

Efeitos da qualidade de luz na germinação e desenvolvimento inicial *in vitro* de *Phyllanthus tenellus*¹

Light quality effects on germination and initial development *in vitro* of *Phyllanthus tenellus*

Cristiane Pimentel Victório^{2*} e Celso Luiz Salgueiro Lage³

Resumo - Este trabalho teve como objetivo avaliar a germinação de sementes e o desenvolvimento inicial *in vitro* de *Phyllanthus tenellus* sob diferentes faixas do espectro luminoso, bem como o uso do meio MS com redução da concentração de nitrogênio no desenvolvimento das plântulas. As sementes foram desinfestadas e inoculadas em meio MS sólido. As sementes e as plantas foram mantidas sob os seguintes tratamentos de luz: branca (controle), azul, verde, vermelha e branca acrescida de UV-A. As sementes germinaram tanto sob luz, quanto no escuro. A máxima porcentagem de germinação foi obtida na 12ª semana, sob luz vermelha (12%), considerada muito baixa. A luz vermelha também aumentou a velocidade de germinação. A porcentagem de enraizamento foi maior sob luz vermelha (80%) e branca (71,4%), e reduzida sob luz azul (51%). A exposição à luz azul resultou em plântulas com maior número de folhas. A redução à metade das concentrações de NH_4NO_3 e KNO_3 do meio MS aprimorou o enraizamento, adequando as melhores condições para o estabelecimento *in vitro* das culturas de *P. tenellus*.

Palavras-chave - Phyllanthaceae. Plantas. Efeitos da luz. Tecidos vegetais. Cultura e meios de cultura.

Abstract - The present research aimed to evaluate the effect of different light spectra on seed germination and initial *in vitro* development of *Phyllanthus tenellus* Roxb. Furthermore, N concentration was evaluated in plant development. Seeds were sterilized and inoculated in solid MS medium. Seeds and plantlets were maintained under the following light treatments: white (control), blue, green, red and white plus UV-A. Seed germination was observed under light and darkness. Under red light, germination showed the greatest percentage (12%) after 12th week, considered very low. Germination rate also increased under red light. Rooting was favored by red light (80%) and white light (71.4%), and reduced under blue light (51%). As results from blue light exposure plantlets presented the highest number of leaves. MS medium reduced to half of NH_4NO_3 and KNO_3 solution improved rooting and revealed the best conditions to *in vitro* establishment of *P. tenellus* cultures.

Key words - Phyllanthaceae. Medicinal plants. Light effects. Plant tissue. Culture media.

* Autor para correspondência

¹Recebido para publicação em 20/11/2008; aprovado em 21/05/2009

Parte da dissertação de mestrado apresentada ao IBCCF/UFRJ, pesquisa financiada pela PROAP/PROEX

²Laboratório de Fisiologia Vegetal, IBCCF/UFRJ, Av. Carlos Chagas Filho, s/n, 21952-590, CCS, Bloco G, sala G2-050. Rio de Janeiro-RJ, Brasil, crispv@biof.ufrj.br

³IBCCF/UFRJ, Rio de Janeiro-RJ, Brasil, elslage@biof.ufrj.br

Introdução

A germinação é uma etapa importante para iniciação da cultura *in vitro* de tecidos vegetais, sendo também uma estratégia promissora na obtenção de plantas em grande quantidade (KULKAMI et al., 2006). Tanto as características intrínsecas quanto os fatores ambientais interferem nas respostas de germinação e desenvolvimento de diferentes espécies. Entre eles, a luz é um fator físico que desencadeia sinais internos de ativação ou inativação de vias metabólicas nas sementes e nas plantas (BHATTACHARYA; KHUSPE, 2001; KERBAUY, 2008). A ação da luz na regulação fisiológica do vegetal é precedida pela sua absorção por fotorreceptores, tais como os da família de fitocromos e criptocromos. (MORELLI; RUBERTI, 2000). Os fotorreceptores são fundamentais na fotomodulação de várias respostas morfogênicas do vegetal. Os fitocromos são cromoproteínas interconversíveis entre a forma inativa e ativa. Quando a forma inativa absorve luz vermelha ou luz azul, altera a conformação estrutural de seu cromóforo e se converte em forma ativa, e ao absorver na faixa do vermelho extremo retorna à forma inativa. Sementes de diferentes espécies emitem respostas fisiológicas distintas conforme a qualidade e intensidade de luz (KULKAMI et al., 2006). A transição da condição heterotrófica do embrião, dependente das reservas nutritivas, para o estágio autotrófico da plântula é regulado pela luz (KERBAUY, 2008). A avaliação de diferentes qualidades de luz no desenvolvimento vegetal revela variações nos parâmetros morfológicos e fisiológicos e na otimização da produção de metabólitos primários e especiais (ISLAM et al., 1999; VICTÓRIO et al., 2007a; VICTÓRIO et al., 2007b; VICTÓRIO; LAGE, 2009). Em relação à radiação UV-A e luz verde, esta última referenciada como luz de segurança em experimentos de germinação, são poucos os trabalhos que avaliam e direcionam os efeitos decorrentes da interação destas faixas espectrais e o desenvolvimento das plantas (DAUGHER; BUGBEE, 2001; SILVA et al., 2005).

O meio de Murashige e Skoog (MS) foi um dos primeiros elaborados para aplicação em cultura de tecidos vegetais, sendo hoje amplamente utilizado na propagação *in vitro* de espécies vegetais. É constituído de 15 nutrientes minerais distribuídos entre micro e macronutrientes conforme a concentração na mistura. Estes nutrientes são fundamentais para o desenvolvimento vegetal (EPSTEIN; BLOOM, 2005; NIEDZ; EVENS, 2007). Diferentes modificações têm sido feitas na constituição quantitativa destes minerais do meio MS no intuito de melhorar parâmetros morfológicos e fisiológicos em cultivos *in vitro*, como desenvolvimento de embriões, regulação do crescimento, aumento em biomassa, indução de raízes e redução da vitrificação (NIEDZ; EVENS, 2007). A

redução da concentração de nitrogênio do meio MS está muitas vezes associada ao aspecto vitrificado das plantas cultivadas *in vitro* (HAZARIKA, 2006).

A espécie *Phyllanthus tenellus* Roxb. (Phyllanthaceae) é uma erva que apresenta em sua constituição química uma diversidade de substâncias fenólicas (KUMARAN; KARUNAKARAN, 2007), sendo muito utilizada e comercializada como fitoterápica tanto no Brasil quanto em outros países para tratar doenças renais e hepatites (CALIXTO et al., 1998; LEE et al., 2006; WRIGHT et al., 2007). A introdução *in vitro* desta espécie representa uma alternativa para se obter culturas padronizadas e assépticas a fim de se obter matéria-prima de qualidade em curto período de tempo. Em vista disto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a germinação e desenvolvimento inicial *in vitro* de *P. tenellus* sob ação de diferentes faixas do espectro luminoso e estabelecer as condições nutritivas para produzir plantas *in vitro* da espécie.

Material e métodos

Exemplar da espécie *Phyllanthus tenellus*, fonte das sementes utilizadas neste trabalho, foi identificado e depositado no Herbário do Museu Nacional do Rio de Janeiro, sob o número R 200872.

Os frutos de *P. tenellus* foram coletados aleatoriamente das plantas mantidas na casa de vegetação do Programa de Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal do Rio de Janeiro, entre os meses abril e maio. Por três dias, os frutos foram mantidos em temperatura ambiente para secagem, após o que as sementes foram retiradas. Foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar através do seguinte protocolo: imersão em etanol 70% - 1 min; lavagens em solução aquosa de detergente comercial (3 gotas) - 15 min; imersão em água sanitária comercial a 20% - 1 min, cada etapa seguida de lavagens em água destilada.

Após desinfestação, as sementes foram introduzidas em tubos de ensaio (100x15 mm) contendo o meio básico MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose; 1,3 µM tiamina-HCl; 3 µM piridoxina; 4,1 µM ácido nicotínico; 0,6mM mio-inositol e solidificado com 7,8 g L⁻¹ agar. O pH foi ajustado antes de ser autoclavado em 5,8 ± 0,2. A esterilização foi feita em autoclave a 120 °C e 1,1 kgf cm², por 15 min. As sementes foram mantidas em sala de crescimento, em prateleiras isoladas para cada tratamento de luz, uma lâmpada por prateleira, ou condição de escuro. A temperatura foi controlada a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas.

Para cada tratamento de luz contínua foi utilizada uma lâmpada fluorescente Sylvania® (F20 W T-12): branca

(controle, 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); azul (17 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); verde (12 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); vermelha (14 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e branca acrescida de UV-A (16 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A lâmpada UV-A emite radiação entre os comprimentos de onda 330 e 380 nm e possui significativa quantidade de luz azul ($\lambda = 380 \text{ nm}$). As irradiâncias foram obtidas utilizando-se um medidor de quantum (Biospherical Instruments Inc., QSL-100). A condição de escuro foi obtida envolvendo-se as estantes com os tubos de ensaio em papel alumínio e colocadas em câmara escura. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições de 25 sementes, em esquema fatorial 6 x 4. Foi considerada como início da germinação a protrusão da radícula. A germinação foi avaliada semanalmente, durante doze semanas (84 dias) para os tratamentos de luz.

Após 20 dias do processo germinativo, as plântulas mantidas nas mesmas condições de luz tiveram o seu desenvolvimento inicial avaliado quanto ao número de brotos, altura dos brotos, número de folhas e porcentagem de enraizamento. Foram avaliadas no mínimo 30 plantas, em três conjuntos de 10 plantas por tratamento de luz.

Segmentos nodais obtidos de plantas germinadas *in vitro* foram inoculados em meio MS básico e MS modificado, com redução à metade das concentrações de NH_4NO_3 e KNO_3 que contêm nitrogênio ($\text{MS}_{1/2}\text{N}$), acrescido de 30 g L^{-1} de sacarose, vitaminas e mio-inositol, como já citado, e 7,8 g L^{-1} agar. O pH foi ajustado para $5,8 \pm 0,2$. Foram testadas duas combinações nutricionais de meios de cultura, MS e $\text{MS}_{1/2}\text{N}$. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições de 10 plantas. As culturas foram mantidas nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo descritas acima.

As análises para porcentagem de enraizamento foram feitas através do teste da diferença entre duas porcentagens (p_1 e p_2), ao nível de significância 5%, utilizando o programa Statística 6.0[®]. Os dados das médias de número de brotos, altura dos brotos e número de folhas foram submetidos à

análise de variância (ANOVA) e as comparações estatísticas foram feitas utilizando-se o teste de Tukey, significância de 5%, no programa Graph Pad InStat 3.0[®].

Resultados e discussão

O protocolo elaborado para desinfestação das sementes de *P. tenellus* foi 100% eficiente. O início da germinação foi verificado a partir da segunda semana apenas para as sementes sob luz vermelha, para luz branca a partir da terceira semana e para os outros tratamentos de luz a partir da quarta semana (Tabela 1 e Figura 1A e B). O percentual de germinação sob luz vermelha diferiu de forma significativa da luz branca ($p = 0,016$), luz azul ($p = 0,016$) e luz branca acrescida de UV-A ($p = 0,006$). As sementes germinaram tanto na presença como na ausência de luz, sendo consideradas em termo classificatório como indiferentes à luz (DINIZ et al., 2008). Venturi e Randi (1997) verificaram diferenças acentuadas na germinabilidade de *P. tenellus* no campo, entre as condições de claro e escuro, ou comportamento fotoblástico negativo conforme a época de coleta das sementes.

A incidência da luz vermelha resultou em 12% de germinação e respostas mais rápidas, o que sugere uma alteração do processo de germinação. A germinação sob luz vermelha aumentou gradativamente até a 12^a semana, diferente das outras luzes, nas quais, após a 6^a semana, não houve incremento na porcentagem de germinação. A luz vermelha é relatada como estimuladora da germinação de sementes de várias espécies (KERBAUY, 2008). As respostas obtidas para indução da germinação, sob luz vermelha, podem estar relacionadas à regulação da biossíntese das giberelinas pelo fitocromo ativo (TOYOMASU et al., 1998), visto que as giberelinas atuam diretamente na promoção da germinação (LONVEGROVE; HOOLEY, 2000). Ao absorver a luz

Tabela 1 - Efeito de diferentes qualidades de luz na germinação *in vitro* de sementes de *Phyllanthus tenellus*, durante 12 semanas ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$)

Qualidade de Luz	Germinação (%)						
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	12 ^a
Branca	-	-	2 a	3 a	3 a	3 a	3 b
Azul	-	-	-	3 a	3 a	3 a	3 b
Vermelha	-	2	3 a	7 a	7 a	8 a	12 a
Verde	-	-	-	6 a	6 a	6 a	6 ab
Branca+UV-A	-	-	-	2 a	2 a	2 a	2 b
Escuro	*	*	*	*	*	*	3 b

Letras diferentes indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, $n = 100$. * Período na ausência de luz

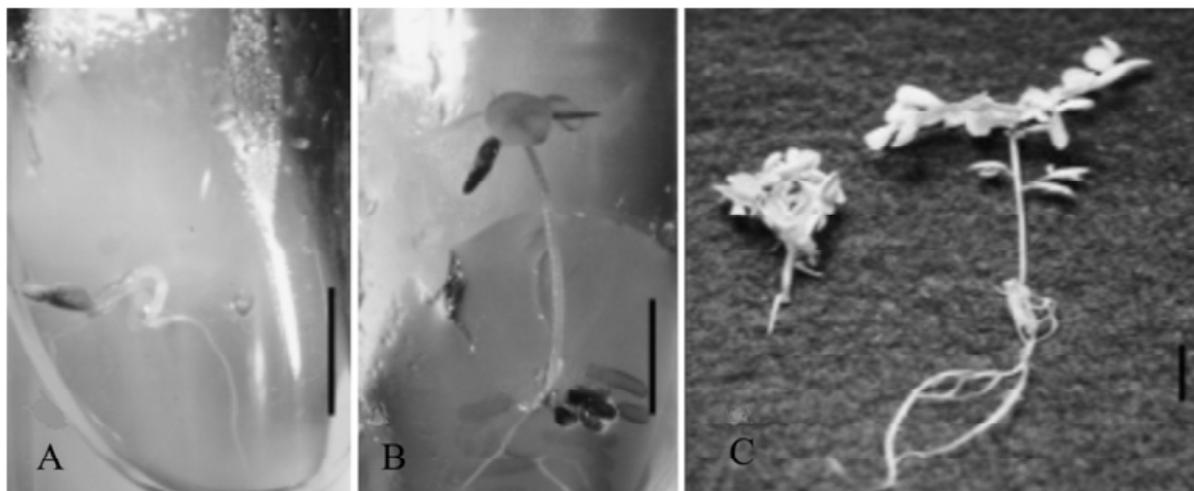


Figura 1 - Germinação *in vitro* de *Phyllanthus tenellus*. A - Plântula após 2 dias; B - Plântulas com 8 dias. C - Plantas com 40 dias de cultivo *in vitro* em meio MS0 e MS $\frac{1}{2}$ N. Barra = 1 cm

vermelha, fitocromos presentes nas sementes convertem-se entre as formas ativa e inativa, resultando em estímulo ou inibição do processo germinativo (SMITH, 2000). A similaridade nas respostas para luz azul e luz branca acrescida de UV-A pode estar relacionada ao criptocromo responsável por absorver os comprimentos de onda na faixa do azul (GYULA et al., 2003).

Vale ressaltar que a porcentagem de germinação *in vitro* de sementes de *P. tenellus* foi muito baixa mas permitiu a introdução *in vitro* de *P. tenellus* para iniciar as culturas organogênicas. A heteromorfia, presença de sementes marrons e amarelas que ocorrem em porcentagens variadas ao longo do ano, foi considerada um fator relevante na germinação de sementes de *P. tenellus*, resultando em porcentagens altas ou baixas em estudos no campo (VENTURI; RANDI, 1997). Estes dados podem indicar uma relação com a baixa taxa germinativa obtida *in vitro*.

Nos sistemas *in vitro*, as culturas introduzidas por sementes passam de um estágio germinativo, no qual os nutrientes do meio não interferem de forma significativa

no processo fisiológico, para outro estágio que mescla o autotrófico e o heterotrófico resultante das condições de cultivo *in vitro*: adição de nutrientes e carboidrato ao meio de cultura e baixa intensidade luminosa que condicionam as plantas a apresentarem uma deficiência no processo fotossintético. Ainda assim, nesta configuração, a intensidade e qualidade de luz participam como fator importante no desenvolvimento do aparato fotossintético e na morfogênese vegetal. O desenvolvimento inicial *in vitro* das plantas, após 20 dias da germinação, foi influenciado de forma significativa pelas qualidades de luz (Tabela 2).

Foi obtido maior enraizamento para as plantas mantidas sob luz vermelha (80%) e branca (71,4%). Os resultados obtidos para luz vermelha sugerem uma ação dos fitocromos no processo de enraizamento. Cerca de 80% das plântulas enraizaram sob luz vermelha em comparação com os 71,4% sob luz branca. Diferentes espectros de luz podem aumentar a proporção de formas ativas dos fitocromos, desencadeando respostas no desenvolvimento vegetal. Sob luz azul, as plantas

Tabela 2 - Desenvolvimento inicial das plântulas de *Phyllanthus tenellus*, após 20 dias da germinação *in vitro*

Qualidade de Luz	Número de brotos	Altura dos brotos	Número de folhas	Enraizamento (%)
Branca	1,29±0,48 a	1,48±0,59 ab	4,79±1,30 b	71,4 ab
Azul	1,17±0,38 a	1,15±0,40 c	5,53±1,36 a	51,0 c
Vermelha	1,41±0,60 a	1,39±0,49 b	4,64±1,40 b	80,0 a
Verde	1,39±0,61 a	1,47±0,45 ab	4,28±1,47 b	64,7 bc
Branca + UV-A	1,10±0,31 a	1,55±0,43 a	4,63±1,14 b	65,6 bc

Diferentes letras para mesma coluna indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, $n \geq 30$

apresentaram número reduzido de raízes (51%). A absorção da luz azul por fotorreceptores presentes nos órgãos vegetais modifica a conformação de flavoproteínas que constituem os criptocromos e, com isso, sua estrutura morfológica e fisiológica é alterada. Efeitos como a redução do tamanho de raízes de *Carica papaya* também foi verificada sob luz azul (ASCENCIO-CABRAL et al., 2008). As plantas mantidas sob luz azul apresentaram maior número de folhas em relação aos outros tratamentos de luz. A adição de UV-A não resultou em prejuízo para as culturas em relação aos parâmetros avaliados, considerando a luz branca como referência. Embora os fotorreceptores de luz azul e UV-A sejam os criptocromos, algumas respostas no desenvolvimento *in vitro* divergiram, como o número de folhas e altura dos brotos, indicando mecanismos diferentes de ação deste grupo de fotorreceptores. Ou, conforme estudos com *Arabidopsis*, as respostas à luz azul e UV-A podem ser mediadas por diferentes tipos de criptocromos e por isso a variação na fisiologia do desenvolvimento (KERBAUY, 2008). O espectro da luz

verde é pouco absorvido pelos fitocromos e por isso esta luz é considerada de segurança. Nestes experimentos, os resultados obtidos para luz verde foram semelhantes para todos os parâmetros morfológicos avaliados em relação à luz branca.

Após germinação, segmentos das plantas foram utilizados para iniciar os subcultivos *in vitro*. O meio MS $\frac{1}{2}$ N foi mais adequado por diminuir o aspecto vitrificado de algumas plantas, triplicar a porcentagem de enraizamento e aumentar a altura dos brotos (Figura 1C e Figura 2). A redução à metade das soluções contendo nitrogênio dos constituintes do meio MS, no intuito de obter menor porcentagem de vitrificação, foi verificada também em estudos *in vitro* com *Calendula officinalis* (VICTÓRIO et al., 2008). O nitrogênio é um dos fatores responsáveis pela hiperidricidade ou vitrificação das culturas (HAZARIKA, 2006), resultando em plantas com deformações morfológicas e alterações fisiológicas. Os dados apresentados neste trabalho indicam que a redução da concentração das soluções NH $_4$ NO $_3$ e KNO $_3$ é uma alternativa para evitar estes efeitos. Diferentes combinações de nutrientes nos meios de cultura têm sido utilizados na implementação da produção *in vitro* de espécies vegetais (JAIN et al., 2008; NIEDZ; EVENS, 2007). Alterações nas concentrações dos micro e macronutrientes que compõem os meios de cultura resultam em variações significativas dos parâmetros de desenvolvimento vegetal (RAMAGE; WILLIAMS, 2002).

A introdução *in vitro* de *P. tenellus* permite a manipulação das condições de cultivo, viabiliza a obtenção de mudas assépticas em larga escala e garante segurança específica do material botânico ante a gama de espécies de *Phyllanthus*.

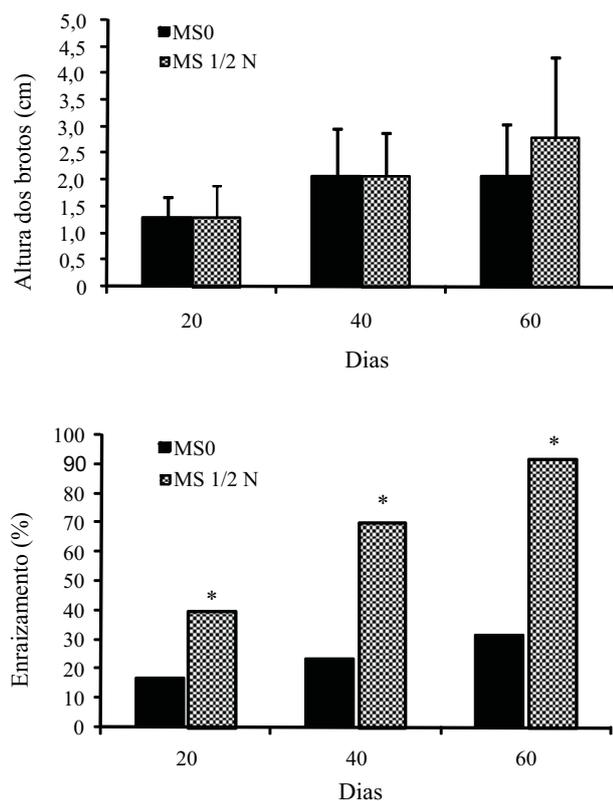


Figura 2 - Respostas no desenvolvimento *in vitro* de *Phyllanthus tenellus* nos diferentes meios. MS $\frac{1}{2}$ N (meio MS reduzido a metade das concentrações de NH $_4$ NO $_3$ e KNO $_3$). *Indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, $n \geq 30$

Conclusões

1. A germinação *in vitro* de sementes de *P. tenellus* foi baixíssima após o período de 12 semanas, registrando um leve aumento na porcentagem de germinação sob luz vermelha e uma redução do tempo de início da germinação.
2. As qualidades de luz interferiram nos aspectos morfogênicos e fisiológicos. A principal variação foi o aumento na porcentagem de enraizamento sob luz vermelha e diminuição sob luz azul.
3. A introdução *in vitro* de *P. tenellus* por organogênese direta, em meio MS $\frac{1}{2}$ N, foi mais favorável para o desenvolvimento das culturas, mostrando 60% de enraizamento a mais que o meio básico de MS e aumento na altura dos brotos.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos órgãos de fomento CAPES/PROAB/PROEX e FAPERJ pelo suporte financeiro.

Referências

- ASCENCIO-CABRAL, A. et al. Plant regeneration of *Carica papaya* L. through somatic embryogenesis in response to light quality, gelling agent and phloridzin. **Scientia Horticulturae**, v. 118, n. 02, p. 155-160, 2008.
- BHATTACHARYA, J.; KHUSPE, S. S. In vitro and in vivo germination of papaya (*Carica papaya* L.) seeds. **Scientia Horticulturae**, v. 91, n. 01-02, p. 39-49, 2001.
- CALIXTO, J. B. et al. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology and therapeutic potential. **Medical Research Review**, v. 18, n. 04, p. 225-258, 1998.
- DAUGHER, T. A. O.; BUGBEE, B. Evidence for yellow light suppression of lettuce growth. **Photochemistry and Photobiology**, v. 73, n. 02, p. 208-212, 2001.
- DINIZ, F. O. et al. Influência da luz e temperatura na germinação de sementes de oiticica (*Licania rigida* Benth.). **Revista Ciência Agrônômica**, v. 39, n. 03, p. 476-480, 2008.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Mineral nutrition of plants: principles and perspectives**. 2. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2005. 400 p.
- GYULA, P.; SCHÄFER, E.; NAGY, F. Light perception and signalling in higher plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 06, n. 05, p. 446-452, 2003.
- HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. **Science Horticulturae**, v. 108, n. 02, p. 105-120, 2006.
- JAIN, N. et al. The effect of medium, carbon source and explant on regeneration and control of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens*. **South African Journal of Botany**, v. 75, n. 01, p. 117-121, 2008.
- ISLAM, M. O.; MATSUI, S.; ICHIHASHI, S. Effects of light quality on seed germination and seedling growth of *Cattleya* orchids in vitro. **Japan Society Horticulture Science**, v. 68, n. 06, p. 1132-1138, 1999.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2008. 431 p.
- KULKAMI, M. G.; SPARG, S. G.; STADEN, J. V. Dark conditioning, cold stratification and a smoke-derived compound enhance the germination of *Eucomis autumnalis* sbsp. *autumnalis* seeds. **South African Journal of Botany**, v. 72, n. 01, p. 157-162, 2006.
- KUMARAN, A.; KARUNAKARAN, R. J. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. **LWT**, v. 40, n. 02, p. 344-352, 2007.
- LEE, C. Y. et al. Hepatoprotective effect of *Phyllanthus* in Taiwan on acute liver damage induced by carbon tetrachloride. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 34, n. 03, p. 471-482, 2006.
- LONVEGROVE, A.; HOOLEY, R. Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. **Trends in Plant Science**, v. 05, n. 03, p. 102-110, 2000.
- MORELLI, G.; RUBERTI, I. Shade avoidance response, driving auxin along lateral routes. **Plant Physiology**, v. 122, p. 621-626, 2000.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 03, p. 473-497, 1962.
- NIEDZ, R. P.; EVENS, T. J. Regulating plant tissue growth by mineral nutrition. **In Vitro Cellular & Development Biology - Plant**, v. 43, n. 04, p. 370-381, 2007.
- RAMAGE, C.M.; WILLIAMS, R.R. Mineral nutrition and plant morphogenesis. **In Vitro Cellular & Development Biology - Plant**, v. 38, n. 02, p. 1054-5476, 2002.
- SILVA, N. C. B. et al. Developmental effects of additional ultraviolet A radiation growth regulators and tyrosine in *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze cultured in vitro. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 05, p. 779-786, 2005.
- SMITH, H. Phytochromes and light signal perception by plants - an emerging synthesis. **Nature**, v. 407, n. 6804, p. 585-591, 2000.
- TOYOMASU, T. et al. Phytochrome regulates gibberellin biosynthesis during germination of photoblastic Lettuce seeds. **Plant Physiology**, v. 118, n. 04, p. 1517-1523, 1998.
- VENTURI, S.; RANDI, A. M. Influência da coloração das sementes na germinação de *Phyllanthus tenellus* Roxb. e *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 11, n. 01, p. 87-94, 1997.
- VICTÓRIO, C. P.; KUSTER, R. M.; LAGE, C. L. S. Qualidade de luz e produção de pigmentos fotossintéticos em plantas in vitro de *Phyllanthus tenellus* Roxb. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 05, n. 02, p. 213-215, 2007a.
- VICTÓRIO, C. P.; TAVARES, E. S.; LAGE, C. L. S. Anatomia de plantas de *Phyllanthus tenellus* Roxb. cultivadas in vitro sob diferentes qualidades de luz. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 216-218, 2007b.
- VICTÓRIO, C. P. et al. Sucrose on in vitro cultures of *Calendula officinalis* L. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 04, n. 01, p. 34-41, 2008.
- VICTÓRIO, C. P.; LAGE, C. L. S. Effects of light qualities and growth regulators on in vitro flowering of *Phyllanthus tenellus* Roxb. **General and Applied Plant Physiology**, 2009. No prelo.
- WRIGHT, C. I. et al. Herbal medicines as diuretics: A review of the scientific evidence. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 01, p. 1-31, 2007.