliptica</i> (Mart.) under conditions that stimulate photoautotrophic behavior	Efeito da irradiância: 0, 50, 75, 100 e $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sob lâmpadas fluorescentes.	O aumento da irradiância minimiza a necessidade de sacarose. Irradiâncias entre 50 e $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foram as mais efetivas.	De Assis et al., 2016

<i>Castanea sativa</i> Mill.	Effect of photon flux density and exogenous sucrose on the photosynthetic performance during <i>in vitro</i> culture of <i>Castanea sativa</i>	50 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , sob lâmpadas fluorescentes	A irradiância mais alta favoreceu a fotossíntese e o crescimento na presença de concentrações moderadas de sacarose adicionadas ao meio de cultivo.	Sáez et al., 2016
<i>Acer saccharum</i> (Marsh.).	High light intensity stress as the limiting factor in micropropagation of sugar maple ( <i>Acer saccharum</i> Marsh.).	Efeito da intensidade: 4, 16 e 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com LEDS azul + vermelho e de amplo espectro	Plantas cultivadas sob espectro azul e vermelho a 4 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e sob amplo espectro a 16 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ exibiram menos sintomas de estresse. Portanto, irradiâncias menores são as mais indicadas para essa espécie <i>in vitro</i> .	Singh et al., 2017
<i>Vitis vinifera</i> L.	An RNA-Seq analysis of grape plantlets grown <i>in vitro</i> reveals different responses to blue, green, red LED light, and white fluorescent light	Efeito da qualidade de luz: LEDs verdes, azuis, vermelhos e lâmpada fluorescente branca sob 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Houve respostas da síndrome de evitação a sombra (SAS) em plantas sob LED vermelha e verde. Em contraste, a luz azul induziu a regulação positiva de genes relacionados a microtúbulos, síntese de clorofila, degradação do açúcar e de genes relacionados à resistência. O crescimento sob luz azul foi comparável à luz branca.	Li et al., 2017

<i>Pouteria gardneriana</i> Radlk.	Morphoanatomy and physiology of <i>Pouteria gardneriana</i> Radlk plantlets grown <i>in vitro</i> at varied photosynthetic photon flux densities.	Efeito da irradiância: 75, 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sob lâmpadas fluorescentes.	Densidade de fluxo de fótons de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ promoveu maior acúmulo de biomassa e certa adaptabilidade anatômica com expansão do parênquima paliçádico	Leite et al., 2017
<i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit	Effect of plant growth regulators, light intensity and LED on growth and volatile compound of <i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit <i>in vitro</i> plantlets	Intensidade de 13, 28, 47, 69, 94 e 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (lâmpadas fluorescentes) e qualidade espectral com LED azul, vermelho, amarelo, branco, verde, vermelho + azul (4:10), (10:4) e (1:1) sob 47 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	A morfogênese foi mais efetiva nas irradiâncias maiores. As plântulas apresentaram melhor crescimento sob LED branco e vermelha: azul (4:10 e 10: 4). Explantes cultivados sob luz fluorescente houve o pior desempenho.	Andrade et al., 2017
<i>Dianthus caryophyllus</i> L.	Blue and red light- emitting diodes improve the growth and physiology of <i>in vitro</i> - grown carnations ‘Green Beauty’ and ‘Purple Beauty’	Efeito da qualidade de luz: LED azul, vermelho e lâmpada fluorescente branca sob 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .	Os LEDs azuis e vermelhos promoveram incrementos no crescimento, parâmetros fotossintéticos e teor de nutrientes em comparação com o tratamento com lâmpada fluorescente branca. Sob LED vermelho houve aumento das atividades de enzimas antioxidantes.	Manivannan et al., 2017

<i>Plectranthusamboinicus</i> (Lour) Spreng	Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the <i>in vitro</i> cultures of <i>Plectranthusamboinicus</i> (Lour.) Spreng	Efeito da intensidade de 26, 51, 69, 94 e 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (lâmpadas fluorescentes) e da qualidade de luz com fluorescente branca e LED azul, vermelho; e associação A + V (1:2,5), (2,5:1) e (1:1) sob 42 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	A intensidade de 69 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi ideal para o crescimento, alterando o perfil de compostos voláteis e aumentando o teor de carvacrol. O vermelho monocromático promoveu o melhor crescimento enquanto o azul monocromático foi o melhor para o aumento do teor de carvacrol.	Silva et al., 2017
<i>Anacardium othonianum</i> Rizz	The influence of light quality on phenolic acid and biflavonoid production in <i>Anacardium othonianum</i> Rizz. seedlings grown <i>in vitro</i>	Efeito da qualidade de luz: amarela, azul, branca, verde e vermelha, sob 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , com lâmpadas fluorescentes	Os maiores acúmulos de massa seca foram observados em mudas cultivadas sob luz vermelha e amarela. A luz azul favoreceu o acúmulo de de ácido gálico e amentoflavona enquanto a luz vermelha foi mais propícia para o acúmulo de ácido 3,4-di-hidroxibenzoico.	Gazolla et al., 2017
<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	The effect of light quality on growth and development of <i>in vitro</i> plantlet of <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.	Efeito da qualidade de luz com lâmpadas fluorescentes brancas e LED azul, branco, vermelho, azul50% + vermelho 50%, sob 40-50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	LEDs vermelhos estimularam a formação de brotação; no entanto, a combinação de LEDs A+V produziu brotos mais longos, com maior número de folhas e estimulou o teor de clorofila, o que favoreceu a aclimatização.	Ramírez-Mosqueda et al., 2017
<i>Lippia gracilis</i> Schauer	Quality and intensity light affect <i>Lippia gracilis</i> Schauer plant growth and volatile compounds <i>in vitro</i>	Efeito das irradiâncias de 26, 51, 69, 94 e 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (lâmpadas fluorescentes) qualidade de luz com LED – branco, vermelho, azul 2.5V:1A, 1V:2.5A, sob	Luz vermelha e uma intensidade de 94 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi melhor para o crescimento. Baixa intensidade (26 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) aumentou o teor de $\gamma$ - terpineno e diminuição do carvacrol. LED azul induziu maior produção de carvacrol.	Lazarini et al., 2018

<i>Myrtus communis</i> L.	LED lighting affects plant growth, morphogenesis and phytochemical contents of <i>Myrtus communis</i> L. <i>in vitro</i>	42 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Efeito da qualidade de luz: LED azul, branco, vermelho, azul (30%) + vermelho (70%) e lâmpada fluorescente branca sob 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Houve efeito estimulante da luz vermelha na taxa de multiplicação, altura da parte aérea e na maior concentração de antioxidantes polifenólicos.	Cioć et al., 2018
<i>Aronia spp</i>	The importance of monochromatic lights in the production of phenolic acids and flavonoids in shoot cultures of <i>Aronia melanocarpa</i> , <i>Aronia arbutifolia</i> and <i>Aronia × prunifolia</i>	Efeito da qualidade de luz: Escuro, UV-A, branca, azul, vermelho, vermelho distante, branca por (lâmpadas fluorescentes, exceto vermelho distante: incandescente com filtro). Irradiância de 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , exceto vermelha e vermelho-distante, 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	A luz azul promoveu maiores incrementos de massa seca e de teores de ácidos fenólicos e de flavonoides totais	Szopa et al., 2018
<i>Bixa orellana</i> L.	Irradiance and light quality affect two annatto ( <i>Bixa orellana</i> L.) cultivars with contrasting bixin production	Efeito de irradiância (50, 150, 50 + 150, 200, 50 + 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e qualidade de luz: lâmpadas fluorescentes e LED branco, azul+verm.	Intensidade de 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com LEDs azul+ vermelho em um genótipo ou fluorescentes brancas em outro são mais efetivos. O efeito de LED sobre produção de bixina é genótipo- dependente	Faria et al., 2019

<i>Piper crassinervium</i> Kunth	Micropropagation of <i>Piper crassinervium</i> : an improved protocol for faster growth and augmented production of phenolic compounds	Foram testadas irradiâncias de 45, 70, 100 e 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sob lâmpadas fluorescentes	Irradiância de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ induziu o acúmulo de biomassa; enquanto 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ restringiu a formação de raízes, com maiores teores de clorofilas, carotenoides, fenóis e flavonoides. No entanto, a produtividade de fenólicos foi similar à de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .	Río-Ríos et al., 2019
<i>Solanum tuberosum</i> L.	Seq analysis reveals differential responses of potato ( <i>Solanum tuberosum</i> L.) plantlets Cultured <i>in vitro</i> to Red, Blue, Green, and White Light-emitting Diodes (LEDs).	Efeito da qualidade de luz: LED verde, azul, vermelho e branco sob 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	A luz vermelha favoreceu o desenvolvimento anatômico das folhas em relação à luz branca. A luz azul se destacou em relação ao desenvolvimento de cloroplastos em comparação com a luz branca. LEDs azuis e brancos proporcionaram maior acúmulo de biomassa e crescimento foliar. Plântulas cultivadas sob luz vermelha e verde foram mais frágeis.	Chen et al., 2019
<i>Physalis angulata</i> (Linn.)	Effects of light quality on rutin production and growth of <i>Physalis angulata</i> (Linn.) seedlings cultured <i>in vitro</i>	Qualidade de luz: amarela, azul, branca, verde e vermelha, sob 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ - lâmpadas fluorescentes	Houve maior acúmulo de massa fresca e seca sob luz branca, entretanto a maior produção de rutina foi sob as lâmpadas azuis e verdes.	Souza et al., 2019
<i>Lippia rotundifolia</i> Cham	Study of the influence of wavelengths and intensities of LEDs on the growth, photosynthetic pigment, and volatile compounds production of <i>Lippia rotundifolia</i> Cham <i>in vitro</i>	Efeito das intensidades de 20, 54, 78, 88 e 110 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (lâmpadas fluorescentes) e qualidade espectral com LED – branco, vermelho, azul 2.5V:1A, 1V:2.5A, sob 42 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .	As irradiâncias de 20 e 54 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ promoveram maior biomassa e conteúdo de pigmentos fotossintéticos. A combinação dos espectros vermelho e azul na proporção 2.5V:1A resultou nos melhores dados biométricos e de clorofila. O LED azul aumentou o teor de mircenos e o limoneno, mas com efeito inverso para mircenona. O espectro branco e combinações A+V induziram o acúmulo de pentadecano.	De Hsie et al., 2019

(Fragaria x Ananassa cv. Festival)	Photosynthetic effects of light-emitting diode (LED) on <i>in vitro</i> -derived strawberry (Fragaria x Ananassa cv. Festival) plants under <i>in vitro</i> conditions	Efeito da intensidade: (25, 50, 75 e 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) sob LEDS com 55% de vermelho, 15% de vermelho distante, 10% de azul, 15% de verde e 5% branco). Lâmpada fluorescente como controle a 45 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	A irradiância de 75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ com o uso de LED favoreceu os parâmetros fotossintéticos e biométricos.	Kepeneck, 2019
------------------------------------	--	--	--	----------------

---

Diante do exposto, a intensidade e a qualidade do espectro de luz são consideradas fonte de energia e sinal importante para o crescimento e desenvolvimento das plântulas cultivadas *in vitro*. Verifica-se também que na maioria das vezes os LEDs foram mais eficientes quando comparado com lâmpadas fluorescentes.

Nos trabalhos listados várias características foram utilizadas para avaliar as respostas à exposição das plantas aos diferentes irradiâncias e comprimentos de ondas, como características biométricas (Hung et al., 2016), teores de pigmentos cloroplastídicos (Liu et al., 2014; Alvarenga et al., 2015), fluorescência da clorofila *a* (Singh et al., 2017; Leite et al., 2017), taxa fotossintética (Eckstein et al., 2012; Kepenek, 2019), metabólitos secundários (De Hsie et al., 2019; Souza et al., 2019) e atividade de enzimas antioxidantes (Manivannan et al., 2017) as quais permitem nortear ajustes consideráveis para a micropropagação *in vitro* e para a produção de fitoquímicos.

Embora haja relato da influência da qualidade da luz sobre o crescimento e o acúmulo de alguns metabólitos em *A. othonianum* (Gazolla et al., 2017) inexistem estudos com diferentes irradiâncias e com qualidade de luz utilizando LEDs, com abordagem fisiológica e bioquímica, o que torna o presente trabalho de grande relevância para o entendimento da fisiologia e da propagação *in vitro* dessa espécie.

### 3. REFERÊNCIAS

Adams WW, Muller O, Cohu CM, Demmig-Adams B (2013) May photoinhibition be a consequence, rather than a cause, of limited plant productivity? *Photosynth res* 117(1-3):31-34. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9849-7>.

Agati G, Brunetti C, Di Ferdinando M, Ferrini F, Pollastri S, Tattini M (2013) Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. *Plant Physiol Bioch* 72:35–45. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.03.014>.

Alvarenga ICA, Pacheco FV, Silva ST, Bertolucci SKV, Pinto JEBP (2015) *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 122(2):299-308. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0766-7>.

Alves AM, Fernandes DC, Borges JF, Sousa AGO, Naves MMV (2016) Oilseeds native to the Cerrado have fatty acid profile beneficial for cardiovascular health. *Rev Nutr* 29(6):859-866. <http://doi.org/10.1590/1678-98652016000600010>.

Alves MSO, Alves AM, Naves MMV (2013) Compostos bioativos e atividade antioxidante de pseudofrutos de caju arbóreo do Cerrado. *Rev Inst Adolfo Lutz* 72(4):327-331.

Andrade HB, Braga AF, Bertolucci SKV, De Hsie BS, Silva ST, Pinto JEBP (2017) Effect of plant growth regulators, light intensity and LED on growth and volatile compound of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit *in vitro* plantlets. *Acta Hortic* (1155):277–284. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2017.1155.40>.

Arcanjo W (2015) Efeito alelopático dos extratos aquosos de folhas de caju-de-árvoredo-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz.) e guapeva (*Pouteria gardneriana* Radlk) sobre a germinação e crescimento de plântulas de alface e rabanete. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós- Graduação em Agroquímica, Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, 115p.

Asada K (1992) Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant* 85:235–241. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb04728.x>.

Assis KC (2010) Propagação *in vitro* de *Anacardium othonianum* Rizz.; uma espécie frutífera e medicinal do Cerrado. Jataí. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Goiás, 89 p.

Assis KC, Pereira FD, Alberto OS, Silva FG, Silva JW, Menezes CCE (2012) *In vitro* cultivation of *Anacardium othonianum* Rizz.: Effects of growth regulator, explant orientation and lighting. *Afr J Biotechnol* 11(7):1559-1566. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1383>.

Barrales-López A, Robledo-Paz A, Trejo C, Espitia-Rangel E, La Rodríguez-De OJL (2015) Improved *in vitro* rooting and acclimatization of *Capsicum chinense* Jacq. plantlets. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 51:274–283. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9671-3>.

Batista DS, Felipe SHS, Silva TD, Castro KM, Mamedes-Rodrigues TC, Miranda NA, Ríos-Ríos AM, Faria DV, Fortini EA, Chagas k, Torres-Silva G, Xavier A, Arencibia AD, Otoni WC (2018) Light quality in plant tissue culture: does it matter? *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 54(3):195-215. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9902-5>.

Bessa NDF, Borges J, Beserra FP, Carvalho RHA, Pereira MAB, Fagundes R, Campos SL, Ribeiro LU, Quirino MS, Chagas Junior AF, Alves A (2013) Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde– Tocantins. *Rev Bras Pl Med* 15(4):692-707. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722013000500010>.

Brunetti C, Guidi L, Sebastiani F, Tattini M (2015) Isoprenoids and phenylpropanoids are key components of the antioxidant defense system of plants facing severe excess light stress. *Environ Exp Bot* 119(4):54-62. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.04.007>

Carvalho SD, Folta KM (2014) Sequential light programs shape kale (*Brassica napus*) sprout appearance and alter metabolic and nutrient content. *Hortic Res* 8(1):1-13.

<http://doi.org/10.1038/hortres.2014.8>.

Cassola F, Silva MHR, Borghi AA, Lusa MG, Sawaya ACHF, Garcia VL, Mayer JLS (2019) Morphoanatomical characteristics, chemical profiles, and antioxidant activity of three species of *Justicia* L. (Acanthaceae) under different growth conditions. *Ind Crop Prod* 131:257-265. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.053>.

Chandra S, Bandopadhyay R, Kumar V, Chandra R (2010) Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnol Lett* 32(9):1199-1205. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0290-0>.

Chen L, Yang Y, Jiang Y, Zhao J, Zang H, Wang X, Hu Y, Xue X (2019) RNA-Seq Analysis Reveals Differential Responses of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Plantlets cultured *in vitro* to red, blue, green, and white light-emitting diodes (LEDs). *J Plant Growth Regul* 38(1):1-16. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09944-7>.

Cioć M, Szewczyk A, Żupnik M, Kalisz A, Pawłowska B (2018) LED lighting affects plant growth, morphogenesis and phytochemical contents of *Myrtus communis* L. *in vitro*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 132:433–447. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1340-2>.

Correa GC, Naves RV, Rocha MR, Chaves LJ, Borges JD (2008) Determinações físicas em frutos e sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.), cajuzinho (*Anacardium othonianum* Rizz.) e pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), visando melhoramento genético. *Biosci J* 24(4):42-47.

Curado FMLMJ, Gazolla AP, Pedroso RCN, Pimenta LP, Oliveira PF, Tavares DC, Silva MLA, Cunha WR, Pietro RCLR, Januário AH, Pauletti PM, Sales JF, Silva FG (2016) Antifungal and cytotoxicity activities of *Anacardium othonianum* extract. *J Med Plants Res* 10(29):450-456. <https://doi.org/10.5897/jmpr2016.6115>.

De Assis ES, Neto AR, Lima LR, Silva FG, Rosa M, Filho SCV, Leite MS (2016) *In vitro* culture of *Mouriri elliptica* (Mart.) under conditions that stimulate photoautotrophic behavior. *Aust J Crop Sci*. <https://doi.org/10.21475/ajcs.19.13.01.p1258>.

De Hsie BS, Bueno AIS, Bertolucci SKV, de Carvalho AA, da Cunha SHB, Martins ER, Pinto J EBP (2019) Study of the influence of wavelengths and intensities of LEDs on the growth, photosynthetic pigment, and volatile compounds production of *Lippia rotundifolia* Cham *in vitro*. J Photochem Photobiol B 111577. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111577>.

Donnelly DJ, Vidaver WE (1984) Pigment content and gas exchange of red raspberry *in vitro* and *ex vitro*. J Am Soc Hortic Sci 109:177-181.

Eckstein A, Zieba P, Gabrys H (2012) Sugar and light effects on the condition of the photosynthetic apparatus of *Arabidopsis thaliana* cultured *in vitro*. J Plant Growth Regul 31:90-101. <https://doi.org/10.1007/s00344-011-9222-z>.

Faria DV, de Freitas Correia LN, de Souza MVC, Ríos AMR, Vital CE, Batista DS, Otoni WC. (2019) Irradiance and light quality affect two annatto (*Bixa orellana* L.) cultivars with contrasting bixin production. J Photochem Photobiol B 111549. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111549>.

Folta KM, Maruhnich SA (2007) Green light: a signal to slow down or stop. J Exp Bot 58(12):3099–3111. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm130>.

Fonseca CM, Boari CA, Domingues PHF, Meira DP, Fernandes LSF, Dumont MA (2014) Iogurte produzido com cajuí (*Anacardium othonianum* Rizz.). Semina: Ciênc Agrár 35(4):1829-1836. <https://doi.org/10.5433/1679-0359>.

Fuentes G, Talavera C, Desjardins Y, Santamaria JM (2005) High irradiance can minimize the negative effect of exogenous sucrose on the photosynthetic capacity of *in vitro* grown coconut plantlets. Biol Plant 49:7–15. <https://doi.org/10.1007/s10535-005-7015-6>.

Galvão VC, Fankhauser C (2015) Sensing the light environment in plants: photoreceptors and early signaling steps. Curr Opin Neurobiol 34:46–53. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.01.013>.

Gazolla AP, Curado FMLMJ, Pedroso RCN, Kellner Filho LC, Sales JF, Rosa M, Costa AC, Pauletti PM, Januário AH, Silva FG (2017) The influence of light quality on phenolic acid and biflavonoid production in *Anacardium othonianum* Rizz. seedlings grown *in vitro*. Aust J Crop Sci 11(5):528-534. <https://doi.org/10.21475/ajcs.17.11.05>. p314.

Gonçalves MAB, Carvalho WR, Damiani C, Silva FA, Caliaro M, Silva YPA, Estevam LKR, Migotto JF, Mendes NSR (2009) Aguardente de cajuzinho do Cerrado: produção e análises físicas e químicas. Rev Proc Q 3(6):31-35. <https://doi.org/10.19142/rpq.v03i06.p31-35.2009>.

Heringer AS, Reis RR, Passamani LZ, Souza-Filho GA, Santa-Catarina C, Silveira V (2017) Comparative proteomics analysis of the effect of combined red and blue lights on sugarcane somatic embryogenesis. Acta Physiol Plant 39(2):52. <http://doi.org/10.1007/s11738-017-2349-1>.

Hung CD, Hong CH, Kim SK, Lee KH, Park JY, Nam MW, Lee HI (2016) LED light for *in vitro* and *ex vitro* efficient growth of economically important highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). Acta Physiol Plant 38(6). <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2164-0>.

Inouea S, Kinoshita T (2017) Blue light regulation of stomatal opening and the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. Plant Physiol 172(2), 531-538. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00166>.

Jeong BR, Sivanesan I (2015) Direct adventitious shoot regeneration, *in vitro* flowering, fruiting, secondary metabolite content and antioxidant activity of *Scrophularia takesimensis* Nakai. Plant Cell, Tissue Organ Cult 123(3):607-618. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0864-6>.

Johkan M, Shoji K, Goto F, Hahida S, Yoshihara T (2012) Effect of green light wavelength and intensity on photomorphogenesis and photosynthesis in *Lactuca sativa* Environ Exp Bot 75(2):128-133. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.08.010>.

Kepek K (2019) Photosynthetic effects of light-emitting diode (LED) on *in vitro*-derived

strawberry (*Fragaria x Ananassa* cv. Festival) plants under *in vitro* conditions. *Erwerbs-Obstbau* 42(2):1-9. <https://doi.org/10.1007/s10341-018-00414-0>.

Kubota C. (2001) Concepts and background of photoautotrophic micropropagation. *Molecular Breeding of Woody Plants*, p. 325-334.

Landi M, Zivcak M, Sytar O, Brestic M, Allakhverdiev SI (2019) Plasticity of photosynthetic processes and the accumulation of secondary metabolites in plants in response to monochromatic light environments: A review. *BBA-Bioenergetics*, 148131. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2019.148131>.

Lazzarini LES, Pacheco FV, Silva ST, Coelho AD, Medeiros APR, Bertolucci SKV, Pinto JEBP, Soares JDR (2017) Use of light-emitting diode (LED) in the physiology of cultivated plants – review. *Sci Agrar Paran* 16(2):137-144. <http://dx.doi.org/10.18188/1983-1471/sap.v16n1p137-144>.

Lazzarini LES, Bertolucci SKV, Pacheco FV, dos Santos J, Silva ST, de Carvalho AA, Pinto JEBP (2018) Quality and intensity of light affect *Lippia gracilis* Schauer plant growth and volatile compounds *in vitro*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1470-1>.

Lee SH, Tewari RK, Hahn EJ, Paek KY (2007) Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania somnifera* (L.) Dunal plantlets. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 90:141-151. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9191-2>.

Leite MS, Silva FG, Assis ES, Neto AR, Mendes GC, Rosa M (2017) Morphoanatomy and physiology of *Pouteria gardneriana* Radlk plantlets grown *in vitro* at varied photosynthetic photon flux densities. *Acta Sci Agron* 39:217–224. <https://doi.org/10.4025/actas-ciagron.v39i2.32515>.

Li Q, Kubota C (2009) Effects of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce. *Environ Exp Bot* 67:59–64. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.06.011>.

Li CX, Xu Z. G, Dong RQ, Chang SX, Wang LZ, Khalil-Ur-Rehman M, Tao JM (2017) An RNA- seq analysis of grape plantlets grown *in vitro* reveals different responses to blue, green, red LED light, and white fluorescent light. *Front Plant Sci* 8(2):78. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00078>.

Liscum E, Hodgson DW, Campbell TJ (2003) Blue light signaling through the cryptochromes and phototropins. So that's what the blues is all about. *Plant Physiol* 133(4):1426-1436. <https://doi.org/10.1104/pp.103.030601>.

Liu M, Xu Z, Guo S, Tang C, Liu X, Jao X (2014) Evaluation of leaf morphology, structure and biochemical substance of balloon flower (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) plantlets *in vitro* under different light spectra. *Sci Hortic* 174(1):112-118. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.05.006>.

Manivannan A, Soundararajan P, Halimah N, KO CH, Jeong BR (2015) Blue LED light enhances growth, phytochemical contents, and antioxidant enzyme activities of *Rehmannia glutinosa* cultured *in vitro*. *Hortic Environ Biotechnol* 56(1):105-113. <https://doi.org/10.1007/s13580-015-0114-1>.

Manivannan A, Soundararajan P, Park YG, Wei H, Kim SH, Jeong BR (2017) Blue and red light- emitting diodes improve the growth and physiology of *in vitro*-grown carnations 'Green Beauty' and 'Purple Beauty'. *Hortic Environ Biotechnol* 58(1):12-20. <https://doi.org/10.1007/s13580-017-0051-2>.

Martínez-Estrada E, Caamal-Velázquez JH, Morales-Ramos V, Bello-Bello JJ (2016) Light emitting diodes improve *in vitro* shoot multiplication and growth of *Anthurium andreanum* Lind. *Propag Ornament Plants* 16(1):3-8.

Mitchell JD, Mori SA (1987) The cashew and its relatives (Anacardium: Anacardiaceae). El marañón y sus parientes (Anacardium: Anacardiaceae). Mem N Y Bot Gard 42(1):1-76.

Möglich A, Yang X, Ayers RA, Moffat K (2010) Structure and function of plant photoreceptors. Annu. Rev. Plant Biol 61:21–47. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112259>.

Naves MMV, Alves AM, Dias T, Hassimotto NMA (2016) Ascorbic acid content, phenolic compounds and antioxidant capacity of brazilian savannah native fruits. FASEB J 30(1):1176.

Nhut DT, Huy NP, Tai NT, Nam NB, Luan VQ, Hien VT, Tung TH, Vinh TB, Luan TC (2015) Light-emitting diodes and their potential in callus growth, plantlet development and saponin accumulation during somatic embryogenesis of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. Biotechnol Biotech Eq 29(2):299-308. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.1000210>.

Oliveira DL (2011) Viabilidade econômica de algumas espécies medicinais nativas do cerrado. Revista EVS 38(2):301-332. <https://doi.org/10.18224/est.v38i2.2196>.

Ouzounis T, Rosenqvist E, Ottosen CO (2015) Spectral effects of artificial light on plant physiology and secondary metabolism: A review. HortSci 50:1128-1135. <https://doi.org/10.21273/hortsci.50.8.1128>.

Pinnola A, Bassi R (2018) Molecular mechanisms involved in plant photoprotection. Biochem Soc Trans 46(2):467–482. <https://doi.org/10.1042/bst20170307>.

Ramírez-Mosqueda MA, Iglesias-Andreu LG, Bautista-Aguilar JR (2017) The effect of light quality on growth and development of *in vitro* plantlet of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Sugar Tech 19(3):331–336. <https://doi.org/10.1007/s12355-016-0459-5>.

Reis ES, Pinto JEBP, Rosado LDS, Corrêa RM (2009) Teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. *in vitro* sob influência do meio de cultura. Acta Sci-Agron 31(2):331-335. <https://doi.org/10.1590/S1807-86212009000200021>.

Ríos-Ríos AM, Silva JVS, Fernandes JVM, Batista DS, Silva TD, Chagas K, Pinheiro MVM, Faria DV, Otoni WC, Fernandes SA (2019) Micropropagation of *Piper crassinervium*: an improved protocol for faster growth and augmented production of phenolic compounds. Plant Cell, Tissue Organ Cult. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01585-8>.

Sáez PL, Bravo LA, Sánchez-Olate M, Bravo PB, Ríos DG (2016) Effect of photon flux density and exogenous sucrose on the photosynthetic performance during *in vitro* culture of *Castanea sativa*. Am J Plant Sci 7:2087–2105. <https://doi.org/10.4236/ajps.2016.714187>.

Santos CM, Verissimo V, Wanderley Filho HCL, Ferreira VM, Cavalcante PGS, Rolim EV, Endres L (2013) Seasonal variations of photosynthesis gas exchange, quantum efficiency of photosystem II and biochemical responses of *Jatropha curcas* L. grow in semi-humid and semi-arid áreas subject to water stress. Ind Crop Prod 41(6):203-213. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.003>.

Silva MR, Lacerda DBCL, Santos GG, Martins DMO (2008) Caracterização química de frutos nativos do cerrado. Cienc Rural 38(6):1790-1793. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000600051>.

Silva ST, Pacheco FV, Alvarenga ICA, Pinto JEBP, Bertolucci SKV, Ferreira CP (2014) Optimization of the protocol for the *in vitro* cultivation of *Piper aduncum* L. Am J Plant Sci 5:3474–3482. <https://doi.org/10.4236/ajps.2014.523363>.

Silva MMA, Oliveira ALB, Oliveira-Filho RA, Camara T, Willadino L, Gouveia-Neto A (2016) The effect of spectral light quality on *in vitro* culture of sugarcane. Acta Sci Biol Sci 38(2):157-161. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v38i2.31109>.

Silva ST, Bertolucci SKV, da Cunha SHB, Lazzarini LES, Tavares MC, Pinto JEBP (2017) Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content

in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 129(3): 501–510. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1195-6>.

Shin KS, Park SY, Paek KY (2013) Sugar metabolism, photosynthesis, and growth of *in vitro* plantlets of *Doritaenopsis* under controlled microenvironmental conditions. In Vitro Cell Dev Biol - Plant 49(4):445–454. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9524-x>.

Singh AS, Jones AMP, Shukla MR, Saxena PK (2017) High light intensity stress as the limiting factor in micropropagation of sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.). Plant Cell, Tissue Organ Cult 129:209–221. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1170-2>.

Souza PLC, Silva MR (2015) Quality of granola prepared with dried caju-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz) and baru almonds (*Dipteryx alata* Vog). Int J Food Sci Tech 52(3):1712– 1717. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1134-4>.

Souza HC, Filho LCK, Brito MF, Hara ACBAM, Donadon MLB, Pietro RCLR, Januário AH, Silva FG (2019) Effects of light quality on rutin production and growth of *Physalis angulata* (Linn.) seedlings cultured *in vitro*. Aust J Crop Sci 13:251-257. <https://doi.org/10.21475/ajcs.19.13.02.p1318>.

Szopa A, Starzec A, Ekiert H (2018) The importance of monochromatic lights in the production of phenolic acids and flavonoids in shoot cultures of *Aronia melanocarpa*, *Aronia arbutifolia* and *Aronia* × *prunifolia*. J Photochem Photobiol B 179:91–97. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.01.005>.

Szymańska R, Ślesak I, Orzechowska A, Kruk J (2017) Physiological and biochemical responses to high light and temperature stress in plants. Environ Exp Bot 139:165–177. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.05.002>

Taiz L, Zeiger E, Moller I, Murphy A (2017) Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 888 p.

Verma N, Shukla, S (2015) Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *J Appl Res Med Aroma* 2(4):105–113. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.09.002>.

Vieira RF, Camillo J, Coradin L (Ed.) (2016) Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: Região Centro-Oeste. Brasília, DF: MMA 1.160 p. (Série Biodiversidade; 44).

Yonghua Q, Shanglong Z, Asghar S, Lingxiao Z, Qiaoping Q, Kunsong C, Changjie X (2005). Regeneration mechanism of Toyonoka strawberry under different color plastic films. *Plant Sci* 168(6):1425–1431. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.11.016>.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Definir as melhores condições de luminosidade para otimizar as respostas morfofisiológicas e bioquímicas de *Anacardium othonianum* Rizz. nas condições *in vitro*.

### **4.2 Objetivos específicos**

Investigar o comportamento morfofisiológico e a produção de metabólitos secundários em plântulas de *A. othonianum* expostos a variações na intensidade da luz;

Verificar as faixas espectrais obtidas por LEDs mais efetivas na ativação de alterações fisiológicas, morfoanatômicas e bioquímicas em *A. othonianum in vitro*.

## **CAPÍTULO I**

**Artigo publicado em dezembro de 2019 no periódico Plant Cell, Tissue and Organ  
Culture:**

**Variations in photon flux density alter the morphophysiological and chemical  
characteristics of *Anacardium othonianum* Rizz. *in vitro***



# Variations in photon flux density alter the morphophysiological and chemical characteristics of *Anacardium othonianum* Rizz. in vitro

Márcio Rosa<sup>1,3</sup> · Aurélio Rubio Neto<sup>2</sup> · Vinícius de Oliveira Marques<sup>2</sup> · Fabiano Guimarães Silva<sup>2</sup> · Elisvane Silva de Assis<sup>2</sup> · Alan Carlos Costa<sup>2</sup> · Luciana Arantes Dantas<sup>1</sup> · Paulo Sérgio Pereira<sup>2</sup>

Received: 22 May 2019 / Accepted: 27 November 2019  
© Springer Nature B.V. 2019

## Abstract

*Anacardium othonianum* Rizz. is a native species of the Cerrado with nutritional and phytotherapeutic properties. Studies that characterize the physiological behavior and the photoautotrophism and production of secondary metabolites by this species in vitro are still scarce. In this context, the objective was to induce photoautotrophism and increase the production of secondary metabolites in *A. othonianum* using increased light intensities. Five photon flux densities—12, 25, 50, 100 and 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ —were tested in a growth chamber during in vitro culture. The plant material was analyzed after 50 days of cultivation. Higher values for the leaf area, dry weight and gallic acid were observed under 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Beyond this level of irradiance, the luminous stress increased, as evidenced by the intensification of lipid peroxidation and the lower mean potential quantum yield, chloroplastid pigments and biomass. Luminous intensities below 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  did not provide a satisfactory energy supply for the accumulation of biomass and secondary metabolites, such as gallic acid, rutin and vitexin. Therefore, varying the photon flux density represents a promising strategy to both promote photoautotrophism and elicit secondary metabolites in *A. othonianum*.

## Key message

The morphophysiological characteristics of *Anacardium othonianum* cultivated in vitro varied considerably as a function of irradiance, its increased phenolic compounds accumulation.

**Keywords** Photosynthetic pigments · Luminous intensity · Irradiance · Secondary metabolites

---

Communicated by Henryk Flachowsky.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11240-019-01744-x>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Aurélio Rubio Neto  
aurelio.rubio@ifgoiano.edu.br

<sup>1</sup> Program in Biotechnology and Biodiversity - Pró Centro Oeste Network, UFG - IPTSP-UFG Building, Cx. Postal 131, Goiás CEP 74001-970, Brazil

<sup>2</sup> Federal Institute of Education, Science and Technology Goiano - Innovation Pole, Rod. Sul Goiana Km 01, Cx. P. 66, Rio Verde, Goiás CEP 75.901-970, Brazil

<sup>3</sup> University of Rio Verde – UniRV, Fontes do Saber Farm, Cx. P. 104, Rio Verde, Goiás CEP 75901-970, Brazil

## Introduction

The Cerrado has several fruit species with great dietary and economic potential, and they are used by the local population by *in natura* consumption or after processing in the forms of juices, liqueurs, sweets, ice creams and spirits (Rocha et al. 2011). Among these species, *Anacardium othonianum* Rizzini, which is known as the Cerrado cashew tree, a widely known ecotype of *Anacardium occidentale* L., is characterized by leaves that are relatively leathery, wavy and sessile. This plant has a smaller, more acidic pseudo fruit (Mitchell and Mori 1987) and better adaptability to low-fertility soils, high temperatures and seasonal rainfall than the other ecotypes (Agostini-Costa et al. 2006).

In addition to its regional acceptance as a food product, this species has medicinal potential. Extracts from the leaves, barks, roots and nuts are used by the local population for medicinal purposes, ranging from expectorant to

anti-inflammatory actions (Agostini-Costa et al. 2006; Dias-Souza et al. 2013). These properties may be related to the presence of bioactive substances such as flavonoids, alkaloids, tannins, saponins, phenolic acids, terpenoids, saponins and coumarins typical of the genus *Anacardium* (Correia et al. 2006; Encarnação et al. 2016). However, studies that characterize the physiological behavior, autotrophism and the production of secondary metabolites of native Cerrado species in vitro are still scarce.

The spread of *Anacardium othonianum* usually occurs through seeds; however, asynchrony in fruit ripening and irregular germination in natural conditions and in nurseries are negative attributes to obtain uniform seedlings. The use of this plant in commercial orchard implementation programs requires the continuous and large-scale production of uniform seedlings. In vitro cultivation may provide a more efficient approach to the plant production of this species (Assis et al. 2015; Souza et al. 2017). The in vitro culture of this species has shown promise (Assis et al. 2012) as well as alternative potential for the production of high-value metabolites, since under these conditions, there is an opportunity to regulate/stimulate biosynthetic pathways because it is possible to control a number of environmental factors. Among these factors, light stands out. In addition to boosting photosynthesis, light also modulates the growth and development of plants (Wang et al. 2012).

For in vitro micropropagation environments, photosynthetic photon flux densities of approximately  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  are most commonly used (Singh et al. 2017); that is, these levels are substantially lower than those experienced by *A. othonianum* plants in the Cerrado, where the irradiance can exceed  $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Palhares et al. 2010). Thus, an increased light intensity in vitro could promote photoautotrophism, but it can also exert greater pressure on the plant defense systems in response to light stimulus (Sáez et al. 2016). If the irradiance exceeds the photosynthetic need, photoinhibition may occur (Powles 1984; Alvarenga et al. 2015). Excess energy in the photosynthetic machinery can lead to an accumulation of reactive oxygen species (ROS), which can be deleterious to biomolecules and cell membranes. Plants have inducible defense mechanisms that protect them against this potential damage.

The elimination of ROS is performed by antioxidant enzymes and low molecular weight chemical compounds such as tocopherol, glutathione, ascorbate and carotenoids (Pinnola and Bassi 2018; Szymańska et al. 2017).

Among low molecular weight compounds, carotenoids act through the de-epoxidation of xanthophylls (violaxanthin in zeaxanthin) to prevent the formation of triplet chlorophyll from singlet chlorophyll via dissipation in the form of heat (nonphotochemical quenching, NPQ), and they also remove accumulated singlet oxygen (Brunetti et al. 2015). However, a photoprotective function similar to that of carotenoids is

attributed to several secondary metabolites, including phenolics and their derivatives, and it can be explained by the presence of conjugated double bonds, that is, by delocalized  $\pi$  electrons. Due to this electron configuration, these compounds tend to absorb radiation (visible and UV), promoting the easy transfer of electrons and energy (Demmig-Adams 2003; Libik-Konieczny et al. 2018).

This reasoning leads to the hypothesis that in terms of their center of origin, *A. othonianum* seedlings respond positively to irradiance higher than the level that is commonly used in conventional micropropagation.

In this context, the objective of this work was to investigate the morphophysiological behavior and the production of secondary metabolites in *A. othonianum* seedlings that were exposed to variations in light intensity in in vitro culture medium.

## Materials and methods

In vitro seedlings were established from *A. othonianum* seeds at the Plant Tissue Culture Laboratory at the Goiano Federal Institute, at Rio Verde Campus. The seeds were collected from trees native to the Montes Claros de Goiás region ( $16^{\circ} 10' 8'' \text{ S}$ ,  $51^{\circ} 27' 12'' \text{ W}$ , 412 m altitude). Voucher number 3793 was deposited at the Jataiense Herbarium at the Federal University of Jataí, Jataí-GO. The in vitro establishment and multiplication procedure for *A. othonianum* was performed in accordance with Assis et al. (2012).

Thirty days after sowing, nodal segments of approximately 1.2 cm containing two shoots were disinfested and inoculated into test tubes containing 10 mL of MS culture medium (Murashige and Skoog 1962) with a 50% salt concentration supplemented with  $30 \text{ g L}^{-1}$  sucrose,  $3.5 \text{ g L}^{-1}$  agar,  $2 \text{ g L}^{-1}$  activated charcoal and  $30 \mu\text{M}$  6-benzylaminopurine (BAP). The pH was adjusted to  $5.7 \pm 0.03$  before a gelling agent was added. The culture medium was autoclaved at  $120^{\circ} \text{C}$  for 20 min. The inoculated tubes containing one explant each were kept in a growth room with a photoperiod of 16 h at  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and a temperature of  $25 \pm 3^{\circ} \text{C}$  for 45 days. Subsequently, the explants were selected and placed inside 250 mL flasks containing 40 mL of 50% MS culture medium with the same concentrations of sucrose, agar, charcoal activated and BAP as previously. The selected explants were subjected for more than 50 days to different flux densities (12, 25, 50, 100 and  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) provided by 36 W Philips fluorescent tubes in a climatic chamber (Fitotron®). The temperature was set to  $25^{\circ} \text{C}$ , the relative humidity was 60% and the photoperiod was 16 h long. The irradiance of each treatment was adjusted using a PAR sensor, model QSO-S (Decagon Devices, Pullman, WA, USA).

## Biometric features

Fifty days after the start of cultivation, the plant length, number of shoots and leaves, leaf area, leaf and total dry weight and specific leaf area (SLA) were evaluated. The leaf area was obtained by integrating several images using ImageJ® software. The dry weight values were determined on an analytical balance after drying the material in an oven at 65 °C for 72 h. The specific leaf area (SLA) was obtained using the leaf area in cm<sup>2</sup>/leaf dry weight (g).

## Leaf anatomical characteristics

For anatomical evaluations of the plant material *in vitro*, the following two anatomical processes were developed: fixation with the embedding of the material in historesin and diaphanization.

For the fixation, the leaves were submerged in Karnovsky's solution (Karnovsky 1965) for 48 h, dehydrated in a graded alcohol series and preinfiltrated and infiltrated with historesin (Historesin Leica). The material was sectioned transversely into 5 µm slices on a rotary microtome (model RM 2155, Leica). The leaf tissue sections were stained with 0.05% toluidine blue, pH 4.0 (O'Brien et al. 1964).

For the diaphanization, the leaf samples were immersed in 5% sodium hydroxide for 24 h, clarified with hydrochloric acid, 1.6:1 (w/v) for a further 24 h and stained with 1% safranin in 50% ethanol (Arnott 1959).

Following the above procedures, slides containing materials were coverslipped using Canada balsam. Images were obtained under an optical microscope (model BX61, Olympus) with a U-photo system.

## Determinations of chloroplastid pigments

The concentrations of chloroplastid pigments (chlorophyll *a* and *b* and carotenoids) were determined from three 5 mm diameter leaf discs that were placed in 5 mL of DMSO then saturated with CaCO<sub>3</sub>. Following 10 h in a water bath at 65 °C, the absorbances of the extracts were read in a UV–VIS spectrophotometer, Evolution 60S (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA). The pigment concentration was calculated according to Wellburn (1994). Additionally, the pheophytinization index was evaluated according to Ronen and Galun (1984).

## Evaluation of chlorophyll *a* fluorescence

The images and chlorophyll fluorescence parameters were obtained using an IMAGING PAM modulated fluorometer (MAXI version) (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany). The leaves were dark-adapted for 30 min so that the reaction centers could be entirely open. Under this

condition, the adaxial portions of the leaves were exposed to a low intensity light (0.03 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) to determine the initial fluorescence (F<sub>0</sub>). Then, a saturation light pulse (> 6000 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) was applied for 0.8 s to determine the maximal fluorescence (F<sub>m</sub>). From these measurements, we calculated the potential quantum yield of photosystem II (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> = (F<sub>m</sub> – F<sub>0</sub>)/F<sub>m</sub>) (Genty et al. 1989).

After each sample was illuminated for 40 s at 11 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, the fluorescence of each light-adapted sample was measured before the saturation pulse (F), subsequently, a saturating pulse was applied to obtain the maximum fluorescence in a light-adapted state (F<sub>m</sub>'), allowing to calculate the effective quantum yield of photosystem II (PSII), Φ<sub>PSII</sub> = (F<sub>m</sub>' – F)/F<sub>m</sub>' (Genty et al. 1989). The regulated nonphotochemical (Φ<sub>NPQ</sub>: (F/F<sub>m</sub>') – (F/F<sub>m</sub>)) and unregulated dissipation yields (Φ<sub>NO</sub>: F/F<sub>m</sub>) were calculated as described by Kramer et al. (2004). The electron transport rate (ETR) was calculated as ETR = Φ<sub>PSII</sub> × PAR × A<sub>leaf</sub> × 0.5 (Bilger et al. 1995), where PAR is the photon flux density, A<sub>leaf</sub> is the amount corresponding to the fraction of incident light that is absorbed by the leaves, and 0.5 is the excitation energy fraction that is presumably distributed equally between PSII and PSI (Laik and Loreto 1996). The data were obtained through image processing on the median regions of the leaves.

## Analyses of enzymatic activity and oxidative stress

The lipid peroxidation was measured in terms of the malonic dialdehyde (MDA) concentration using the thiobarbituric acid reaction (TBAR) method, according to Heath and Packer (1968). Leaf tissue samples weighing 0.15 g each were macerated in liquid N<sub>2</sub>. The resulting powder was homogenized in 2 mL of 1% trichloroacetic acid (TCA) (m/v). The homogenate was centrifuged at 10,000×g for 15 min at 4 °C. After the centrifugation, 0.5 mL of supernatant was added to 1.5 mL of thiobarbituric acid (TBA) 0.5% (w/v), TCA 20% (w/v) and incubated in a water bath at 95 °C for 30 min. After this incubation, the reaction was stopped in an ice bath. The samples were centrifuged at 9000×g for 10 min, and the specific and nonspecific absorbances of the supernatant were determined at 532 and 600 nm, respectively. The MDA concentration was calculated using the extinction coefficient of 155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

To determine the nonspecific peroxidase (POX) activities, 0.2 g of leaf tissue was macerated in liquid nitrogen with 2 mL of the following extraction medium: potassium phosphate buffer 50 mM (pH 6.8), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 0.1 mM, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 1 mM, and 2% polyvinylpyrrolidone (PVP). The enzyme extract was centrifuged at 12,000×g for 15 min at 4 °C, and the supernatant was used as a crude extract (Debona et al. 2012).

The POX activity was determined by adding 100  $\mu\text{L}$  of leaf extract to a reaction medium containing 25 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8), 20 mM pyrogallol and 20 mM hydrogen peroxide at a volume of 2 mL (Kar and Mishra 1976). The reaction was started after the addition of 15  $\mu\text{L}$  of leaf extract, and the absorbance was determined at 420 nm for 1 min at 25 °C. A molar extinction coefficient of 2.47  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  (Chance and Maehly 1955) was used to calculate the POX activity. The activity of the POX was expressed on a protein basis, the concentration of which was determined in accordance with the Bradford method (Bradford 1976), using bovine serum albumin as the standard protein.

### Phytochemical analyses

The concentrations of gallic acid and flavonoids, quercitrin, rutin and vitexin were determined by HPLC according to methodology adapted from Curado et al. (2016). For each repetition, 50 mg of dry seedling shoot extract was used. The extraction was performed in 1 mL of HPLC-grade methanol using an ultrasonic bath for 30 min. After filtration through Advantec HP020AN membranes (20  $\mu\text{m}$  mesh), the extracts were transferred to 1 mL vials, from which 20  $\mu\text{L}$  aliquots were analyzed by HPLC.

### Statistical analyses

The experiment was conducted in a completely randomized design, with six replicates for the biometric characteristics, five for the chloroplast pigment concentration and four for the other evaluated characteristics. Each replicate consisted of 1 vial containing 2 seedlings. The data were statistically evaluated using an analysis of variance (ANOVA) with the F test (5%), and the regression models were fitted

using SISVAR statistical analysis software (Ferreira 2011). Pearson correlation estimates were performed using the R software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) and the Corrplot package plot, which marked all features based on the Pearson correlation coefficient on the heatmap.

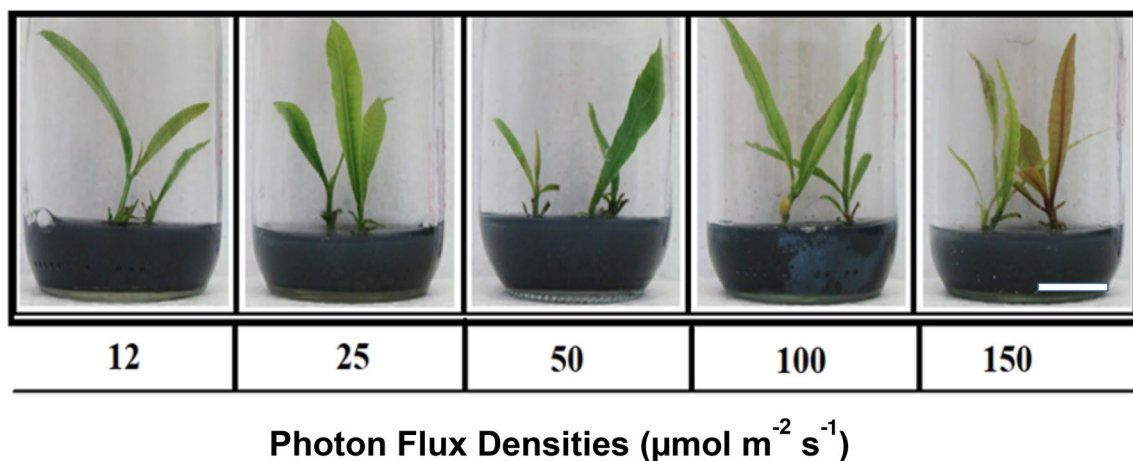
## Results and discussion

### Biometric features

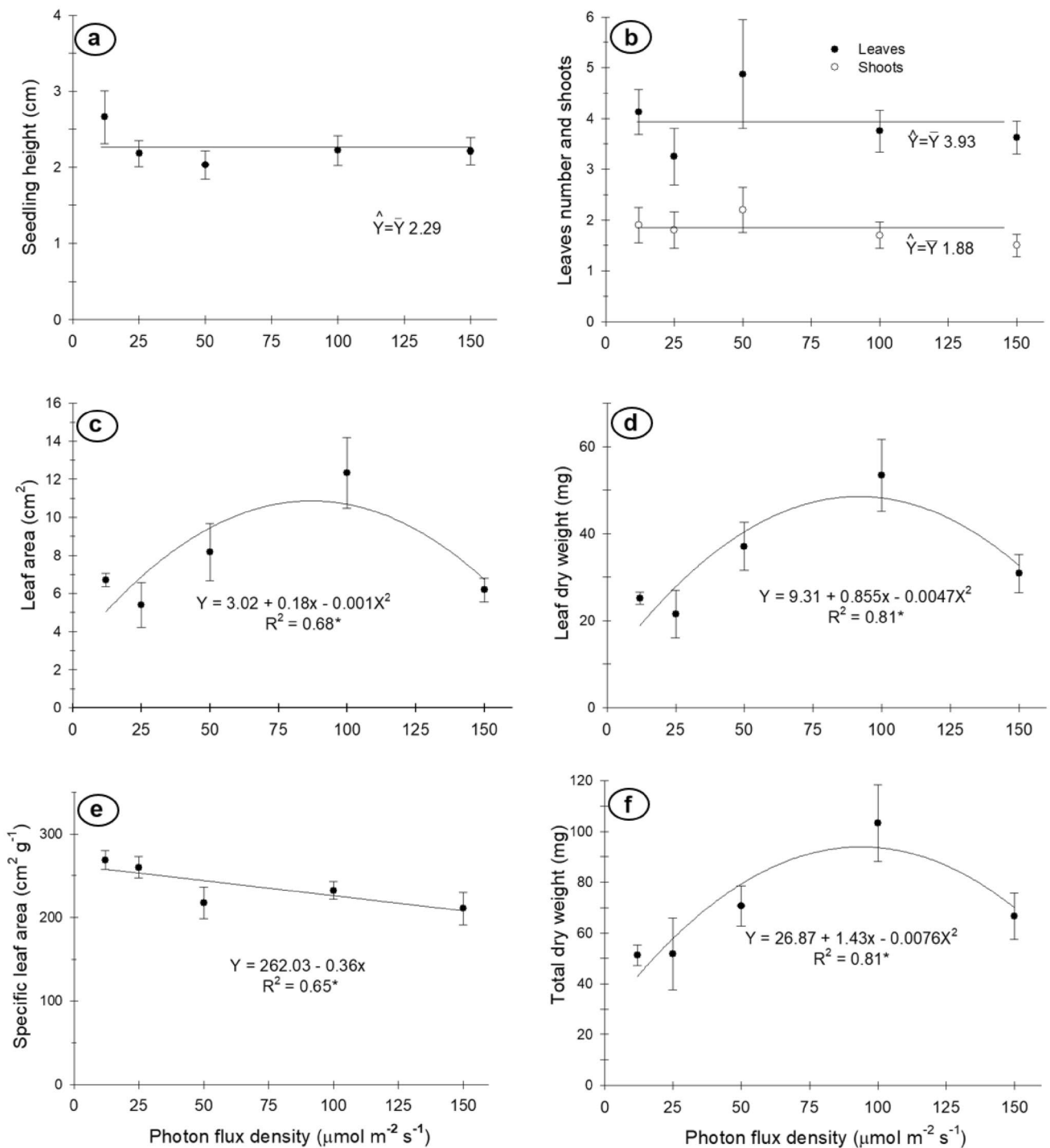
The photon flux density (PFD) affected the morphophysiological and biochemical characteristics of the *A. othonianum* grown in vitro. The yellow/orange coloration of the leaves was evident under higher irradiances (Fig. 1), which could be attributed to the higher anthocyanin contents in plants under light stress, since these pigments are related to photoprotection (Chen et al. 2013). This characteristic was also observed in *Acer saccharum* Marsh. under higher irradiances in vitro (Singh et al. 2017). There was no mortality due to PFD variation in the growth environment.

It was observed that the heights of the seedlings and the numbers of shoots and leaves did not change due to the increasing levels in the PFD, with mean values of 2.29, 1.88 and 3.93, respectively (Fig. 2a, b). However, the leaf area as well as the leaf and total dry weight exhibited quadratic behavior in response to the luminosity, with maxima at 90, 91 and 94  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 2c, d, f), respectively.

The profiles of the growth and development responses to the luminosity variations are specie-dependent. For example, better seedling growth rates were obtained in *Capsicum chinense* Jacq. under a low PFD (28  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) than under 225  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Barrales-López et al. 2015). In *Cocos nucifera* L., a PFD of 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  provided



**Fig. 1** Images of the *Anacardium othonianum* Rizz. seedlings after 50 days of in vitro culture under different photon flux densities (bar = 2 cm)



**Fig. 2** Heights of seedlings (a), numbers of leaves and shoots (b), leaf area (c), leaf dry weight (d), specific leaf area (e) and total dry weight (f) of *Anacardium othonianum* Rizz. cultured in vitro, as a function

of the photon flux density. The data are the means and standard errors (n=6). \*p<0.05; \*\*p<0.01

better results than a PFD of less than 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fuentes et al. 2005). In this sense, the results demonstrated here fill an important knowledge gap, since there are no studies that portray the morphophysiological

behavior of *A. othonianum* subjected to different irradiance levels, especially under in vitro conditions.

The lower accumulation of biomass observed under the lower irradiances is probably attributed to the insufficient

biosynthesis of ATP and NADPH to ensure carbon fixation and, consequently, the biosynthesis of carbohydrates, causing lower plant growth (Sáez et al. 2016). Low light intensities are capable of saturating the reaction of phytochromes and cryptochromes, but they may be insufficient for the fullness of the photosynthetic process (Zheng and Van Labeke 2018), and, consequently, the accumulation of biomass.

The specific leaf area (SLA) was reduced linearly as a function of the light intensity (Fig. 2e). The higher SLA values are characteristic features of low-light environments and can signify strategies to optimize the uptake of light energy, while decreasing the SLA at higher irradiances can attenuate the damage caused by excess light energy (Fan et al. 2013). A higher specific leaf area is a reflection of less investment in the lignification of the epidermis and cuticle (Rossatto et al. 2010), which may subsequently lead to difficulties in acclimatization, especially in relation to the temperature and relative humidity fluctuations in the ex vitro environment.

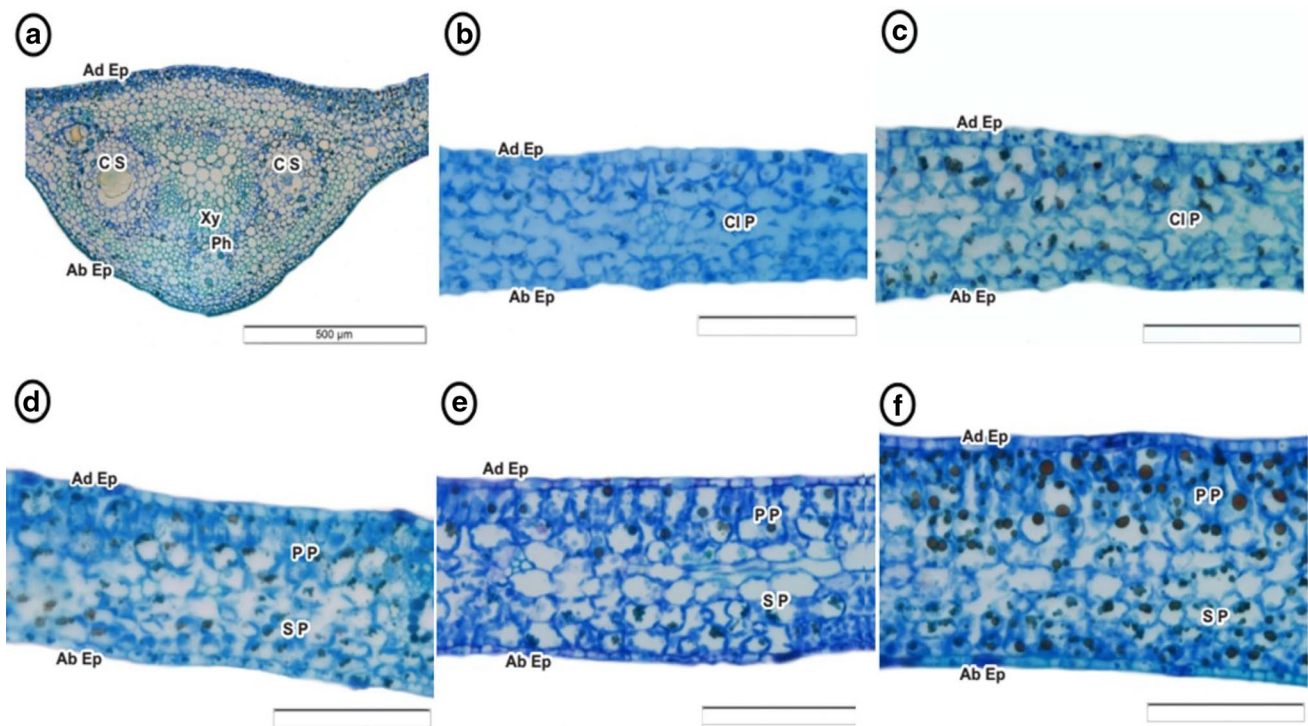
### Anatomical variables

The differentiation of vascular bundles in the xylem and phloem was observed in all plants independent of their PFDs (Fig. 3a).

Regarding the development of the chlorophyll parenchyma, under low irradiance conditions (12 and

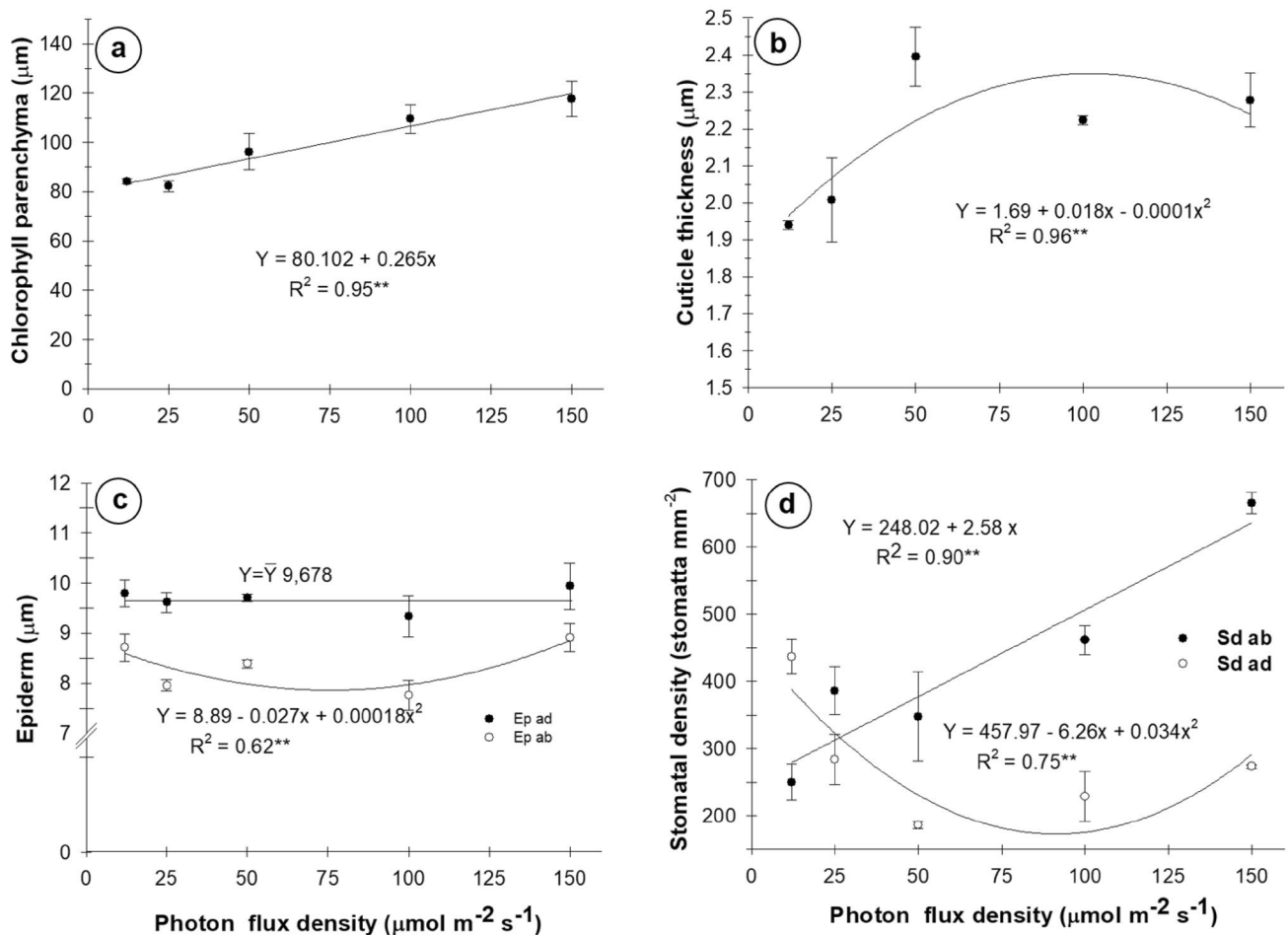
$25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), the leaves formed a homogeneous and less thick chlorophyll parenchyma (Figs. 3b, c and 4a). Above an irradiance of  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , tissue differentiation was observed in the palisade and spongy parenchyma, that is, the dorsiventral type was heterogeneous (Fig. 3d, f), which configures the tissue expansion. The leaf spongy parenchyma of the *A. othonianum* cultured under PFD of 50, 100 and  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  formed stratified layers consisting of polyhedral and isodiametric cells. These characteristics determine the tissue and differentiate the palisade parenchyma from juxtaposed columnar cells (Fig. 3d, f). The epidermis on both sides of the leaf was uniseriate, consisted of juxtaposed cells and was rectangular in shape with an externa plana or slightly convex outer periclinal wall (Fig. 3).

The thickness of the leaf chlorophyll parenchyma increased considerably as a function of the PFD, with a variation of 40% between 12 and  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 4a). Morphological or physiological changes in leaves are commonly observed as adaptive plant responses to different environmental conditions (Assis et al. 2015; Pereira et al. 2013). This behavior was also observed for the species *Mouriri elliptica* Mart. when it was cultivated in the absence of sucrose and different luminous intensities (de Assis et al. 2016). Plant investments in leaf tissues, in particular, chlorophyll parenchyma, enhances the plant's ability to use the available light and  $\text{CO}_2$  to perform photosynthesis, resulting



**Fig. 3** Photomicrographs of leaf cross sections from *Anacardium othonianum* Rizz. cultured in vitro for 50 days (a), the region between ribs at photon flux densities of 12 (b), 25 (c), 50 (d), 100 (e) and 150

(f)  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . CS Secretory channel, Ad ep adaxial and Ab ep abaxial epidermis, Cl P chlorophyll parenchyma, PP palisade parenchyma and SP spongy parenchyma. 100  $\mu\text{m}$  bar (b–f)



**Fig. 4** Thickness of the chlorophyll parenchyma (a), cuticle thickness (b), adaxial (Ep ad) and abaxial epidermis (Ep ab) (c) and adaxial (Sd ad) and abaxial (Sd ab) (d) leaves of *Anacardium othonianum* Rizz.

in the production of primary metabolic compounds, which are essential for plant growth both *in vitro* and *ex vitro*. Lower specific leaf areas usually indicate increases in the leaf thickness (Fan et al. 2013), this was evidenced in this study by the negative correlation between SLA and thickness of the chlorophyll parenchyma ( $-0.6 \leq r < 1$ , Fig. 5).

The thickness of the cuticle varied according to the *in vitro* culture conditions (Fig. 4b). The behavior of the cuticle thickness was quadratic, with a maximum point of  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Seedlings cultivated under light intensity levels of 12 and  $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  had a lower capacity for cuticular formation.

Leaf anatomical variations may represent the adaptive capacity for the *in vitro* conditions imposed on them. These variations, as connoted by anatomical plasticity (de Assis et al. 2016), were also considered for the species *Pouteria gardneriana* Radlk in a culture with high irradiances (Leite et al. 2017). The adaxial epidermis barely changed, but quadratic behavior was verified for the abaxial epidermis,

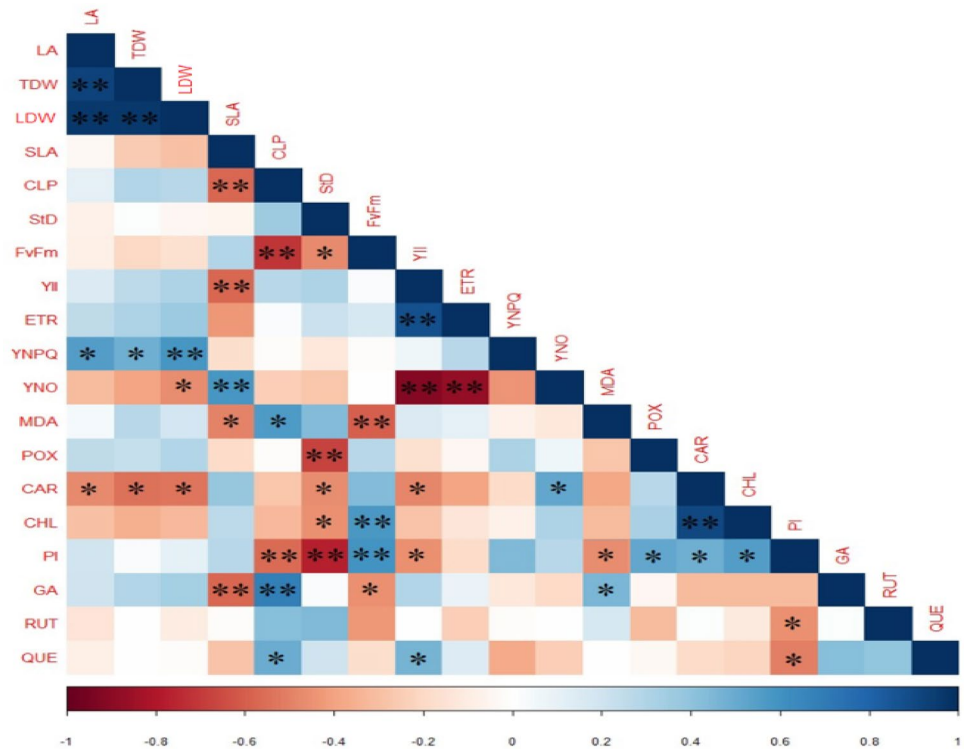
cultured *in vitro* under different photon flux densities. The data are the means and standard error ( $n=4$ ). Significance:  $**p < 0.01$

with the highest averages found at the extremes of irradiance. The abaxial stomatal density increased linearly as a function of the PFD (Fig. 4d). The increase in stomatal density in leaves under higher irradiance favors increased  $\text{CO}_2$  uptake (Lichtenthaler et al. 1981; Liu et al. 2014); however, due to the pronounced increase in light stress, in this study such adjustment was not sufficient for a higher accumulation of dry weight at the highest irradiances, as shown in correlation analysis (Fig. 5).

### Chloroplast pigments

The concentrations of chloroplast pigments, especially chlorophyll a and carotenoids, in addition to the pheophytinization index (PI), were sensitive indicators of variations in the PFD (Fig. 6). The reduced chlorophyll concentration in leaves under higher light intensities might be due to the greater investment in electron transport components and complex ATPases (Walters 2005; Mathur et al. 2018). In

**Fig. 5** Pearson correlation heatmap obtained between variables at 50 days of in vitro cultivation of *A. othonianum* subjected to different flow densities. *LA* leaf area, *TDW* total dry weight, *LDW* leaf dry weight, *SLA* specific leaf area, *CLP* chlorophyll parenchyma, *StD* stomatal density, *FvFm* potential quantum yield, *YII* effective quantum yield, *ETR* electron transport rate, *YNPQ* and *YNO* regulated nonphotochemical and unregulated dissipation yields, respectively, *MDA* malondialdehyde, *POX* nonspecific peroxidase, *CAR* carotenoides, *CHL* total chlorophyll, *PI* pheophytinization index, *GA* gallic acid, *RUT* rutina, *QUE* quercitrin. Significância: \* ( $p \leq 0.05$ ), \*\* ( $p \leq 0.01$ )



contrast to what would occur in plants under low luminosity, the investment would primarily consist of increases in the PSII and its antenna complex and, consequently, in the reduction of the chl *a*/chl *b*, (Lüttge 2008). However, the reduction in the chlorophyll concentrations (Fig. 6a) and the chl *a*/chl *b* ratio (Fig. 6c) observed at higher light intensities could be due to light stress.

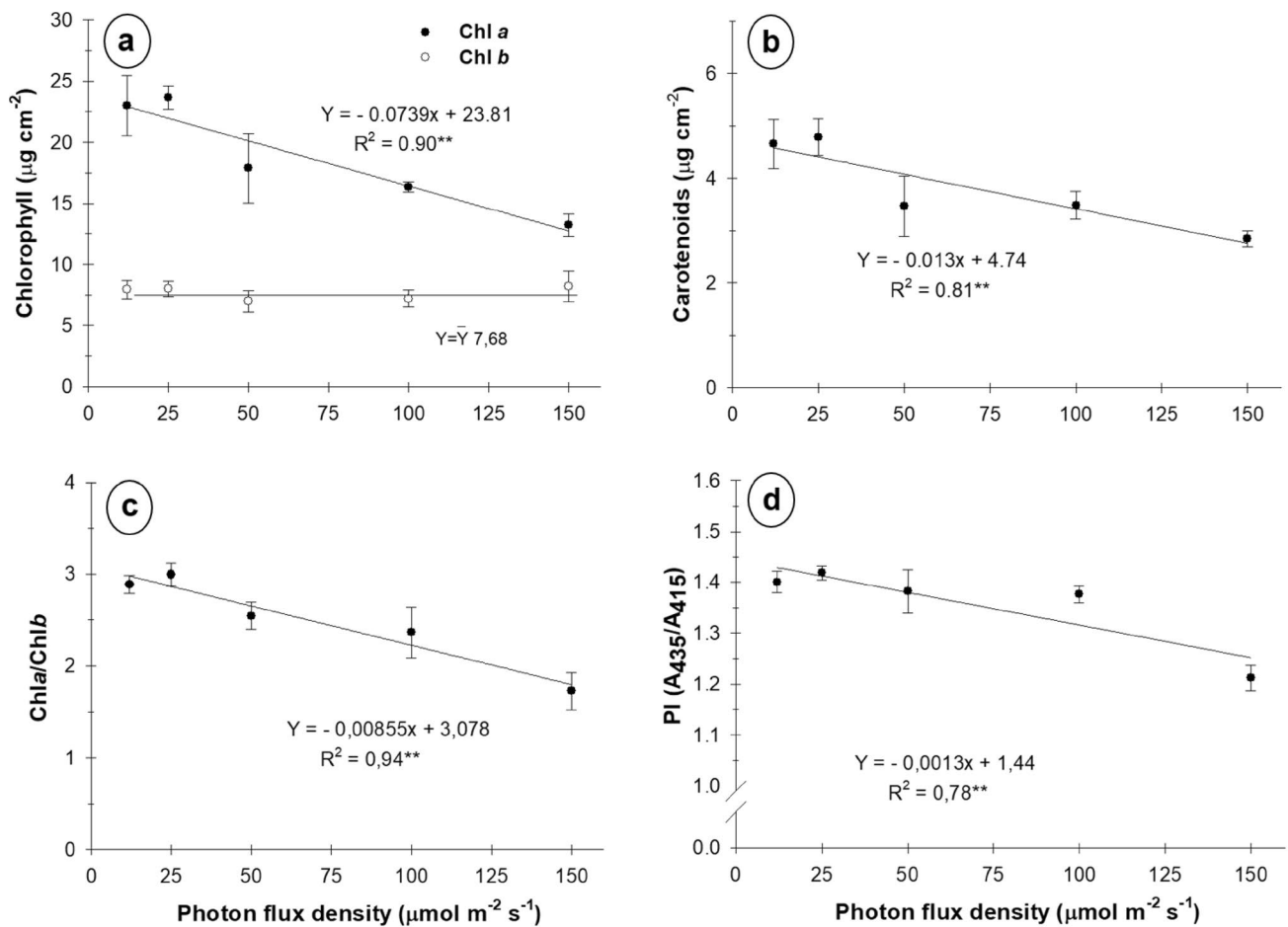
The photostability of chlorophylls can be ensured by carotenoids, key pigments in photoprotection that act through the xanthophyll cycle (Alvarenga et al. 2015). In addition to contributing to the capture of light energy for the photosynthetic process, these pigments also act as singlet oxygen scavengers, dissipating excess energy from PSII in the form of heat (Jahns and Holzwarth 2012). However, reductions in the concentration of carotenoids and PI was observed with the increasing light intensity (Fig. 6b, d). The PI reported by Ronen and Galun (1984) in a study on bryophytes has also been adopted in studies on higher plants (Costa et al. 2014; Leite et al. 2017). Values below 1.4 for this variable signal the degradation of pigments, especially chlorophyll *a*.

In the presence of light, chlorophylls are naturally synthesized and photooxidized (Alvarenga et al. 2015), but these pigments degrade more rapidly at higher rather than low light intensities, and their half-lives are reduced considerably (Turan et al. 2014; Vavilin and Vermaas 2007). Therefore, the extent of the impacts from pigment degradation and related proteins typical of the photoinhibitory processes is

related to the photodamage and repair mechanisms (Murata et al. 2012). However, the magnitude of pigment degradation, as observed here, can be minimized by considering the effect of the dilution of these pigments against the larger leaf area from  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### Fluorescence of chlorophyll a

The potential quantum yield of photosystem II, which is expressed by the *Fv*/*Fm* ratio, showed a linear decrease as a function of the PFD (Fig. 7a and Supplementary Figure). These results reflect what was observed for the behavior of photosynthetic pigments, as verified by correlation analysis (Fig. 5). The lowest values for the *Fv*/*Fm* ratio observed in seedlings grown under  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  indicate the occurrence of light stress. The values considered optimal for this variable are approximately 0.83; however, values of 0.75 are typical for in vitro seedlings (Gago et al. 2014). Generally, the decrease occurs at values well below the optimum results for the photochemical inactivation and/or the increase of the thermal dissipation energy of PSII associated with the antenna complex (Adams et al. 2013). However, these results did not constitute a chronic photoinhibition, since the effective quantum yield, ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ), which estimates the efficiency with which light absorbed by PSII is used to reduce quinone *a* (Baker 2008), did not change ( $p$  value > 0.05) (Fig. 7b and Supplementary Figure).



**Fig. 6** Concentration of chlorophyll *a* and *b* (a), carotenoids (b), ratio between chlorophyll *a* and *b* (c) and pheophytinization index, PI (d) in *Anacardium othonianum* Rizz. seedlings cultured in vitro, as a

function of the photon flux density. The data are the means and standard error ( $n=5$ ). Significance: \*\* $p < 0.01$

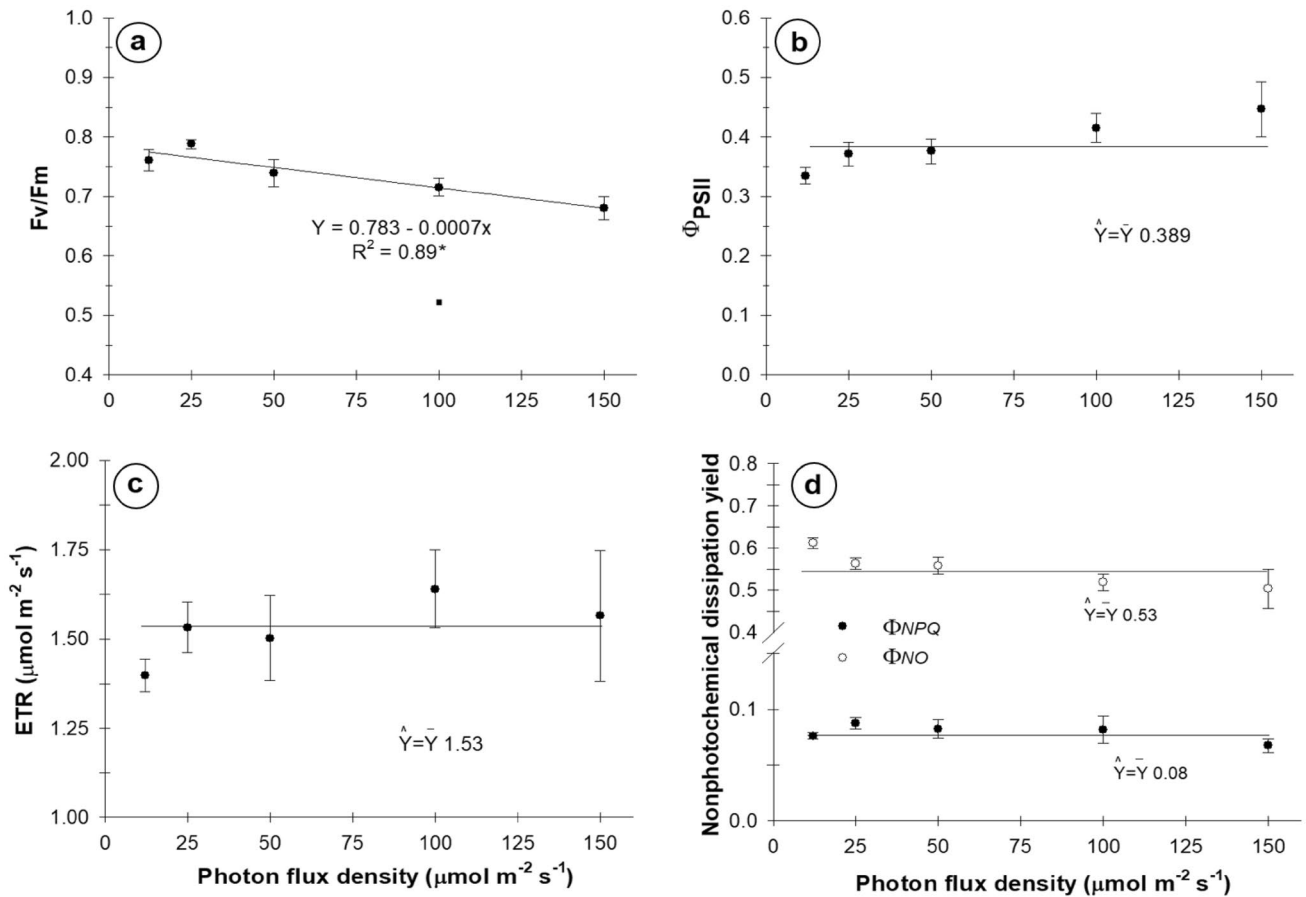
The maintenance of  $\Phi_{\text{PSII}}$  and the relative rate of electron transport (Fig. 7c) is supported by the repair mechanisms. Among these repair mechanisms, the  $\Phi_{\text{NPQ}}$  indices representing the nonphotochemical dissipation yield regulated by the xanthophyll cycle remained low, with a mean of 0.08 (Fig. 7d). Most of the nonphotochemical dissipation quenching was unregulated, at  $\Phi_{\text{NO}}$  (Fig. 7d), that is, in the form of constitutive heat loss (Osório et al. 2013). The high values on the  $\Phi_{\text{NO}}$  indicate that regardless of the luminosity, the in vitro environment is relatively stressful for *A. othonianum*.

The observed drop in the carotenoid concentration (Fig. 6c) might be related to an inability to increase the nonphotochemical regulated quenching ( $\Phi_{\text{NPQ}}$ ) at the higher photon flux densities. It should also be considered that part of the electron drain is being directed to process the photorespiration, since plants in the *Anacardium* genus are typically  $\text{C}_3$  type plants, and by means of the water–water cycle path (Asada 1992; Lima et al. 2018).

## Antioxidant enzymes and lipid peroxidation

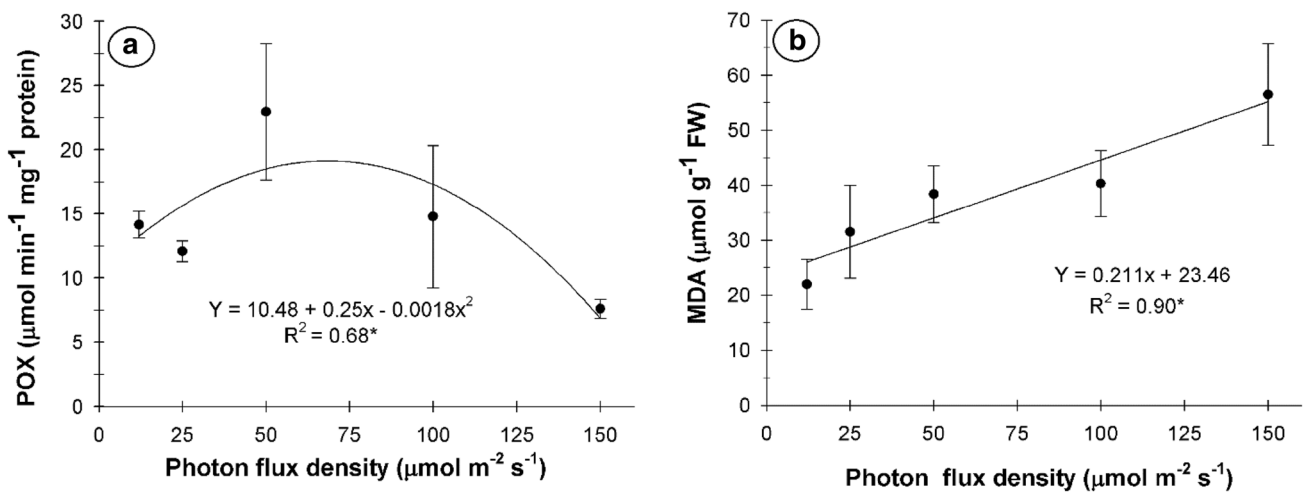
Although there is a greater availability of energy to the seedlings under high luminosity, this condition acted as a stressor starting from  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . The absence of better biometric and photochemical indices under these conditions occurred due to the greater oxidative stress, which affected the activity of the scavenger enzymes from ROS, particularly those observed by the decrease of POX (Fig. 8a), and they caused a substantial increase in the concentration of malondialdehyde (MDA) (Fig. 8b).

MDA is a sensitive biomarker for the occurrence of lipid peroxidation in membranes and as hydroperoxide products in polyunsaturated fatty acids, and it is related to oxidative damage (Dewir et al. 2015). A loss of membrane integrity, such as the integrity of chloroplasts, which are the sites of photosynthetic pigments, may have contributed to the degradation of chlorophyll (MDA and PI:  $-0.6 \leq r < 1$ , Fig. 5), thus limiting the photochemical efficiency (MDA and Fv/



**Fig. 7** Potential quantum yield of photosystem II,  $F_v/F_m$  (a), effective quantum yield,  $\Phi_{PSII}$  (b), electron transport rate, ETR (c) and regulated nonphotochemical,  $\Phi_{NPQ}$  and unregulated dissipation

yields,  $\Phi_{NO}$  (d) in the leaf tissues of *Anacardium othonianum* Rizz. cultured in vitro, as a function of different photon flux densities. The data are the means and standard errors ( $n=4$ ). Significance:  $*p < 0.05$



**Fig. 8** Activity of the nonspecific peroxidase, POX (a) and the concentration of malondialdehyde, MDA (b) in the leaf tissues of *Anacardium othonianum* Rizz. cultured in vitro, as a function of the pho-

ton flux density. The data are the means and standard errors ( $n=4$ ). Significance:  $*p < 0.05$

Fm:  $-0.6 \leq r < 1$ , Fig. 5) and preventing more pronounced biomass gains, even with the increased availability of energy.

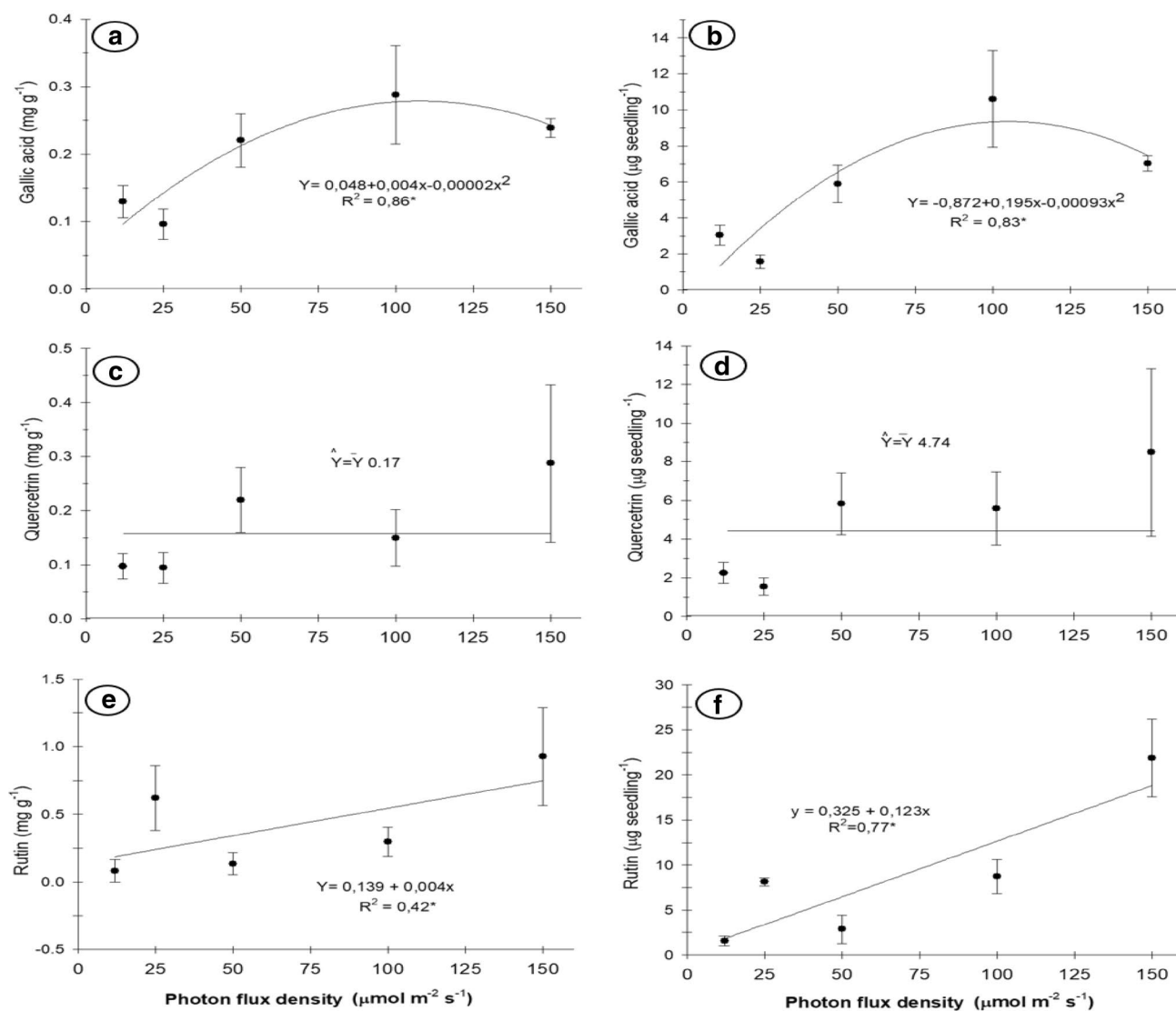
### Secondary metabolism: phenolic compounds

An increase in luminosity in the environment can act as an induction of metabolic routes and consequently in the production of secondary metabolites with antioxidant function, such as phenolic compounds (Ghasemzadeh et al. 2010). The importance of flavonoids as antioxidants may increase in leaves with excessive light stress when other ROS detoxifying systems have already been compromised (Brunetti et al. 2015).

Among the compounds determined here, gallic acid biosynthesis showed quadratic behavior, with a maximum yield point in the culture between 100 and 105  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 9a, b).

In plants, the accumulation of phenolic compounds such as gallic acid represents an interesting defense against reactive species of oxygen and other free radicals, which can ensure their survival. According to Gazolla et al. (2017), the concentration of gallic acid can still be optimized in *A. othonianum* using blue light.

The average rutin concentrations verified here exceeded existing values, while the quercitrin levels were nearly half to those obtained in in vitro culture of *Aronia* (Szopa et al. 2018). These values are still discrete when compared to



**Fig. 9** Concentration and yield of gallic acid (a, b, respectively), quercitrin (c, d) and rutin (e, f) in the leaf tissues of *Anacardium othonianum* Rizz. cultured in vitro under different photon flux densi-

ties. The data are the means and standard errors ( $n=4$ ). Significance: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

other species in situ, such as *Calathea undulata* Linden & Andre, a Marantaceae member that can accumulate more than 8% rutin in its leaves (Abdullah et al. 2008).

The rutin (quercetin 3-*O*-rutinoside) and quercitrin (quercetin-3-rhamnoside) are flavonoid glycosides, and generally, their biosynthesis is stimulated at higher irradiances (Agati et al. 2013). It was not possible to fit a significant regression model explaining quercitrin's answer to PFD ( $p > 0.05$ ) (Fig. 9c, d). However, the linear increase of the concentration and yield for rutin as a function of the luminosity was verified (Fig. 9e, f). This result indicates that in addition to favoring organogenesis, the increase in luminosity also favors the higher production of this metabolite.

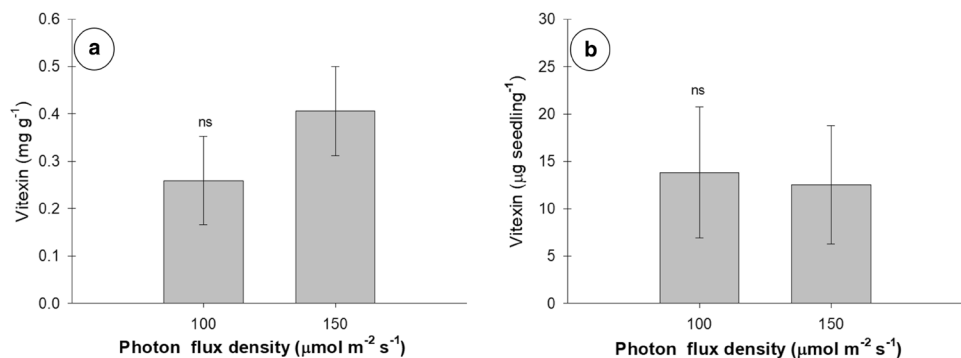
The antioxidant and consequently photoprotective action of quercetin glycosides, such as rutin, is related to their ability to interact with the polar phospholipid head at the water–lipid interface of the membranes, reducing the risk of oxidative damage (Erlejman et al. 2004). In this sense, level increase of this flavonoid may help to maintain the survival of plants exposed to the highest PFD. Generally, flavonoids with substituted B-monohydroxy ring, such as vitexin, apparently has no stimulated biosynthesis at higher irradiances, and they are predominant in more shaded environments (Agati et al. 2013). In *A. othonianum* grown in vitro, their production was only found in the 100 and 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 10a, b), reinforcing these light levels as the most favorable conditions for the production of flavonoids.

The average levels of vitexin found in this research are similar and, in some cases higher than those found in leaves of some species of *Crataegus*, one of the major genera known for the accumulation of this metabolite (He et al. 2016). From the obtained results, it is clear that increased luminosity can promote the accumulation and/or production of phenolic compounds, representing an alternative for physical elicitation.

## Conclusions

In the in vitro culture of *A. othonianum*, photon flux densities approximately 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  increase the pressure on the photosynthetic machinery, but there is a more pronounced accumulation of biomass and secondary metabolites, which are associated with the photoprotection mechanisms. Under 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , there was a favorable stimulus for the production of metabolites, but with a more pronounced trend in the fall of seedling homeostasis, which was evidenced by the intensification of lipid peroxidation, by the lower Fv/Fm means of the chloroplast pigments and biomass. Intensities below 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  represent suboptimal conditions for the accumulation of biomass and secondary metabolites, such as gallic acid, rutin and vitexin. Additional studies involving sealing, light quality, substrates and the carbon supply may provide a perspective for the use of higher irradiances to promote photoautotrophism and acclimatization.

**Fig. 10** Concentration (a) and yield (b) of vitexin in the leaf tissues of *A. othonianum* Rizz. cultured in vitro as a function of different photon flux densities. The data are the means and standard errors ( $n = 4$ ). ns = difference not statistically significant according to the F test ( $p > 0.05$ )



**Acknowledgements** We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) and the Instituto Federal Goiano providing the equipment and reagents for this research.

**Authors contributions** MR and ARN performed the experiments; VOM and MR raised the *in vitro* plants for the experiments; PSP and LAD performed the chromatographic analyzes; ESA, LAD and VOM performed anatomical analyzes; MR, ARN, FGS and ACC contributed to the design and interpretation of the research and to the writing of the paper.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that there are no conflict of interests.

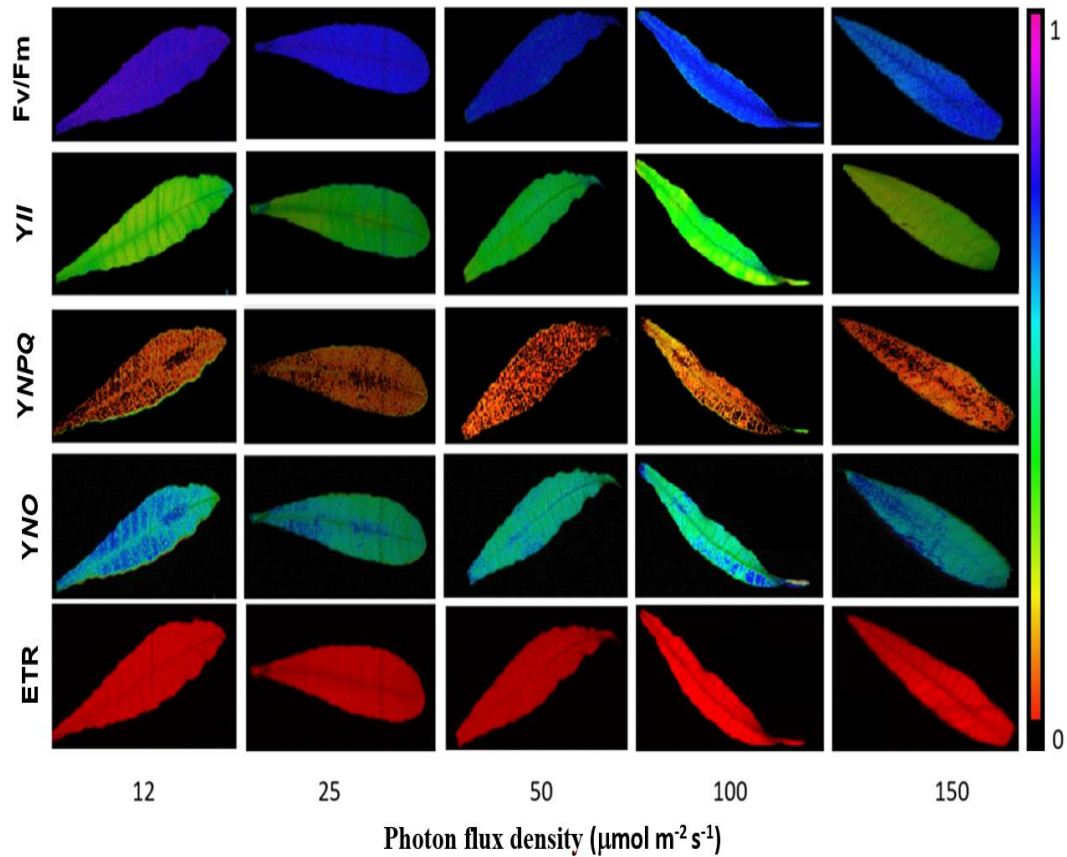
## References

- Abdullah Y, Schneider B, Petersen M (2008) Occurrence of rosmarinic acid, chlorogenic acid and rutin in *Marantaceae* species. *Phytochem Lett* 1:199–203. <https://doi.org/10.1016/j.phyto.2008.09.010>
- Adams WW, Muller O, Cohu CM, Demmig-Adams B (2013) May photoinhibition be a consequence, rather than a cause, of limited plant productivity? *Photosynth Res* 117:31–44. <https://doi.org/10.1007/s1120-013-9849-7>
- Agati G, Brunetti C, Di Ferdinando M, Ferrini F, Pollastri S, Tattini M (2013) Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. *Plant Physiol Biochem* 72:35–45. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.03.014>
- Agostini-Costa TS, Faria JP, Naves RV, Vieira RF (2006) Frutas do cerrado. In: Vieira RF, Agostini-Costa TS, Silva DB, Ferreira FR, Sano SM (eds) Native fruits of the central region—east of Brazil. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, Brasília, pp 136–151
- Alvarenga ICA, Pacheco FV, Silva ST, Bertolucci SKV, Pinto JEBP (2015) *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 122:299–308. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0766-7>
- Arnott HJ (1959) Leaf clearings. *Turttox News* 37:192–194. <https://doi.org/10.1021/cen-v037n009.p192>
- Asada K (1992) Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant* 85:235–241. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb04728.x>
- Assis K, Pereira FD, Alberto PS, Silva FG, Silva JW, Menezes CCE (2012) *In vitro* cultivation of *Anacardium othonianum* Rizz.: effects of growth regulator, explant orientation and lighting. *Afr J Biotechnol* 11:1559–1566. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1383>
- Assis K, Silva FG, Pereira F, Filho S, Menezes CC (2015) Effects of photomixotrophic conditions and type of culture vessel closure on *Anacardium othonianum* Rizz. grown *in vitro*. *Acta Hort* 1083:553–564. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1083.74>
- Baker NR (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. *Annu Rev Plant Biol* 59:89–113. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>
- Barrales-López A, Robledo-Paz A, Trejo C, Espitia-Rangel E, La Rodríguez-De OJL (2015) Improved *in vitro* rooting and acclimatization of *Capsicum chinense* Jacq. plantlets. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 51:274–283. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9671-3>
- Bilger W, Schreiber U, Bock M (1995) Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia* 102:425–432. <https://doi.org/10.1007/bf00341354>
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Brunetti C, Guidi L, Sebastiani F, Tattini M (2015) Isoprenoids and phenylpropanoids are key components of the antioxidant defense system of plants facing severe excess light stress. *Environ Exp Bot* 119:54–62. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.04.007>
- Chance B, Maehly AC (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol* 2:764–775. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(55\)02300-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(55)02300-8)
- Chen C, Li H, Zhang D, Li P, Ma F (2013) The role of anthocyanin in photoprotection and its relationship with the xanthophyll cycle and the antioxidant system in apple peel depends on the light conditions. *Physiol Plant* 149:354–366. <https://doi.org/10.1111/ppl.12043>
- Correia SDJ, David JP, David JM (2006) Metabólitos secundários de espécies de *Anacardiaceae*. *Quím Nova* 29:1287–1300. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422006000600026>
- Costa AC, Rosa M, Megguer CA, Silva FG, Pereira FD, Otoni WC (2014) A reliable methodology for assessing the *in vitro* photosynthetic competence of two Brazilian savanna species: *Hyptis marrubioides* and *Hancornia speciosa*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 117:443–454. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0455-y>
- Curado FAMLIMJ, Gazolla AP, Pedrosa RCN, Pimenta LIP, Oliveira PF, Tavares DC, Pauletti PIM (2016) Antifungal and cytotoxicity activities of *Anacardium othonianum* extract. *J Med Plants Res* 10:450–456. <https://doi.org/10.5897/jmpr2016.6115>
- De Assis ES, Neto AR, Lima LR, Silva FG, Rosa M, Filho SCV, Leite MS (2016) *In vitro* culture of *Mouriri elliptica* (Mart.) under conditions that stimulate photoautotrophic behavior. *Aust J Crop Sci* 10:229–236
- Debona D, Rodrigues FÁ, Rios JA, Nascimento KJT (2012) Biochemical changes in the leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology* 102:1121–1129. <https://doi.org/10.1094/phyto-06-12-0125-r>
- Demmig-Adams B (2003) Linking the xanthophyll cycle with thermal energy dissipation. *Photosynth Res* 76:73–80. <https://doi.org/10.1023/a:1024902927403>
- Dewir YH, El-Mahrouk ME-S, Al-Shmgani HS, Rihan HZ, Da Silva JAT, Fuller MP (2015) Photosynthetic and biochemical characterization of *in vitro*-derived African violet (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl) plants to *ex vitro* conditions. *J Plant Interact* 10:101–108. <https://doi.org/10.1080/17429145.2015.1018967>
- Dias-Souza MV, Andrade S, Aguiar AP, Monteiro A (2013) Evaluation of antimicrobial and anti-biofilm activities of *Anacardium occidentale* stem bark extract. *J Nat Prod* 6:198–205
- Encarnaç o S, De Mello-Sampayo C, Graça NAG, Catarino L, Da Silva IBM, Lima BS, Silva OMD (2016) Total phenolic content, antioxidant activity and pre-clinical safety evaluation of an *Anacardium occidentale* stem bark Portuguese hypoglycemic traditional herbal preparation. *Ind Crop Prod* 82:171–178. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.001>
- Erlejman AG, Verstraeten SV, Fraga CG, Oteiza PI (2004) The interaction of flavonoids with membranes: potential determinant of flavonoid antioxidant effects. *Free Radic Res* 38:1311–1320. <https://doi.org/10.1080/10715760400016105>
- Fan XX, Xu ZG, Liu XY, Tang CM, Wang LW, Han XL (2013) Effects of light intensity on the growth and leaf development of young tomato plants grown under a combination of red and blue light. *Sci Hortic* 153:50–55. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.01.017>

- Ferreira DF (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciênc Agrotecnol* 35:1039–1042. <https://doi.org/10.1590/s1413-7054011000600001>
- Fuentes G, Talavera C, Desjardins Y, Santamaria JM (2005) High irradiance can minimize the negative effect of exogenous sucrose on the photosynthetic capacity of in vitro grown coconut plantlets. *Biol Plant* 49:7–15. <https://doi.org/10.1007/s10535-005-7015-6>
- Gago J, Martínez-Núñez L, Landín M, Flexas J, Gallego PP (2014) Modeling the effects of light and sucrose on in vitro propagated plants: a multiscale system analysis using artificial intelligence technology. *PLoS ONE* 9:e85989. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085989>
- Gazolla AP, Curado FMLMJ, Pedroso RCN, Filho LCK, Sales JDF, Rosa M, Costa AC, Pauletti PM, Januário AH, Silva FG (2017) The influence of light quality on phenolic acid and biflavonoid production in *Anacardium othonianum* Rizz. seedlings grown in vitro. *Aust J Crop Sci* 11:528–534. <https://doi.org/10.21475/ajcs.17.11.05.p314>
- Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 990:87–92. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(89\)80016-9](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(89)80016-9)
- Ghasemzadeh A, Jaafar HZE, Rahmat A, Wahab PEM, Halim MRA (2010) Effect of different light intensities on total phenolics and flavonoids synthesis and anti-oxidant activities in young ginger varieties (*Zingiber officinale* Roscoe). *Int J Mol Sci* 11:3885–3897. <https://doi.org/10.3390/ijms11103885>
- He M, Min JW, Kong WL, He XH, Li JX, Peng BW (2016) A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. *Fitoterapia* 115:74–85. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.09.011>
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125:189–198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Jahns P, Holzwarth AR (2012) The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1817(1):182–193. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.04.012>
- Kar M, Mishra D (1976) Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol* 57:315–319. <https://doi.org/10.1104/pp.57.2.315>
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:1A–149A
- Kramer DM, Johnson G, Kiirats O, Edwards GE (2004) New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. *Photosynth Res* 79:209–218. <https://doi.org/10.1023/b:pres.0000015391.99477.0d>
- Laisk A, Loreto F (1996) Determining photosynthetic parameters from leaf CO<sub>2</sub> exchange and chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol* 110:903–912. <https://doi.org/10.1104/pp.110.3.903>
- Leite MS, Silva FG, Assis ES, Neto AR, Mendes GC, Rosa M (2017) Morphoanatomy and physiology of *Pouteria gardneriana* Radlk plantlets grown in vitro at varied photosynthetic photon flux densities. *Acta Sci Agron* 39:217–224. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v39i2.32515>
- Libik-Konieczny M, Capecka E, Kałol E, Dziurka M, Grabowska-Joachimak A, Sliwiska E, Pistelli L (2018) Growth, development and steviol glycosides content in the relation to the photosynthetic activity of several *Stevia rebaudiana* Bertoni strains cultivated under temperate climate conditions. *Sci Hortic* 234:10–18. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.015>
- Lichtenthaler HK, Buschmann C, Doli M, Fietz HJ, Bach T, Kozel U, Meier D, Rahmsdorf U (1981) Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynth Res* 2:115–141. <https://doi.org/10.1007/bf00028752>
- Lima CS, Ferreira-Silva SL, Carvalho FEL, Lima Neto MC, Aragão RM, Silva EN, Sousa RMJ, Silveira JAG (2018) Antioxidant protection and PSII regulation mitigate photo-oxidative stress induced by drought followed by high light in cashew plants. *Environ Exp Bot* 149:59–69. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.02.001>
- Liu M, Xu Z, Guo S, Tang C, Liu X, Jao X (2014) Evaluation of leaf morphology, structure and biochemical substance of balloon flower (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) plantlets in vitro under different light spectra. *Sci Hortic* 174:112–118. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.05.006>
- Lüttge U (2008) *Physiological ecology of tropical plants*, 2nd edn. Springer, Berlin
- Mathur S, Jain L, Jajoo A (2018) Photosynthetic efficiency in sun and shade plants. *Photosynthetica* 56:354–365. <https://doi.org/10.1007/s11099-018-0767-y>
- Mitchell JD, Mori SA (1987) *The cashew and its relatives (Anacardium: Anacardiaceae)*. Memoirs of the New York Botanical Garden, New York
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Murata N, Allakhverdiev SI, Nishiyama Y (2012) The mechanism of photoinhibition in vivo: re-evaluation of the roles of catalase,  $\alpha$ -tocopherol, non-photochemical quenching, and electron transport. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1817:1127–1133. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.02.020>
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59:368–373. <https://doi.org/10.1007/bf01248568>
- Osório ML, Gonçalves S, Coelho N, Osório J, Romano A (2013) Morphological, physiological and oxidative stress markers during acclimatization and field transfer of micropropagated *Tuberaria major* plants. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 115:85–97. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0343-x>
- Palhares D, Franco A, Zaidan L (2010) Photosynthetic responses of cerrado plants in the dry and the rainy seasons. *Rev Bras Bioci* 8:213–220
- Pereira JD, Medri ME, Moreira RS (2013) Avaliações morfológicas e micromorfológicas de folhas de sol e de sombra *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl. (*Anacardiaceae*). *Evol Conserv Biodivers* 4:22–31. <https://doi.org/10.7902/ecb.v4i1.47>
- Pinnola A, Bassi R (2018) Molecular mechanisms involved in plant photoprotection. *Biochem Soc Trans* 46:467–482. <https://doi.org/10.1042/bst20170307>
- Powles SB (1984) Photoinhibition of photosynthesis induced by visible-light. *Annu Rev Plant Physiol* 35:15–44. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.35.060184.000311>
- Rocha WS, Lopes RM, Silva DD, Vieira RF, Silva JP, Agostini-Costa TDS (2011) Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. *Rev Bras Frutic* 33:1215–1221. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011000400021>
- Ronen R, Galun M (1984) Pigment extraction from lichens with dimethyl sulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. *Environ Exp Bot* 24:239–245. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(84\)90004-2](https://doi.org/10.1016/0098-8472(84)90004-2)
- Rossatto DR, Takahashi FSC, Silva LCR, Franco AC (2010) Leaf functional traits in sun and shade leaves of gallery forest trees in Distrito Federal, Brazil. *Acta Bot Bras* 24:640–647. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062010000300007>
- Sáez PL, Bravo LA, Sánchez-Olate M, Bravo PB, Ríos DG (2016) Effect of photon flux density and exogenous sucrose on the photosynthetic performance during in vitro culture of *Castanea sativa*. *Am J Plant Sci* 7:2087–2105. <https://doi.org/10.4236/ajps.2016.714187>
- Singh AS, Jones AMP, Shukla MR, Saxena PK (2017) High light intensity stress as the limiting factor in micropropagation of sugar

- maple (*Acer saccharum* Marsh.). *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 129:209–221. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1170-2>
- Souza ID, Sousa JB, Pereira FD, Santana JG, Rubio Neto A, de Assis ES (2017) Composition of the cultivation medium for the production of microplants of Cerrado-tree cashew (*Anacardium othonianum* RIZZ.). *Cientific@* 1:1–6. <https://doi.org/10.29247/2358-260x.2017v4i1.p01-11>
- Szopa A, Starzec A, Ekiert H (2018) The importance of monochromatic lights in the production of phenolic acids and flavonoids in shoot cultures of *Aronia melanocarpa*, *Aronia arbutifolia* and *Aronia × prunifolia*. *J Photochem Photobiol, B* 179:91–97. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.01.005>
- Szymańska R, Ślesak I, Orzechowska A, Kruk J (2017) Physiological and biochemical responses to high light and temperature stress in plants. *Environ Exp Bot* 139:165–177. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.05.002>
- Turan S, Kumar S, Cornish K (2014) Photosynthetic response of in vitro guayule plants in low and high lights and the role of non-photochemical quenching in plant acclimation. *Ind Crop Prod* 54:266–271. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.022>
- Vavilin D, Vermaas W (2007) Continuous chlorophyll degradation accompanied by chlorophyllide and phytol reutilization for chlorophyll synthesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1767:920–929. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.03.010>
- Walters RG (2005) Towards an understanding of photosynthesis acclimation. *J Exp Bot* 56:435–447. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri060>
- Wang Y, Gao L, Wang Z, Liu Y, Sun M, Yang D, Wei C, Shan Y, Xia T (2012) Light-induced expression of genes involved in phenylpropanoid biosynthetic pathways in callus of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Sci Hortic* 133:72–83. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.10.017>
- Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol* 144:307–313. [https://doi.org/10.1016/s0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/s0176-1617(11)81192-2)
- Zheng L, Van Labeke MC (2018) Effects of different irradiation levels of light quality on *Chrysanthemum*. *Sci Hortic* 233:124–131. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.01.033>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Supplementary figure** Chlorophyll fluorescence images. Potential quantum yield of PSII ( $F_v/F_m$ ), effective quantum yield of PSII ( $\Phi_{PSII}$ ), regulated energy dissipation yield ( $\Phi_{NPQ}$ ), nonregulated energy dissipation yield ( $\Phi_{NO}$ ) and apparent electron transport rate (ETR) as measured at steady state ( $11 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in the leaves of *Anacardium othonianum* Rizz *in vitro*. The false color code below the images ranges from 0.000 (black) to 1,000 (pink).

## CAPÍTULO II

### **Impacto da qualidade da luz sobre as respostas morfofisiológicas e bioquímicas de *Anacardium othonianum* Rizzini *in vitro***

**Resumo:** *Anacardium othonianum* Rizz. conhecido como caju-de-árvore-do-cerrado, é um ecótipo de *A. occidentale* L. ainda não domesticado, mas com grande potencial devido às suas propriedades alimentares e fitoterápicas, sendo que o cultivo *in vitro* dessa espécie representa uma estratégia importante para a sua propagação. A seleção de faixas espectrais pode representar uma alternativa para otimizar as características fisiológicas e produtivas desta espécie no cultivo *in vitro*. Nesse contexto, objetivou-se investigar o efeito da qualidade de luz nas características morfoanatômicas, fisiológicas e bioquímicas desta espécie *in vitro* crescidas sob LEDs azul, branco, verde, vermelho e azul+vermelho. Para tanto, segmentos nodais foram cultivados em frascos de 250 mL com meio MS 50%, sob  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16h por 50 dias e, posteriormente, submetidos a avaliações de pigmentos, eficiência fotossintética, características morfoanatômicas e atividade enzimática. Verificou-se que sob a associação de LEDs azuis e vermelhos os índices biométricos não foram prejudicados, ocorreram maiores taxas fotossintéticas e evidências de mecanismos antioxidantes, bem como, menores danos no aparato fotossintético (maiores índice de performance fotossintético -  $\text{PI}_{\text{ABS}}$ , e menor dissipação na forma de calor –  $\phi\text{Do}$  e  $\text{Dio/RC}$ ). Sob luz branca houve bons índices entre as variáveis avaliadas, enquanto sob luz vermelha houve redução da concentração de pigmentos, maiores índices de absorção e de transporte de energia, porém com alta dissipação de energia, comprometendo a funcionalidade do aparato fotossintético. As plantas sob luz verde tiveram características de síndrome de evitação à sombra, enquanto sob luz azul os índices quantitativos e qualitativos oscilaram. Portanto, o cultivo *in vitro* sob LEDs com espectro mais amplo, como os proporcionados por LEDs brancos e azuis + vermelhos são os mais adequados por permitirem o equilíbrio entre as características fisiológicas, morfoanatômicas e bioquímicas indicando essas condições como as mais propícias para estimular o cultivo *in vitro* de *A. othonianum*.

**Palavra-chave:** características fotossintéticas, cultura de tecidos, flavonoides, qualidade espectral

# 1. INTRODUÇÃO

O Cerrado brasileiro possui uma flora rica em espécies frutíferas com grande potencial alimentício e econômico (Pereira e Santos, 2016; Oliveira, 2011). Dentre estas espécies destaca-se o *Anacardium othonianum* Rizzini, conhecida popularmente como caju-de-árvore-do-cerrado (Agostini-Costa et al., 2006). É comumente utilizada pela população local através do consumo *in natura* ou processadas na forma de sucos, licores, doces, sorvetes, aguardentes e para fins medicinais, variando de ação expectorante a anti-inflamatória (Rocha et al., 2011).

Esta espécie é caracterizada como um ecótipo de *A. occidentale* L, caracterizado por possuir folhas mais coriáceas, onduladas e subsésseis, assim como pseudofruto menor e mais ácido do que o ecótipo da região de restinga (Mitchell e Mori, 1987; De Andrade et al., 2019). Distingue-se das demais espécies deste gênero do Cerrado: *A. humile*, *A. nanum* e *A. corymbosum*, pelo seu porte arbóreo com 3 a 6 m de altura (Agostini-Costa, 2006; Silva et al., 2008).

A propagação dessa espécie convencionalmente é realizada via semente, no entanto, estas possuem limitações como a perecibilidade do pseudofruto, variações no amadurecimento e a sazonalidade de produção (Assis et al., 2015). Metodologias alternativas, como a micropropagação *in vitro*, têm surgido como técnica viável para superá-las (Sharma, 2017). Entretanto, a técnica de micropropagação é influenciada por vários fatores, como o tipo de explante, genótipo, concentrações de reguladores de crescimento, meio de cultivo, concentrações de sacarose, e condições ambientais controladas, como a temperatura e a luz (Reis et al., 2009).

A fotossíntese e a fotomorfogênese das plantas são influenciadas pelo comprimento de onda da luz, intensidade e fotoperíodo via fotorreceptores que controlam o crescimento da planta (Lee et al., 2007; Bilodeau et al., 2019). Dentre os fotorreceptores vegetais os principais são os fitocromos (PHYs), que absorvem a luz fortemente nas regiões vermelha (600 a 700 nm) e vermelha distante (700 a 800 nm); as proteínas da família dos criptocromos (CRYs), fototropinas (PHOTs) e zeitlupe (ZTL), que absorvem a luz fortemente nas regiões azul (400 a 500 nm) e ultravioleta-A (UV-A; 315 a 400 nm) (Folta e Carvalho, 2015; Galvão e Fankhauser, 2015; Klem et al., 2019).

Na presença da faixa espectral correspondente os fotorreceptores ativam as vias de transdução de sinal e resultam em alterações na permeabilidade de membranas ou na expressão gênica, acarretando em alterações fisiológicas e/ou bioquímicas (Landi et al., 2019).

Desta forma investigações sobre a utilização de fontes artificiais de luz e sua atuação sobre os fotorreceptores têm sido centro de várias pesquisas ao longo dos anos em diversas espécies (Heringer et al., 2017; Batista et al., 2018). Tem-se evidenciado que plântulas cultivadas *in vitro* sob comprimento de onda na faixa do vermelho, apresentaram maior acumulação de amido, maior comprimento das brotações, alongamento celular e acúmulo de matéria seca (Mengxi et al., 2011; Gazolla et al., 2017; Cioć et al., 2018), creditando-se isso a atuação orquestrada pelos fitocromos. Em plantas cultivadas sob luz azul houve resultados indicando o estímulo do desenvolvimento dos cloroplastos, na síntese de clorofilas, na abertura de estômatos e na regulação da expansão foliar (Li e Tang, 2010; Liu et al., 2014; Hung et al., 2016) em respostas grande parte dirigidas pelos criptocromos e fototropinas (Landi et al., 2019). Entre essas respostas, pode-se destacar a atuação das fototropinas mediando a fosforilação e ativação das H<sup>+</sup>ATPases da membrana plasmática, mantendo os estômatos abertos para facilitar a troca de gases entre a planta e a atmosfera (Inouea e Kinoshita, 2017).

Adicionalmente, efeitos sinérgicos podem ser esperados a partir das associações entre as faixas espectrais do azul e do vermelho, visto que são os protagonistas relacionados às respostas fotossintética e fotomorfogênicas (He et al., 2017), o que tem conduzido a realização de ensaios com diferentes espécies utilizando tais associações. Tem sido observado que as associações de LEDs azuis e vermelhos podem aumentar o comprimento de brotações das plantas, o acúmulo de matéria seca e fresca em comparação com os LEDs monocromáticos (Li e Tang, 2010; Li et al., 2013; Silva et al., 2016; Silva et al., 2017).

Já comprimentos de onda em luz verde são pouco absorvidas pelos principais pigmentos, sendo em sua maioria refletida, assim por muito tempo foi desconsiderado o seu papel no crescimento de plantas (Lazzarini et al., 2017). No entanto, estudos têm evidenciado que comprimentos de ondas em luz verde também afetam a morfologia e a fisiologia de plantas cultivadas *in vitro*. Em plântulas de *Solanum tuberosum* L. e *Vitis vinifera* L., foram evidenciados o menor acúmulo de matéria seca e área foliar e maior comprimento de parte aérea (Li et al., 2017; Chen et al., 2019), enquanto Alvarenga et al. (2015) observaram que plântulas de *Achillea millefolium* L. cultivadas com luz verde, apresentaram maior comprimento de parte aérea e teor de clorofila total. Assim, algumas respostas positivas ao verde podem ser encontradas em alguns casos, visto que os fitocromos e criptocromos são sensíveis à esta radiação (Folta e Maruhnich, 2007; Carvalho e Folta, 2016).

As respostas morfofisiológicas têm se diferenciando, de acordo com as espécies estudadas (Cioc et al., 2018; Batista et al., 2018). Assim, considera-se a hipótese que as plântulas de *A. othonianum* cultivadas *in vitro* apresentem variações morfofisiológicas frente às diferentes qualidades de luz, e sobretudo com melhores respostas fisiológicas em ambiente com maior variação espectral. Neste sentido, objetivou-se investigar quais faixas espectrais obtidas por LEDs ativam vias e acarretam alterações fisiológicas, morfoanatômicas e bioquímicas em *A. othonianum* cultivado *in vitro*

Para tal testou-se lâmpadas LEDs como fonte de faixas específicas de comprimentos de onda, bem como combinações deles. O trabalho é inédito e proporciona contribuições para ampliar o entendimento das características morfofisiológicas e bioquímicas das plantas *in vitro*, lançando alternativas relacionadas ao aprimoramento das taxas de estabelecimento, multiplicação e aclimatização. Diante disso, serão discutidas informações científicas relevantes acerca da capacidade das plantas de *A. othonianum* ajustarem-se às variações de qualidade de luz no ambiente *in vitro* fornecidas por lâmpadas LEDs.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

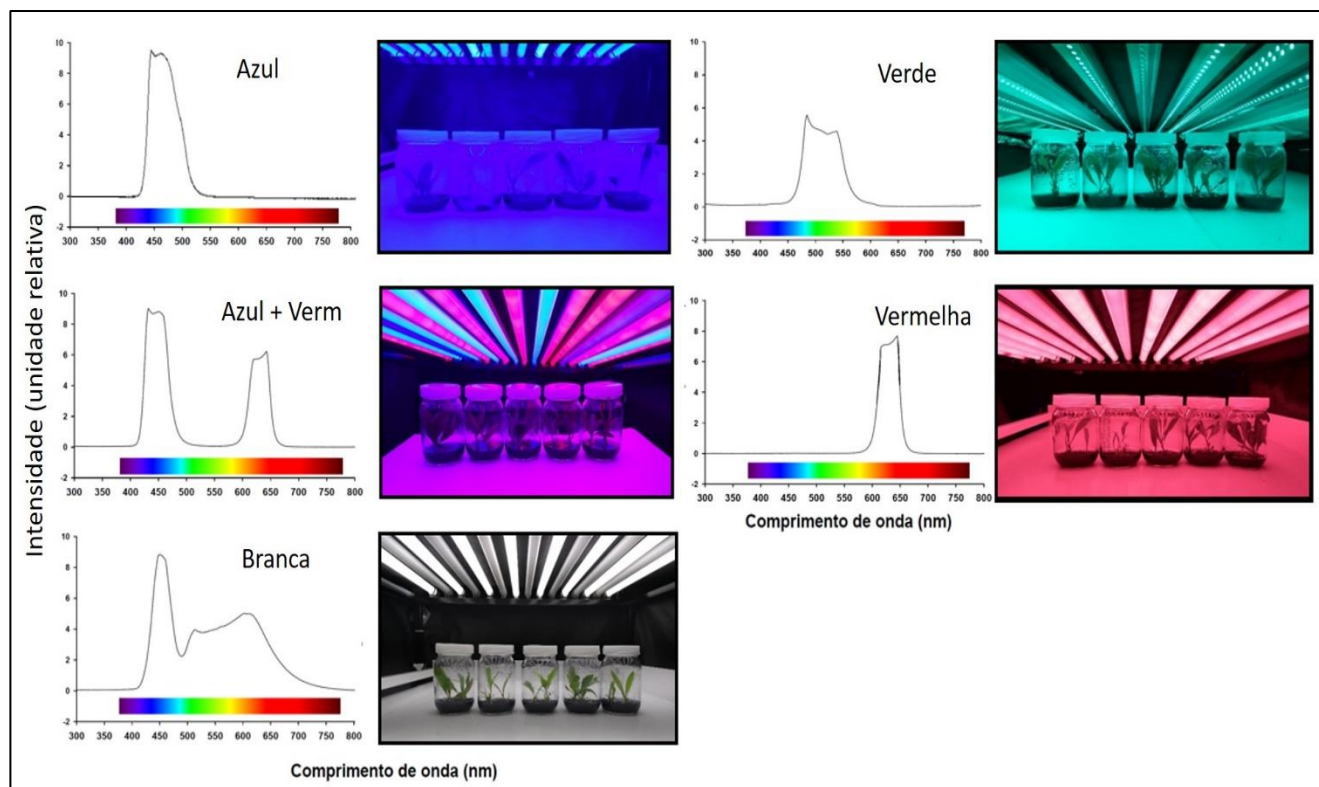
### **2.1 Material Vegetal**

As plântulas *in vitro* foram estabelecidas a partir de sementes de *A. othonianum* no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde. As sementes foram coletadas de árvores nativas da região de Montes Claros de Goiás (16° 10'8 "S, 51° 27' 12" W, 412 m de altitude). O voucher número 3793 foi depositado no Herbário Jataiense na Universidade Federal de Jataí, Jataí-GO. O procedimento de estabelecimento e multiplicação *in vitro* de *A. othonianum* foi de acordo com Assis et al. (2012).

Após 30 dias da semeadura, segmentos nodais de aproximadamente 1,2 cm contendo duas brotações foram desinfestados e inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultivo MS com 50% da concentração de sais suplementado com 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 3,5 g L<sup>-1</sup> de ágar, 2 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado e 30 µM de 6-benzilaminopurina (BAP). O pH foi ajustado para 5,7 ± 0,03 antes da adição do agente gelificante. O meio de cultivo foi autoclavado a 120°C durante 20 min. Os tubos inoculados contendo um explante cada foram mantidos em sala de crescimento sob

fotoperíodo de 16 h a  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e temperatura de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ , durante 45 dias.

Os explantes foram selecionados e introduzidos em frascos de 250 mL contendo 40 mL de meio de cultura MS a 50% com as mesmas concentrações de sacarose, ágar, carvão ativado e BAP como anteriormente. Posteriormente foram submetidos por mais 50 dias a diferentes faixas espectrais, branca (400-700nm), azul (400-490 nm), verde (490-560nm), vermelha (600-700 nm) e azul/vermelha (1:1) fornecidas por tubos de diodos emissores de luz (LEDs) de 20W (Lanao serie Tubes, China) (Figura 1) instalados sob estrutura metálica (1,10 x 0,90m) de altura ajustável.



**Figura 1.** Distribuição relativa dos espectros dos LEDs utilizados no cultivo *in vitro* de *Anacardium othonianum* Rizzini.

A densidade de fluxo de fótons (DFF) foi fixada em  $100 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , conforme indicado para esta espécie *in vitro* (Rosa et al., 2019), fotoperíodo de 16 horas, temperatura de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  e  $40 \pm 10\%$  de umidade relativa. Para a aferição da qualidade espectral utilizou-se o espectroradiômetro portátil USB2000 (Ocean Optics, Dunedin, FL, USA). Os dados coletados foram processados pelo *software* SpectraSuite. A radiação fotossinteticamente ativa foi determinada por

sensor PAR, modelo APG-SQ-316 (Apogee, North Logan, UT, USA). As avaliações fisiológicas e biométricas foram realizadas após 50 dias de cultivo.

## **2.2 Determinações de pigmentos foliares**

As concentrações de pigmentos cloroplastídicos (clorofilas *a* e *b*, e carotenoides) foram determinados a partir de três discos foliares de 5 mm de diâmetro colocados em recipientes contendo 5 mL de DMSO (dimetilsulfóxido), saturado com CaCO<sub>3</sub> e mantidos no escuro. Após 10 horas em banho maria a 65°C, as absorvâncias dos extratos foram lidas em espectrofotômetro UV-VIS, Evolution 60S (Termo Fisher Scientific, Madison, WI, USA).

As concentrações dos pigmentos foram expressas em  $\mu\text{g cm}^{-2}$ . Os comprimentos de onda, as equações e cálculos para a determinação da concentração de pigmentos foram baseados no trabalho de Wellburn (1994). Adicionalmente, avaliou-se o índice de feofitinação das clorofilas por meio da razão entre as absorvâncias em 435 e 415 nm (Ronen e Galun, 1984).

Os índices de flavonóis e antocianinas também foram determinados, bem como o índice de balanço de nitrogênio (IBN), usando o sensor Dualex Scientific™ (Force-A, Orsay, França), com base nos espectros de excitação por fluorescência da clorofila (Cerovic et al., 2012). O IBN foi estimado a partir da razão entre clorofilas e flavonoides. Para esta avaliação foram realizadas leituras em pontos do terço médio da porção adaxial das folhas.

## **2.3. Avaliação de fluorescência da clorofila a**

Os frascos foram previamente adaptados ao escuro por 30 minutos para oxidação completa do sistema fotossintético de transporte de elétrons das folhas. Posteriormente, sob ausência quase completa de radiação fotossinteticamente ativa, as plântulas foram rapidamente retiradas dos frascos e submetidas a pulso de  $3000 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$  de luz azul (450 nm) medindo-se a fluorescência mínima ( $F_0$ ) em 50  $\mu\text{s}$  quando todos os centros de reação do PSII estão abertos e definido como o passo O, seguido pelo passo J a 2 ms, o passo I a 30 ms e a fluorescência máxima ( $F_m$ ) quando todos os centros de reação do PSII estão fechados, conhecido como passo P. Estes valores foram utilizados para calcular vários índices bioenergéticos do fotossistema II, conforme Strasser et al.,

2000. A fluorescência transiente OJIP da clorofila *a* foi determinada com o uso de fluorômetro portátil FluorPen FP 100 (Photon Systems Instruments; Drasov, Czech Republic).

#### **2.4. Taxa fotossintética**

As avaliações de taxa fotossintética foram realizadas conforme a metodologia proposta por Costa et al. (2014) para plantas *in vitro*. Nesse sistema, o próprio frasco de crescimento é utilizado como câmara de medição, assim toda a planta é mensurada. No dia das medições as plântulas foram mantidas por oito horas no escuro (durante a noite) e antes do início das medições, foram expostas por 60 minutos na irradiância de crescimento e imediatamente avaliadas. As medições foram realizadas em sala climatizada, utilizando o conjunto analisador de trocas gasosas da Qubit Systems (Kingston, ON, Canadá). O ar de referência foi obtido a partir de um cilindro de CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>, com concentração padrão de 400 µmol mol<sup>-1</sup>. O fluxo de ar na câmara de medição foi ajustado para 400 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura do ar de referência foi mantida em 25 ± 1°C e a umidade relativa foi ajustada para 60 ± 5%. A irradiância de medição foi fixada em 500 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

#### **2.5. Análises de atividade enzimática e de estresse oxidativo**

A peroxidação lipídica foi medida em termos de concentração de dialdeído malônico (MDA) usando o método da reação do ácido tiobarbitúrico (TBA), conforme Heath e Packer (1968). Amostras de 0,15 g de tecido foliar foram maceradas em N<sub>2</sub> líquido e posteriormente homogeneizadas em 2 mL constituído de ácido tricloroacético (TCA) 1 % (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10000 g, durante 15 min, a 4°C. Após centrifugação, 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado a 1,5 mL da solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5 % (m/v) em TCA 20 % (m/v) e incubado em banho-maria a 95°C, por 30 min. Após esse período, a reação foi interrompida em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas a 9000 g, por 10 min, e as absorbâncias específicas e inespecíficas do sobrenadante foram determinadas a 532 e 600 nm, respectivamente. A concentração de MDA foi calculada usando o coeficiente de extinção de 155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

Para a determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD), da catalase (CAT), da ascorbato peroxidase (APX) e da fenilalanina amônia-liase (PAL) foram macerados 0,2 g de tecido foliar em almofariz com nitrogênio líquido contendo 2 mL do seguinte meio de extração: tampão

fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona 2% (PVP). O extrato enzimático foi centrifugado a 12000 g durante 15 min a 4°C e o sobrenadante utilizado como extrato bruto (Debona et al., 2012).

A atividade da SOD foi determinada a partir da metodologia proposta por Del Longo et al., (1993), mediante a mensuração da capacidade da enzima em reduzir fotoquimicamente o azul de nitrotetrazólio (NBT). A mistura de reação consistiu de tampão fosfato de potássio (pH 7,8) 50 mM, metionina 13 mM, NBT 0,075 mM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 0,002 mM. A reação se iniciou após a adição 50 µL do extrato enzimático em 1,95 mL da mistura da reação. A reação ocorreu a 25°C sob exposição de uma lâmpada de 15 W. Depois de 10 min de exposição à luz, a produção de formazana azul, resultado da fotoredução do NBT, foi determinada a 560 nm, conforme Giannopolitis e Ries (1977). As amostras-controle foram mantidas no escuro durante 10 min e mensurada a absorbância a 560 nm. Os valores obtidos do branco das amostras foram subtraídos dos valores das amostras de cada uma das repetições de cada tratamento exposto à luz. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da fotoredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971).

A atividade da CAT foi determinada pela velocidade da decomposição do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 240 nm durante 3 min a 25°C (Havir e Mc Hale, 1987), com algumas modificações. A reação foi iniciada após adição de 10 µL do extrato bruto enzimático em 990 µL do meio de reação contendo tampão de fosfato de potássio (pH 7,0) 25 mM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2,5 mM. O coeficiente de extinção molar de 36 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> foi utilizado para calcular a atividade da enzima.

Para atividade da APX foi utilizada a metodologia proposta por Nakano e Asada (1981). A reação foi iniciada após a adição de 50 µL do extrato enzimático bruto em 1,95 mL do meio de reação contendo tampão de fosfato de potássio (pH 6,0) 50 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM e ascorbato 0,8mM. A atividade APX foi medida pela taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm durante 1 min a 25°C.

O coeficiente de extinção molar de 2,8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Nakano e Asada, 1981) foi utilizado para calcular a atividade da APX.

Para a quantificação da atividade da PAL foi utilizada a metodologia proposta por Data et al. (1984) com modificações. Para a reação foram utilizados 20 µL de tampão tris-HCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> (pH 8,8); 140 µL de água ultrapura; 200 µL de L-fenilalanina 0,1 mol L<sup>-1</sup> e 200 µL do extrato

enzimático bruto. Os tubos com a mistura de reação foram incubados em banho-maria a 37 °C, por 60 minutos, utilizando 50 µL de ácido clorídrico (HCl 5N) para interromper a reação. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro ajustado a 290 nm. Uma unidade de atividade da PAL foi definida como 1 µmol de ácido trans-cinâmico formado por minuto nas condições do ensaio

A atividade das enzimas foi expressa com base em proteína, cuja concentração foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina como proteína padrão.

## **2.6 Características anatômicas**

Na fixação, as folhas foram submersas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 48 horas, desidratadas em série etílica crescente, pré-infiltradas e infiltradas com historesina (Historesin Leica) de acordo com as recomendações do fabricante. O material foi seccionado transversalmente a 5 µm de espessura, em micrótomo rotativo (modelo RM 2155, Leica). Os cortes do tecido foliar, foram corados com Azul de Toluidina à 0,05%, pH 4,0 (O'Brien et al., 1965). Na diafanização, as amostras das folhas foram imersas em hidróxido de sódio 5% por 24 horas, clarificadas com cloral hidratado, 1,6:1 (p/v) por mais 24 horas e coradas com safranina 1% em etanol 50% (Arnott, 1959). Este procedimento foi necessário para o estudo da superfície foliar.

Após os procedimentos citados, as lâminas com material foram cobertas com lamínula utilizando bálsamo do Canadá. As imagens foram obtidas em microscópio óptico (modelo BX61, Olympus) com sistema U-photo, do Laboratório de Anatomia Vegetal do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde.

## **2.7 Características biométricas**

Avaliou-se o comprimento das plantas, número de brotações, folhas e raízes, a área foliar, a área foliar específica (AFE) e a matéria seca de folhas, caules, raízes e total. A área foliar foi obtida a partir da integração das imagens por meio do *software* ImageJ<sup>®</sup>. Os valores de matéria seca foram determinados em balança analítica após a secagem do material em estufa sob 40°C até atingir massa constante. A AFE foi obtida a partir de área foliar em cm<sup>2</sup> / matéria seca foliar (g).

## 2.8 Análises estatísticas

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com dez repetições para as características biométricas e cinco para as demais avaliações. Cada repetição constituiu de 1 frasco com 2 plântulas. Os dados foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de t (LSD) ( $p < 0,05$ ) por meio do *software* de análises estatísticas Sisvar (Ferreira, 2011). As estimativas de correlações de Pearson foram realizadas com o *software* R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) e a confecção de gráfico com pacote Corrplot, que marcou todos os recursos com base no coeficiente de correlação de Pearson para *heatmap*.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Pigmentos foliares em resposta à qualidade espectral

A dinâmica de pigmentos em *A. othonianum* foi alterada frente à variação espectral *in vitro*. Sob luz vermelha houve uma redução de 30% da concentração de clorofila *a* em relação aos demais tratamentos (Tabela 1). Alguns estudos indicam que a luz vermelha não é propícia à formação de clorofila, devido a redução do ácido 5-aminolevulínico (ALA), o precursor do tetrapirrol (Tanaka et al., 1998; Fan et al., 2013a). Menor concentração de clorofila *a* sob luz vermelha também foi observada em *Plectranthus scutellarioides* (L.) R.Br. *in vitro* (Cho et al., 2019). Embora não tenha ocorrido uma variação na concentração de clorofila *b* e total entre os ambientes testados, a relação clorofila *a/b* foi afetada, sobretudo sob luz vermelha, que por sua vez não diferenciou dos demais tratamentos, exceto em relação à associação azul + vermelho. A redução da razão *cla/clb* sob luz vermelha indica que o excesso de energia proveniente da excitação do fitocromo pode estar sendo descarregado na clorofila *b* (van Huylbroeck et al., 2000; Alvarenga et al., 2015).

Além de ser a fonte de energia para o processo fotossintético a luz atua na modulação de uma série de processos que envolvem o desenvolvimento e o metabolismo vegetal (Abidi et al., 2013), inclusive a formação e acumulação de pigmentos fotossintéticos (Chen et al., 2017). Geralmente a luz azul é relacionada ao estímulo da síntese de clorofila, maturação dos cloroplastos, bem como da abertura estomática (Hung et al., 2016). Apesar da alta concentração de pigmentos

sob luz azul, nesta condição houve também o maior índice de degradação, como apontado pela baixa razão *cla/clb* e também pelo menor índice de feofitinação (IF) (Tab. 1), pois este índice é inversamente proporcional à degradação de clorofilas (Ronen e Galun, 1984; Costa et al., 2014).

Sob luz verde houve manutenção de altos níveis de clorofilas (Tab. 1). Alvarenga et al., (2015) verificaram que em *Achillea millefolium* L. a luz verde promoveu maior acúmulo de clorofilas em relação a outras faixas espectrais, o que possivelmente representa mecanismo de otimizar a captura de luz, visto que pouco desta radiação é absorvida pelas clorofilas.

Em relação aos carotenoides verificou-se valores expressivos deste pigmento sob a associação dos LEDs azuis e vermelhos (A+V), com valores superiores às condições de radiação monocromática, mas similares à luz branca (Tab. 1). Os carotenoides estão relacionados aos mecanismos de fotoproteção, ou seja, atuam como componentes do sistema antioxidante da célula (Pinnola e Bassi, 2018). Os reduzidos valores de carotenoides sob LEDs vermelhos podem ter refletido em menor concentração de clorofila *a*, visto que os carotenoides podem prevenir a sua fotooxidação (Ouzounis et al., 2015). Essa constatação é corroborada pela correlação positiva entre clorofila *a* e carotenoides ( $0,4 \leq r < 1$ , Fig. 8)

**Tabela 1.** Clorofila *a* (Cl *a*), clorofila *b* (Cl *b*), carotenoides (Car), razão entre clorofilas *a* e *b*, clorofila total (Cl t) e índice de feofitinação (IF) em *Anacardium othonianum* Rizz.; aos 50 dias de cultivo *in vitro* em função de diferentes qualidades de luz.

Qualidade de luz	Cl <i>a</i> ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )	Cl <i>b</i> ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )	Car ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )	Cl <i>a</i> /Cl <i>b</i>	Cl t ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )	IF (A <sub>435</sub> /A <sub>415</sub> )
<b>Azul</b>	30,6±1,4a	25,0±3,0 <sup>ns</sup>	2,1±0,6bc	1,3±0,2ab	55,6±3,7 <sup>ns</sup>	1,18±0,03b
<b>A+V</b>	33,8±3,9a	21,0±2,9	3,9±0,4a	1,6±0,1a	54,8±6,6	1,30±0,02a
<b>Branca</b>	28,7±1,3a	19,7±1,6	2,7±0,2a	1,5±0,1ab	48,4±2,8	1,30±0,01a
<b>Verde</b>	27,9±2,5a	20,3±3,8	2,1±0,5bc	1,5±0,1ab	48,2±6,2	1,32±0,01a
<b>Vermelha</b>	21,1±0,8b	20,4±2,2	1,3±0,4c	1,1±0,1b	41,5±2,9	1,26±0,02a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de t (LSD) ( $p \leq 0,05$ ). ± Erro padrão, <sup>ns</sup> = não significativo.

A luz está entre um dos fatores exógenos mais importantes que interferem na biossíntese de flavonoides em plantas (Nadeem et al., 2018). Os flavonóis e as antocianinas são compostos do grupo dos flavonoides que exercem papel relevante contra uma série de agentes estressores e os

danos causados pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio, sobretudo aqueles causados por radiação visível e ultravioleta (Brunetti et al., 2015; Pinnola e Bassi, 2018).

A concentração de antocianinas (Tab. 2) não variou entre os tratamentos, entretanto o índice de flavonóis foi superior nos LEDs com presença substancial de luz azul (azul + vermelha e azul monocromática). Em extensão menor que a UV, a luz azul promove a estimulação de genes pertencentes a via fenilpropanoide, que estão relacionadas à biossíntese de ácidos fenólicos e flavonoides. Esta promoção está relacionada ao envolvimento integrado de criptocromos e fitocromos na percepção da luz. A luz vermelha geralmente não aumenta a biossíntese ou acúmulo de flavonoides foliares quando comparadas àquelas sob azul e branco (Landi et al., 2019). No entanto, em alguns casos, a luz vermelha resultou em aumento da concentração de flavonoides (Li e Kubota, 2009; Manivannan et al., 2015; Cioć et al., 2018).

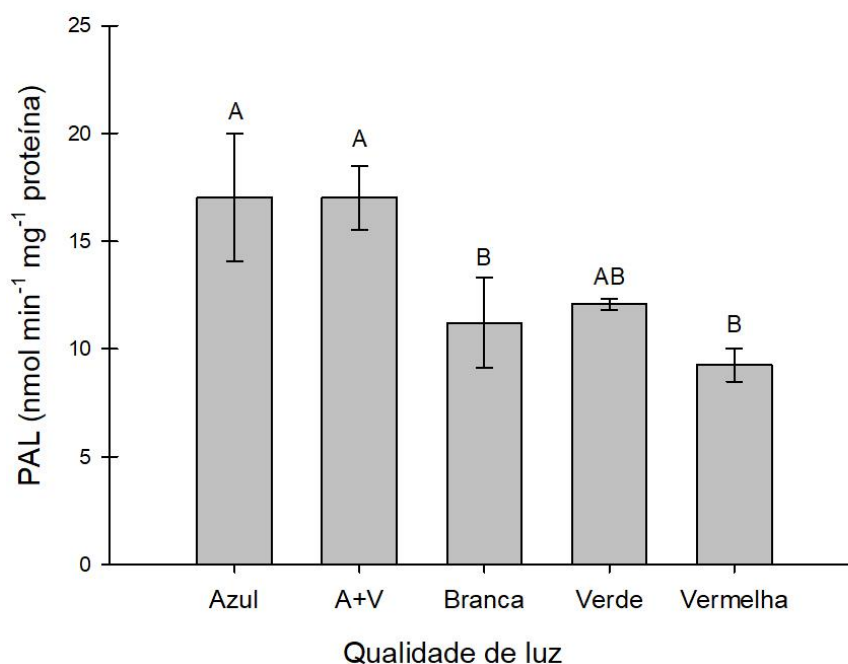
Em contrapartida, os maiores índices de balanço de nitrogênio, obtidos a partir da razão de clorofilas e o de flavonóis, foram encontrados em plântulas sob LEDs verde e vermelho (Tab. 2). Dependendo da espécie e de calibração apropriada, a concentração de N na folha pode ser estimada indiretamente, pois há uma correlação negativa com os teores de compostos fenólicos nas folhas e correlação positiva de N com os teores de clorofila e o IBN (Coelho et al., 2012). Como o N é constituinte relevante na composição das clorofilas, a partir deste índice infere-se que nestas faixas espectrais houve maior eficiência do investimento deste nutriente para o acúmulo de esqueletos de carbono para posterior destino ao metabolismo primário ao invés do secundário.

**Tabela 2.** Índices Dualex de flavonóis (FLAV), antocianinas (ANT) e de balanço de nitrogênio (IBN) em plântulas de *Anacardium othonianum* Rizz. aos 50 dias de cultivo *in vitro* em função de diferentes qualidades de luz.

Qualidade de luz	FLV	ANT	IBN
<b>Azul</b>	0,44±0,04ab	0,29±0,01 <sup>ns</sup>	64,2±6,2c
<b>A+V</b>	0,46±0,05a	0,28±0,01	74,4±11,1c
<b>Branca</b>	0,36±0,02b	0,29±0,01	82,6±7,8bc
<b>Verde</b>	0,23±0,01c	0,28±0,01	113,1±6,1a
<b>Vermelha</b>	0,24±0,01c	0,30±0,01	98,3±4,2ab

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de t (LSD) ( $p \leq 0,05$ ).  
 $\pm$  Erro padrão, <sup>ns</sup> = não significativo.

A atividade da enzima fenilalanina amonialiase (PAL) foi pronunciada nos tratamentos azul e A+V, superando os LEDs brancos e vermelhos, enquanto as plântulas sob o verde não diferiram de nenhum dos tratamentos (Fig. 2). A PAL catalisa os mais importantes passos na via fenilpropanoide pela qual os compostos polifenólicos são sintetizados, e a sua regulação transcricional pode ser ativada pela luz (Zhang et al., 2012), especialmente a azul (Heo et al., 2012), mas alguns estudos como o de Manivannan et al. (2015) destacam o papel da luz vermelha desempenhando essa função. A ação da PAL sobre a produção de fenólicos pode ser evidenciada neste estudo por meio da correlação positiva com a concentração de flavonóis ( $0,5 \leq r < 1$ , Fig. 8).

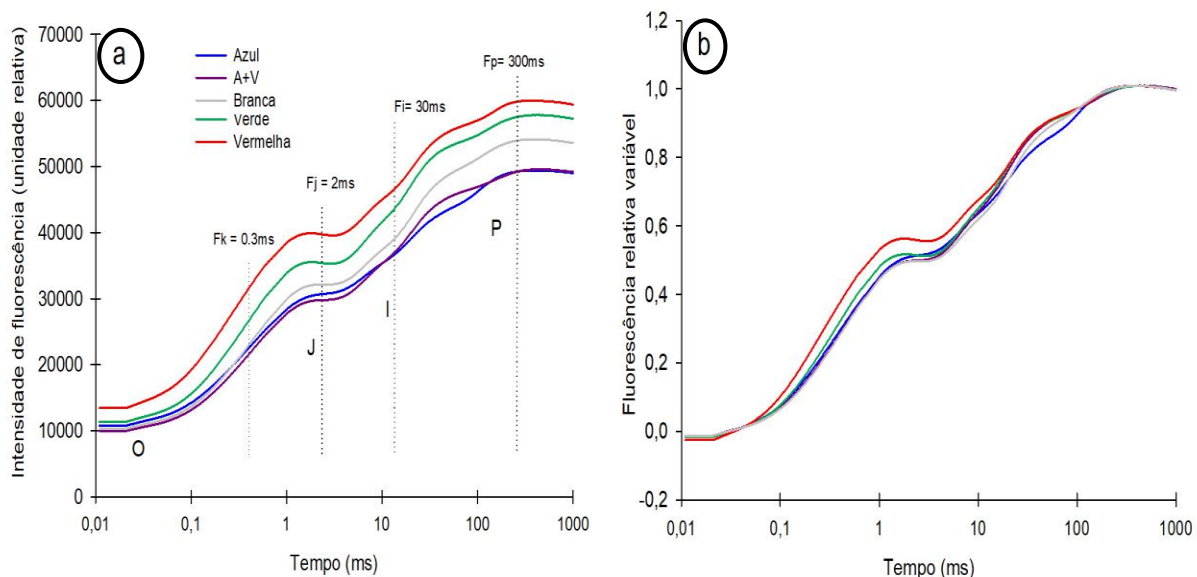


**Figura 2.** Atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) em tecidos foliares de plântulas de *Anacardium othonianum* Rizz. cultivadas *in vitro*, em função de diferentes qualidades de luz. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de t (LSD) ( $p \leq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão das médias.

### 3.2 Alterações na qualidade de luz afetam a eficiência fotossintética

Os dados de avaliação dos transientes da fluorescência da clorofila apresentaram uma típica curva polifásica OJIP, a partir de um nível basal ( $F_0$ ) para um nível máximo ( $F_m$ ), e os passos J e I foram bem definidos (Fig. 3a). A curva OJIP representa uma sucessiva redução do transporte de elétrons do fotossistema II. Sob LEDs vermelhos houve aumento de  $F_0$ . Valores mais altos de  $F_0$  podem ser um indicativo de inibição parcial do centro de reação do PSII, que por sua vez inibe o fluxo de elétrons do aceitador quinona primária (Qa) ao aceitador de elétrons de quinona secundária (Qb), diminuindo a eficiência da energia capturada no PS II (Strasser et al., 2000). Por outro lado, não houve redução de  $F_m$ , indicando que todos os receptores de elétrons iniciais, intermediários e final conseguiram ser reduzidos (Kalaji et al., 2016; Rosa et al., 2018).

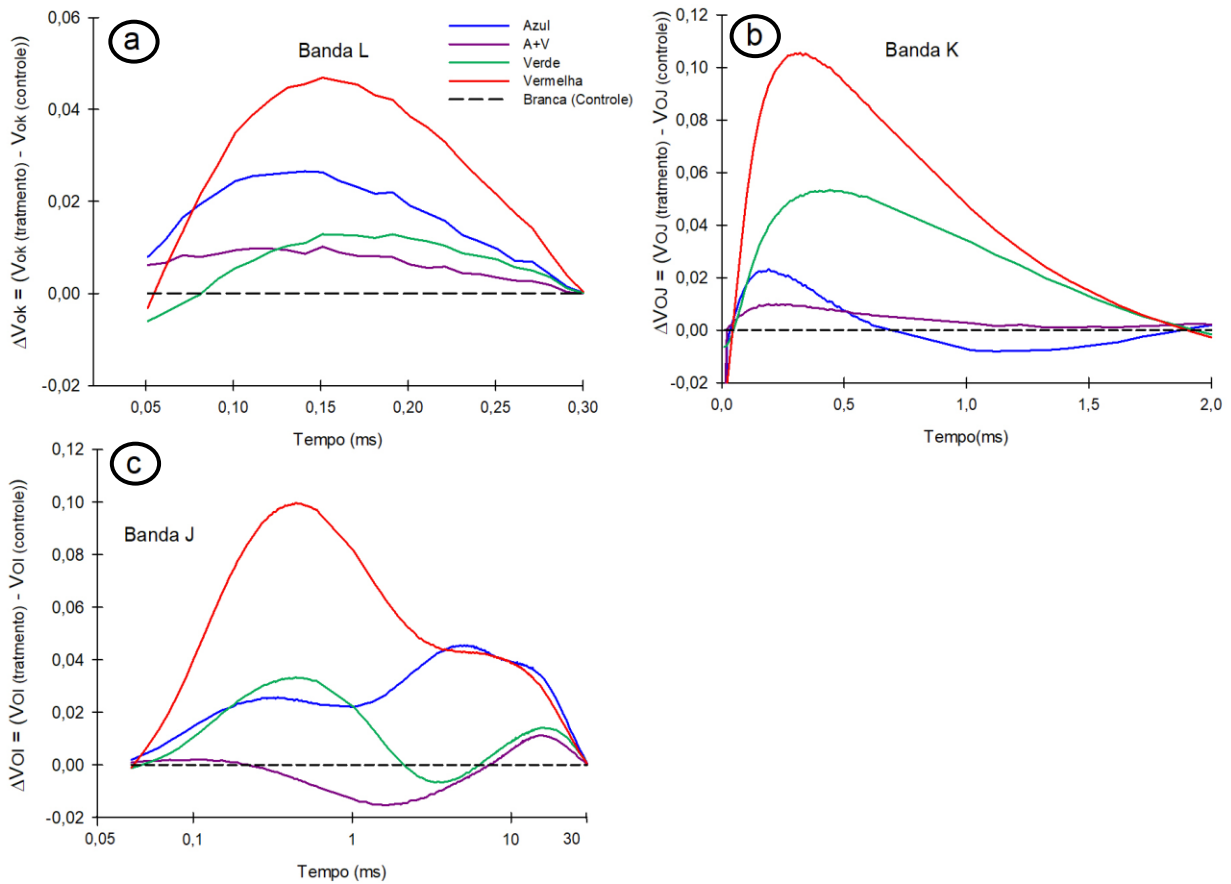
No entanto, pode ser demonstrado pelos valores da fluorescência variável relativa que sob luz vermelha as plântulas de *A. othonianum* estiveram sob condição mais estressante (Fig. 3b). Nesta condição verificou-se que a forma do transiente na fase J foi mais pronunciada, e o que o ponto P não foi superior às demais condições de luminosidade. A amplitude do transiente na fase J indica a ocorrência de comprometimento da capacidade das plantas reduzirem fotoquimicamente a quinona *a*.



**Figura 3.** Transientes da fluorescência da clorofila *a* (Curva OJIP), realizado em folhas de *Anacardium othonianum* Rizz. aos 50 dias de cultivo *in vitro* em função de diferentes qualidades de luz. Intensidade de fluorescência (a). Fluorescência relativa variável (b).

A condição estressante sob luz vermelha é reforçada após a normalização entre os pontos O e K (banda L), O e J (banda K) e O e I (banda J) (Fig. 4 a, b e c, respectivamente). A banda L é um indicativo da funcionalidade do PSII e está relacionada ao empilhamento e ao desempilhamento de tilacoides. A presença da banda L positiva pronunciada nas plântulas sob luz vermelha é indicativo da baixa conectividade de energia entre as unidades do PSII (Strasser et al., 2004; Rosa et al., 2018). Nesse sentido, constata-se que a luz azul também condiciona uma pressão sobre a maquinaria do PSII e que a luz branca, que aqui foi utilizada como controle em razão da sua ampla utilização, condicionou vantagem fotoquímica em relação aos demais tratamentos.

Para a banda K o comportamento positivo foi mais proeminente nas plântulas sob os LEDs vermelhos e verde, enquanto entre os demais tratamentos os resultados foram similares (Fig. 4b). A banda K reflete uma inativação do complexo de evolução de oxigênio (CEO) e / ou um tamanho aumentado da antena funcional do PSII (Yusuf et al., 2010; Martins et al., 2015a). A perda de conectividade energética e a inativação do CEO sob luz verde e vermelha foi consistente com a redução limitada de plastoquinona (PQ), que foi demonstrada pela banda J (Fig. 4c). Banda J positiva também foi observada em plântulas sob luz azul. Esta variável está relacionada à sequência de eventos desde a captura do éxciton por PSII até a redução de plastoquinona (Yusuf et al., 2010; Martins et al., 2015a; Rosa et al., 2018).



**Figura 4.** Diferenças cinéticas de fluorescência relativa de *Anacardium othonianum* durante as etapas 0 a K =  $\Delta VOK = VOK \text{ (tratamento)} - VOK \text{ (controle)}$ (a); 0 a J =  $\Delta VOJ = VOJ \text{ (tratamento)} - VOJ \text{ (controle)}$  (b); e 0 a I =  $\Delta VOI = VOI \text{ (tratamento)} - VOI \text{ (controle)}$  (c). Controle: branca.

Por meio da análise do *JIP-test* a partir dos transientes da clorofila, verificou-se que as plântulas submetidas à LEDs brancos, azuis associados com vermelhos, azuis e verdes atingiram valores próximos de rendimento quântico de fotoquímica primária ( $\psi Po$ , equivalente a razão  $Fv/Fm$ ), rendimento quântico de transporte de elétrons ( $\psi Eo$ ), assim como do índice de desempenho fotossintético ( $PI_{ABS}$ ) (Tab. 3).

Devido o  $PI_{ABS}$  relacionar a eficiência de absorção, a captura e transferência de energia de excitação pelo fotossistema II, este índice tem sido considerado um importante parâmetro para uma

visão mais ampla do grau de efeito do ambiente estressante (Gonçalves et al., 2010). No entanto, sob LED azul houve uma maior pressão no fotossistema II do que sob luz branca, uma vez que o rendimento quântico de dissipação de energia na forma de calor ( $\phi_{DO}$ ) foi maior. Embora as plântulas sob luz vermelha tenham apresentado maiores índices de absorção de energia (ABS/RC), a dissipação na forma de calor, ou seja, *quenching*-não fotoquímico ( $\phi_{DO}$  e Dio/RC) é alta, indicando limitação da funcionalidade do aparato fotossintético, evidenciada por valores 40% menores de  $PI_{ABS}$  quando em comparação com as médias das outras qualidades luminosas avaliadas.

O aumento de ABS/RC nas plantas sob LED vermelho pode ser explicada por uma diminuição no número de centros reativos ativos do PSII, que podem servir como mecanismo de defesa para reduzir a carga de seus sistemas quando ocorreu estresse luminoso (Strasser et al., 2000). Por outro lado, valores altos de dissipação de energia na forma de calor representam estratégias para diminuir a geração de espécies reativas de oxigênio que poderiam comprometer ainda mais a funcionalidade dos fotossistemas (Szymańska et al., 2017). Segundo Tennessen et al. (1994) a luz vermelha monocromática pode provocar um desequilíbrio na energia da luz disponível necessário para o funcionamento ideal dos fotossistemas I e II.

**Tabela 3.** Características da fluorescência da clorofila. Rendimento quântico máximo de fotoquímica primária ( $\phi_{Po}$ ), rendimento quântico de dissipação de energia na forma de calor ( $\phi_{Do}$ ), rendimento quântico de transporte de elétrons ( $\psi_{Eo}$ ), absorção de energia luminosa por centro de reação (ABS/RC), fluxo de transporte de elétrons (além da  $Q_a^-$ ) por centro de reação em  $t = 0$  (Eto/RC), dissipação de energia na forma de calor por centro de reação (Dio/RC) e índice de desempenho fotossintético ( $PI_{ABS}$ ).

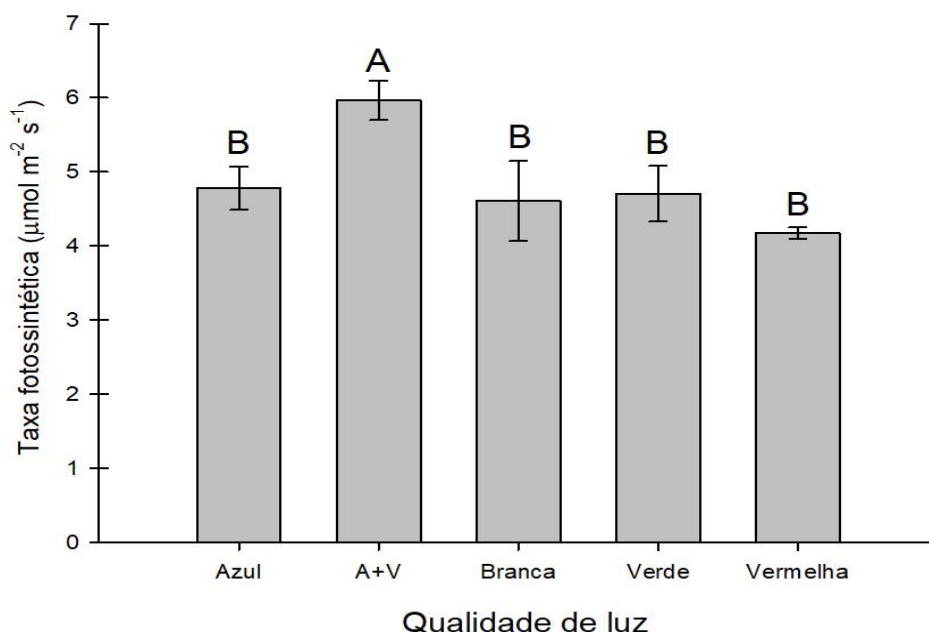
Qualidade de luz	$\phi_{Po}$	$\phi_{Do}$	$\psi_{Eo}$	ABS/RC	Eto/RC	Dio/RC	$PI_{ABS}$
<b>Azul</b>	0,77±0,01ab	0,23±0,01ab	0,40±0,01a	2,33±0,12b	0,92±0,03 <sup>ns</sup>	0,54±0,05b	1,62±0,18a
<b>A+V</b>	0,78±0,01a	0,22±0,01bc	0,40±0,01a	2,33±0,08b	0,93±0,03	0,51±0,03b	1,66±0,12a
<b>Branca</b>	0,79±0,01a	0,20±0,01c	0,41±0,01a	2,28±0,07b	0,92±0,03	0,47±0,02b	1,80±0,12a
<b>Verde</b>	0,79±0,01a	0,21±0,01bc	0,39±0,01a	2,52±0,08b	0,98±0,03	0,53±0,02b	1,47±0,10a
<b>Vermelha</b>	0,76±0,01b	0,24±0,01a	0,34±0,02b	2,91±0,17a	0,98±0,03	0,72±0,07a	0,99±0,18b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de t (LSD) ( $p \leq 0,05$ ).  $\pm$  Erro padrão, <sup>ns</sup> = não significativo.

As médias de taxa fotossintética nos diferentes ambientes espectrais variaram entre 4,0 e 6,1  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 5). Este é o primeiro relato de taxa fotossintética para *A. othonianum* e para espécies de cajueiro em condições *in vitro*. Mas é possível verificar que os valores não estão muito aquém do observado para *Anacardium occidentale* L. em condições *ex vitro*. Souza et al. (2005), observaram que sob condições naturais a fotossíntese líquida máxima alcançou valores de 10  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e 13  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  em condições ótimas.

Os bons índices verificados pela avaliação de fluorescência da clorofila *a* na associação A+V, refletiram positivamente em maiores taxas fotossintéticas, com valores aproximadamente 36% superiores às medias dos demais ambientes de luminosidade, os quais não diferenciaram entre si para esta variável (Fig. 5). O  $\text{PI}_{\text{ABS}}$  correlacionou-se positivamente com os valores de clorofila *a*, ( $0,5 \leq r < 1$ ) que por sua vez se correlacionaram positivamente com taxa fotossintética ( $0,5 \leq r < 1$ , Fig. 8). Maiores taxas fotossintéticas na associação dos LEDs azul+vermelho também foram observadas em *Withania somnifera* (L.) Dunal. (Lee et al., 2007).

Em comparação com os LEDs branco, vermelho e azul, os LEDs verdes não promoveram reduções significativas de taxa fotossintética. Isso possivelmente se deve a fonte de luz verde possuir um significativo componente azul (Fig. 1). Esse efeito também foi observado por XiaoYing et al. (2011) em estudo com LEDs em tomate cereja (*Solanum lycopersicum* Mill.). Em geral, a luz azul promove a abertura dos estômatos mais do que outras faixas espectrais e essa estimulação da abertura dos estômatos pode contribuir para o aumento da condutância estomática (Terfa et al., 2012) e conseqüentemente a taxa fotossintética em ambientes enriquecidos com a mesma, como na associação A+V. Por outro lado, sob luz vermelha a condutância estomática é limitada, bem como o conteúdo de Rubisco (Muneer et al., 2014) e de suas subunidades pequenas (Su et al., 2014) o que contribui para diminuir a taxa fotossintética (Landi et al., 2019).



**Figura 5.** Taxa fotossintética ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) de plântulas de *Anacardium othonianum* Rizz. aos 50 dias de cultivo *in vitro* em função de diferentes qualidades de luz. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de t (LSD) ( $p \leq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão das médias. <sup>ns</sup> = não significativo.

### 3.3 Modificações morfoanatômicas foliares de plântulas de *A. othonianum* em diferentes qualidades luminosas

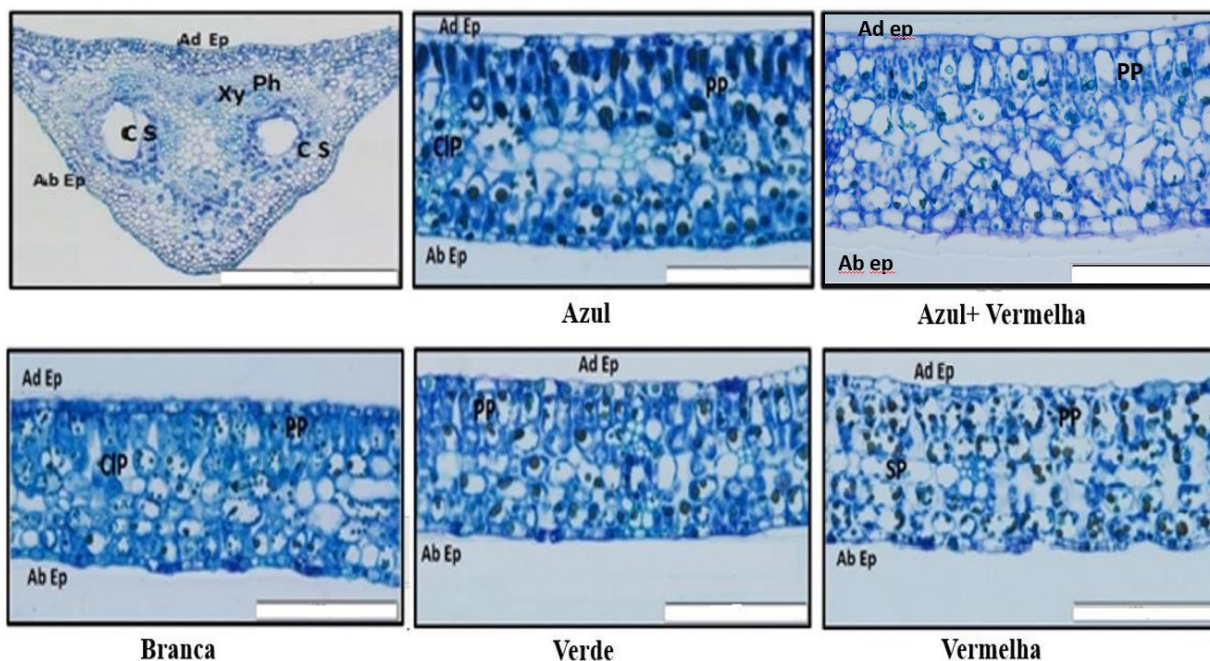
Os espectros de luz influenciaram significativamente a microformetria de *A. othonianum* (Tab. 4). A espessura das epidermes adaxial e abaxial não variou, no entanto as diferenças de espessura do parênquima clorofiliano (paliçádico e esponjoso) foram expressivas, com médias superiores nas plantas sob LEDs azuis e azul associado com vermelho e inferiores nos LEDs verdes e vermelhos.

O maior espessamento das folhas se correlacionou negativamente com a AFE ( $-0,6 \leq r < 1$ , Fig. 8). Esses resultados caracterizam as plantas cultivadas sob luz azul como plantas do sol, mesmo que a intensidade da luz seja baixa (Hogewoning et al., 2010). Li et al. (2017) e Chen et al. (2019) demonstraram que plântulas de *Vitis vinifera* L. e *Solanum tuberosum* L, respectivamente, cultivadas *in vitro* sob luz vermelha e verde mostraram comportamento típico de plantas sob

estresse de sombra. Comportamento de planta de sol e sombra respectivamente, também foi observado em plântulas de *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg. cultivadas sob LEDs monocromáticos azul e vermelho (Centofante, 2020).

Neste estudo, as plântulas sob luz verde manifestaram algumas características da síndrome de prevenção do sombreamento, SAS (Casal, 2012; Li et al., 2017; Chen et al., 2019). Dentre estas características destacou-se a ocorrência de folhas mais finas, com taxas fotossintéticas reduzidas, maior alongamento do caule, além de menor expressão de genes de defesa que por sua vez pode ser evidenciado pela menor atividade de enzimas antioxidantes (Fig 6). Contudo a adição de luz verde pode ter um efeito positivo nas plantas, pois penetra mais profundamente na folhagem do que luzes vermelhas e azuis, aumentando potencialmente o crescimento das plantas, estimulando a assimilação de carbono em partes inferiores da copa (Brodersen e Vogelmann, 2010).

Devido os fitocromos e criptocromos também serem receptores de luz verde (Folta e Maruhnich, 2007), isto pode justificar os resultados serem em alguns aspectos, semelhantes aos da luz vermelha e, em outros aspectos, similares aos da luz azul, como também observado em *Alternanthera brasiliana* Kuntze *in vitro* (Macedo et al., 2011).



**Figura 6** Fotomicrografias das seções transversais das folhas de *Anacardium othonianum* Rizz. cultivadas *in vitro* por 50 dias (Barra: 500µm), e região entre nervuras nas diferentes qualidades de

luz (Barra: 100  $\mu\text{m}$ ). Canal secretor (C S), Epidermes adaxial (Ad ep) e abaxial (Ab ep), parênquima clorofiliano (Cl P), parênquima paliçádico (PP) e parênquima esponjoso (S P).

**Tabela 4.** Efeito de diferentes qualidades de luz na espessura foliar de plântulas de *A. othonianum* cultivadas *in vitro*: espessura do mesofilo (Mes Th), epiderme adaxial (Ad ep), espessura do parênquima clorofiliano (Chl P Th), parênquima esponjoso (Spong P), parênquima paliçádico (Palisade P) e epiderme abaxial (Ab Ep).

<b>Qualidade de luz</b>	<b>Mes Th</b> ( $\mu\text{m}$ )	<b>Ad Ep</b> ( $\mu\text{m}$ )	<b>Chl P Th</b> ( $\mu\text{m}$ )	<b>Palisade P</b> ( $\mu\text{m}$ )	<b>Spong P</b> ( $\mu\text{m}$ )	<b>Ab Ep</b> ( $\mu\text{m}$ )
<b>Azul</b>	122,0 $\pm$ 1,6a	8,0 $\pm$ 0,3 <sup>ns</sup>	108,0 $\pm$ 1,7a	37,1 $\pm$ 1,8a	70,4 $\pm$ 5,3a	6,8 $\pm$ 0,5 <sup>ns</sup>
<b>A+V</b>	131,3 $\pm$ 4,3a	7,3 $\pm$ 0,2	114,9 $\pm$ 5,2a	37,2 $\pm$ 1,1a	76,4 $\pm$ 10,9a	6,9 $\pm$ 0,5
<b>Branca</b>	103,5 $\pm$ 5,5b	7,1 $\pm$ 0,4	89,1 $\pm$ 5,5b	34,6 $\pm$ 1,1ab	55,3 $\pm$ 9,7b	6,4 $\pm$ 0,3
<b>Verde</b>	87,7 $\pm$ 2,0c	7,7 $\pm$ 0,2	72,6 $\pm$ 1,9c	26,0 $\pm$ 1,2c	45,9 $\pm$ 3,7b	6,2 $\pm$ 0,2
<b>Vermelha</b>	96,3 $\pm$ 2,9bc	7,3 $\pm$ 0,2	82,1 $\pm$ 2,8bc	33,9 $\pm$ 1,0b	50,3 $\pm$ 7,4b	5,9 $\pm$ 0,3

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de t (LSD) ( $p \leq 0,05$ ).  $\pm$  Erro padrão, <sup>ns</sup> = não significativo.

Independente do tratamento a densidade estomática abaxial foi superior em relação à porção adaxial (Tab. 5), ocorrendo variação significativa somente na densidade estomática adaxial, onde as plantas sob mix de LEDs azul e vermelho tiveram os menores médias, porém não diferenciando da luz branca (Tab. 5).

Embora se atribua maior capacidade de trocas gasosas aos tecidos com maiores densidades estomáticas (Liu et al., 2014), deve se levar em conta a funcionalidade dos estômatos. A razão diâmetro polar/diâmetro equatorial tem sido descrita como um índice que reflete a habilidade estomática caracterizando os estômatos com perfil mais elipsoide (Sha Valli Khan et al., 1999; Leite et al., 2017). Nesse sentido, as plantas sob A+V se destacam positivamente com as maiores médias tanto na porção abaxial quanto na adaxial. Já a luz branca teve comportamento superior à luz azul e similar a luz verde e vermelha, que por sua vez são similares entre si, exceto na porção abaxial onde a luz vermelha supera a luz azul. A redução do diâmetro polar é relatado como uma das causas de baixa funcionalidade (Martins et al., 2009; Martins et al., 2015b) que não chegou a correlacionar os valores de taxa fotossintética ( $p > 0,05$ ), mas que se persistirem podem afetar as plantas sensivelmente durante a aclimação (Rosa et al., 2018).

**Tabela 5.** Efeito de diferentes qualidades de luz nas características estomáticas de *A. othonianum in vitro*: densidade estomática abaxial (Ab St Dens), densidade estomática adaxial (Ad St Dens), diâmetro polar abaxial (Ab Pol D), diâmetro equatorial abaxial (Ab Pol D), razão entre diâmetro polar e equatorial abaxial (Ab Pol/Eq), diâmetro polar adaxial (Ad Pol D), diâmetro equatorial adaxial (Ad Pol D), razão entre diâmetro polar e equatorial adaxial (Ad Pol /Eq)

Qualidade de luz	Ab St Dens (St mm <sup>-2</sup> )	Ad St Dens (St mm <sup>-2</sup> )	Ab Pol D (µm)	Ab Eq D (µm)	Ab Pol / Eq	Ad Pol D (µm)	Ad Eq D (µm)	Ad Pol / Eq
<b>Azul</b>	873,2±24,9 <sup>ns</sup>	653,7±110,7a	13,6±0,5a	11,1±0,9a	1,2±0,08c	15,1±0,5 <sup>ns</sup>	12,4±0,6 <sup>ns</sup>	1,2±0,03c
<b>A+V</b>	898,8±82,0	409,1±35,9b	14,5±0,5a	8,8±0,3bc	1,7±0,04a	15,1±0,5	9,7±0,7	1,6±0,07a
<b>Branca</b>	853,4±66,0	550,0±28,4ab	14,6±0,6a	10,1±0,5ab	1,5±0,04b	15,2±0,3	10,6±0,4	1,4±0,05ab
<b>Verde</b>	894,0±27,3	594,8±21,3a	11,9±0,2b	8,5±0,3c	1,4±0,05bc	15,2±0,2	11,1±0,4	1,4±0,05bc
<b>Vermelha</b>	841,7±33,8	612,7±16,9a	13,5±0,2a	10,3±0,3ab	1,3±0,04bc	15,5±0,8	11,0±1,2	1,5±0,09ab

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de t (LSD) ( $p \leq 0,05$ ).  $\pm$  Erro padrão, <sup>ns</sup> = não significativo.

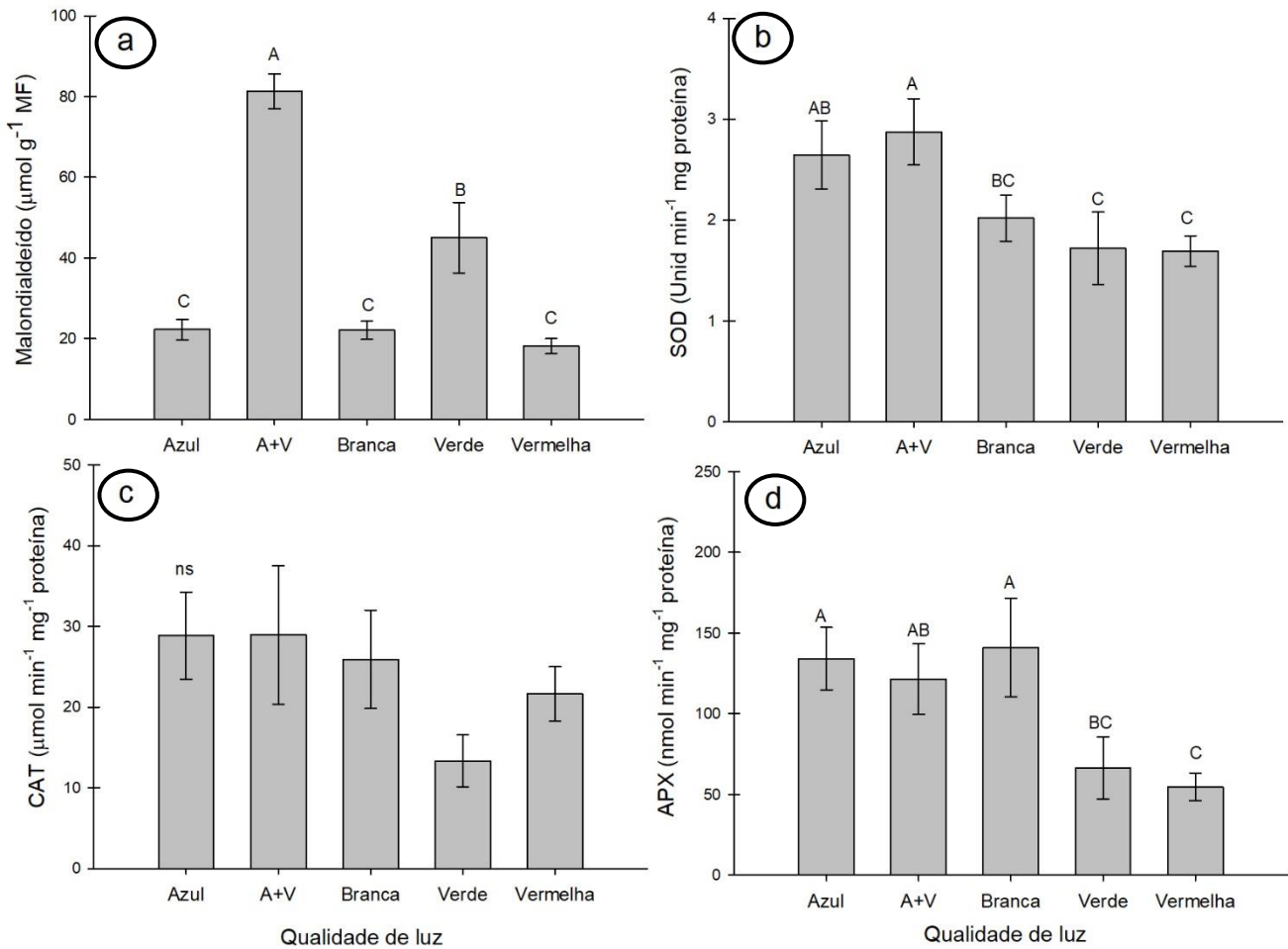
### 3.4 Peroxidação lipídica e atividade de enzimas antioxidantes

A qualidade de luz afetou sensivelmente o mecanismo antioxidante nas plantas de *A. othonianum*. A concentração de malondialdeído (MDA) foi marcadamente superior nas plantas sob A+V, seguido da luz verde, que por sua vez superou os demais tratamentos (Fig. 7a). A maior atividade da SOD foi observada na associação azul+vermelha e sob luz azul, que por sua vez teve resposta similar à luz branca (Fig. 7b). Embora tenha ocorrido uma tendência na queda na atividade da CAT sob luz verde não foi possível afirmar variação entre os tratamentos (Fig. 7c). Atividade expressiva da APX foi observada em plântulas sob os LEDs brancos e azuis (Fig. 7d). Resultado similar foi observado sob A+V, no entanto, nessa condição a APX teve atividade próxima a observada sob os LEDs verdes (Fig. 7d).

Geralmente o acúmulo de MDA está associado à peroxidação lipídica de membranas e consequente dano oxidativo (Dewir et al., 2015). Contudo, o nível de MDA em explantes tratados com mix de azul e vermelho podem não ter sido tão prejudiciais, pois parte dos peróxidos formados podem estar contribuindo para o desenvolvimento, uma vez que estariam integrando a rede de

sinalização, como proposto por Gupta e Sahoo (2015).

Embora os valores aumentados de enzimas antioxidantes estejam muitas vezes relacionados à evidência de maior estresse oxidativo podem também indicar maior eficiência dos mecanismos de proteção (Xu et al., 2018). Quedas acentuadas dos níveis dessas enzimas, como observado sob os LEDs verde e vermelhos, podem indicar início de senescência (Dong et al., 2014). Os valores mais expressivos destas enzimas em plantas sob LED branco, azul e A+V podem estar relacionados à maior atividade metabólica, bem como maior resiliência das plântulas nessas condições.



**Figura 7.** Concentração de malondialdeído – MDA (a), atividade das enzimas superóxido dismutase - SOD (b), catalase - CAT (c) e ascorbato peroxidase - APX (d) em tecidos foliares de plântulas de *Anacardium othonianum* Rizz. cultivadas *in vitro*, em função de diferentes qualidades de luz. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de t (LSD) ( $p \leq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão das médias. <sup>ns</sup> = não significativo.

### 3.5 Características biométricas de *A. othonianum* frente a variação espectral

A variação na qualidade de luz promoveu poucas diferenças nas características biométricas de *Anacardium othonianum*. Com exceção do comprimento da parte aérea (CPA) e da AFE, não houve variações consideráveis para as demais características (Tabela 6). O comprimento da parte aérea foi superior sob luz vermelha, com média 39% superior em relação às demais condições testadas. Resposta similar foi observada em *Scrophularia takesimensis* Nakai (Jeong et al., 2015) e tem sido associada ao efeito inibidor sobre a atividade da enzima AIA oxidase, aumentando assim o nível endógeno de auxinas. Isto também pode ser explicado devido ao efeito estimulador da luz vermelha sobre as giberelinas endógenas as quais estão envolvidas na mitose e proliferação celular (Toyomasu et al., 1993; Manivannan et al., 2015).

Mesmo com a provável inibição da AIA oxidase e o melhor índice de balanço de nitrogênio observado sob LEDs vermelho (Tab. 2), isso não foi suficiente para promover maior taxa fotossintética, nem maior acúmulo de matéria seca (Tab. 6). Uma das causas pode estar relacionada à indução do acúmulo de amido nos cloroplastos e consequente inibição da fotossíntese nas plantas (Sæbø et al., 1995; Li et al., 2013). Além disso, os menores índices de carotenoides, de flavonóis, de eficiência fotoquímica, bem como maior AFE sob luz vermelha podem resultar em vulnerabilidade na etapa de aclimatização.

Os efeitos negativos induzidos pela luz vermelha monocromática, são chamados de "síndrome da luz vermelha", são principalmente atribuíveis alta estimulação do fitocromo devido à falta de luz vermelha distante, o que leva a um desequilíbrio a proporção de vermelho para vermelho distante, que, por sua vez, tem efeitos diretos no crescimento das plantas (Trouwborst et al., 2016). Embora estas respostas estejam mais frequentemente associadas a uma reduzida razão vermelho-vermelho distante, alguns estudos mostraram que um nível reduzido de luz azul teve um efeito semelhante e sugeriram que uma cascata hormonal independente de PHY-B também pode levar à síndrome (Keller et al., 2011).

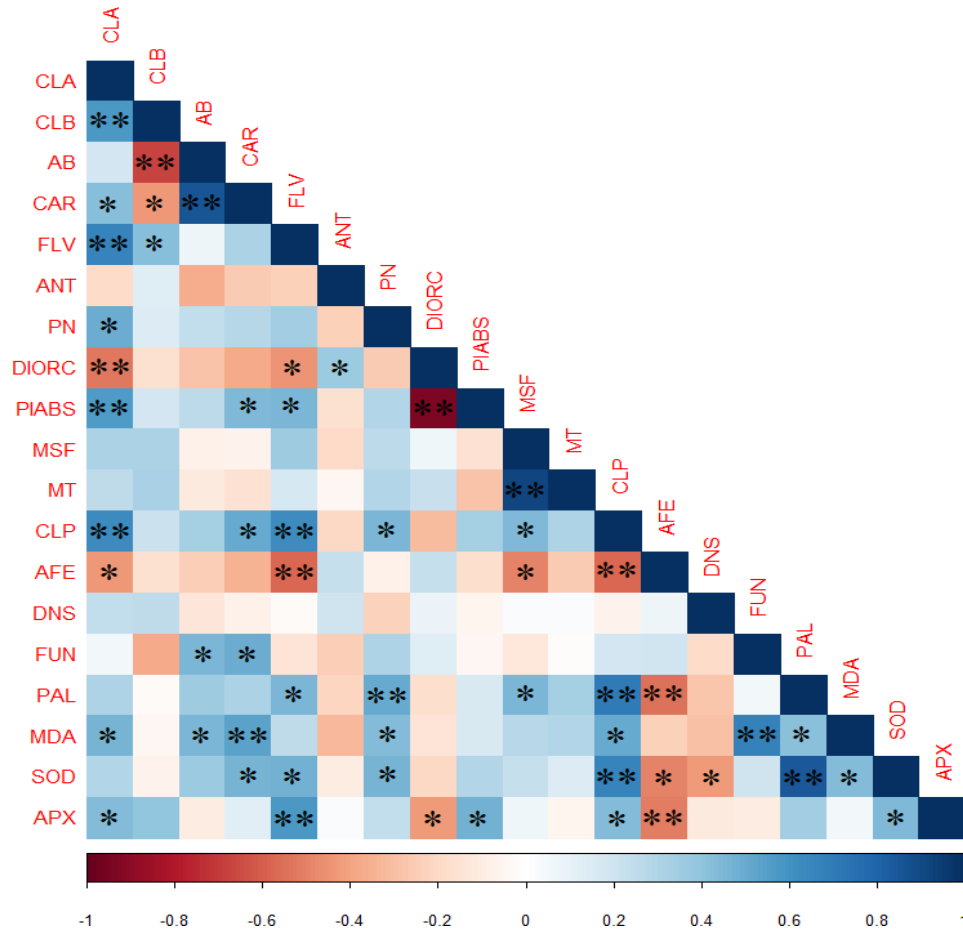
Verificou-se que a luz azul diminuiu a AFE (Tab. 6). AFE menor geralmente é reflexo de maior espessamento de parênquima (Fan et al., 2013b), sendo observada a correlação entre essas variáveis nesse estudo (Fig. 8). Devido estas radiações possuírem comprimento de onda menor, ou seja, mais energéticos é possível que esse maior espessamento da lâmina foliar represente uma estratégia para dissipar o excesso de energia. Em contrapartida, os altos valores de AFE observada

sob luz verde pressupõe a ocorrência de mecanismo para otimizar a absorção de luz, visto que pouca radiação verde é absorvida, e uma compensação pode ocorrer pelo adelgamento foliar permitindo uma melhor penetração do feixe luminoso (Brodersen e Vogelmann, 2010). Tais estratégias foram eficientes visto que a matéria seca foliar e total nesta condição se equipararam às plantas crescidas sob os demais LEDs.

**Tabela 6.** Características biométricas de plântulas de *A. othonianum* Rizz. aos 50 dias de cultivo *in vitro* em função de diferentes qualidades de luz. Número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), número de brotações (BROT), número de raízes (NR), área foliar (AF), massa seca foliar (MSF), massa seca total (MST) e área foliar específica (AFE).

Qualidade de luz	NF	CPA (cm)	BROT	NR	AF (cm <sup>2</sup> )	MSF (mg)	MST (mg)	AFE (cm <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )
<b>Azul</b>	3,2±0,36 <sup>ns</sup>	2,7±0,1*b	2,6±0,2 <sup>ns</sup>	0,1±0,07 <sup>ns</sup>	9,0±1,1 <sup>ns</sup>	58,3±6,5 <sup>ns</sup>	114,2±8,7 <sup>ns</sup>	163,7±9,8c
<b>A+V</b>	3,5±0,04	2,3±0,2b	2,8±0,4	0,1±0,08	8,4±0,8	50,0±7,2	107,9±10,6	172,4±6,4bc
<b>Branca</b>	3,6±0,60	2,3±0,1b	2,7±0,2	0,1±0,08	10,1±1,9	50,0±15,8	100,8±22,8	197,7±9,9ab
<b>Verde</b>	4,5±0,72	2,9±0,3ab	3,4±0,5	0,4±0,09	12,1±1,9	56,4±9,9	121,4±14,5	221,2±11,9a
<b>Vermelha</b>	3,4±0,65	3,5±0,4a	3,6±0,4	0,1±0,07	9,8±1,9	47,1±5,3	114,3±7,5	214,6±10,1a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de t (LSD) ( $p \leq 0,05$ ). ± Erro padrão, <sup>ns</sup> = não significativo.



**Figura 8.** Correlações de Pearson representada em *heatmap* obtidas entre as variáveis aos 50 dias de cultivo *in vitro* de *A. othonianum* submetido as diferentes qualidades de luz. Significância: \* ( $p \leq 0,05$ ), \*\* ( $p \leq 0,01$ ). CLA clorofila *a*, CLB clorofila *b*, AB razão *cla/club*, CAR carotenoides, FLV flavonóis, ANT antocianinas, PN taxa fotossintética líquida, DioRC dissipação de energia na forma de calor por centro de reação, PIABS índice de performance fotossintético, MSF massa seca foliar, MT massa seca total, CLP parênquima clorofiliano, AFE área foliar específica, DNS densidade estomática, FUN funcionalidade estomática (Razão diâmetro polar/equatorial), PAL fenilalanina amônia-liase, MDA malondialdeído, SOD superóxido dismutase, APX ascorbato peroxidase. Significância: \* ( $p \leq 0.05$ ), \*\* ( $p \leq 0.01$ ).

Apesar da maior taxa fotossintética nas plantas sob a associação de LED A+V, não foi evidenciado superioridade no acúmulo de biomassa (Tab. 6). Parte dessa resposta pode estar relacionada à atuação da luz azul, a qual pode desencadear altos níveis de flavonoides, ligninas, fenilpropanoides e fitohormônios, consequentemente reduzindo a fração de metabólitos primários

disponíveis para o crescimento (OuYang et al., 2015; Li et al., 2017). Adicionalmente, o estresse oxidativo evidente sob estes LEDs (Fig. 6) pode ter drenado a energia para mecanismos de reparo impedindo assim um acúmulo pronunciado de biomassa. Em contrapartida, estas plantas podem estar mais aptas para a aclimatização ao ambiente *ex vitro*, visto que já esboçam mecanismos de defesa frente às pressões ambientais.

#### **4. CONCLUSÃO**

Ambiente sob LEDs monocromáticos vermelhos representa condição marcadamente limitadora para o cultivo de *A. othonianum in vitro*. As plantas sob luz verde tiveram características de síndrome de evitação à sombra, enquanto sob luz azul os índices quantitativos e qualitativos oscilaram. Ambientes espectrais mais enriquecidas como os proporcionados por LEDs brancos e associação azul/vermelho permitiram o equilíbrio entre as características fisiológicas, morfoanatômicas e bioquímicas indicando essas condições como as mais propícias para estimular o fotoautotrofismo *in vitro* desta espécie.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abidi F, Girault T, Douillet O, Guillemain G, Sintès G, Laffaire M, Ben Ahmed H, Smiti S, Huché-Hélière L, Leduc N (2012) Blue light effects on rose photosynthesis and photomorphogenesis. *Plant Biol* 15(1):67-74. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00603.x>.

Alvarenga ICA, Pacheco FV, Silva ST, Bertolucci SKV, Pinto JEBP (2015) *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 122(2):299-308. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0766-7>.

Assis KC, Pereira FD, Alberto OS, Silva FG, Silva JW, Menezes CCE (2012) *In vitro* cultivation of *Anacardium othonianum* Rizz.: Effects of growth regulator, explant orientation and lighting. *Afr J Biotechnol* 11(7):1559-1566. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1383>.

Assis K, Silva FG, Pereira F, Filho S, Menezes CC (2015) Effects of photomixotrophic conditions and type of culture vessel closure on *Anacardium othonianum* Rizz. grown *in vitro*. *Acta Hort* 1083:553–564. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1083.74>.

Batista DS, Felipe SHS, Silva TD, Castro KM, Mamedes-Rodrigues TC, Miranda NA, Ríos-Ríos AM, Faria DV, Fortini EA, Chagas K, Torres-Silva G, Xavier A, Arencibia AD, Otoni WC (2018) Light quality in plant tissue culture: does it matter? *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 54(3):195- 215. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9902-5>.

Bilodeau SE, Wu BS, Rufyikiri AS, MacPherson S, Lefsrud M (2019) An update on plant photobiology and implications for cannabis production. *Front Plant Sci* 10:1-15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00296>.

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.

Brodersen CR, Vogelmann TC (2010) Do changes in light direction affect absorption profiles in leaves? *Funct Plant Biol* 37:403–412. <https://doi.org/10.1071/fp09262>.

Brunetti C, Guidi L, Sebastiani F, Tattini M (2015) Isoprenoids and phenylpropanoids are key components of the antioxidant defense system of plants facing severe excess light stress. *Environ Exp Bot* 119(4):54-62. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.04.007>.

Carvalho SD, Folta KM (2016) Green light control of anthocyanin production in microgreens. *Acta Hortic* (1134):13–18. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2016.1134.2>

Casal JJ (2012) Shade avoidance. *Arabidopsis Book* 10: e 0157. doi:10.1199/tab.0157.

Centofante AR (2020) Light quality on the morphoanatomy and physiology of *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg. seedlings. *Sci Hortic* 259. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108765>.

Cerovic ZG, Masdoumier G, Ghazlen NB, Latouche G (2012) A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoids. *Physiol Plant* 146(3):251-260. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01639.x>.

Chandra S, Bandopadhyay R, Kumar V, Chandra R (2010) Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnol Lett* 32(9):1199-1205. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0290-0>.

Chen L, Xue X, Yang Y, Chen F, Zhao J, Wang X, Khan AT, Hu Y (2017) Effects of red and blue LEDs on *in vitro* growth and microtuberization of potato single-node cuttings. *Front Agr Sci Eng* 5(2):197-205. <https://doi.org/10.15302/J-FASE-2018224>.

Chen L, Yang Y, Jiang Y, Zhao J, Zang H, Wang X, Hu Y, Xue X (2019) RNA-Seq analysis reveals differential responses of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets cultured *in vitro* to red, blue, green, and white light-emitting diodes (LEDs). *J Plant Growth Regul* 38(1):1-16. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09944-7>.

Cho KH, Laudos VY, Wallace-Springer N, Clark DG, Folta KM, Colquhoun TA (2019) Effects of light quality on vegetative cutting and *in vitro* propagation of coleus (*Plectranthus scutellarioides*). HortScience 54(5):926-935. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13903-19>.

Coelho FS, Fontes PCR, Finger FL, Cecon PR (2012) Avaliação do estado nutricional do nitrogênio em batateira por meio de polifenóis e clorofila na folha. Pesq Agropec Bras 47(4):584-592. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012000400015>.

Costa AC, Rosa M, Megguer CA, Silva FG, Pereira FD, Otoni WC (2014) A reliable methodology for assessing the *in vitro* photosynthetic competence of two Brazilian savanna species: *Hyptis marruboides* and *Hancornia speciosa*. Plant Cell, Tissue Organ Cult 117(3):443-454. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0455-y>.

Data ES, Quevedo MA, Gloria LA. Pruning techniques affecting the root quality of cassava at harvest and subsequent storage. In: I. Uritani and E.D. Reyes (Eds.) Tropical Root Crops: Postharvest Physiology and Processing, JSSP, Tokyo (1984):127–143.

Dong C, Fu Y, Liu G, Liu, H (2014) Growth, photosynthetic characteristics, antioxidant capacity and biomass yield and quality of wheat (*Triticum aestivum* L.) exposed to LED light sources with different spectra combinations. J Agron Crop Sci 200(3):219–230. <https://doi.org/10.1111/jac.12059>.

De Andrade IM, de Oliveira Nascimento JD, de Sousa MV, dos Santos JO, Mayo SJ (2019) A morphometric study of the restinga ecotype of *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae): wild coastal cashew populations from Piauí, Northeast Brazil. Feddes Reper. <https://doi.org/10.1002/fedr.201800024>.

Debona D, Rodrigues FÁ, Rios JA, Nascimento KJT (2012) Biochemical changes in the leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. Phytopathology 102:1121–1129. <https://doi.org/10.1094/phyto-06-12-0125-r>.

Del Longo OT, Gonzalez CA, Pastori GM, Trippi VS (1993). Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell Physiol* 34:1023-8. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078515>.

Dewir YH, El-Mahrouk ME-S, Al-Shmgani HS, Rihan HZ, Da Silva JAT, Fuller MP (2015) Photosynthetic and biochemical characterization of *in vitro*-derived African violet (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl) plants to *ex vitro* conditions. *J Plant Interact* 10:101–108. <https://doi.org/10.1080/17429145.2015.1018967>.

De Hsie BS, Bueno AIS, Bertolucci SKV, de Carvalho AA, da Cunha SHB, Martins ER, Pinto JEBP (2019) Study of the influence of wavelengths and intensities of LEDs on the growth, photosynthetic pigment, and volatile compounds production of *Lippia rotundifolia* Cham *in vitro*. *J Photochem Photobiol B* 111577. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111577>.

Fan X, Zang J, Xu Z, Guo S, Jiao X, Liu X, Gao Y (2013) Effects of different light quality on growth, chlorophyll concentration and chlorophyll biosynthesis precursors of non-heading chinese cabbage (*Brassica campestris* L.). *Acta Physiol Plant* 35(9):2721–2726 <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1304-z>.

Fan XX, Xu ZG, Liu XY, Tang CM, Wang LW, Han XL (2013) Effects of light intensity on the growth and leaf development of young tomato plants grown under a combination of red and blue light. *Sci Hortic* 153(3):50-55. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.01.017>.

Ferreira DF (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciênc Agrotecnol* 35(6):1039-1042. <https://doi.org/10.1590/s1413-70542011000600001>.

Folta KM, Maruhnich SA (2007) Green light: a signal to slow down or stop. *J Exp Bot* 58(12):3099–3111. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm130>.

Beauchamp C, Fridovich I (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable

to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44:276-87. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8).

Galvão VC, Fankhauser C (2015) Sensing the light environment in plants: photoreceptors and early signaling steps. *Curr Opin Neurobiol* 34:46–53. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.01.013>.

Gazolla AP, Curado FMLMJ, Pedroso RCN, Kellner Filho LC, Sales JF, Rosa M, Costa AC, Pauletti PM, Januário AH, Silva FG (2017) The influence of light quality on phenolic acid and biflavonoid production in *Anacardium othonianum* Rizz. seedlings grown *in vitro*. *Aust J Crop Sci* 11(5):528-534. <https://doi.org/10.21475/ajcs.17.11.05>. p 314.

Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol* 59:309-14. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>.

Gonçalves JFC, Silva CE, Guimarães DG, Bernardes RS (2010) Análise dos transientes da fluorescência da clorofila *a* de plantas jovens de *Carapa guianensis* e de *Dipteryx odorata* submetidas a dois ambientes de luz. *Acta Amaz* 40(1):89-98. <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672010000100012>.

Gupta SD, Sahoo TK (2015) Light emitting diode (LED)-induced alteration of oxidative events during *in vitro* shoot organogenesis of *Curculigo orchioides* Gaertn. *Acta Physiol Plant* 37(11):233. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-1990-9>.

Havir EA, MC Hale NA (1987). Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol* 84:450-5. <https://doi.org/10.1104/pp.84.2.450>.

He J, Qin L, Chong EL, Choong TW, Lee SK (2017) Plant growth and photosynthetic characteristics of *Mesembryanthemum crystallinum* grown aeroponically under different blue-and red-LEDs. *Front Plant Sci* 8(5): 361. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00361>.

Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125:189–198.

[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1).

Heo JW, Kang DH, Bang HS, Hong SG, Chun C, Kang KK (2012) Early growth, pigmentation, protein content, and phenylalanine ammonia-lyase activity of red curled lettuces grown under different lighting conditions. *Kor J Hort Sci Technol* 30(1):6-12. <http://dx.doi.org/10.7235/hort.2012.11118>.

Heringer AS, Reis RR, Passamani LZ, Souza-Filho GA, Santa-Catarina C, Silveira V (2017) Comparative proteomics analysis of the effect of combined red and blue lights on sugarcane somatic embryogenesis. *Acta Physiol Plant* 39(2):52. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2349-1>.

Hogewoning SW, Trouwborst G, Maljaars H, Poorter H, van Ieperen W, Harbinson J (2010) Blue light dose-responses of leaf photosynthesis, morphology, and chemical composition of *Cucumis sativus* grown under different combinations of red and blue light. *J. Exp. Bot.* 61(11):3107–3117. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq132>.

Hung CD, Hong CH, Kim SK, Lee KH, Park JY, Nam MW, Lee HI (2016) LED light for *in vitro* and *ex vitro* efficient growth of economically important highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Acta Physiol Plant* 38(6). <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2164-0>.

Inouea S, Kinoshita T (2017) Blue light regulation of stomatal opening and the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiol* 172(2):531-538. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00166>.

Jeong BR, Sivanesan I (2015) Direct adventitious shoot regeneration, *in vitro* flowering, fruiting, secondary metabolite content and antioxidant activity of *Scrophularia takesimensis* Nakai. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 123(3):607-618. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0864-6>.

Kalaji HM, Jajoo A, Oukarroum A, Brestic M, Zivcak M, Samborska IA, Cetner MD, Łukasik I, Goltsev V, Ladle RJ (2016) Chlorophyll *a* fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiol Plant* 4:1–11. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2113-y>.

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

Keller MM, Jaillais Y, Pedmale UV, Moreno JE, Chory J, Ballaré CL (2011) Cryptochrome 1 and phytochrome B control shade-avoidance responses in *Arabidopsis* via partially independent hormonal cascades. *Plant J* 67(2):195–207. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113x.2011.04598.x>.

Landi M, Zivcak M, Sytar O, Brestic M, Allakhverdiev SI (2019). Plasticity of photosynthetic processes and the accumulation of secondary metabolites in plants in response to monochromatic light environments: A review. *BBA - Bioenergetics*, 148131. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2019.148131>.

Lazzarini LES, Pacheco FV, Silva ST, Coelho AD, Medeiros APR, Bertolucci SKV, Pinto JEBP, Soares JDR (2017) Use of light-emitting diode (LED) in the physiology of cultivated plants—review. *Sci Agrar Paran* 16(2):137-144. <http://dx.doi.org/10.18188/1983-1471/sap.v16n1p137-144>.

Lee SH, Tewari RK, Hahn EJ, Paek KY (2007) Photon flux density and light quality induce changes in growth, stomatal development, photosynthesis and transpiration of *Withania somnifera* (L.) Dunal plantlets. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 90(2):141-151. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9191-2>.

Li H, Xu Z, Tang C (2010) Effect of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets *in vitro*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 103(2):155-163. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9763-z>.

Li H, Tang C, Xu Z (2013) The effects of different light qualities on rapeseed (*Brassica napus* L.) plantlet growth and morphogenesis *in vitro*. *Sci Hortic* 150(2):117-124. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.10.009>.

Li CX, Xu Z. G, Dong RQ, Chang SX, Wang LZ, Khalil-Ur-Rehman M, Tao JM (2017) An RNA-seq analysis of grape plantlets grown *in vitro* reveals different responses to blue, green, red LED light, and white fluorescent light. *Front Plant Sci* 8(2):78. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00078>.

Liu M, Xu Z, Guo S, Tang C, Liu X, Jao X (2014) Evaluation of leaf morphology, structure and biochemical substance of balloon flower (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) plantlets *in vitro* under different light spectra. *Sci Hortic* 174(1):112-118. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.05.006>.

Klem K, Gargallo-Garriga A, Rattanapichai W, Oravec M, Holub P, Veselá B, Sardans J, Peñuelas J, Urban O (2019) Distinct morphological, physiological, and biochemical responses to light quality in barley leaves and roots. *Front Plant Sci* 10:1026. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01026>.

Macedo AF, Leal-Costa MV, Tavares ES, Lage CLS, Esquibel MA (2011) The effect of light quality on leaf production and development of *in vitro*-cultured plants of *Alternanthera brasiliana* Kuntze. *Environ Exp Bot* 70(1):43-50. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.05.012>.

Manivannan A, Soundararajan P, Halimah N, KO CH, Jeong BR (2015) Blue LED light enhances growth, phytochemical contents, and antioxidant enzyme activities of *Rehmannia glutinosa* cultured *in vitro*. *Hortic Environ Biotechnol* 56(1):105-113. <https://doi.org/10.1007/s13580-015-0114-1>.

Manivannan A, Soundararajan P, Park YG, Wei H, Kim SH, Jeong BR (2017) Blue and red light-emitting diodes improve the growth and physiology of *in vitro*-grown carnations ‘Green Beauty’ and ‘Purple Beauty’. *Hortic. Environ. Biotechnol* 58(1):12-20. <https://doi.org/10.1007/s13580-017-0051-2>

Martínez-Estrada E, Caamal-Velázquez JH, Morales-Ramos V, Bello-Bello JJ (2016) Light emitting diodes improve *in vitro* shoot multiplication and growth of *Anthurium andreanum* Lind. *Propag Ornament Plants* 16(1):3-8.

Martins JR, Alvarenga AA, Castro EM, Silva APO, Oliveira C, Alves E (2009) Leaf Anatomy of alfavaca-cravo plants cultivated under colored nets. *Cienc. Rural.* 39 (1):82-87. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008005000040>.

Martins JPR, Schimildt ER, Alexandre RS, Falqueto AR, Otoni WC (2015a) Chlorophyll *a* fluorescence and growth of *Neoregelia concentrica* (Bromeliaceae) during acclimatization in response to light levels. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 51:471–481. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9711-z>.

Martins JPR, Verdoodt V, Pasqual M, De Proft M (2015b) Impacts of photoautotrophic and photomixotrophic conditions on *in vitro* propagated *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae). *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 123:121–132. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0820-5>.

Mengxi L, Zhigang X, Yang Y, Yijie F (2011) Effects of different spectral lights on *Oncidium* PLBs induction, proliferation, and plant regeneration. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 106(1):1– 10. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9887-1>.

Mitchell JD, Mori SA (1987) The cashew and its relatives (Anacardium: Anacardiaceae). *El marañón y sus parientes* (Anacardium: Anacardiaceae). *Mem N Y Bot Gard* 42(1):1-76.

Muneer S, Kim E, Park J, Lee J (2014) Influence of green, red and blue light emitting diodes on multiprotein complex proteins and photosynthetic activity under different light intensities in lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.). *Int J Mol Sci* 15(3):4657-4670. <https://doi.org/10.3390/ijms15034657>.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 5(3):473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.

Nadeem M, Abbasi BH, Younas M, Ahmad W, Zahir A, Hano C (2018) LED-enhanced biosynthesis of biologically active ingredients in callus cultures of *Ocimum basilicum*. *J Photoch Photobio B* 190(2):172-178. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.09.011>.

Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22:867–880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>.

Nhut DT, Huy NP, Tai NT, Nam NB, Luan VQ, Hien VT, Tung TH, Vinh TB, Luan TC (2015) Light-emitting diodes and their potential in callus growth, plantlet development and saponin accumulation during somatic embryogenesis of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. *Biotechnol Biotech Eq* 29(2):299-308. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.1000210>.

Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74(4): 418–425. <https://doi.org/10.1093/ajcn/74.4.418>.

O’Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59:368–373. <https://doi.org/10.1007/bf01248568>.

Oliveira DL (2011) Viabilidade econômica de algumas espécies medicinais nativas do cerrado. *Revista EVS* 38(2):301-332. <https://doi.org/10.18224/est.v38i2.2196>.

OuYang F, Mao JF, Wang J, Zhang S, Li Y (2015) Transcriptome analysis reveals that red and blue light regulate growth and phytohormone metabolism in Norway Spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. *PLoS ONE* 10(8): e0127896. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127896>.

Ouzounis T, Rosenqvist E, Ottosen CO (2015) Spectral effects of artificial light on plant physiology and secondary metabolism: A review. *HortSci* 50:1128-1135. <https://doi.org/10.21273/hortsci.50.8.1128>.

Pereira AC, Santos ER (2016) Frutas nativas do Tocantins com potencial de aproveitamento econômico. *Agri-environmental sciences* 1(1):22-37.

Pinnola A, Bassi R (2018) Molecular mechanisms involved in plant photoprotection *Biochem Soc Trans* 46(2):467–482. <https://doi.org/10.1042/bst20170307>.

Ramírez-Mosqueda MA, Iglesias-Andreu LG, Bautista-Aguilar JR (2017) The effect of light quality on growth and development of *in vitro* plantlet of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Sugar Tech* 19(3):331–336. <https://doi.org/10.1007/s12355-016-0459-5>.

Reis ES, Pinto JEBP, Rosado, LDS, Corrêa RM (2009) Teor e composição química do óleo essencial de *Melissa officinalis* L. *in vitro* sob influência do meio de cultura. *Acta Sci-Agron* 31(2):331-335. <https://dx.doi.org/10.1590/S1807-86212009000200021>.

Ríos-Ríos AM, Silva JVS, Fernandes JVM, Batista DS, Silva TD, Chagas K, Pinheiro MVM, Faria DV, Otoni WC, Fernandes SA (2019) Micropropagation of *Piper crassinervium*: an improved protocol for faster growth and augmented production of phenolic compounds. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01585-8>.

Rocha WS, Lopes RM, Silva DD, Vieira RF, Silva JP, Agostini-Costa TDS (2011) Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. *Rev Bras Frutic* 33:1215–1221. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011000400021>.

Ronen R, Galun M (1984) Pigment extraction from lichens with dimethyl sulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. *Environ Exp Bot* 24:239–245. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(84\)90004-2](https://doi.org/10.1016/0098-8472(84)90004-2).

Rosa, WS, Martins JPR, Rodrigues ES, de Almeida Rodrigues LC, Gontijo ABPL, Falqueto AR. (2018). Photosynthetic apparatus performance in function of the cytokinins used during the *in vitro* multiplication of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae). *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 133(3):339–350. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1385-x>.

Rosa M, Rubio Neto A, Marques VO, Silva FG, de Assis ES, Costa AC, Dantas LA, Pereira PS (2019). Variations in photon flux density alter the morphophysiological and chemical

characteristics of *Anacardium othonianum* Rizz. *in vitro*. Plant Cell, Tissue Organ Cult. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01744-x>.

Sæbø A, Krekling T, Appelgren M (1995) Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. Plant Cell, Tissue Organ Cult 41(2):177–185. <https://doi.org/10.1007/bf00051588>.

Sha Valli Khan P, Kozai T, Nguyen QT, Kubota C, Dhawan V (2003) Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. Biol Plantarum 46:161-166. <https://doi.org/10.1023/A:1022844720795>.

Sharma H (2017) Role of growth regulators in micropropagation of woody plants: A review. Int J Adv Res 5(2):2378-2385. <https://doi.org/10.21474/IJAR01/3421>.

Silva MR, Lacerda DBCL, Santos GG, Martins DMO (2008) Caracterização química de frutos nativos do cerrado. Cienc Rural 38(6):1790-1793. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000600051>.

Silva MM A, Oliveira ALB, Oliveira-Filho RA, Camara T, Willadino L, Gouveia-Neto A (2016) The effect of spectral light quality on *in vitro* culture of sugarcane. Acta Sci Biol Sci 38(2):157-161. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v38i2.31109>.

Silva ST, Bertolucci SKV, Cunha SHB, Lazzarini LES, Tavares MC, Pinto JEBP (2017) Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. Plant Cell, Tissue Organ Cult 129(3):501–510. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1195-6>.

Souza RP, Ribeiro RV, Machado EC, Oliveira RF, Silveira JAG (2005) Photosynthetic responses of young cashew plants to varying environmental conditions. Pesq agropec bras 40(8):735-744. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2005000800002>.

Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Srivastava A. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus M, Pather U, Mohanly P. (Eds.) (2000) Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation. London: Taylor and Francis, p. 445-483.

Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Srivastava A (2004) Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. In: Papageorgiou GC, Govindjee (eds) Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis. Kluwer Academic Publishers Press, Dordrecht, pp 321–362. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_12).

Su N, Wu Q, Shen Z, Xia K, Cui J (2014) Effects of light quality on the chloroplastic ultrastructure and photosynthetic characteristics of cucumber seedlings, *Plant Growth Regul* 73:227-235. <https://doi.org/10.1007/s10725-013-9883-7>.

Taiz L, Zeiger E, Moller I, Murphy A (2017) *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 888 p.

Tanaka A, Ito H, Tanaka R, Tanaka NK, Yoshida K, Okada K (1998) Chlorophyll *a* oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll *b* formation from chlorophyll *a*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(21):12719–12723. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12719>.

Tennessen DJ, Singaas EL, Sharkey, TD (1994) Light-emitting diodes as a light source for photosynthesis research. *Photosynth Res* 39(1):85-92. <https://doi.org/10.1007/bf00027146>.

Terfa MT, Solhaug KA, Gislørød HR, Olsen JE, Torre S (2013) A high proportion of blue light increases the photosynthesis capacity and leaf formation rate of *Rosa × hybrida* but does not affect time to flower opening. *Plant Physiol* 148(1):146-159. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01698.x>.

Toyomasu T, Tsuji H, Yamane H, Nakayama M, Yamaguchi I, Murofushi N, Takahashi N, Inoue Y. (1993). Light effects on endogenous levels of gibberellins in photoblastic lettuce seeds. *J Plant Growth Regul* 12(2):85–90. <https://doi.org/10.1007/bf00193238>.

Trouwborst G, Hogewoning SW, Van Kooten O, Harbinson J, Van Ieperen W (2016) Plasticity of photosynthesis after the “red light syndrome” in cucumber. *Environ Exp Bot* 121:75–82. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.05.002>.

Van Huylenbroeck J, Piqueras A, Debergh P (2000) The evolution of photosynthetic capacity and the antioxidant enzymatic system during acclimatization of micropropagated *Calathea* plants. *Plant Sci* 155:59–66. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X).

XiaoYing L, ShiRong G, ZhiGang X, XueLei J, Tezuka JXT (2011) Regulation of chloroplast ultrastructure, cross-section anatomy of leaves, and morphology of stomata of cherry tomato by different light irradiations of light-emitting diodes. *HortScience* 46(2):217-221. <https://doi.org/10.21273/HortSci.46.2.217>.

Xu J, Yan Z, Xu Z, Wang Y, Xie, Z (2018) Transcriptome analysis and physiological responses of the potato plantlets *in vitro* under red, blue, and white light conditions. *3 Biotech*, 8(9). <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1410-0>.

Wellburn AR (1994) The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Plant Physiol Biochem* 144(3):307-313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2).

Yusuf MM, Kumar D, Rajwanshi R, Strasser RJ, Tsimilli-Michael M, Govindjee Sarin NB (2010) Overexpression of  $\gamma$ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: physiological and chlorophyll fluorescence measurements. *Biochim Biophys Acta* 1797:1428–1438. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.002>.

Zhang ZZ, Li XX, Chu YN, Zhang MX, Wen YQ, Duan CQ, Pan QH (2012) Three types of ultraviolet irradiation differentially promote expression of shikimate pathway genes and production of anthocyanins in grape berries. *Plant Physiol Bioch* 57:74–83. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.05.005>.

## CONCLUSÃO GERAL

Foi possível regenerar plantas de *A. othonianum* em diferentes condições de luminosidade *in vitro*, sendo a densidade de fluxo de fótons de aproximadamente  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a mais adequada para o crescimento e a produção de compostos fenólicos. No entanto, plantas sob luz vermelha e verde tiveram respostas típicas da síndrome de evitação à sombra. Faixas espectrais mais enriquecidas, como as proporcionadas por LEDs brancos ou azuis + vermelhos, permitem o equilíbrio entre as características morfofisiológicas promovendo o estímulo fotoautotrófico desta espécie *in vitro*.