



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DO  
MARANHÃO



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**ADRIELY SÁ MENEZES DO NASCIMENTO**

**EFEITO DO FOTOPERÍODO NA MORFOFISIOLOGIA DE ABACAXIZEIRO  
CULTIVADO *IN VITRO* EM SISTEMA FOTOMIXOTRÓFICO**

São Luís – MA

2026

**ADRIELY SÁ MENEZES DO NASCIMENTO**

**EFEITO DO FOTOPERÍODO NA MORFOFISIOLOGIA DE ABACAXIZEIRO  
CULTIVADO *IN VITRO* EM SISTEMA FOTOMIXOTRÓFICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências Agrárias – PPGCIAG/CCA/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias.

**Orientador:** Prof. Dr. Diego Silva Batista

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thais Roseli Corrêa

São Luís – MA

2026

**ADRIELY SÁ MENEZES DO NASCIMENTO**

**EFEITO DO FOTOPERÍODO NA MORFOFISIOLOGIA DE ABACAXIZEIRO  
CULTIVADO *IN VITRO* EM SISTEMA FOTOMIXOTRÓFICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências Agrárias – PPGCIAG/CCA/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias.

Aprovada em: 20/02/2026

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Diego Silva Batista (Orientador)  
Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

---

Prof. Dr. Fábio Afonso Mazzei Moura de Assis Figueiredo  
Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

---

Prof. Dr. Sérgio Heitor Sousa Felipe  
Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA)

São Luís – MA

2026

Nascimento, Adriely Sá Menezes do.

Efeito do fotoperíodo na morfofisiologia de abacaxizeiro cultivado in vitro em sistema fotomixotrófico./ Adriely Sá Menezes do Nascimento. - São Luís - MA, 2026.

78f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual do Maranhão, 2026 .

Orientador: Prof. Dr. Diego Silva Batista.

1. Ananas comosus (L.) Merrill. 2. Micropropagação. 3. Luminosidade. 4. Fotossíntese. 5. Ritmo circadiano. I. Título.

CDU: 634.774:577.355

*Dedico este trabalho aos meus pais, Sanes Léa Maciel Sá Menezes e José Adriano Carvalho do Nascimento, que me deram a vida desde o primeiro evento biológico que possibilitou minha existência. O cuidado, o apoio e o amor de vocês foram essenciais para que eu florescesse ao longo dessa trajetória acadêmica e pessoal. Amo vocês!*

*"A persistência é o caminho do êxito"*

Charles Chaplin.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pelo dom da vida e por me motivar a cada dia a superar todos os desafios encontrados ao longo dessa jornada, que é a vida, e por colocar pessoas tão incríveis em todas as áreas dela.

Aos meus pais, José Adriano e Sanes Léa, por tanto amor, carinho e cuidado em todos os momentos da minha vida.

Aos meus avós, Maria Goreth, Josedna Carvalho, José Antônio e Domingos Sá Menezes (*In memoriam*) por todo amor e bondade sobre mim.

As minhas irmãs, Sandrielle, Sandy Hellen e Arielly por serem luz na minha vida e muito companheiras.

A minha família, em especial meus tios: Ronilson Sá Menezes, Cleudilene Pereira, Dalinajara Maciel, Adriane Carvalho, Salete Maciel, José Rosendo, Maria do Espírito Santos, Jamilson Maciel e minhas primas Andréa Rosa, Ianara Jennyffer, Itaciara Jenny e Josephane Santos por todo o amor e incentivo.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Diego Silva Batista por toda confiança depositada em mim, pela constante disponibilidade e pelas contribuições fundamentais ao longo deste trabalho, realizadas com excelência mesmo à distância.

Ao meu grande amigo, Prof. Dr. Sergio Heitor Sousa Felipe, por todo o apoio, paciência e dedicação em transmitir seus conhecimentos, pelas palavras de incentivo e pelas valiosas contribuições, sugestões e discussões ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À minha coorientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thais Roseli Corrêa, por abrir as portas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetal (LCT) para mim, pelas ricas contribuições, pelos ensinamentos valiosos, e por ser esse ser humano inspirador.

Aos meus amigos, Fernanda Oliveira e Matheus Henrique pela valiosa amizade e companheirismo, por compartilharem comigo os mesmos desafios e perrengues desde o início do mestrado.

Aos amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos, em especial Fernanda Oliveira, Myrella Katlhen, Matheus Henrique, Thayanna Vieira, Vitória Karla, Cinthya Veras, Nahor Diniz, Thainan Gomes, Tamires de Moura, Hivine Raquel, Priscila Marlys, Jordanya Pinheiro, Irislene Albuquerque, Darlyara Silva, Givago Lopes, Anyela Rios, Osmar Vasconcelos, Vanessa Lira, Lukas Allayn, dona Maria, Maria Cristina e aos amigos do Laboratório de Ciências Ambientais e Biodiversidade, Robson Felipe e Patrick Silva pelo apoio e ajuda na execução deste trabalho, vocês foram fundamentais.

As minhas amigas, Taís Sousa, Flavia Myllena, Rita de Cássia, Ana Cristina Mendonça, Wendy Vasconcelos e Danyelle Lopes pela valiosa amizade ao longo desses anos.

À secretária do PPGCIAG, Rayanne Ferreira por desempenhar sua função com responsabilidade e por sempre está disposta a ajudar os alunos.

À Universidade Estadual do Maranhão em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

Agradeço a todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, sintam-se abraçados por mim!!!

## Sumário

|  |    |
|--|----|
| Lista de Figuras .....   | 10 |
| Lista de tabelas .....   | 12 |
| Lista de siglas e abreviações .....  | 13 |
| Resumo .....   | 15 |
| Abstract .....   | 16 |
| Capítulo I.....  | 17 |
| Abstract .....   | 18 |
| Resumo .....   | 19 |
| 1. INTRODUCTION.....   | 18 |
| 2. Circadian Rhythm in Plants.....   | 19 |
| 3. Photoperiod in Plants.....  | 23 |
| 4. Response of <i>In Vitro</i> Grown Plants to Photoperiod and Variation in Circadian Rhythms..... | 27 |
| 4.1. Plant Flowering Time Responses to Photoperiod.....  | 28 |
| 4.2. Responses on Primary Metabolism.....  | 29 |
| 4.3. Responses on Secondary Metabolism .....   | 31 |
| 5. Conclusions .....   | 32 |
| REFERENCES .....   | 33 |
| Capítulo II.....   | 41 |
| Resumo .....   | 42 |
| Abstract .....   | 43 |
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 44 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS.....   | 45 |
| 2.1 Material vegetal.....  | 45 |
| 2.2 Condições experimentais .....  | 46 |
| 2.3 Análise de crescimento.....  | 46 |
| 2.4 Análises anatômicas e micromorfometria foliar .....  | 47 |
| 2.5 Índice estomático.....   | 47 |
| 2.6 Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....  | 48 |
| 2.7 Conteúdo relativo de água.....   | 48 |
| 2.8 Determinação de pigmentos fotossintéticos.....   | 48 |
| 2.9 Avaliações na fase de aclimatização <i>ex vitro</i> .....                                      | 49 |
| 2.10 Taxa fotossintética <i>ex vitro</i> .....   | 49 |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>2.11 Análises estatísticas .....</b> | <b>50</b> |
| <b>3. RESULTADOS.....</b>               | <b>50</b> |
| <b>4. DISCUSSÃO .....</b>               | <b>65</b> |
| <b>5. CONCLUSÃO.....</b>                | <b>69</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                | <b>70</b> |

## Lista de Figuras

### Capítulo I

**Figure 1.** Publication metrics on circadian rhythm in plants *in vitro*. The search was done with the terms “circadian rhythm”, “plant\*”, “in vitro”, filtering only works of the “article” type and in English in the last ten years. Publications over the years **(a)** and countries where most publications occurred **(b)**.....22

**Figure 2.** Publication metrics on photoperiod in plants *in vitro*. The search was done with the terms “photoperiod”, “plant\*”, “in vitro”, filtering only works of the “article” type and in English in the last ten years. Publications over the years **(a)**, countries where most publications occurred **(b)**, authors who have published the most on the topic **(c)** and journals that published the most on the topic **(d)**.....24

### Capítulo II

**Figura 1.** Parâmetros de crescimento das plantas de abacaxi das variedades Pérola e Turiaçu sob diferentes fotoperíodos (4, 8, 16, e 24h), após 45 dias de cultivo *in vitro*. **A)** Fenótipo das plantas, Barra equivale a 2 cm. **B)** Comprimento da parte aérea (cm), **C)** Comprimento da raiz (cm), **D)** Massa fresca da parte aérea (g), **E)** Massa seca da parte aérea (g), **F)** Massa fresca da raiz (g), **G)** Massa seca da raiz (g), **H)** Diâmetro da base da roseta (mm).....52

**Figura 2.** Parâmetros foliares e pigmentos fotossintéticos. **A)** Clorofila *a*, **B)** Clorofila *b*, **C)** Carotenoides, **D)** Índice estomático, **E)** Número de folhas, **F)** Área foliar, **G)** Índice estomático e **H)** Conteúdo relativo de água na folha (CRA).....54

**Figura 3.** Impressões epidérmicas da face abaxial das folhas de abacaxi das variedades Pérola e Turiaçu, sob diferentes fotoperíodos (4, 8, 16, e 24h), após 45 dias de cultivo *in vitro*, em objetiva de 10x.....55

**Figura 4.** Parâmetros da Fluorescência da clorofila *a* das plantas de abacaxi das variedades Pérola e Turiaçu sob diferentes fotoperíodos (4, 8, 16, e 24h), após 45 dias de cultivo *in vitro*. **A)** Fluorescência inicial (*F<sub>o</sub>*), **B)** Fluorescência máxima (*F<sub>m</sub>*), **C)** Fluorescência variável (*F<sub>v</sub>*), **D)** Eficiência quântica máxima do PSII (*F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>*), **E)** energia luminosa absorvida pelo centro de reação (*RC/ABS*), **F)** Índice de Performance.....57

**Figura 5.** Parâmetros micromorfométricos foliares de abacaxi das variedades Pérola e Turiaçu sob diferentes fotoperíodos (4, 8, 16, e 24h), após 45 dias de cultivo *in vitro*. **A)** Seção transversal da folha, **B)** Espessura da epiderme adaxial (mm), **C)** Espessura da epiderme abaxial (mm), **D)** Espessura do parênquima aquífero (mm), **E)** Espessura do parênquima clorofilado (mm), **F)** Espessura do feixe vascular transversal (mm), e **G)** Espessura do feixe vascular longitudinal.....58

**Figura 6.** Parâmetros de crescimento das plantas de abacaxi das variedades Pérola e Turiaçu após 45 dias de cultivo *ex vitro*. **A)** Fenótipo das plantas, Barra equivale a 2 cm. **B)** Comprimento da parte aérea (cm), **C)** Comprimento da raiz (cm), **D)** Massa fresca da

parte aérea (g), **E**) Massa seca da parte aérea (g), **F**) Massa fresca da raiz (g), **G**) Massa seca da raiz (g), **H**) Volume de raiz, **I**) Diâmetro da base da roseta (mm).....60

**Figura 7.** Parâmetros foliares e pigmentos fotossintéticos das plantas de abacaxi aclimatadas. **A**) Clorofila *a*, **B**) Clorofila *b*, **C**) Carotenoides, **D**) Índice estomático, **E**) Número de folhas, **F**) Área foliar e **G**) Índice estomático.....62

**Figura 8.** Parâmetros da Fluorescência da clorofila *a*. **A**) Fluorescência inicial ( $F_0$ ), **B**) Fluorescência máxima ( $F_m$ ), **C**) Fluorescência variável ( $F_v$ ), **D**) Eficiência quântica máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ), **E**) energia luminosa absorvida pelo centro de reação (RC/ABS), **F**) Índice de Performance.....63

**Figura 9.** Variáveis fotossintéticas das plantas de abacaxi aclimatadas. **A**) Taxa fotossintética ( $A$ ), **B**) Transpiração ( $E$ ), **C**) eficiência fotossintética ( $A/C_i$ ), **D**) Eficiência intrínseca do uso da água ( $A/G_s$ ), **E**) Razão intercelular/atmosférica de  $CO_2$  ( $C_i/C_a$ ), **F**) Condutância estomática ( $G_s$ ).....65

## Lista de tabelas

### Capítulo I

|   |    |
|---|----|
| <b>Table 1.</b> Summary of the main studies focused on plant responses to circadian rhythms and/or photoperiod under <i>in vitro</i> cultivation..... | 25 |
|---|----|

## Lista de siglas e abreviações

|  |   |
|--|---|
| $\mu\text{g}$ = Micrograma   | Fm = Fluorescência máxima                             |
| $\mu\text{M}$ = Micromole  | FT = Flowering locus T gene                           |
| A = Assimilação fotossintética de $\text{CO}_2$                    | Fv/Fm = Rendimento quântico máximo do fotossistema II |
| A/Ci = Eficiência carboxilativa                                    | g = Grama   |
| A/gs = Eficiência intrínseca no uso da água                        | GI = Gigantea gene                                    |
| ABA = Ácido abscísico  | gs = Condutância estomática                           |
| Abe = Epiderme abaxial   | h = Horas   |
| Ade = Epiderme adaxial   | IE = Índice estomático                                |
| ANA = Ácido naftalenoacético                                       | LD = long-day   |
| Ap = Parênquima aquífero   | L/D = light/darkness relationship                     |
| BAP = 6 benzilaminopurina  | LHY = Late elongated hypocotyl gene                   |
| C3 = Metabolismo fotossintético do tipo C3                         | LUX/PCL1 = Lux arrhythmo/phytoclock 1 gene            |
| CAM = Metabolismo Ácido das Crassuláceas                           | MF = Massa fresca                                     |
| CCA1 = Circadian clock-associated 1 gene                           | mL = Mililitro  |
| Ci/Ca = Relação da concentração interna e externa de $\text{CO}_2$ | mm = milímetro  |
| cm = Centímetro  | MS = Massa seca                                       |
| $\text{cm}^2$ = Centímetro quadrado                                | MS = Murashige  |
| $\text{CO}_2$ = Dióxido de carbono                                 | MT = Massa túrgida                                    |
| Cp = Parênquima clorofilado  | PI = Índice de desempenho                             |
| CRA = Conteúdo relativo de água na folha                           | PRR = Pseudo-response regulators genes                |
| DMSO = Dimetilsulfóxido  | PSII = Fotossistema II                                |
| E = Taxa transpiratória  | RC/ABS = Energia absorvida por centro de reação ativo |
| ELF = Early flowering gene   | RVE = Reveilles gene                                  |
| F0 = Fluorescência inicial   | SD = Short-day  |
|  | SG = Steviol glycoside                                |

TOC1 = Timing of cab expression 1  
gene

TTFL = Transcriptional–translational  
feedback loops

Vb = Feixe vascular.

ZTL = Zeitlupe gene

## Resumo

As plantas ajustam seu desenvolvimento às variações ambientais por meio de mecanismos moleculares regulados pelo ritmo circadiano, sendo o fotoperíodo um dos principais moduladores desses processos. Nesse contexto, o cultivo *in vitro* constitui uma ferramenta estratégica para investigar a plasticidade fisiológica vegetal e a interação entre fotoperíodo e relógio biológico. No estado do Maranhão, a variedade de abacaxi ‘Turiaçu’ apresenta potencial agrônômico, porém enfrenta limitações na obtenção de mudas de qualidade, o que torna o cultivo *in vitro* uma alternativa viável. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar as respostas morfofisiológicas de abacaxizeiros das variedades ‘Pérola’ e ‘Turiaçu’ cultivados *in vitro* sob diferentes fotoperíodos. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $2 \times 4$ , considerou duas variedades e quatro fotoperíodos (4, 8, 16 e 24 h de luz). Os fotoperíodos de 8 e 16 h promoveram maior crescimento radicular, expansão da área foliar, acúmulo de biomassa e aumento dos pigmentos fotossintéticos em ambas as variedades, enquanto o fotoperíodo contínuo de 24 h comprometeu o crescimento e a eficiência fisiológica, além de alterar características anatômicas. Conclui-se que fotoperíodos intermediários são os mais adequados para o cultivo *in vitro* das variedades estudadas, o que evidencia o papel central do fotoperíodo na regulação circadiana e na plasticidade morfofisiológica das plantas.

**Palavras-chave:** *Ananas comosus* (L.) Merrill; micropropagação; luminosidade; fotossíntese; ritmo circadiano.

## Abstract

Plants adjust their development to environmental variations through molecular mechanisms regulated by the circadian rhythm, with photoperiod being one of the main modulators of these processes. In this context, *in vitro* culture represents a strategic tool for investigating plant physiological plasticity and the interaction between photoperiod and the biological clock. In the state of Maranhão, the pineapple variety 'Turiaçu' shows agronomic potential, however, it faces limitations in the production of high-quality plantlets, making *in vitro* culture a viable alternative. Thus, this study aimed to evaluate the morphophysiological responses of pineapple plants from the 'Pérola' and 'Turiaçu' varieties cultivated *in vitro* under different photoperiods. The experiment was conducted in a completely randomized design, in a  $2 \times 4$  factorial scheme, considering the two varieties and four photoperiods (4, 8, 16, and 24 h of light). Photoperiods of 8 and 16 h promoted greater root growth, leaf area expansion, biomass accumulation, and increased levels of photosynthetic pigments in both varieties, whereas the continuous 24 h photoperiod impaired growth and physiological efficiency, in addition to altering anatomical traits. It is concluded that intermediate photoperiods are the most suitable for the *in vitro* culture of the varieties studied, highlighting the central role of photoperiod in circadian regulation and plant morphophysiological plasticity.

**Keywords:** *Ananas comosus* (L.) Merrill; micropropagation; light intensity; photosynthesis; circadian rhythm.

## Capítulo I

---

### **Photoperiod and Circadian Regulation in Plants: A Review of Insights from In Vitro Studies**

*Artigo publicado na Revista Biology e adaptado as normas da dissertação de Mestrado em Ciências Agrárias*

### **Abstract**

Plants possess several molecular mechanisms that enable them to adapt their development to environmental changes. Many plant biological processes depend on the circadian rhythm and are regulated by the internal biological clock. Predictable environmental changes, such as variations in photoperiod, can modulate circadian rhythms, allowing organisms to synchronize their biological processes with seasonal conditions. Plant tissue culture is a valuable tool for investigating and monitoring plant plasticity in response to environmental fluctuations, as well as for elucidating the biological changes that occur under these conditions. This review highlights the importance of *in vitro* culture as a tool to study the physiological plasticity triggered by photoperiod and its interaction with the plant biological clock. To achieve this, a descriptive analysis was conducted through a literature search in the Scopus database, followed by a bibliometric analysis to demonstrate the progress in the application of *in vitro* culture to studies on photoperiod and circadian regulation in plants.

**Keywords:** circadian rhythm; light; tissue culture; physiological plasticity

## Resumo

As plantas possuem diversos mecanismos moleculares que lhes permitem adaptar seu desenvolvimento às mudanças ambientais. Muitos processos biológicos das plantas dependem do ritmo circadiano e são regulados pelo relógio biológico interno. Alterações ambientais previsíveis, como variações no fotoperíodo, podem modular os ritmos circadianos, permitindo que os organismos sincronizem seus processos biológicos com as condições sazonais. A cultura de tecidos vegetais é uma ferramenta valiosa para investigar e monitorar a plasticidade das plantas em resposta às flutuações ambientais, bem como para elucidar as mudanças biológicas que ocorrem nessas condições. Esta revisão destaca a importância do cultivo *in vitro* como ferramenta para estudar a plasticidade fisiológica desencadeada pelo fotoperíodo e sua interação com o relógio biológico das plantas. Para atingir esse objetivo, foi realizada uma análise descritiva por meio de uma busca bibliográfica na base de dados Scopus, seguida de uma análise bibliométrica para demonstrar o progresso na aplicação do cultivo *in vitro* em estudos sobre fotoperíodo e regulação circadiana em plantas.

**Keywords:** ritmo circadiano; luz; cultura de tecidos; plasticidade fisiológica.

## 1. INTRODUCTION

*In vitro* culture provides sterile propagation of plant cells, tissues, or organs on nutrient media under controlled conditions, where cellular totipotency drives the regeneration of whole plants with defined traits or their plant organs [1,2]. Because of this regenerative potential, *in vitro* culture underpins research in plant biology, biochemistry, and molecular biology, and supports strategies to overcome agricultural challenges, including those imposed by global climate change [3,4].

Environmental stress factors disrupt biochemical and physiological processes that sustain plant growth and development. However, these stressors also induce phenotypic plasticity through epigenetic mechanisms, which increases tolerance and enhances adaptive responses [5].

Circadian clocks evolved as endogenous ~24 h systems. Environmental cues, particularly those of exceptionally low light intensity, regulate these clocks, enabling organisms to anticipate predictable fluctuations and optimize their adaptation and performance [6,7]. In plants, circadian regulation aligns physiological processes with daily cycles. This alignment drives photosynthesis, carbon metabolism, growth, and flowering, and simultaneously modulates defense pathways and responses to stress [8].

The circadian system relies on interconnected transcriptional–translational feedback loops (TTFLs) that form the central oscillator. Clock genes interact with environmental signals to generate rhythms that control daily patterns of plant behavior [9–13]. Light predominates among these signals because it regulates transcription and translation of rhythmic genes and stabilizes messenger RNA [14]. Temperature also influences central oscillator components, but researchers have not yet fully elucidated the molecular pathways involved [15,16]. The photoperiod, determined by the length of the light phase within the 24 h cycle, governs developmental transitions, including flowering, seed germination, senescence, fruit set, and budburst [17–20].

When circadian timing fails to align with external rhythms, circadian disruption occurs, resulting in reduced plant growth and developmental performance [10]. This misalignment can affect key physiological processes, such as photosynthesis, hormone signaling, and resource allocation, thereby compromising the plant's overall fitness. Understanding how circadian regulation mediates stress tolerance is therefore essential for developing cultivars with superior productivity.

Understanding circadian regulation is critical for improving stress tolerance and overall performance in crop cultivars. While *in vivo* studies provide valuable insights under natural

conditions, *in vitro* culture allows precise control of environmental variables, such as light and temperature, as well as the developmental stage of the explants. This control enables detailed investigation of the interplay between photoperiod, developmental cues, and circadian regulation. This review highlights how *in vitro* approaches provide a robust framework to study the physiological plasticity of vascular plants at the whole-plant level.

## 2. Circadian Rhythm in Plants

Circadian rhythms (from the Latin *circa*, “about,” and *diem*, “day”) coordinate cellular and metabolic processes by anticipating and synchronizing responses in plants and animals [21–23]. This rhythmicity enables organisms to adjust essential processes to the most suitable time of day. In plants, circadian rhythms promote growth and development, enhancing fitness when the internal clock is in synchrony with the light–dark cycle [11,24,25].

In general, the plant circadian system is structured into three main pathways that ensure the integration of environmental stimuli and maintain endogenous rhythmicity. The input pathway includes light and temperature receptors responsible for capturing external information. The central oscillator consists of interconnected TTFLs, including the morning and evening loops, which synchronize environmental signals with the expression of clock genes. The output pathway translates this information into physiological and metabolic responses. These components do not act in isolation but rather in an interconnected manner, reinforcing the robustness and plasticity of the system and enabling plants to adjust growth, development, and adaptive responses to dynamic environmental conditions [26,27].

The circadian clock is composed of core genes that interact through multiple TTFLs, in which the transcription of each TTFL accumulates for a defined period within a 24 h cycle, thereby generating rhythmic gene expression [28,29]. However, although the genes are expressed throughout the day, transcriptional phases differ depending on the time of day, driven by the activity of multiple core circadian clock proteins [30].

The circadian clock genes in *Arabidopsis thaliana* are organized into distinct phases of expression that alternate between morning and evening periods. During the morning phase, the main components include CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 (CCA1), LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY), REVEILLEs (RVE8, RVE4, RVE6), NIGHT LIGHT-INDUCIBLE AND CLOCK-REGULATED (LNK1, LNK2), and PSEUDO-RESPONSE REGULATORS (PRR9, PRR7) [31–33]. In contrast, during the evening phase, the key components are PRR5, PRR3, PRR1 (also known as TIMING OF CAB EXPRESSION 1,

TOC1), ZEITLUPE (ZTL), GIGANTEA (GI), LUX ARRHYTHMO/PHYTOCLOCK 1 (LUX/PCL1), and the EARLY FLOWERING genes (ELF3, ELF4) [34,35].

In an integrated manner, most of these proteins participate in light signaling, contributing to the alignment of the circadian clock with environmental cycles. They adjust endogenous rhythmicity daily through the perception of light and temperature cues at dawn and dusk [16,36]. Moreover, these proteins can modify the expression phase of transcripts in response to photoperiod, enabling plants to synchronize their biological processes with seasonal variations [16,37,38]. The circadian clock exhibits a self-sustained oscillation that persists even in the absence of environmental changes, demonstrating its endogenous rhythmicity. This rhythm is entrained by external cues such as light and temperature, allowing plants to synchronize internal processes with the environment. Importantly, the clock also shows temperature compensation, maintaining a consistent period despite fluctuations in ambient temperature. Under environmental stress conditions, plants reorganize their circadian components and activate alternative output pathways, thereby enhancing stress resilience, developmental efficiency, and overall fitness [24,27,39].

In recent years, several studies have identified genes related to the *Arabidopsis circadian* clock in various plant species, primarily those of agricultural interest, including *Pisum sativum*, *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor*, *Glycine max*, *Zea mays*, and *Triticum aestivum* [40]. These studies suggest that clock-related genes may contribute to high performance and increased crop productivity. While findings from *Arabidopsis* provide a useful reference, it is important to recognize that the specific roles and regulatory networks of clock genes can differ between species. For example, as observed in *Arabidopsis*, the circadian effect on biomass vigor in hybrids is associated with altered expression of the CCA1 homolog [41]. Similarly, in maize hybrids, CCA1 acts as a morning activator that regulates the expression of photosynthetic genes, promoting photosynthesis and biomass heterosis [42], although the downstream regulatory interactions may not be identical to those in *Arabidopsis*.

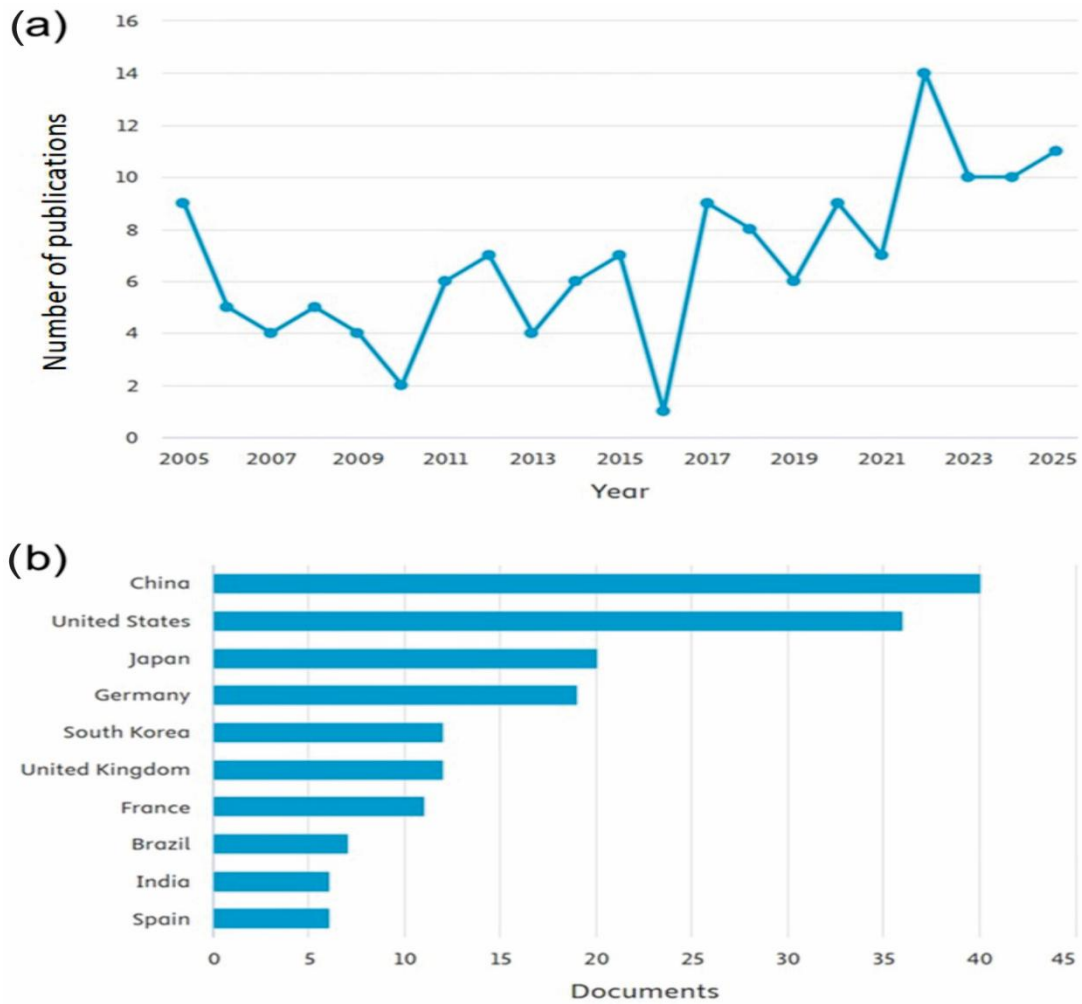
In *Arabidopsis*, PSEUDO-RESPONSE REGULATOR (PRR) genes play a central role in the regulation of abscisic acid (ABA) signaling. In *Oryza sativa*, PRR95 acts as a transcriptional regulator rather than a direct transcription factor, modulating the expression of ABA-responsive genes to influence seed germination, seedling growth, and early development [43]. This functional divergence illustrates that PRR genes can have species-specific roles in connecting the circadian clock to hormonal signaling pathways. Comparisons with other species, such as soybean and *Brassica rapa*, further highlight the variability in PRR-mediated

regulation of ABA responses, emphasizing the need to consider both conserved and divergent mechanisms when studying circadian–hormone interactions across vascular plants [25,40].

The GIGANTEA (GI) gene was first associated with the effect of late flowering in *Arabidopsis* [44]. Subsequently, GI was also related to tolerance to stress triggered by several abiotic factors, such as cold [45,46], drought [47,48], and salinity [49,50]. Kim et al. [51] demonstrated that the molecular functions of GI described in *Arabidopsis* are conserved in *Brassica rapa* and suggested that manipulating gene expression can increase tolerance to abiotic stresses, such as salinity, thereby improving crop yield. In *Glycine max*, orthologs of GIGANTEA influence the regulation of flowering time in response to photoperiod and productivity [52].

#### *Publications on Circadian Rhythm in Plants In Vitro*

Searches in the Scopus database reveal a fluctuating trend in the number of publications containing the terms “circadian rhythm,” “plant\*,” and “in vitro” in the title, abstract, or keywords. The search was limited to research papers, excluding review articles, conference papers, or technical notes. In 2016, there was a sharp decline in publications on circadian rhythm in plants under *in vitro* conditions (only one article). However, this was followed by an increase in 2017 (nine documents). Although the number of publications gradually declined again in 2019, it consistently remained above six per year, reaching a peak in 2022 with 14 publications (Figure 1a). China accounted for the largest number of studies on circadian rhythm in plants *in vitro*, with approximately 40 publications, followed by the United States with 36 (Figure 1b). These findings highlight the growing global recognition of circadian regulation as a key factor in plant development and productivity. The increase in publications up to 2022 suggests a phase of consolidation in this research area, reflecting both methodological advances in molecular and physiological analyses under controlled conditions and the broader integration of circadian studies into plant biotechnology. The slight decline observed after 2022 may indicate a transition toward more specialized or applied investigations. Overall, these trends point to the need for future studies focusing on diverse plant species, cross-environmental comparisons, and the integration of omics approaches to uncover how circadian regulation can be harnessed to optimize plant growth and resilience.



**Figure 1.** Publication metrics on circadian rhythm in plants *in vitro*. The search was done with the terms “circadian rhythm”, “plant\*”, “in vitro”, filtering only works of the “article” type and in English in the last ten years. Publications over the years **(a)** and countries where most publications occurred **(b)**.

The circadian clock and photoperiod are intricately interconnected systems that jointly regulate plant development and environmental adaptation. While the circadian clock generates internal rhythms that align physiological and metabolic processes with the day–night cycle, photoperiod provides an external temporal cue that entrains these rhythms to seasonal changes. Through this interaction, plants integrate endogenous timing with external light–dark signals, optimizing processes such as photosynthesis, hormone signaling, and flowering. Understanding this mechanistic connection is essential before exploring how photoperiod specifically influences plant growth and development under *in vitro* conditions.

### 3. Photoperiod in Plants

The Earth's rotation and orbit create a predictable daily cycle of light and darkness lasting approximately 24 h. The length of daylight within this cycle, known as the photoperiod, varies with the season and latitude [53,54]. Photoperiod plays a central role in regulating many plants' biological processes. By conveying information from the internal circadian clock through light perception, plants adjust their growth and development to changing light conditions. This synchronization allows plants to time key developmental events, such as flowering, to occur under optimal seasonal conditions. Importantly, photoperiod-dependent flowering has been shaped by environmental selection: species that flower when days are shortening or lengthening have evolved strategies to maximize reproductive success under their specific climatic conditions, ensuring that reproduction aligns with favorable environmental periods [54–57].

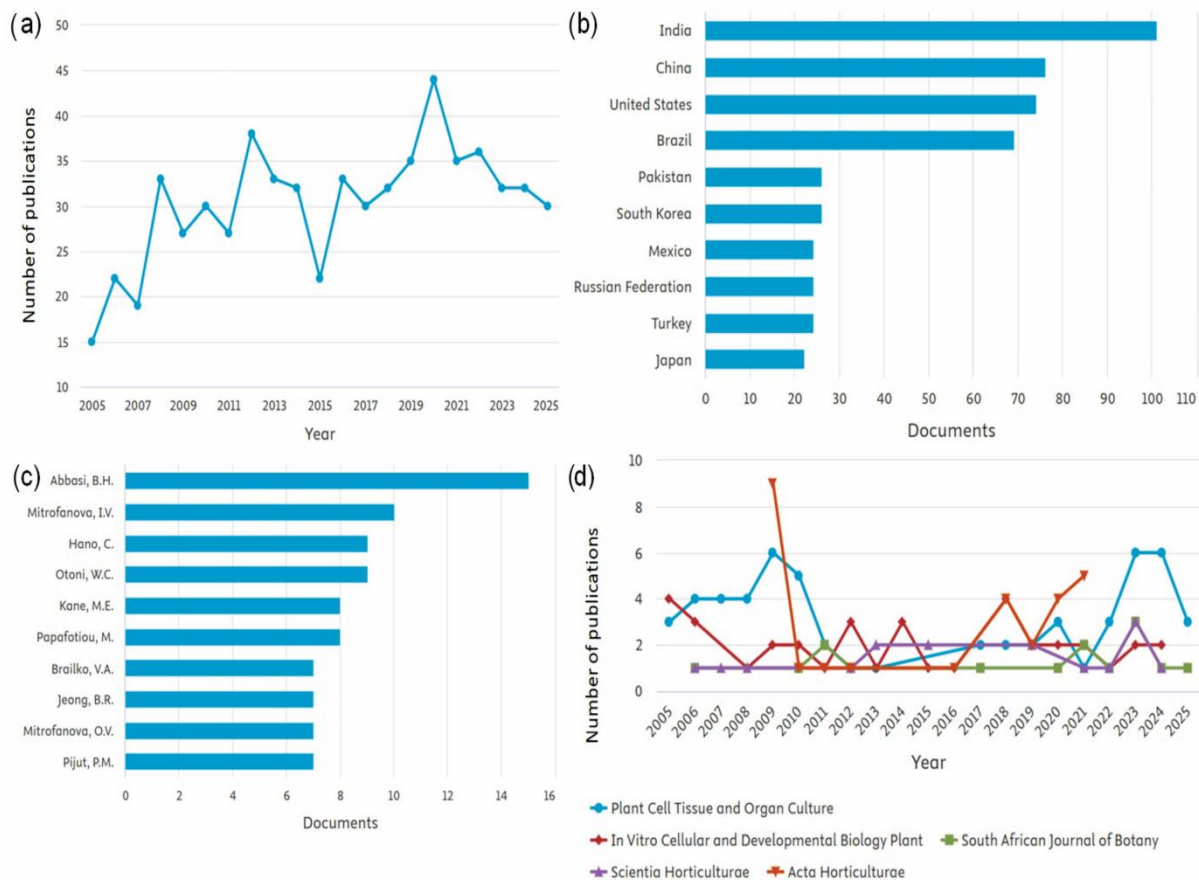
The regulation of flowering by day length is a well-established concept in plant physiology. Since the pioneering work of Garner and Allard [58], who first demonstrated that photoperiod rather than photosynthate availability determines flowering time, subsequent studies have built upon this foundational discovery to elucidate its molecular basis [58–62]. Based on their photoperiodic responses, plants are generally classified into three categories: long-day plants, which flower under long-day (LD) conditions; short-day plants, which flower under short-day (SD) conditions; and day-neutral plants, which show little or no sensitivity to photoperiod and tend to maintain stable developmental processes regardless of day length [63–65].

Studies using light pulses to interrupt the night period have shown that plants, regardless of their previous classification, respond to the period of darkness, not specifically to day length [66,67]. More recent research shows that photoperiod-dependent flowering is, in fact, a response driven by the circadian clock. Nevertheless, the terms mentioned remain useful, as they categorize plants according to their photoperiodic response [59,68].

#### *Publications on Photoperiod in In Vitro Plants*

Searches in the Scopus database show fluctuations in the number of publications containing the terms “photoperiod,” “plant\*,” and “in vitro” in the title, abstract, or keywords. The search was limited to research papers, excluding review articles, conference papers, or technical notes. Between 2005 (15 documents) and 2025 (30 documents), the number of studies

addressing photoperiod in plants under *in vitro* conditions increased. Despite oscillations over the 20-year period, 2020 marked a peak with 45 publications (Figure 2a). India contributed the highest number of publications on this topic, with 100 documents, followed by China (74) and the United States (73) (Figure 2b). This predominance of India and China likely reflects their strong investment in plant biotechnology and tissue culture research, as well as the high diversity of plant species cultivated and studied under controlled conditions in these countries. Notably, the most prolific author was Abbasi, Bilal Haider, from Pakistan (Figure 2c), further highlighting the significant contribution of Asian research groups to this field. The journal with the greatest number of recent publications was *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (57 articles), followed by *In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant* (37) and *Acta Horticulturae* (28) (Figure 2d). These numbers highlight the importance of *in vitro* culture as a tool for investigating photoperiod in plants.



**Figure 2.** Publication metrics on photoperiod in plants *in vitro*. The search was done with the terms “photoperiod”, “plant\*”, “in vitro”, filtering only works of the “article” type and in English in the last ten years. Publications over the years (a), countries where most publications

occurred (**b**), authors who have published the most on the topic (**c**) and journals that published the most on the topic (**d**).

Over the last four years, the number of publications focusing exclusively on photoperiod has declined, likely because many fundamental mechanisms have already been characterized. However, photoperiodic studies increasingly address complex interactions with other factors, such as temperature, light intensity, plant growth regulators, and elicitors, which often require whole-plant experiments to capture relevant phenotypes, including photoperiod-dependent flowering. *In vitro* approaches provide an alternative framework to study these interactions under controlled conditions, allowing precise manipulation of environmental cues. It is possible that recent publications investigating these multifactorial interactions are not fully captured in conventional literature searches, suggesting that alternative search strategies may be required to comprehensively assess the current research landscape.

Most publications on photoperiod under *in vitro* conditions investigated its interactions with plant growth regulators (PGRs) (Table 1). Many of these studies described the development of efficient micropropagation protocols, focusing on promoting plant growth and development (primary metabolism) [69–71], as well as enhancing the production of bioactive compounds (secondary metabolism) [71–73]. However, the bibliometric data reveal notable knowledge gaps. Few studies have explored how photoperiod influences gene expression networks and signaling pathways under *in vitro* conditions, or how these responses compare with those observed in whole plants grown *ex vitro*. Additionally, the limited number of studies on non-model or economically important species indicates an opportunity to expand research beyond traditional model systems. Addressing these gaps would contribute to a more comprehensive understanding of how photoperiod modulates physiological plasticity in controlled environments.

**Table 1.** Summary of the main studies focused on plant responses to circadian rhythms and/or photoperiod under *in vitro* cultivation.

| Espécie                      | Modo de propagação                 | Efeitos estudados                                      | Reflexos                                    | Referência            |
|------------------------------|------------------------------------|--|---|-----------------------|
| <i>Suaeda glauca</i>         | cotyledons, hypocotyls, and leaves | Explant type, plant growth regulators, and photoperiod | Molecular mechanisms and primary metabolism | Mohammadi et al. [69] |
| <i>Marchantia polymorpha</i> | buds                               | Light intensity  | Molecular mechanisms and primary metabolism | Zhu et al. [74]       |
| <i>Schisandra chinensis</i>  | embryos                            | Light intensity  | Primary metabolism                          | Sun et al. [75]       |
| <i>Gossypium hirsutum</i>    | ovules                             | Photoperiod  | Primary metabolism                          | Wang et al. [76]      |

|                                |                 |   |   |                             |
|--------------------------------|-----------------|---|---|-----------------------------|
| <i>Cocos nucifera</i>          | embryos         | CO <sub>2</sub> concentrations, light intensities, light qualities, and photoperiod | Primary metabolism                          | Mu et al. [77]              |
| <i>Sequoia sempervirens</i>    | shoots          | Culture medium and photoperiod  | Secondary metabolism                        | Kirakosyan et al. [72]      |
| <i>Anthyllis hermanniae</i>    | shoots          | Plant growth regulators and photoperiod   | Primary metabolism                          | Martini et al. [70]         |
| <i>Moringa oleifera</i>        | callus          | Light quality and photoperiod   | Primary and secondary metabolism            | Bajwa et al. [71]           |
| <i>Cydonia oblonga</i>         | shoots          | Plant growth regulators and photoperiod   | Primary metabolism                          | Durul et al. [78]           |
| <i>Rheum rhaponticum</i>       | shoots          | Temperature and photoperiod   | Primary and secondary metabolism            | Wojtania et al. [73]        |
| <i>Solanum tuberosum</i>       | nodal segments  | Gene expression   | Molecular mechanisms and primary metabolism | Wang et al. [79]            |
| <i>Anthyllis barba-jovis</i>   | seeds           | Temperature and photoperiod   | Primary metabolism                          | Bertsouklis et al. [80]     |
| <i>Gentiana triflora</i>       | shoots          | Gene expression   | Molecular mechanisms                        | Takase et al. [81]          |
| <i>Spiranthes ochroleuca</i>   | seeds           | Culture medium and photoperiod  | Primary metabolism (germination)            | Zale et al. [82]            |
| <i>Artemisia ludoviciana</i>   | nodal segments  | Plant growth regulators and photoperiod   | Primary and secondary metabolism            | Ramos et al. [83]           |
| <i>Aloe sul-africana</i>       | seeds           | Temperature and photoperiod   | Primary metabolism (germination)            | Amoo et al. [84]            |
| <i>Artemisia tilesii</i>       | roots           | Phenylalanine concentrations and light  | Primary and secondary metabolism            | Bohdanovych et al. [85]     |
| <i>Paphiopedilum</i> spp.      | shoots          | Plant growth regulators and photoperiod   | Molecular mechanisms and primary metabolism | Istiqomah et al. [86]       |
| <i>Artemisia alba</i>          | shoots          | Plant growth regulators and photoperiod   | Primary and secondary metabolism            | Pecheva et al. [87]         |
| <i>Cannabis sativa</i>         | stem segments   | Culture medium and photoperiod  | Flowering                                   | Lavie et al. [88]           |
| <i>Plumbago auriculata</i>     | shoots          | Temperature and photoperiod   | Flowering                                   | Shen et al. [89]            |
| <i>Curcuma caesia</i>          | shoots          | Photoperiod   | Primary metabolism and flowering            | Sarma et al. [90]           |
| <i>Cannabis sativa</i>         | shoots          | Photoperiod   | Primary metabolism and flowering            | Moher et al. [18]           |
| <i>Cunninghamia lanceolata</i> | shoots          | Photoperiod and light quality   | Primary metabolism                          | Xu et al. [91]              |
| <i>Narcissus tazetta</i>       | bulbs           | Plant growth regulators and photoperiod   | Primary and secondary metabolism            | Rahimi et al. [92]          |
| <i>Basella rubra</i>           | callus          | Plant growth regulators and photoperiod   | Primary and secondary metabolism            | Kumar et al. [93]           |
| <i>Triticum aestivum</i>       | seeds           | Culture medium and photoperiod  | Primary and secondary metabolism            | Virdi et al. [94]           |
| <i>Lippia alba</i>             | nodal segments  | Photoperiod   | Primary and secondary metabolism            | Castro et al. [95]          |
| <i>Solanum tuberosum</i>       | shoots          | Photoperiod and silver thiosulfate concentrations                                   | Primary metabolism                          | El-Sayed et al. [96]        |
| <i>Solanum tuberosum</i>       | stem segments   | Photoperiod and KNO <sub>3</sub> concentrations                                     | Primary metabolism                          | Choirunnisa & Wardana. [97] |
| <i>Solanum tuberosum</i>       | shoots          | Culture medium and photoperiod  | Primary metabolism                          | Wafa et al. [98]            |
| <i>Kaempferia galanga</i>      | rhizome shoots  | Plant growth regulators and photoperiod   | Primary and secondary metabolism            | Shofiyani et al. [99]       |
| <i>Ficus palmata</i>           | axillary shoots | Culture medium and photoperiod  | Primary metabolism                          | Ahmed et al. [100]          |
| <i>Pfaffia glomerata</i>       | nodal segments  | Photoperiod   | Primary and secondary metabolism            | Fortini et al. [101]        |

|   |                  |  |   |                          |
|---|------------------|--|---|--------------------------|
| <i>Bletia urbana</i>                              | protocorms       | Plant growth regulators and photoperiod          | Primary metabolism and flowering            | Rodríguez et al. [102]   |
| <i>Origanum dictamnus</i>                         | seeds            | Plant growth regulators and photoperiod          | Primary metabolism (germination)            | Sarropoulou et al. [103] |
| <i>Vaccinium floribundum</i>                      | seeds and shoots | Medium, photoperiod, and temperature             | Primary metabolism                          | Meneses et al. [104]     |
| <i>Fagonia indica</i>                             | stem explants    | UV-C regimes and photoperiod                     | Primary and secondary metabolism            | Abbasi et al. [105]      |
| <i>Anacamptis longicornu e Ophrys panormitana</i> | seeds            | Culture medium, temperature, and photoperiod     | Primary metabolism (germination)            | Arcidiacono et al. [106] |
| <i>Solanum tuberosum</i>                          | cuttings         | Gene expression, culture medium, and photoperiod | Molecular mechanisms and primary metabolism | Kondhare et al. [107]    |
| <i>Ligaria cuneifolia</i>                         | embryos          | Plant growth regulators and photoperiod          | Primary and secondary metabolism            | Ricco et al. [108]       |

#### 4. Response of *In Vitro* Grown Plants to Photoperiod and Variation in Circadian Rhythms

*In vitro* culture has a practical purpose, as it enables large-scale plant propagation. This direct application consolidates it as an essential tool that also facilitates biotechnological applications in plant breeding, particularly in stages involving genetic transformation [1,4]. Moreover, *in vitro* culture is widely employed in studies of plant biology, biochemistry, and molecular biology, as it allows precise control of growth conditions (light intensity and quality, photoperiod, temperature, among others) and accelerates data generation by reducing the time required for treatments to express their phenotypes [4].

In this context, researchers have investigated photoperiodic rhythmicity and other environmental conditions using *in vitro* culture as an effective tool, since the system enhances growth and yield while conferring high tolerance to environmental stresses [88,92,101]. Because tissue culture provides a controlled, uniform, and efficient environment, it becomes the method of choice in studies that require strict control and elimination of external variability—conditions difficult to achieve with conventional approaches [4]. For this reason, Takase et al. [81] reported that when attempting to control day length in *Gentiana triflora* under field conditions, they opted to use *in vitro*-grown plantlets.

Despite its advantages, *in vitro* culture has inherent limitations. Artificial light sources often differ in spectral quality and intensity from natural sunlight, potentially affecting photoperiodic responses. Environmental conditions such as humidity, CO<sub>2</sub> concentration, and nutrient availability are tightly controlled *in vitro* but differ significantly from field environments, which can influence plant physiology and development [95, 101]. Consequently, photoperiodic or stress responses observed *in vitro* may not always translate directly to *ex vitro*

or field conditions. Researchers must carefully consider these factors when extrapolating findings, and complementary studies under natural conditions are often necessary to validate *in vitro* observations.

#### 4.1. Plant Flowering Time Responses to Photoperiod

Several studies have demonstrated how plants respond to photoperiod under *in vitro* conditions, with one of the most relevant effects being the regulation of flowering time. In many species, the expression of the FLOWERING LOCUS T (FT) gene results in the production of a systemic signaling molecule that acts as a trigger for the onset of flowering. This molecule is synthesized in the leaves and transported to the shoot apical meristem, where it induces flower formation [109].

The photoperiod-dependent flowering mechanism induced by FT expression is best characterized in long-day plants. In *Arabidopsis thaliana*, long-day conditions induce high levels of FT expression, which accelerate flowering, whereas short-day conditions lead to very low FT expression [110]. The induction of FT depends on both day length and the transcriptional activator CONSTANS (CO), whose expression is tightly regulated by the circadian clock [111]. According to the external coincidence model, the accumulation of CO transcripts occurs from late afternoon to evening, under circadian control, coinciding with light exposure, particularly during summer [112]. Under these conditions, the CO protein is stabilized, leading to increased FT expression and the promotion of flowering. Thus, the flowering response represents a clear example of how the molecular components of the circadian clock (such as CO and FT) integrate environmental light cues to generate coordinated developmental outcomes. This connection between clock-regulated gene expression and phenotypic flowering behavior illustrates the close interplay between molecular timing mechanisms and photoperiodic adaptation in plants.

In *Cannabis sativa* grown *in vitro*, flowering induction depends not only on photoperiod but also on the physiological state of the explants prior to exposure to inductive conditions. In the study by Mahlberg and Hemphill [21], flowering was observed when *in vitro*-grown plantlets, already established with 6–8 fully expanded leaves, were exposed to photoperiods of 13.2 h or less per day, or, more precisely, to dark periods of at least 10.8 uninterrupted hours. Similar results were reported by Potter [88], who found that low light intensity during the floral induction stage optimized flower formation, emphasizing that induction efficiency depends on the developmental maturity of the cultured plantlets.

In *Plumbago auriculata*, both temperature and photoperiod influenced flowering. *In vitro* plantlets with 5–7 expanded leaves showed inhibited floral bud development under long photoperiods (20 h), whereas an intermediate photoperiod (16 h) promoted rapid floral induction and the formation of complete, morphologically normal floral structures [89]. These findings highlight the importance of considering the plant's developmental stage before induction when evaluating photoperiodic responses under *in vitro* conditions.

A study on *Bletia urbana*, an endangered orchid species, showed that a neutral photoperiod (12 h) resulted in the highest flowering rate [102]. This outcome may be associated with adaptations to its natural tropical habitat, where day length and night length show little seasonal variation.

#### 4.2. Responses on Primary Metabolism

The control of photoperiod, together with circadian rhythm variation, is also an important tool explored in *in vitro* culture to promote plant growth and development (primary metabolism). Zhu et al. [74], studying the relationship between putative lunularic acid (AL) levels and growth variation in *Marchantia polymorpha* according to the circadian clock, observed that shoot growth rates were generally higher during the light period than during the dark period. This was accompanied by changes in endogenous AL concentrations, indicating that AL synthesis is closely related to light intensity.

Plant growth and development follow a rhythmic day–night pattern regulated by the circadian clock and light-responsive genes. Key circadian clock components, such as *CCA1*, *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR (PRR)* genes, and *GIGANTEA (GI)*, coordinate the timing of gene expression and metabolic activity [6,8]. In *Gossypium hirsutum*, small peptides regulated by the circadian clock, such as *GhRALF1*, may exert rhythmic inhibitory effects on fiber elongation, likely acting downstream of these clock components to synchronize fiber growth with the daily light–dark cycle [76]. By linking clock gene activity to fiber cell metabolism, these observations highlight how circadian regulation underpins primary growth processes in cotton.

In *Solanum tuberosum*, tuberization and tuber yield are strongly affected by day length. A photoperiod of 8 h combined with 3.8 g L<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub> resulted in the earliest onset of microtuber formation, at 8 days after explant planting (DAP) [97]. Under a 16 h photoperiod with 1.9 g L<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>, tuberization occurred only after 11 DAP; however, this condition increased the number of microtubers by 30% compared with the 8 h photoperiod [97]. In contrast, another study

reported that darkness induced microtubers in a shorter time (8.85 days) and reached the highest tuberization percentage (80%). On the other hand, the greatest number of microtubers per explant and the maximum mean fresh weight (207 mg) were obtained under short-day conditions (8 h light) [98].

Tuberization in *Solanum tuberosum* is a short-day–induced process and involves a regulatory mechanism analogous to the flowering control in *Arabidopsis thaliana*. Under long-day conditions, circadian clock–regulated genes promote the degradation of the *Solanum CYCLING DOF FACTOR 1* (*StCDF1*), a transcriptional repressor of the *CONSTANS*-like gene *StCOL1*. When *StCDF1* is degraded, *StCOL1* becomes active and induces the expression of *StSP5G*, which acts as a mobile repressor of tuberization by inhibiting the *StSP6A* gene, a tuberigen homologous to FT [113]. Conversely, under short-day conditions, *StCDF1* remains stable and represses *StCOL1*, leading to reduced *StSP5G* expression and allowing *StSP6A* to accumulate, which promotes tuber formation. This finely tuned regulatory cascade illustrates how photoperiodic signals, integrated through circadian clock components, control developmental phase transitions in potato in a manner similar to the flowering pathway in *Arabidopsis*.

Photoperiod also influences seed germination under *in vitro* conditions. In African Aloe species (*A. modesta*, *A. peglerae*, *A. reitzii*), germination speed decreased under long photoperiods (16 h and 24 h) [84]. Similarly, in *Anacamptis longicornu* and *Ophrys panormitana*, germination occurred only under a neutral photoperiod (12 h,  $18 \pm 1$  °C), whereas no germination was observed under 16 h light at  $25 \pm 1$  °C [106]. By contrast, in *Origanum dictamnus*, the highest germination rates up to day 12 of the experiment were obtained under a 16 h photoperiod [103]. In two-year-old scarified seeds of *Anthyllis barba-jovis*, germination ranged from 89 to 97% at 15 and 20 °C under a 16 h photoperiod but dropped to ~84% under continuous darkness [80].

In *Cunninghamia lanceolata* seedlings cultured *in vitro* under three photoperiods (8, 16, and 24 h), the best development occurred under a 16 h photoperiod, which promoted higher rooting rates, root length, and root volume [91]. In contrast, in *Cydonia oblonga* shoots, the greatest number and longest roots were observed in shoots exposed to 10 days of continuous darkness [78].

Biomass accumulation is also strongly influenced by photoperiod. In callus cultures of *Moringa oleifera*, the highest biomass accumulation was observed under continuous white light (24 h), whereas the lowest occurred under continuous darkness [71]. A similar trend was reported for *Lippia alba* [95] and *Rheum rhaponticum* ‘Raspberry’ [73], where longer

photoperiods (16 and 24 h) increased dry mass, while shorter photoperiods (4 h and 10 h) reduced it. In *Artemisia tilesii*, however, hairy roots accumulated more biomass in darkness, but these roots were white, elongated, and less branched [85].

Leaf area can also be influenced by photoperiod. In *Pfaffia glomerata*, leaf area increased under continuous light (24 h) [101]. A similar response was observed in *L. alba* seedlings [95], which developed larger leaves with increasing photoperiod up to 24 h, while shorter photoperiods (4 and 8 h) resulted in smaller leaf areas. In these cases, sucrose supplementation in the medium may have positively contributed to this response under continuous light. In contrast, in *Alocasia amazonica*, larger leaf areas were obtained under shorter photoperiods (8/16 h L/D, 12/12 h L/D) [114].

A reduction in leaf area under short photoperiods may reflect lower photosynthetic performance. In *L. alba*, a shorter photoperiod (4 h) led to reduced concentrations of photosynthetic and photoprotective pigments (carotenoids) [95]. Similar reductions were observed in *P. glomerata* [101] and in *C. lanceolata* under an 8 h photoperiod [91].

#### 4.3. Responses on Secondary Metabolism

Several studies confirm that photoperiod exerts a strong influence on the production of secondary metabolites. Although most investigations have been conducted under *ex vitro* conditions, *in vitro* studies are increasing due to the possibility of tighter environmental control and the application of elicitors to specific metabolic pathways [115].

In *Lippia alba*, photoperiod modulated the essential oil profile: despite no changes in the relative expression of circadian clock genes, plants grown under continuous light (24 h) showed a significant increase in linalool content compared with 8 h and 16 h photoperiods [95]. Similar results were reported in callus cultures of *Kaempferia galanga*, where a 12/12 h light/dark regime enhanced the accumulation of flavonoids and terpenoids, while production declined sharply under continuous darkness [99]. Likewise, *Basella rubra* cultures accumulated higher levels of phenolics under a 16 h photoperiod than under continuous light or continuous darkness [93].

In *Artemisia ludoviciana*, a 16 h light photoperiod not only enhanced achillin synthesis but also increased callus induction compared with complete darkness [83]. In callus cultures of *Moringa oleifera*, continuous white light (24 h) resulted in the highest accumulation of phenolics (TPC: 18 mg g<sup>-1</sup>), phenolic production (TPP: 287 mg L<sup>-1</sup>), and flavonoids (TFC: 15

mg g<sup>-1</sup>; TFP: 212 mg L<sup>-1</sup>), while also positively regulating the transcription of flavonoid biosynthetic genes [71].

*In vitro* culture has also proven valuable for understanding the implications of photoperiod in circadian rhythms. In *Solanum lycopersicum*, the interaction between photoperiod and circadian oscillations modulated the phase of cyclic gene expression, improving crop adaptation to different day lengths in latitudes outside the tropics [116]. In *Stevia rebaudiana*, a short-day species with a critical photoperiod of 12–13 h, a 12/12 h regime promoted reproductive development, whereas 15/9 h and 16/8 h photoperiods favored vegetative growth. Conversely, photoperiods shorter than 12 h triggered premature and undesirable reproductive development, leading to reduced steviol glycoside (SG) content [117].

## 5. Conclusions

This review demonstrates that *in vitro* systems provide a robust framework for studying circadian regulation in vascular plants, enabling precise analysis of how internal biological rhythms coordinate physiological and developmental processes. By offering tightly controlled experimental conditions, *in vitro* cultivation allows researchers to dissect interactions between the circadian clock and environmental cues such as photoperiod, light intensity, and temperature. The precision and reproducibility of this approach strengthen its potential for revealing the mechanisms underlying physiological plasticity and stress adaptation.

Within this framework, photoperiod has been shown to directly modulate key processes including primary and secondary metabolism, flowering, tuberization, and biomass accumulation. These findings confirm that *in vitro* cultivation uncovers adaptive mechanisms that may be difficult to observe under *ex vitro* conditions. Therefore, the integration of circadian studies and *in vitro* cultivation represents a powerful strategy to advance both plant propagation and the production of valuable secondary metabolites. This research field offers important opportunities for applying biotechnology to address climate change challenges and promote more sustainable agricultural systems.

## REFERENCES

1. Kumar, P.P.; Loh, C.S. Plant Tissue Culture for Biotechnology. *In Plant Biotechnology and Agriculture*, **2012**; pp. 131–138. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381466-1.00009-2>
2. Wijerathna-Yapa, A.; Ramtekey, V.; Ranawaka, B.; Basnet, BR Applications of In Vitro Tissue Culture Technologies in Breeding and Genetic Improvement of Wheat, *Plants*, **2022**, 11, 273. <https://doi.org/10.3390/plants11172273>
3. Gamborg, O.L. Plant Tissue Culture. Biotechnology. Milestones. *Vitr. Cell Dev. Biol. Plant*, **2002**, 38, 84–9. <https://doi.org/10.1079/IVP2001281>
4. Wijerathna-Yapa, A.; Hiti-Bandaralage, J. Tissue Culture—A Sustainable Approach to Explore Plant Stresses. *life*, **2023**, 13, 780. <https://doi.org/10.3390/life13030780>
5. Geng, Y.; Gao, L.; Yang, J. Epigenetic flexibility underlying phenotypic plasticity. *Progress in Botany*, **2013**, v. 74, p. 153-163. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30967-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30967-0_5)
6. Srivastava, D.; Shamim, M. D.; Kumar, M.; Mishra, A.; Maurya, R.; Sharma, D. Role of circadian rhythm in plant system: An update from development to stress response. *Environ. Exp. Bot*, **2019**, 162, 256–271. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1208-6>
7. Man, A. W. C.; Xia, N.; and Li, H. Circadian rhythm in adipose tissue: novel antioxidant target for metabolic and cardiovascular diseases. *Antioxidants*, **2020**. 9, 968. <https://doi.org/10.3390/antiox9100968>
8. McClung C.R. Plant circadian rhythms. *Plant Cell*. **2006**, 18, 4, pp. 792–803. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.040980>.
9. Creux N.; Harmer S. Circadian rhythms in plants. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2019**, 11, a034611. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034611>
10. Hotta, C. T. From crops to shops: how agriculture can use circadian clocks, *Journal of Experimental Botany*, **2021**, v. 72, n. 22, P. 7668–7679. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab371>
11. Greenwood, Mark; Locke, James Cw. The circadian clock coordinates plant development through specificity at the tissue and cellular level. *Current Opinion in Plant Biology*, **2020**, v. 53, p. 65-72. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.09.004>.
12. Muranaka, T., & Oyama. Monitoring circadian rhythms of individual cells in plants. Monitoring circadian rhythms of individual cells in plants. *Journal of plant research*, **2018**, v. 131, p. 15-21.
13. Oravec, M. W., & Greenham, K. The adaptive nature of the plant circadian clock in natural environments. *Plant Physiology*, **2022**, 190, 2, p. 968-980.
14. Staiger, D.; Green, R. RNA-based regulation in the plant circadian clock. *Trends in Plant Science*. **2011**, 16, p. 517–523. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.06.002>.
15. Gil, K.E.; Kim, W.Y.; Lee, H.J.; Faisal, M.; Saquib, Q.; Alatar A. A.; Park C.M. Contributes to a Thermoresponsive Protein Quality Control System in Arabidopsis. *Plant Cell*, **2017**, 29, p.2882–2894. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00612>
16. Webb AAR, Seki M, Satake A, Caldana C. Continuous dynamic adjustment of the plant circadian oscillator. *Nat Commun*, **2019**, 10, p. 4–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08398-5>.
17. Taniguchi, T.; Murayama, N.; Ario, N.; Nakagawa, A. C.; Tanaka, S.; Tomoita, Y.; & Ishibashi, Y. Photoperiod sensing of leaf regulates pod setting in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.), *Plant Production Science*. **2020**, 23, 3, p. 360-365. <https://doi.org/10.1080/1343943X.2019.1709512>.
18. Moher, M.; Jones, M.; & Zheng, Y. Photoperiodic Response of In Vitro *Cannabis sativa* Plants. *HortScience horts*, **2020**, 56, 1, p. 108-113. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI15452-20>.

19. Serrano-Bueno, G.; Sanchez de Medina Hernandez, V.; and Valverde, F. Photoperiodic signaling and senescence, an ancient solution to a modern problem? *Front. Plant Sci.* **2021**, 12, 634393. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.634393>.
20. Rezvani, M; Nadimi, S.; Zaefarian, F.; & Chauhan, B. S. Environmental factors affecting seed germination and seedling emergence of three Phalaris species. *Crop Protection*, **2021**, v. 148, p. 105743. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105743>.
21. Asher, G., & Zhu, B. Beyond circadian rhythms: emerging roles of ultradian rhythms in control of liver functions. *Hepatology*, **2023**, 77, n. 3, p. 1022-1035.
22. Greenham, K. & McClung, C. R. Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants. *Nat Rev Genet*, **2015**. 16, 10, p. 598–610. <https://doi.org/10.1038/nrg3976>
23. Lal, H., Verma, S. K., Wang, Y., Xie, M., & Young, M. E. Circadian rhythms in cardiovascular metabolism. *Circulation research*, **2024**, 134, 6, p. 635-658.
24. Nohales, M.A.; Kay, S.A. Molecular mechanisms at the core of the plant circadian oscillator. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, 23, 1061–1069. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3327>.
25. Inoue, K., Araki, T., and Endo, M. Circadian clock during plant development. *J. Plant Res.* **2018**, 131, 59–66. doi: 10.1007/s10265-017-0991-8
26. Dios, V.R.; Anderegg, W. R. L.; Li, X., Tissue, D. T. Circadian regulation of photosynthesis and transpiration from genes to ecosystems. *Environ. Exp. Bot.* **2018**, 152, 37–48. <https://doi: 10.1016/j.envexpbot.2017.09.010>.
27. Xu, X.; Yuan, L.; Yang, X.; Zhang, X.; Wang, L.; & Xie, Q. Circadian clock in plants: Linking timing to fitness. *Journal of integrative plant biology*, **2022**, 64, 4, p. 792-811. <https://doi.org/10.1111/jipb.13230>.
28. Harmer, S. L. The circadian system in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2009**. 60, 357–377. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.09205>.
29. McClung, C. R. Wheels within wheels: new transcriptional feedback loops in the Arabidopsis circadian clock. *F1000prime reports*, **2014**, 6, 2.
30. Bendix, C.; Marshall, C.M.; Harmon, F.G. Circadian clock genes universally control key agricultural traits. *Mol Plant.* **2015**; 8, 1135–52. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.03.003>.
31. Nakamichi, N., Kiba, T., Henriques, R., Mizuno, T., Chua, N. H., & Sakakibara, H. PSEUDO-RESPONSE REGULATORS 9, 7, and 5 are transcriptional repressors in the Arabidopsis circadian clock. *The Plant Cell*, **2010**, 22, 3, p. 594-605.
32. Rawat, R., Takahashi, N., Hsu, P. Y., Jones, M. A., Schwartz, J., Salemi, M. R., ... & Harmer, S. L. REVEILLE8 and PSEUDO-REPOSE REGULATOR5 form a negative feedback loop within the Arabidopsis circadian clock. *PLoS genetics*, **2011**, 7, 3, p. e1001350.
33. Alabadi, D., Oyama, T., Yanovsky, M.J., Harmon, F.G., Mas, P., and Kay, S.A. Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/ CCA1 within the Arabidopsis circadian clock. *Science*, **2001**, 293, n. 5531, p. 880-883.
34. Wang, X.; and Ma, L. Unraveling the circadian clock in Arabidopsis. *Plant Signal Behav.* **2013**. 8, e23014. <https://doi.org/10.4161/psb.23014>.
35. Seo, PJ, & Mas, P. STRESSing the role of the plant circadian clock. *Trends in Plant Science*, **2015**, 20, 4, p. 230-237.
36. Jones MA. Entrainment of the arabidopsis circadian clock. *J Plant Biol.* **2009**, 52, 202–9. <https://doi.org/10.1007/s12374-009-9030-1>.
37. Weng X.; Lovell J.T.; Schwartz S. L.; Cheng C.; Haque, T.; Zhang L, Complex interactions between day length and diurnal patterns of gene expression drive photoperiodic responses in a perennial C4 grass. *Plant Cell Environ.* **2019**; 42, 2165–82. <https://doi.org/10.1111/pce.13546>.
38. Michael, T.P.; Mockler T. C.; Breton, G.; McEntee, C.; Byer, A.; Trout J.D. Network discovery pipeline elucidates conserved time-of-day-specific cis-regulatory modules. *PLoS Genet.* **2008**, p. 4-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0040014>.

39. Xu, H., Zuo, Y., Wei, J., & Wang, L. The Circadian Clock Coordinates the Tradeoff between Adaptation to Abiotic Stresses and Yield in Crops. *Biology*, **2023**, 12, 11, p. 1364.
40. McClung CR. Circadian clock components offer targets for crop domestication and improvement. *Genes*. **2021**, 12, 374. <https://doi.org/10.3390/genes12030374>.
41. Ng, D. W. K., Miller, M., Yu, H. H., Huang, T. Y., Kim, E. D., Lu, J., ... & Chen, Z. J. A role for CHH methylation in the parent-of-origin effect on altered circadian rhythms and biomass heterosis in Arabidopsis intraspecific hybrids. *The Plant Cell*, **2014**, 26, 6, p. 2430-2440.
42. Ko, DK, Rohozinski, D., Song, Q., Taylor, SH, Juenger, TE, Harmon, FG, & Chen, ZJ. Temporal shift of circadian-mediated gene expression and carbon fixation contributes to biomass heterosis in maize hybrids. *PLoS genetics*, **2016**, 12, 7, p. e1006197.
43. Wang, Y., Wu, F., Lin, Q., Sheng, P., Wu, Z., Jin, X., ... & Wan, J. A regulatory loop establishes the link between the circadian clock and abscisic acid signaling in rice. *Plant Physiology*, **2023**, 191, 3, p. 1857-1870.
44. Fowler, S., Lee, K., Onouchi, H., Samach, A., Richardson, K., Morris, B., ... & Putterill, J. GIGANTEA: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in Arabidopsis and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. *The EMBO journal*, **1999**.
45. S Cao, M Ye, S Jiang, Involvement of *GIGANTEA* gene in the regulation of the cold stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep*, **2005**, 24, 683–690.
46. Ji, MG, Huh, JS, Lim, CJ, Ahn, G., Cha, JY, Jeong, SY, ... e Kim, WY. GIGANTEA functions as a co-repressor of cold stress response with a histone-modifying complex. *Plant Physiology and Biochemistry*, **2025**, v. 223, p. 109801.
47. M Riboni, M Galbiati, C Tonelli, L Conti, GIGANTEA enables drought escape response via abscisic acid-dependent activation of the florigens and SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS. *Plant Physiol*, **2013**, 162, 1706–1719.
48. Baek, D., Kim, W. Y., Cha, J. Y., Park, H. J., Shin, G., Park, J., ... & Yun, D. J. The GIGANTEA-ENHANCED EM LEVEL complex enhances drought tolerance via regulation of abscisic acid synthesis. *Plant Physiology*, **2020**, 184, 1, 443-458.
49. W-Y Kim, et al., Release of SOS2 kinase from sequestration with GIGANTEA determines salt tolerance in *Arabidopsis*. *Nat Commun*, **2013**, 4, 1352.
50. Hajdu, A., Nyári, D., Terecskei, K., Gyula, P., Ádám, É., Dobos, O., & Kozma-Bognár, L. LIP1 Regulates the Plant Circadian Oscillator by Modulating the Function of the Clock Component GIGANTEA. *Cells*, **2024**, 13, 17, 1503.
51. Kim, JA, Jung, He., Hong, JK *et al.* A redução da expressão de *GIGANTEA* em *Brassica rapa* transgênica aumenta a tolerância ao sal. *Plant Cell Rep*, **2016**, 1943–1954. <https://doi-org.ez80.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s00299-016-2008-9>.
52. Wang, L., Li, H., He, M., Dong, L., Huang, Z., Chen, L. & Zhao, X. GIGANTEA orthologs, E2 members, redundantly determine photoperiodic flowering and yield in soybean. *Journal of Integrative Plant Biology*, **2023**, 65, 1, pp. 188-202.
53. Jackson, S. D. Plant responses to photoperiod. *New Phytol.* **2009**, 181, 517–531. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02681.x>.
54. Roeber VM, Schmülling T e Cortleven A. O The photoperiod: handling and causing stress in plants. *Frontiers in Plant Science*, 12, **2022**, 781988. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.781988>.
55. Osnato M, Cota I, Nebhnani P, Cereijo U and Pelaz S. Photoperiod Control of Plant Growth: Flowering Time Genes Beyond Flowering. *Front. Plant Sci.* **2022**, 12:805635. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.805635>.
56. Hotta, C. T., Gardner, M. J., Hubbard, K. E., Baek, S. J., Dalchau, N., Suhita, D., ... & Webb, A. A. Modulation of environmental responses of plants by circadian clocks. *Plant, cell & environment*, **2007**, 30, 333-349. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01627.x>
57. Batista, D.S.; Felipe, S.H.S.; Silva, T.D.; de Castro, K.M.; Mamedes-Rodrigues, T.C.; Miranda, N.A.; Ríos-Ríos, A.M.; Faria, D.V.; Fortini, E.A. Light quality in plant tissue

- culture: Does it matter? *Vitr. Cell. Dev. Biol. Plant* **2018**, *54*, 195–215. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9902-5>
58. Garner, W.W.; Allard, H.A. Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *Mon. Weather Rev.* **1920**, *48*, 415.
  59. Micallef, B. J. Circadian Clocks/Photoperiodism and Crop Quality, **2011**
  60. Song, Y. H., Shim, J. S., Kinmonth-Schultz, H. A., and Imaizumi, T. Photoperiodic flowering: time measurement mechanisms in leaves. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2015**, *66*, 441–464. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-115555>.
  61. Lavie, O., Buxdorf, K., & Eshed Williams, L. Optimizing cannabis cultivation: an efficient in vitro system for flowering induction. *Plant Methods*, **2024**, *20*, 1, p. 141. <https://doi.org/10.1186/s13007-024-01265-5>.
  62. Zhang, M., Jiang, Y., Dong, H., Shan, X., Chen, H., Li, X., Ren, C. Comparative transcriptome analysis of oat varieties with different flowering performances under a short-day photoperiod. *BMC Plant Biology*, **2025**, *25*, 1, 1-17
  63. Plantenga, F. D., Heuvelink, E., Rienstra, J. A., Visser, R. G., Bachem, C. W., & Marcelis, L. F. Coincidence of potato CONSTANS (StCOL1) expression and light cannot explain night-break repression of tuberization. *Physiologia Plantarum*, **2019**. 167(2), 250-263. <https://doi.org/10.1111/ppl.12885>.
  64. Singh, R. K., Svystun, T., AlDahmash, B., Jonsson, A. M., and Bhalerao, R. P. Photoperiod- and temperature-mediated control of phenology in trees - a molecular perspective. *New Phytol.* **2017**, *213*, 511–524. <https://doi.org/10.1111/nph.14346>.
  65. Alter, H., Sade, Y., Sood, A., Carmeli-Weissberg, M., Shaya, F., Kamenetsky-Goldstein, R., & Spitzer-Rimon, B. Inflorescence development in female cannabis plants is mediated by photoperiod and gibberellin. *Horticulture Research*, **2024**, *11*, uhae245.
  66. Margay, A.R.; Ashraf, S.; Fatimah, N.; Jabeen, S.G.; Showkat, M.; Nayana R U, K.; Dilip, S.; Basu, S.R.; Aswathy, K.A. Plant Circadian Clocks: Unravelling the Molecular Rhythms of Nature. *Int. J. Plant Soil Sci.* **2024**, *36*, 596–617. <https://doi.org/10.9734/ijpss%2F2024%2Fv36i84890>
  67. Roblin, G., Moyen, C., Fleurat-Lessard, P., & Dédaldéchamp, F. Rapid osmocontractile response of motor cells of *Mimosa pudica* pulvini induced by short light signals. *Photochemistry and Photobiology*, **2024**.
  68. González-Delgado, A., Jiménez-Gómez, J. M., & Wabnik, K. Regulatory principles of photoperiod-driven clock function in plants. *Trends in Plant Science*, **2025**.
  69. Mohammadi, M. A., Xu, M., Wang, Y., Zhang, Z., Wai, M. H., Rizwan, H. M. & Cheng, Y. A highly efficient organogenesis system based on 6-benzylaminopurine and indole-6-butyric acid in *Suaeda glauca*-a medicinal halophyte under varying photoperiods. *Industrial Crops and Products*, **2024**, *216*, 118672. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.118672>
  70. Martini, A. N., & Papafotiou, M. In Vitro Seed and Clonal Propagation of the Mediterranean Bee Friendly Plant *Anthyllis hermanniae* L. *Sustainability*, **2023**, *15*, 5, p. 4025. <https://doi.org/10.3390/su15054025>
  71. Bajwa, M. N., Khanum, M., Zaman, G., Ullah, M. A., Farooq, U., Waqas, M., ... & Abbasi, B. H. Effect of Wide-Spectrum Monochromatic Lights on Growth, Phytochemistry, Nutraceuticals, and Antioxidant Potential of In Vitro Callus Cultures of *Moringa oleifera*. *Molecules*, **2023**, *28*, 3, p. 1497. <https://doi.org/10.3390/molecules28031497>.
  72. Kirakosyan, R. N., Kalasnikova, E. A., Bolotina, E. A., Saleh, A., Balakina, A. A., & Zaytseva, S. M. Localization of Secondary Metabolites in Relict Gymnosperms of the Genus *Sequoia* In Vivo and in Cell Cultures In Vitro, and the Biological Activity of Their Extracts. *Life*, **2024**, *14*, 12, p. 1694. <https://doi.org/10.3390/life14121694>.
  73. Wojtania, A., Markiewicz, M., & Waligórski, P. Growth cessation and dormancy induction in micropropagated plantlets of *Rheum rhaponticum* ‘Raspberry’ influenced by

- photoperiod and temperature. *International Journal of Molecular Sciences*, **2022**, 24, 1, p. 607. <https://doi.org/10.3390/ijms24010607>.
74. Zhu, T. T., Xu, Y. L., Ta, H., Zhang, J. Z., Xu, D. D., Fu, J. & Lou, H. X., Reversible Glc-conjugation/hydrolysis modulates the homeostasis of lunularic acid in *Marchantia polymorpha* growth. *The Plant Journal*, **2025**, 121, 1, p. e17166. <https://doi.org/10.1111/tpj.17166>.
  75. Sun, D., Zhang, S., Ai, J., Wang, Z., Shi, G., Guo, J. & Liu, Y. Physiological and molecular mechanisms of radicle development of somatic embryos in *Schisandra chinensis* cultured in the dark. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, **2024**, 157, 1. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02662-9>.
  76. Wang, D., Hu, X., Ye, H., Wang, Y., Yang, Q., Liang, X., & Wang, K. Cell-specific clock-controlled gene expression program regulates rhythmic fiber cell growth in cotton. *Genome Biology*, **2023**, 24, 1, p. 49. <https://doi.org/10.1186/s13059-023-02886-0>.
  77. Mu, Z., Li, Z., Nulu, N. P. C., Kalaipandian, S., Biddle, J. M., Bazrafshan, A., ... & Adkins, S. W. A Photomixotrophic System to Improve the Growth of In Vitro-Cultured Seedlings of Coconut (*Cocos nucifera* L.). *Horticulturae*, **2025**, 11, 3, p. 224. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11030224>.
  78. Durul, M. S., & Aktaş, T. K. In vitro propagation of *Cydonia oblonga* cv. Esme. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, **2023**, 47, 4, pp. 578-589. <https://doi.org/10.55730/1300-011X.3110>.
  79. Wang, E., Zhou, T., Jing, S., Dong, L., Sun, X., Fan, Y., & Song, B. Leaves and stolons transcriptomic analysis provide insight into the role of phytochrome F in potato flowering and tuberization. *The Plant Journal*, **2023**, 113, 2, p. 402-415. <https://doi.org/10.1111/tpj.16056>.
  80. Bertsouklis, K., Vlachou, G., Trigka, M., & Papafotiou, M. In Vitro Studies on Seed Germination of the Mediterranean Species *Anthyllis barba-jovis* to Facilitate Its Introduction into the Floriculture Industry. *Horticulturae*, **2022**, 8, 10, pp. 889. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8100889>.
  81. Takase, T., Shimizu, M., Takahashi, S., Nemoto, K., Goto, F., Yoshida, C. & Nishihara, M. De Novo Transcriptome Analysis Reveals Flowering-Related Genes That Potentially Contribute to Flowering-Time Control in the Japanese Cultivated Gentian *Gentiana triflora*. *International Journal of Molecular Sciences*, **2022**, 23, 19, p. 11754. <https://doi.org/10.3390/ijms231911754>.
  82. Zale, P. J., Clayton, A., Nix, J., & Taylor, M. Asymbiotic in vitro seed germination, in vitro seedling development, and ex vitro acclimatization of *Spiranthes*. *Applications in Plant Sciences*, **2022**, 10, 5, pp. e11494. <https://doi.org/10.1002/aps3.11494>.
  83. Ramos, S. M., Berman-Bahena, S., Alvarez, L., Sánchez-Carranza, J. N., Bernabé-Antonio, A., Román-Guerrero, A., & Cruz-Sosa, F. Effect of plant growth regulators on different explants of *Artemisia ludoviciana* under photoperiod and darkness conditions and their Influence on achillin production. *Processes*, **2022**, 10, 8, p. 1439. <https://doi.org/10.3390/pr10081439>.
  84. Amoo, S. O., Hlatshwayo, N. A., Doležal, K., & Olowoyo, J. O. Seed germination and in vitro propagation of three threatened endemic South African Aloe species. *South African Journal of Botany*, **2022**, 147, p. 1214-1220. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.04.033>.
  85. Bohdanovych, T. A.; Matvieieva, N. A. Effect of Phenylalanine and Light on the growth of hairy roots of *Artemisia tilesii* Ledeb. *Biotechnologia Acta*, **2023**, 16, n. 5, p. 61-69. <https://doi.org/10.15407/biotech16.05.061>.
  86. Istiqomah, N., Indriani, H., Wijaya, Y. I. F., Yalapuspita, D. C., Handini, E., Diantina, S. & Semiarti, E. Clonal propagation of rare orchid species *Paphiopedilum* spp. (Orchidaceae) to save Indonesian biodiversity. *South African Journal of Botany*, **2024**, 172, pp. 779-785. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.05.004>.

87. Pecheva, D., & Danova, K. Light and auxin treatments affect morphogenesis and polyphenolics productivity in *Artemisia alba* Turra cell aggregates in vitro. *BioRisk*, **2022**, 17, pp. 213-225. <https://doi.org/10.3897/biorisk.17.77452>.
88. Ahsan, S.M.; Injamum-Ul-Hoque, M.; Das, A.K.; Shaffique, S.; Hasan, M.; Kang, S.-M.; Lee, I.-J.; Choi, H.W. Tuning Up In Vitro Growth and Development of *Cannabis sativa*: Recent Advances in Micropropagational Approach. *Appl. Biosc.* **2025**, 4, 12. <https://doi.org/10.3390/applbiosci4010012>
89. Shen, P., Gao, S., Hu, J., Li, Y., Lei, T., & Shi, L. In vitro flowering of the distylous plant *Plumbago auriculata* Lam. *South African Journal of Botany*, **2021**, 137, 492-498. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.11.018>.
90. Sarma, I., Deka, A. C., & Sarma, T. C. A Protocol for Rapid Clonal Propagation and Microrrhizome Production of *Curcuma caesia* Roxb. (Zingiberaceae): A Critically Endangered Medicinal Plant of North East India. *Indian Journal of Agricultural Research*, **2021**, 55, 1. <https://doi.org/10.18805/IJARE.A-5338>
91. Xu, Y., Yang, M., Cheng, F., Liu, S., & Liang, Y. Effects of LED photoperiods and light qualities on in vitro growth and chlorophyll fluorescence of *Cunninghamia lanceolata*. *BMC Plant Biology*. **2020**, 20, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02480-7>.
92. Rahimi Khonakdari, M., Rezadoost, H., Heydari, R., & Mirjalili, M. H. Effect of photoperiod and plant growth regulators on in vitro mass bulblet proliferation of *Narcissus tazetta* L. (Amaryllidaceae), a potential source of galantamine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, **2020**, 142, pp. 187-199. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01853-y>.
93. Kumar, S. S., Arya, M., Mahadevappa, P., and Giridhar, P. Influence of photoperiod on growth, bioactive compounds and antioxidant activity in callus cultures of *Basella rubra* L. *J. Photochem. Photobiol.* **2020**, B 209:111937. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111937>
94. Viridi, A. S., Singh, N., Bains, K. K., & Kaur, A. Effect of photoperiod and growth media on yield and antioxidant properties of wheatgrass juice of Indian wheat varieties. *Journal of Food Science and Technology*, **2021**, 58, pp. 3019-3029. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04805-8>.
95. Castro, K. M., Batista, D. S., Fortini, E. A., Silva, T. D., Felipe, S. H. S., Fernandes, A. M. & Otoni, W. C. Photoperiod modulates growth, morphoanatomy, and linalool content in *Lippia alba* L. (Verbenaceae) cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, **2019**, 139, 139-153. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01672-w>
96. El-Sayed, S. F., Taha, S. S., Darwish, O. S., & Mwessongo, S. Z. EFFECT OF SILVER THIOSULPHATE AND PHOTOPERIOD ON IN VITRO TUBERIZATION OF THREE POTATO (*SOLANUM TUBEROSUM* L.) CULTIVARS. *Plant Archives*, **2021**, 21, 1, pp. 308-317. <https://doi.org/10.51470/PLANTARCHIVES.2021.v21.S1.049>.
97. Choirunnisa, J. P., & Wardana, R. Effect of photoperiod and KNO<sub>3</sub> concentration on the induction and development of potato (*Solanum tuberosum*) microtuber in vitro. *Cell Biology and Development*, **2021**, 5, 2. <https://doi.org/10.13057/cellbioldev/v050203>
98. Wafa, A., Fekry, W., Hassan, A., & Khatab, I. In vitro MICROTUBERIZATION OF SOME POTATO (*Solanum tuberosum* L.) CULTIVARS AS RESPONSE TO MEDIA CONSTITUENTS AND PHOTOPERIOD. *Journal of Productivity and Development*, **2024**, 29, 2, pp. 81-98.
99. Shofiyani, A., Suwanto, Suprayogi, & Yuniaty, A. Growth characteristics and production of bioactive compounds in aromatic ginger (*Kaempferia galanga*) callus under photoperiod and auxin treatments. *International Journal of Agriculture and Biology*, 28 **2023**, 29, 6, p. 410-420. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.2047>
100. Al-Aizari, A. A., Dewir, Y. H., Al-Obeed, R. S., Al-Saif, A. M., Almutairi, K. F., Murthy, H. N., & Hakiman, M. Study of shoot tip necrosis problems of Fegra Fig (*Ficus palmata* Forssk.) in vitro in Saudi Arabia. *HortScience*, **2024**, 59, 8, pp. 1127-1132. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI17765-24>.

101. Fortini, E. A., Batista, D. S., de Castro, K. M., Silva, T. D., Felipe, S. H. S., Correia, L. N. F., Otoni, W. C. Photoperiod modulates growth and pigments and 20-hydroxyecdysone accumulation in Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] grown in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, **2020**, 142, 3, pp. 595-611. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01886-3>
102. Guillén-Rodríguez, S., Cruz-López, C., Martínez-Ávalos, J. G., & Martínez-Palacios, A. Effect of N6-Benzyladenine and photoperiod on the flowering of in vitro protocorms of *Bletia urbana* (Orchidaceae). *Revista fitotecnia mexicana*, **2022**, 45, 4, pp. 475-482. <https://doi.org/10.35196/rfm.2022.4.475>.
103. Sarropoulou, V., Maloupa, E., & Grigoriadou, K. In vitro direct organogenesis of the Cretan dittany (*Origanum dictamnus* L.), an important threatened Greek endemic species. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, **2022**, 50, 2, pp. 12715. <https://doi.org/10.15835/nbha50212715>.
104. Meneses, L. S., Morillo, L. E., & Vásquez-Castillo, W. In vitro propagation of *Vaccinium floribundum* Kunth from seeds: promissory technology for mortiño accelerated production. *Canadian Journal of Plant Science*, **2022**, 102, 1, pp. 216-224. <https://doi.org/10.1139/cjps-2020-0290>.
105. Abbasi, B. H., Khan, T., Khurshid, R., Nadeem, M., Drouet, S., & Hano, C. UV-C mediated accumulation of pharmacologically significant phytochemicals under light regimes in in vitro culture of *Fagonia indica* (L.). *Scientific reports*, **2021**, 11, 1, pp. 679. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79896-6>.
106. Arcidiacono, M., Catalano, C., Motisi, A., Sajeve, M., Carimi, F., & Carra, A. Influence of culture conditions on in vitro asymbiotic germination of *Anacamptis longicornu* and *Ophrys panormitana* (Orchidaceae). *Plants*, **2021**, 10, 11, pp. 2543. <https://doi.org/10.3390/plants10112543>.
107. Kondhare, K. R., Kumar, A., Patil, N. S., Malankar, N. N., Saha, K., & Banerjee, A. K. Development of aerial and belowground tubers in potato is governed by photoperiod and epigenetic mechanism. *Plant Physiology*, **2021**, 187, 3, pp. 1071-1086. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab409>.
108. Ricco, M.V, Bari, M.L, Catalano, A.V, López, P., Dobrecky, C.B, Teves, S.A & Álvarez, M.A. Dynamics of polyphenol biosynthesis by calli cultures, suspension cultures and wild specimens of the medicinal plant *Ligaria cuneifolia* (Ruiz & Pav.) Tiegh. (Loranthaceae). Analysis of their biological activity. *Plants*, **2021**, 10, 8, p. 1713. <https://doi.org/10.3390/plants10081713>.
109. Wang, Q.; Liu, W.; Leung, C.C.; Tarté, D.A.; Gendron, J.M. Plants distinguish different photoperiods to independently control seasonal flowering and growth. *Science* **2024**, 383, eadg9196. <https://doi.org/10.1126/science.adg9196>
110. Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M. and Araki, T. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science*, **1999**, 286, 1960–1962. <https://doi.org/10.1126/science.286.5446.196>
111. Putterill J, Robson F, Lee K, Simon R, Coupland G. The CONSTANS gene of Arabidopsis promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell*, **1995**, 80, 847–857.
112. Pittendrigh, Colin S.; Minis, Dorothea H. The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clocks. *The American Naturalist*, **1964**, 98, 902, pp. 261-294.
113. Dutta, M.; Mali, S.; Raturi, V.; Zinta, G. Transcriptional and post-transcriptional regulation of tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). *J. Plant Growth Reg.* 2024, 43, 1–24. <https://doi.org/10.1007/s00344-023-11053-5>
114. Jo, E. A., Tewari, R. K., Hahn, E. J., & Paek, K. Y. Effect of photoperiod and light intensity on in vitro propagation of *Alocasia amazonica*. *Plant Biotechnology Reports*, **2008**, 2, 3, 207-212. <https://doi.org/10.1007/s11816-008-0063-6>.

115. Hussain, A., Qarshi, I. A., Nazir, H., & Ullah, I. Plant tissue culture: current status and opportunities. In: Recent advances in plant in vitro culture. *IntechOpen*, **2012**.
116. Xiang, Y.; Sapir, T.; Rouillard, P. Interaction between photoperiod and variation in circadian rhythms in tomato. *BMC Plant Biol*, **2022**, 22, 187. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03565-1>.
117. Andrade, M. V. S., de Castro, R. D., da Silva Cunha, D., Neto, V. G., Carosio, M. G. A., Ferreira, A. G., Ribeiro, P. R. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni cultivated under different photoperiod conditions: Improving physiological and biochemical traits for industrial applications. *Industrial Crops and Products*, **2021**, 168, pp. 113595. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113595>.

## Capítulo II

---

### **Efeito do fotoperíodo na morfofisiologia de abacaxizeiro cultivado *in vitro* em sistema fotomixotrófico**

*Artigo a ser submetido na Revista Vegetos (ISSN: 2229-4473)*

## Resumo

No estado do Maranhão, a variedade 'Turiaçu' destaca-se por suas características peculiares, mas enfrenta limitações especialmente na obtenção de mudas de qualidade, o que torna a micropropagação uma alternativa, sendo o fotoperíodo um fator determinante para o sucesso do cultivo *in vitro*. O objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas morfofisiológicas envolvidas na micropropagação de abacaxi das variedades 'Pérola' e 'Turiaçu' sob diferentes fotoperíodos. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 2 x 4 (variedades de abacaxi: 'Pérola' e 'Turiaçu' x fotoperíodos: 4, 8, 16 e 24 h de luz por dia). Avaliou-se parâmetros de crescimento, fisiológicos e anatômicos. A variedade Pérola apresentou crescimento da parte aérea, diâmetro da base e acúmulo de biomassa superiores ao Turiaçu. O fotoperíodo de 24 h proporcionou efeitos negativos sobre o crescimento das plantas de ambas as variedades e nos parâmetros fotossintéticos, além disso ele reduziu a espessura do parênquima aquífero e aumentou a quantidade de estômatos em ambas variedades. Em contraste, os fotoperíodos de 8 e 16 h proporcionaram os melhores resultados em termos de crescimento da raiz, aumento da área foliar, acúmulo de biomassa e aumento na concentração dos pigmentos fotossintéticos nas duas variedades. Portanto, concluiu-se que fotoperíodos intermediários (8 e 16 horas) é o mais recomendável para o desenvolvimento das variedades de abacaxi estudadas.

**Palavras-chave:** *Ananas comosus* (L.) Merrill; micropropagação; luminosidade; fotossíntese; ritmo circadiano.

### Abstract

In the state of Maranhão, the 'Turiaçu' variety stands out for its unique characteristics, but faces limitations, especially in obtaining quality seedlings, which makes micropropagation an alternative, with photoperiod being a determining factor for the success of *in vitro* cultivation. The objective of this work was to evaluate the morphophysiological responses involved in the micropropagation of pineapple varieties 'Pérola' and 'Turiaçu' under different photoperiods. The experiment was conducted in a completely randomized design, in a 2 x 4 factorial scheme (pineapple varieties: 'Pérola' and 'Turiaçu' x photoperiods: 4, 8, 16 and 24 h of light per day). Growth, physiological, and anatomical parameters were evaluated. The Pérola variety showed superior shoot growth, base diameter, and biomass accumulation compared to Turiaçu. The 24-hour photoperiod had negative effects on plant growth in both varieties and on photosynthetic parameters; in addition, it reduced the thickness of the water-storing parenchyma and increased the number of stomata in both varieties. In contrast, photoperiods of 8 and 16 h provided the best results in terms of root growth, increased leaf area, biomass accumulation, and increased content of photosynthetic pigments in both varieties. Therefore, it is concluded that intermediate photoperiods (8 and 16 hours) are the most recommended for the development of the pineapple varieties studied.

**Keywords:** *Ananas comosus* L. Merrill; micropropagation; luminosity; photosynthesis; Circadian rhythm

## 1. INTRODUÇÃO

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill) é uma cultura de clima tropical e subtropical pertencente à família Bromeliaceae, com fruto apreciado em todo o mundo (Yan et al. 2021, Kessel-Domini et al. 2022). Em 2024, a produção mundial de abacaxi foi estimada em 29.36 milhões de toneladas, em que a Indonésia, Filipinas, Costa Rica e Brasil foram os principais produtores (Faostat, 2025). O Brasil, considerado um dos centros de origem dessa espécie, apresenta grande variabilidade genética, no entanto mais de 95% das lavouras são dominadas pelas variedades 'Smooth Cayenne' e 'Pérola' (Reinhardt et al. 2018; Souza et al. 2021).

Entre as variedades promissoras e pouco exploradas no Brasil destaca-se o abacaxizeiro 'Turiaçu' nativo do município de Turiaçu, no estado do Maranhão, que surgiu por seleção local realizada por povos originários e pequenos agricultores (Araujo et al. 2007). Seus frutos possuem características diferenciadas, como maior doçura, aroma agradável e cor intensa, o que resulta em uma elevada aceitação pelos consumidores locais (Araujo et al. 2012; Reinhardt et al. 2018). Apesar desse potencial agrônômico e comercial, sua expansão ainda é limitada pela falta de tecnologias eficientes que permitam a produção de mudas em larga escala (Reis et al. 2019). Nesse contexto, torna-se necessária a adoção de estratégias que viabilizem a multiplicação rápida e padronizada de plantas.

Dentre as alternativas capazes de atender essa demanda, o cultivo *in vitro* destaca-se como uma técnica fundamental, tanto para suprir a produção massal de mudas de qualidade fitossanitária, quanto para facilitar o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas para melhoramento vegetal (Kumar e Loh, 2012; Wijerathna-Yapa et al. 2022). Entretanto, o sucesso de protocolos de micropropagação depende diretamente da taxa de proliferação obtida *in vitro* e da estabilidade das plantas durante a fase de aclimatação *ex vitro* (Miler et al. 2019). Fatores como a luz desempenham um papel crucial no sucesso da produção *in vitro* de plantas, juntamente com outros fatores como a composição do meio de cultivo, as taxas de trocas gasosas entre o *headspace* do recipiente da cultura e o ambiente externo, a temperatura e a plasticidade fisiológica da espécie diante das alterações do sistema de cultivo (Cavallaro et al. 2022). Além de atuar como fonte energética para a fotossíntese, a luz também funciona como um importante sinal ambiental capaz de regular processos fisiológicos e de desenvolvimento vegetal.

Nesse sentido, os organismos vivos desenvolveram mecanismos endógenos de cronometragem com o propósito de antecipar, com eficiência, as mudanças ambientais previsíveis ligadas às oscilações diurnas, chamados de relógios circadianos (Srivastava et al.

2019; Man et al. 2020). Na maioria das plantas, este relógio auxilia na previsão das mudanças diárias e sazonais, no ambiente circundante, e permite que elas adaptem os processos fisiológicos e de desenvolvimento ao período de tempo ideal (McClung 2006). Entre os fatores que impactam no ritmo circadiano destaca-se o fotoperíodo, definido como o período diário de exposição a luz.

O fotoperíodo influencia diretamente diversos processos fisiológicos nas plantas, incluindo a fotossíntese, a floração, e a frutificação. Plantas ajustam seus processos fisiológicos e fenológicos em resposta ao fotoperíodo e ao controle do relógio biológico e da expressão gênica associada, o que pode ser explorado no cultivo *in vitro* para otimizar a produção de plantas vigorosas e homogêneas (Osnato et al. 2022; Nascimento et al. 2025). Em *Ananas comosus*, embora seja uma espécie tipicamente CAM em condições naturais, o ambiente *in vitro* frequentemente favorece um comportamento metabólico mais próximo ao C3, em função da alta disponibilidade hídrica, baixa variação térmica e limitação na difusão de CO<sub>2</sub> no interior dos frascos (Ming et al. 2015; Alves et al. 2023). Nesse contexto, alterações no fotoperíodo podem impactar diretamente a eficiência fotossintética, o balanço energético e a alocação de biomassa, o que influencia no crescimento e na qualidade das mudas produzidas.

As alterações do fotoperíodo podem promover o crescimento vegetativo, aumentar a biomassa e sincronizar processos fenológicos, possibilitando uma produção mais uniforme e previsível, contribuindo para o planejamento agrícola e a maximização da produtividade (Taniguchi et al. 2020; Serrano-Bueno et al. 2021; Rezvani et al. 2021; Moher et al. 2024). Por outro lado, quando há um desalinhamento entre o relógio circadiano e os ritmos ambientais, pode haver uma diminuição da aptidão da plantas, como redução da tolerância a estresses e menor eficiência fotossintética (Hotta 2021).

Nesse contexto, este estudo objetivou avaliar as respostas morfofisiológicas envolvidas na micropropagação de abacaxi das variedades 'Pérola' e 'Turiaçu' sob diferentes fotoperíodos, propondo que tal estratégia pode viabilizar sua produção em larga escala e contribuir para o aproveitamento de sua variabilidade genética e comercial no Brasil.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material vegetal**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos - LCT da Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, São Luís, Brasil (latitude 2°35'32" S e longitude

44°13'47" O). Foram utilizadas brotações de abacaxizeiro 'Pérola' e 'Turiaçu' previamente estabelecidas *in vitro*, e subcultivadas sucessivamente em 30 mL de meio MS no banco de germoplasma do LCT (Murashige; Skoog, 1962) (PhytoTechnology<sup>®</sup>, Lenexa, KS, USA), suplementado com 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA), 4 µM de 6 benzilaminopurina (BAP) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA), 2 µM de ácido naftalenoacético (ANA) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA) e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose (Dinâmica<sup>®</sup> Ltda, Jardim da Glória, SP, Brazil). O pH ajustado em 5,7 ± 0,1, e o meio solidificado com 2,0 g L<sup>-1</sup> de Phytigel (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA) e autoclavado a 120°C a uma pressão de 1,5 atm, por 15 minutos.

## 2.2 Condições experimentais

Para a realização do experimento, em câmara de fluxo laminar, 2 brotos com aproximadamente 3 cm de comprimento da parte aérea (e com excisão do sistema radicular) foram inoculados em cada frasco de vidro com capacidade de 350 mL, com 60 mL de meio de cultura MS, suplementados com 100 mg L<sup>-1</sup> de mio inositol, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 2,7 µM de ANA, solidificado com 2,0 g L<sup>-1</sup> de Phytigel, com pH ajustado em 5,7 ± 0,1, e autoclavado a 120 °C a uma pressão de 1,5 atm, por 15 minutos.

Os frascos de cultivo foram mantidos em sala de crescimento a uma temperatura média de 25 ± 2 °C em diferentes fotoperíodos (4, 8, 16 e 24 h de luz por dia) e irradiância de 65 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fornecidas de quatro lâmpadas tubulares do tipo LED brancos T8 (9W, Avant, São Paulo - SP, Brasil). Os frascos foram vedados com tampas rígidas de polipropileno, com dois orifícios (10 mm) recobertos por membranas de fita microporosa, conforme proposto por Saldanha et al. (2012).

Após 45 dias de cultivo *in vitro*, foram realizadas as análises de crescimento, anatômicas e fisiológicas.

## 2.3 Análise de crescimento *in vitro*

Foram realizadas as análises das seguintes características de crescimento: comprimento total da parte aérea (cm), comprimento total da maior raiz (cm), diâmetro da base da roseta (mm), massa fresca da parte aérea e da raiz (g), massa seca da parte aérea e da raiz (g), e área foliar (cm<sup>2</sup>). A massa seca foi obtida após a secagem do material fresco em estufa de circulação

forçada de ar a 70°C por 48 horas (Couto et al. 2014) e a determinação da área foliar foi feita com auxílio do programa ImageJ (Schneider et al. 2012).

#### **2.4 Análises anatômicas e micromorfometria foliar**

Na caracterização anatômica estrutural, as amostras foram retiradas da região mediana da quinta folha do ápice para a base e fixadas em solução FAA 50% (formaldeído, ácido acético e álcool etílico), conforme metodologia de Johansen (1940) durante 72 horas e desidratadas com concentrações crescentes de etanol em série etílica (30%, 40%, 50%, 60% e 70%) a cada 1 h, em seguida foram desidratadas novamente em série etílica de (80%, 90%, 95% e 100% a cada 2 h, e logo após incluídas em historesina (Historesin<sup>®</sup>, Leica Instruments, Heidelberg, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante. Para a montagem das lâminas, cortes transversais com 6 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo (Lupetec modelo MRP2015, São Carlos, Brasil).

Os cortes foram recolhidos em lâminas de vidro, secos à temperatura ambiente e corados com azul de toluidina (0,05% em pH 4,0) (O'Brien; McCully, 1981) por 8 min. As imagens foram capturadas em microscópio (Global Optics<sup>®</sup> modelo NO226T) equipado com câmera (Bioptika<sup>®</sup> CMOS 5.0).

As análises micromorfométricas foram realizadas a partir de imagens digitais do limbo foliar, obtidas com o uso da objetiva de 4x. Os parâmetros avaliados foram: espessura da epiderme abaxial e adaxial, parênquima clorofiliano, parênquima aquífero, comprimento transversal e longitudinal dos feixes vasculares, conforme metodologia de Silva-Moraes et al. (2025). As medidas foram determinadas com o auxílio do software ImageJ<sup>®</sup>. As análises foram realizadas em três pontos distintos de cada fotografia correspondente a cada material vegetal (folha) e consideradas cinco repetições biológicas por tratamento, o que totalizou 120 observações (8 tratamentos x 5 repetições x 3 pontos) para cada parâmetro.

#### **2.5 Índice estomático**

O índice estomático foi avaliado por meio de impressões da superfície abaxial (inferior) da quinta folha do ápice para a base, com o uso de adesivo instantâneo (Super Bonder<sup>®</sup>). As impressões foram colocadas em lâminas de vidro e examinadas em microscópio óptico (microscópio Leica DME, Wetzlar, Alemanha), acoplado a uma câmera digital (Leica EC3), e

analisadas com o uso do software LAS EZ (Leica Microsystems). As imagens foram processadas no software Image J® e o índice estomático (IE) calculado conforme Cutter (1986):

$$IE (\%) = [C2/(C1 + C2)] * 100$$

Em que: C1= células epidérmicas e C2= estômatos

## 2.6 Fluorescência da clorofila *a*

Na análise da fluorescência da clorofila *a* foi avaliada a fluorescência inicial (F0), fluorescência máxima (Fm), rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm), energia absorvida por centro de reação ativo (RC/ABS) e o índice de desempenho (PI), através de medições após adaptação das plantas ao escuro por 30 min. As avaliações foram feitas no segundo par de folha do ápice para a base com o uso de um fluorômetro não modulado (Pocket PEA; Plant Efficiency Analyzer, Hansatech, King's Lynn, Reino Unido). Foi aplicado um pulso de luz saturante de 3500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Gonçalves et al. 2010).

## 2.7 Conteúdo relativo de água

Na realização da avaliação do conteúdo relativo de água na folha (CRA), foram cortados seis discos de folhas completamente expandidas de cada amostra, com diâmetro de 0,6 cm<sup>2</sup>, com o auxílio de um perfurador. Os discos foram pesados para mensurar a massa fresca (MF), após a pesagem eles foram submersos em água destilada por 24 horas e em seguida, realizado a segunda pesagem, da massa dos discos turgidos (MT). Após este processo os discos foram desidratados em estufa de circulação de ar forçado à 70°C por 24 horas, por fim os discos foram novamente pesados para mensurar a massa seca (MS). O cálculo do CRA foi feito com base na expressão matemática de Barr e Weatherley (1962):

$$CRA (\%) = \frac{MF - MS}{MT - MS} \times 100$$

## 2.8 Determinação de pigmentos fotossintéticos

Os pigmentos foram extraídos de três discos foliares (0,21 cm<sup>2</sup> de diâmetro) da quinta folha contada do ápice para a base da planta. Os discos foliares foram imersos em 3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO; Isofar® Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brasil) e deixado no escuro por 48 h (Santos et al. 2008). As medições de absorvância das amostras a 665 nm, 645 nm e 480 nm foram realizadas com um espectrofotômetro UV-visível (mono-feixe) (modelo UV-M51;

BEL Engineering Company, Monza, Itália) em uma cubeta de quartzo de 10 mm. Para os cálculos da clorofila a, b, e os carotenoides foi usado o método descrito por Wellburn (1994):

$$\text{Clorofila } a \text{ (}\mu\text{gmL}^{-1}\text{)} = 12,19A_{665} - 3,45A_{645}$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (}\mu\text{gmL}^{-1}\text{)} = 21,99A_{645} - 5,32A_{665}$$

$$\text{Clorofila total (}\mu\text{gmL}^{-1}\text{)} = (12,19A_{665} - 3,45A_{645}) + (21,99A_{645} - 5,32A_{665})$$

$$\text{Carotenoides total (}\mu\text{gmL}^{-1}\text{)} = \frac{(1000A_{480} - 2,14 \text{ Clorofila } a - 70,16 \text{ Clorofila } b)}{220}$$

## 2.9 Avaliações na fase de aclimatização *ex vitro*

Após 45 dias no cultivo *in vitro*, 15 plantas de cada tratamento foram retiradas dos frascos de cultivo, o que totalizou 120 plantas, provenientes dos 8 tratamentos experimentais (2 variedades  $\times$  4 fotoperíodos). As mudas foram lavadas em água corrente para retirada de resíduos do meio de crescimento e transferidas para tubetes de polietileno (280 cm<sup>3</sup>) preenchidos com substrato comercial (Carolina Soil<sup>®</sup>, composto por 75% de turfa Sphagnum e 25% vermiculita) com textura fina a média. As plantas foram então transferidas para uma casa de vegetação (2°31'51"S, 44°18' 24"W).

Durante essa etapa, não foram aplicados tratamentos fotoperiódicos, em que todas as mudas foram mantidas sob condições ambientais uniformes, de modo que as respostas avaliadas representassem efeitos residuais dos fotoperíodos previamente aplicados durante o cultivo *in vitro*. As plantas permaneceram sob irrigação por sistema de microaspersão acionado por 15 minutos a cada 3 horas, das 6:00 às 18:00 h, em temperatura média de 27,5 °C, umidade relativa média de 82,1% e luz natural com intensidade média de 1150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , correspondente a fotoperíodo natural aproximado de 12 horas.

Após 45 dias no cultivo *ex vitro*, foram avaliadas a taxa de sobrevivência das plantas (%) aclimatadas. Também foram avaliados os parâmetros de crescimento, anatômicos, pigmentos fotossintéticos e a fluorescência da clorofila *a*, conforme as mesmas variáveis descritas no *in vitro*. Adicionalmente, foi realizada a taxa fotossintética, com o analisador de gás a infravermelho (IRGA, Infrared Gas Analyzer - LI-6400 XT, Licor Ltda, USA).

## 2.10 Taxa fotossintética *ex vitro*

As análises de trocas gasosas foram realizadas com o analisador de gás a infravermelho (IRGA, Infrared Gas Analyzer - LI-6400 XT, Licor Ltda, USA). Foi determinada a taxa fotossintética líquida (A) ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a condutância estomática (gs) ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a transpiração (E) ( $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e a relação entre a concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) e concentração externa de  $\text{CO}_2$  ( $C_a$ ) ( $C_i/C_a$ ). A partir desses valores, foram calculados a eficiência carboxilativa ( $A/C_i$ ) ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{ppm}^{-1}$ ) e a eficiência intrínseca no uso da água ( $A/\text{gs}$ ) ( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ), sob uma concentração de  $\text{CO}_2$  de  $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$  de ar, umidade relativa do ar de  $60 \pm 5\%$  e a temperatura foliar de  $28^\circ\text{C}$  a  $31^\circ\text{C}$ . Para otimizar a abertura dos estômatos, todas as medições foram realizadas sob luz artificial saturada de  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , gerada por um diodo emissor de luz, com 10% de luz azul.

## 2.11 Análises estatísticas

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial  $2 \times 4$  composto por duas variedades de abacaxi ('Pérola' e 'Turiaçu') e quatro fotoperíodos (4, 8, 16 e 24 h de luz), que totalizou 8 tratamentos. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade de Shapiro-Wilk. As seguintes variáveis foram transformadas a partir da equação  $\sqrt{(x+0,5)}$  para atender aos pressupostos da ANOVA: Epiderme abaxial, condutância estomática, transpiração, eficiência carboxilativa. O conteúdo relativo de água foi transformado por meio da equação  $\arcsen\sqrt{(x/100)}$ . As médias de todas as variáveis foram comparadas por meio de análise de variância (ANOVA) e posteriormente pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software estatístico R versão 4.3.2 (R Core Team 2023).

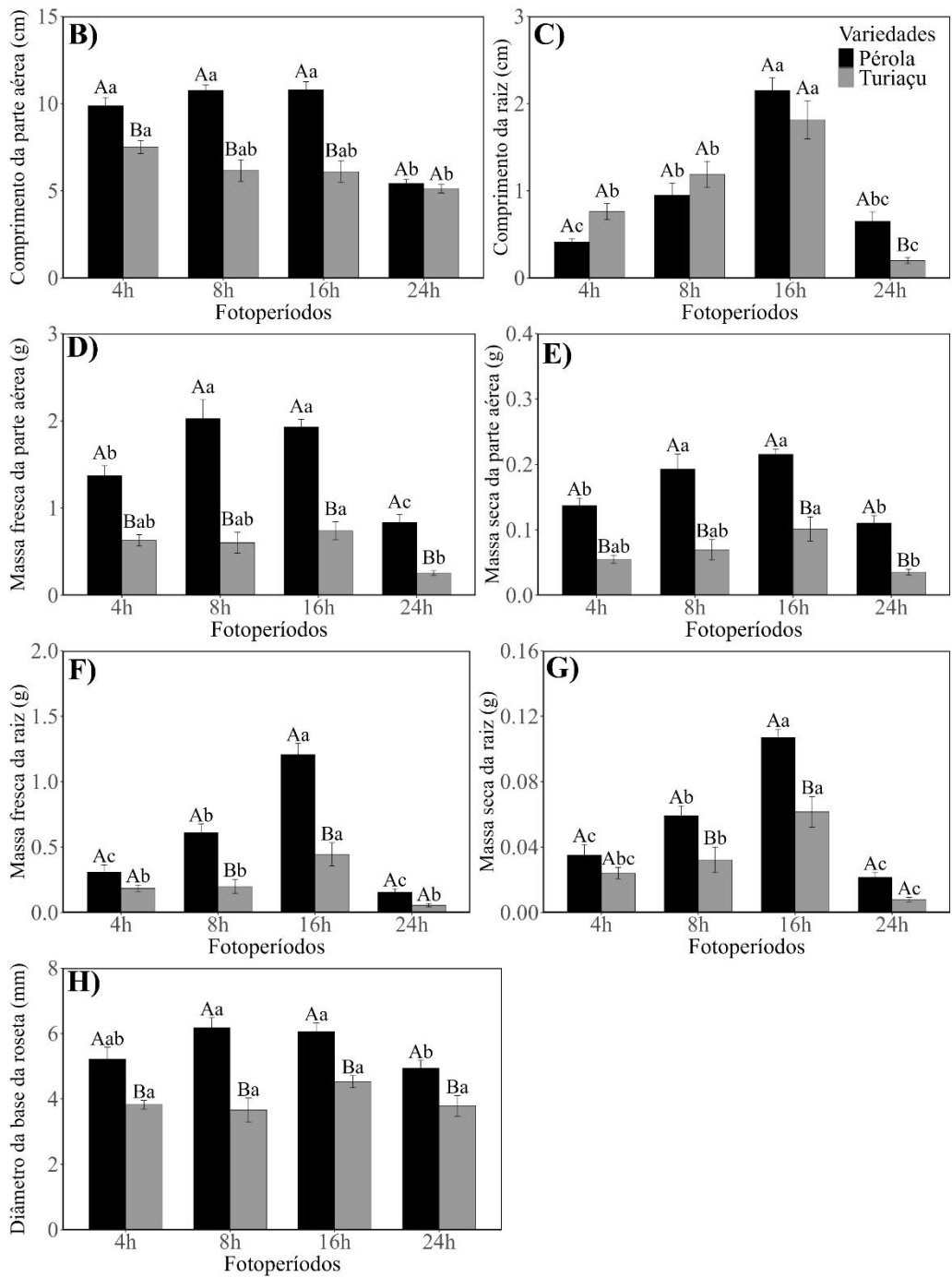
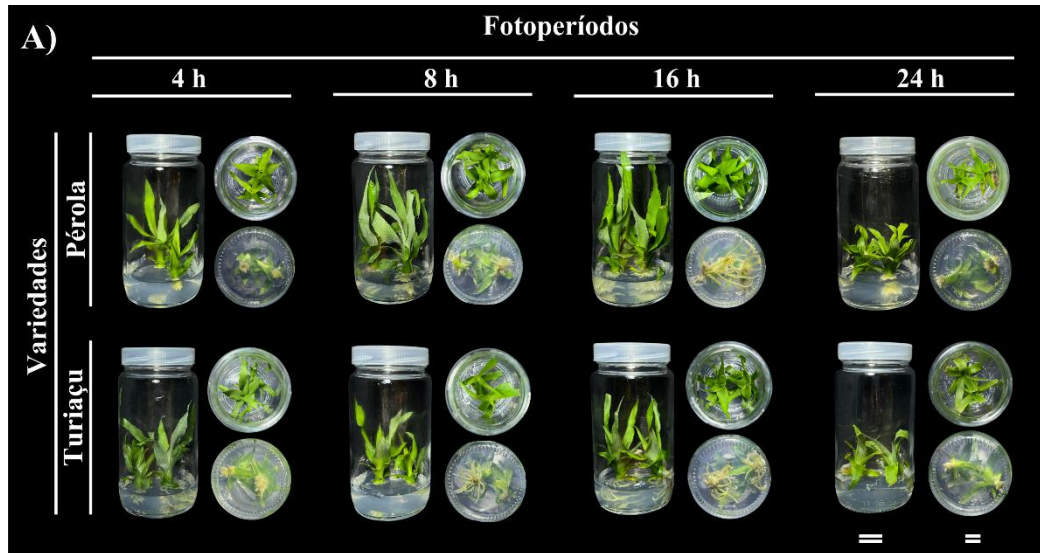
## 3. RESULTADOS

### O fotoperíodo influenciou o crescimento das variedades de abacaxi cultivadas *in vitro*

Os parâmetros de crescimento apresentaram diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre os diferentes fotoperíodos, bem como entre as variedades (Pérola e Turiaçu). O comprimento da parte aérea foi aproximadamente 48% maior na variedade Pérola em relação à Turiaçu na maioria dos fotoperíodos, enquanto o diâmetro da base da roseta foi cerca de 41% superior no Pérola (Figura 1A, 1B, 1H). Para o tamanho da raiz, a variedade Pérola se mostrou superior a Turiaçu apenas no tratamento com 24 h de luz (Figura 1C).

O acúmulo de biomassa apresentou aumento de 174% na variedade Pérola e 139% na variedade Turiaçu, quando submetidas a fotoperíodos intermediários (8 h e 16 h), embora o Pérola tenha sido superior ao Turiaçu no acúmulo de biomassa (Figura 1E, 1G).

O fotoperíodo de 24 h afetou negativamente o crescimento da parte aérea e da raiz nas duas variedades, com plantas pouco desenvolvidas. Em contraste, o fotoperíodo de 16 h proporcionou os maiores comprimentos de raiz e acúmulo de biomassa em ambas as variedades.



**Figura 1.** Parâmetros de crescimento das plantas de abacaxi das variedades Pérola e Turiaçu sob diferentes fotoperíodos (4, 8, 16, e 24h), após 45 dias de cultivo *in vitro*. **A)** Fenótipo das plantas, Barra equivale a 2 cm. **B)** Comprimento da parte aérea (cm), **C)** Comprimento da maior raiz (cm), **D)** Massa fresca da parte aérea (g), **E)** Massa seca da parte aérea (g), **F)** Massa fresca da raiz (g), **G)** Massa seca da raiz (g), **H)** Diâmetro da base da roseta (mm). Letras maiúsculas comparam as médias das duas variedades sob o mesmo fotoperíodo, enquanto letras minúsculas comparam a mesma variedade sob diferentes fotoperíodos (teste de Tukey;  $P \leq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão ( $n = 8$ ).

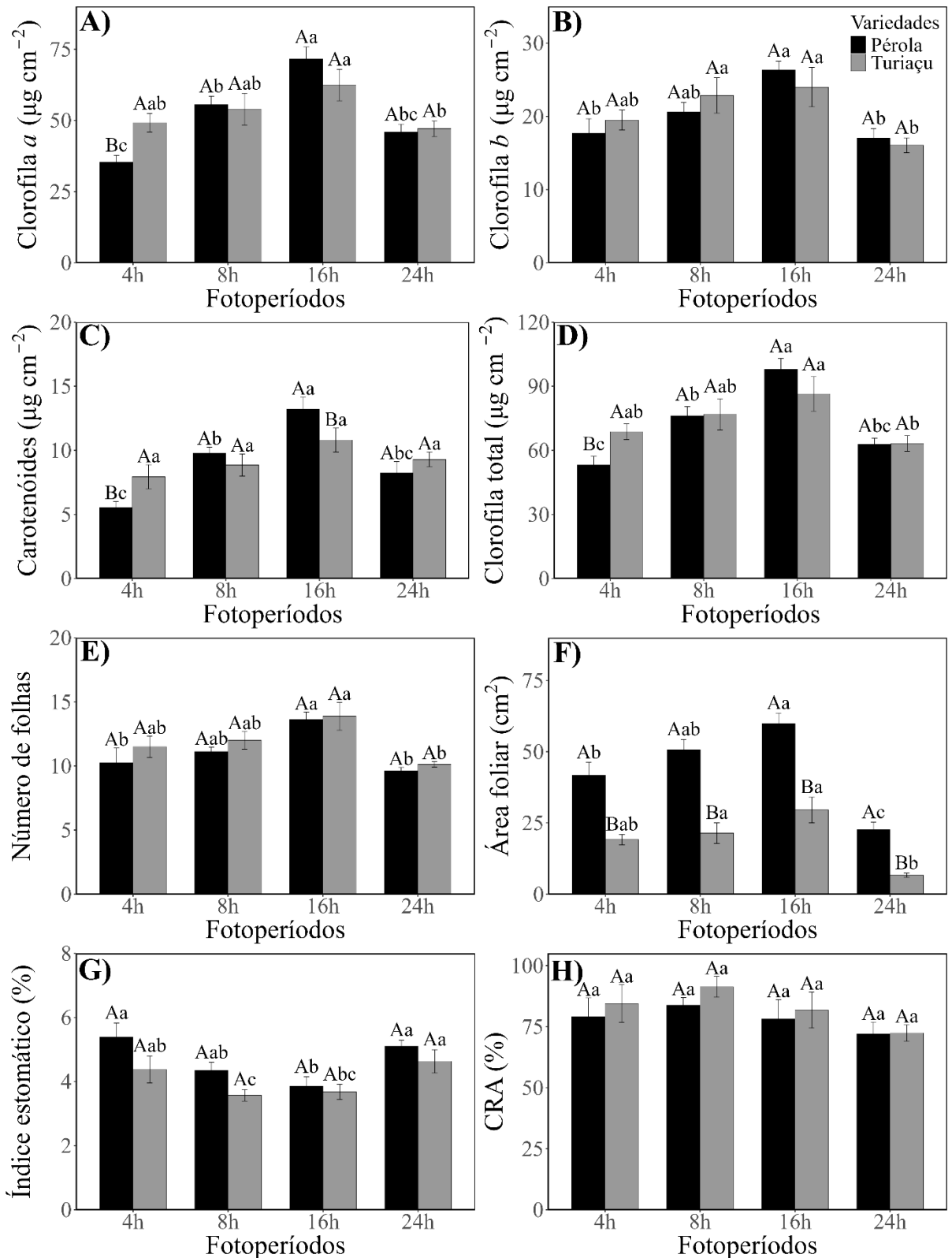
### **O fotoperíodo influenciou parcialmente os parâmetros foliares e pigmentos fotossintéticos das variedades de abacaxi cultivadas *in vitro***

A concentração de clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides e clorofila total não apresentou diferenças significativas entre as variedades expostas na maioria dos fotoperíodos (Figura 2A, B, C, D). No entanto, no fotoperíodo de 4 h a variedade Turiaçu apresentou uma concentração de clorofila *a* superior a variedade Pérola. Houve diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre os fotoperíodos. Os extremos (4 e 24 h de luz) reduziram concentração de clorofila *a* e clorofila *b* nas duas variedades (Figura 2 A e B). Enquanto que o fotoperíodo de 16 h proporcionou concentrações mais elevadas de clorofilas também em ambas as variedades.

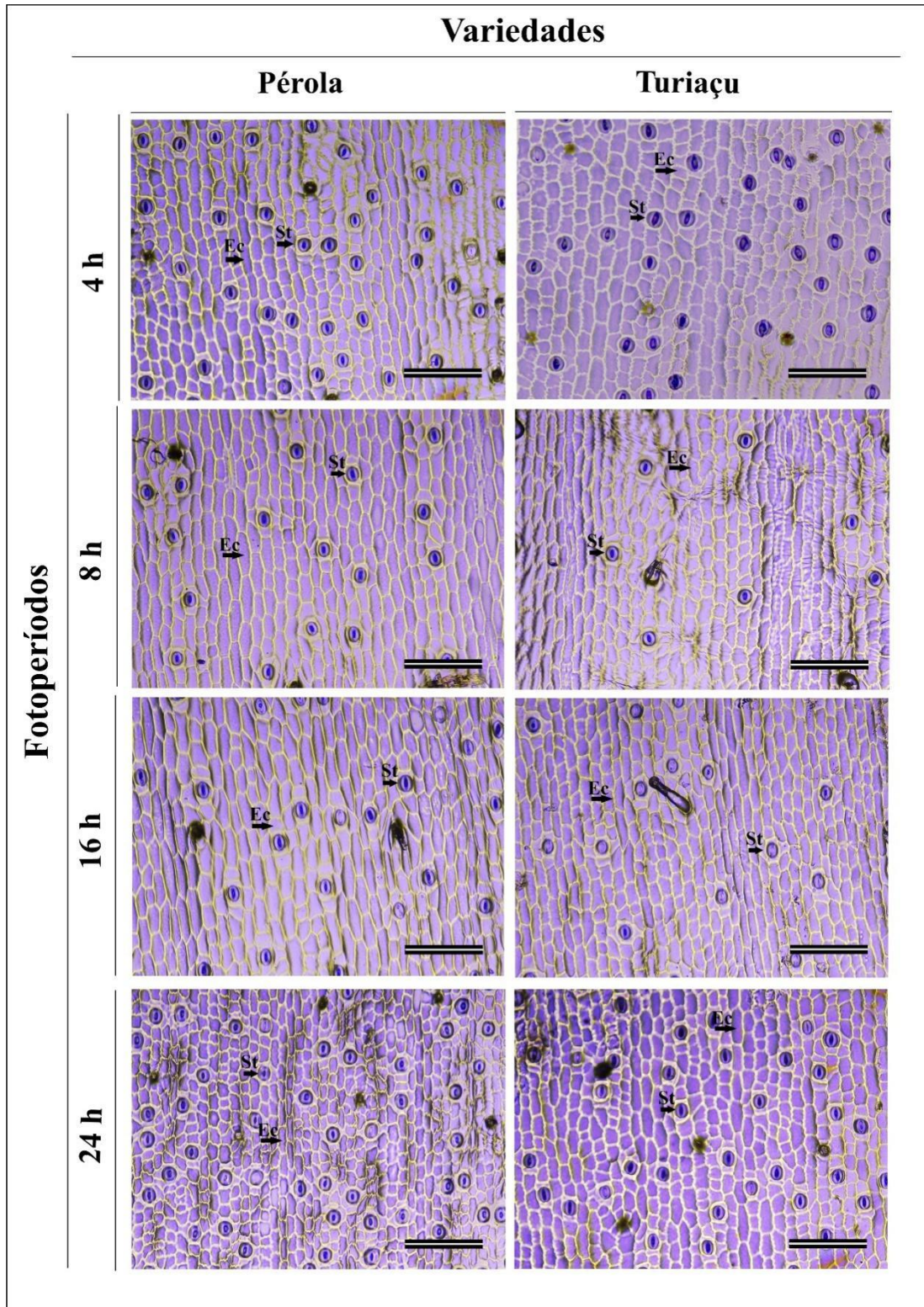
Em relação a concentração de carotenoides e clorofila total, a variedade Turiaçu não apresentou diferença significativa entre os fotoperíodos, já a variedade Pérola se mostrou mais sensível, pois sob o fotoperíodo de 16 h apresentou o maior conteúdo de carotenoides e clorofila total (Figura 2 C e D).

As variedades não diferiram em relação ao número de folhas, no entanto, sofreram influência dos fotoperíodos (Figura 2 E). Na variedade Pérola, os fotoperíodos de 8 e 16 h proporcionaram maiores quantidades de folhas, enquanto na variedade Turiaçu, além de 8 e 16 h, o fotoperíodo de 4 h também apresentou plantas com grandes quantidades de folhas. Com relação a área foliar, a variedade Pérola apresentou uma área de 127% maior que a variedade Turiaçu (Figura 2 F). Em ambas variedades, a exposição a 8 e 16 h possibilitou as maiores áreas foliares. Enquanto as plantas expostas a 24 h de luz apresentaram uma menor área foliar.

Em relação ao índice estomático, as variedades não diferiram estatisticamente, mas sofreram influência dos fotoperíodos (Figura 2 G). Os fotoperíodos de 4 e 24 h proporcionaram os maiores índices estomáticos em ambas as variedades, com aumentos de 32% e 21%, respectivamente, em relação ao fotoperíodo de 8 h, e de 48% e 36% em relação a 16 h (Figura 3).



**Figura 2.** Parâmetros foliares e pigmentos fotossintéticos. **A)** Clorofila a, **B)** Clorofila b, **C)** Carotenóides, **D)** Índice estomático, **E)** Número de folhas, **F)** Área foliar, **G)** Índice estomático e **H)** Conteúdo relativo de água na folha (CRA). Letras maiúsculas comparam as médias das duas variedades sob o mesmo fotoperíodo, enquanto letras minúsculas comparam a mesma variedade sob diferentes fotoperíodos (teste de Tukey;  $P \leq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão ( $n = 8$ ).

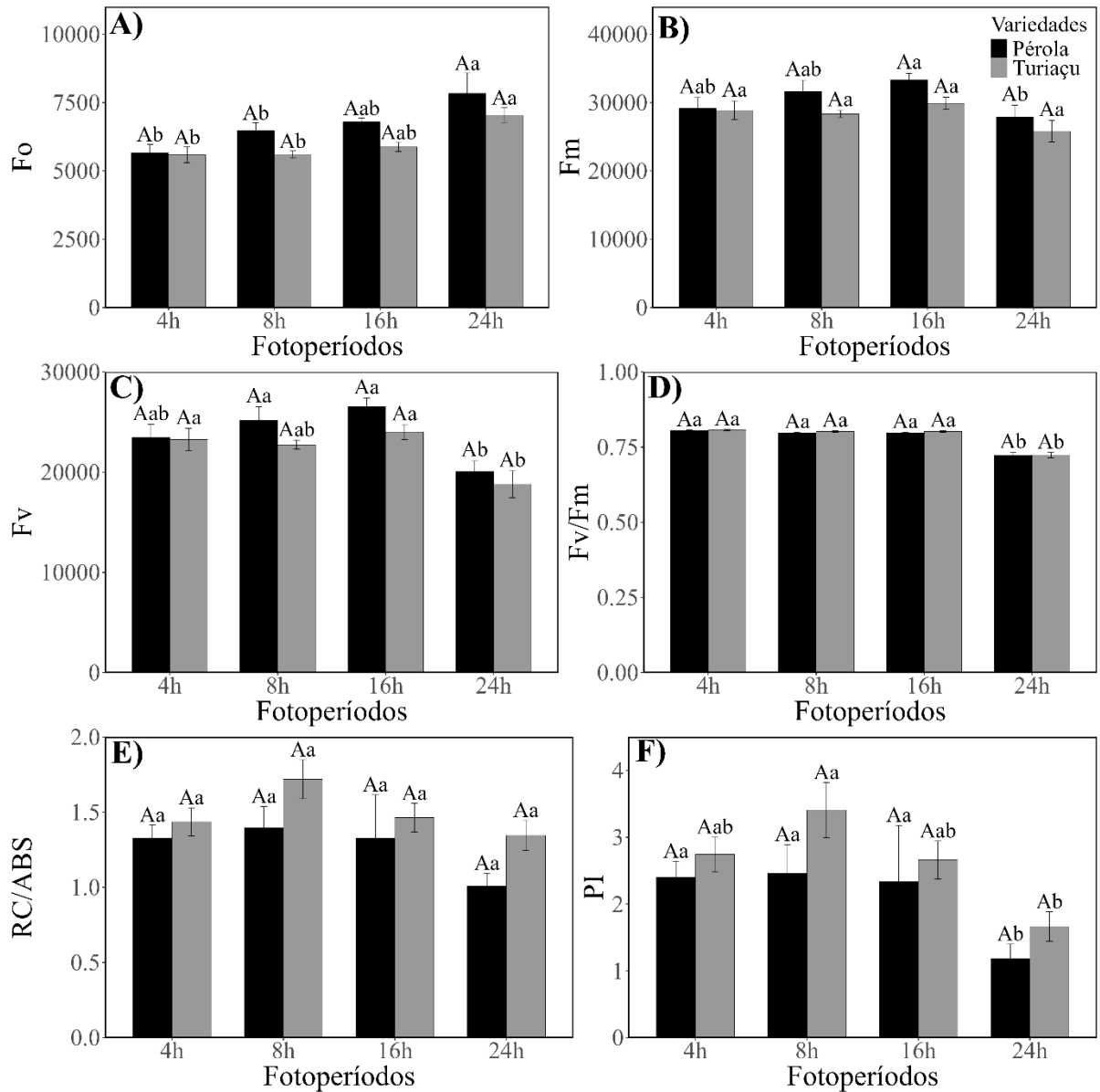


**Figura 3.** Impressões epidérmicas da face abaxial das folhas de abacaxi das variedades Pérola e Turiapu, sob diferentes fotoperíodos (4, 8, 16, e 24h), após 45 dias de cultivo *in vitro*, em objetiva de 10x. Ec: Célula epidérmica, St: Estômato. Barra equivale a 100 µm.

### **O fotoperíodo influenciou parcialmente os parâmetros da Fluorescência da clorofila *a* das variedades de abacaxi cultivadas *in vitro***

Não foram observadas diferenças significativas entre as variedades para os parâmetros fotoquímicos ( $P > 0,05$ ), mas foram observadas diferenças entre os regimes de fotoperíodo ( $P \leq 0,05$ ). Os maiores níveis de fluorescência mínima ( $F_o$ ) foram obtidos nos fotoperíodos mais longos (16 e 24 h) em ambas variedades. A fluorescência máxima ( $F_m$ ) foi maior com 4, 8 e 16 h de luz na variedade Pérola, enquanto que na variedade Turiaçu, esse parâmetro não diferiu entre os fotoperíodos. A fluorescência variável ( $F_v$ ) também foi maior com 4, 8 e 16 h de luz em ambas variedades. (Figura 4 A-B-C).

Em relação a eficiência máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ) o fotoperíodo de 24 h propiciou os menores níveis de eficiência, com  $F_v/F_m$  abaixo de 0,75 (Figura 4 D). Os fotoperíodos não influenciaram estatisticamente a energia luminosa absorvida pelo centro de reação (RC/ABS). Já o Índice de Performance (PI) foi influenciado pelos fotoperíodos, em que com 24 h de luz houve uma redução do o índice em 93% na variedade Pérola e 88% na variedade Turiaçu (Figura 4 E, F).

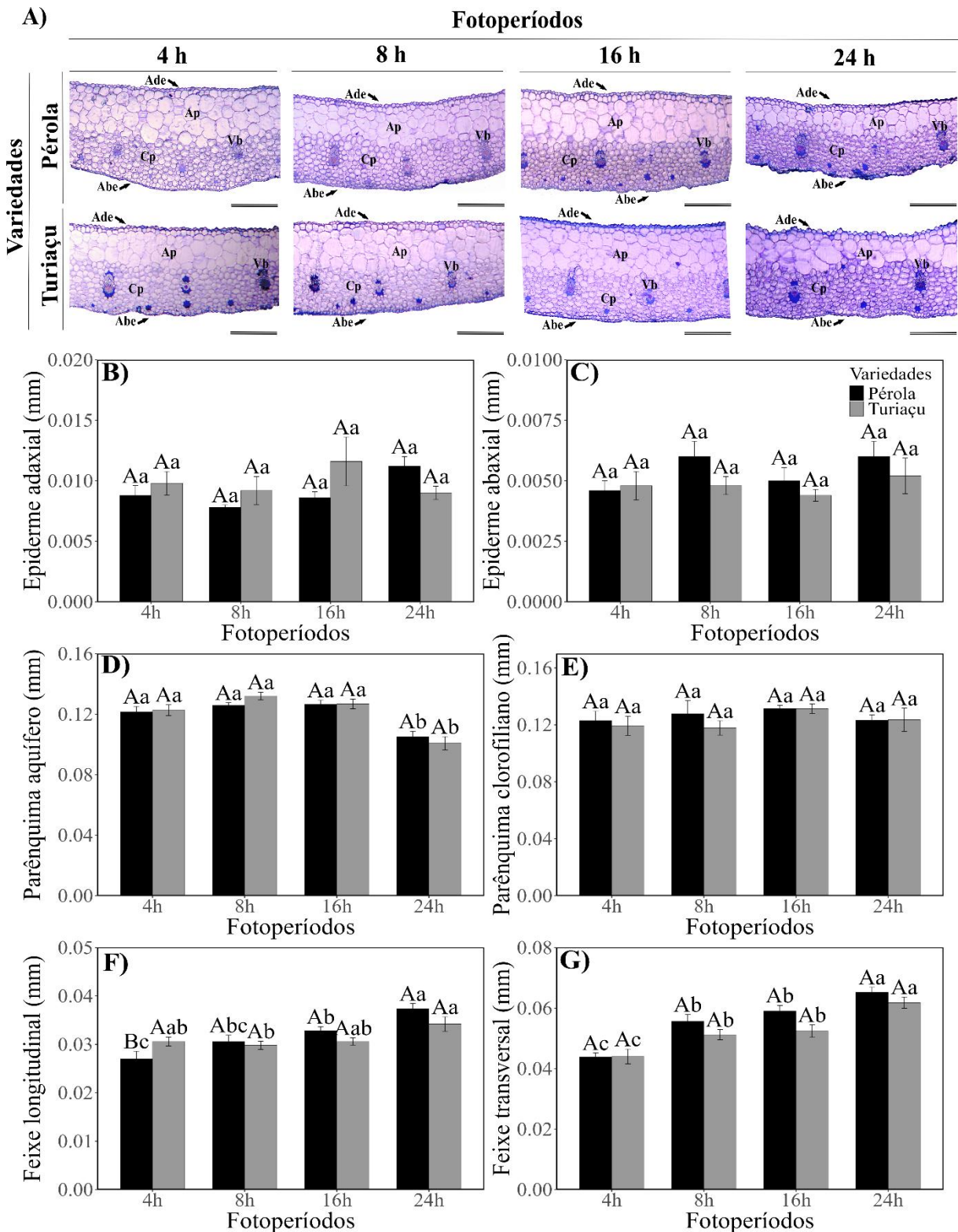


**Figura 4.** Parâmetros da Fluorescência da clorofila *a* das plantas de abacaxi das variedades Pérola e Turiaçu sob diferentes fotoperíodos (4, 8, 16, e 24h), após 45 dias de cultivo *in vitro*. **A)** Fluorescência inicial (Fo), **B)** Fluorescência máxima (Fm), **C)** Fluorescência variável (Fv), **D)** Eficiência quântica máxima do PSII (Fv/Fm), **E)** energia luminosa absorvida pelo centro de reação (RC/ABS), **F)** Índice de Performance. Letras maiúsculas comparam as médias das duas variedades sob o mesmo fotoperíodo, enquanto letras minúsculas comparam a mesma variedade sob diferentes fotoperíodos (teste de Tukey;  $P \leq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão ( $n = 5$ ).

#### O fotoperíodo influenciou parcialmente os parâmetros anatômicos das variedades de abacaxi cultivadas *in vitro*

O fotoperíodo não afetou a maioria das características anatômicas, porém exerceu influência sobre a espessura do parênquima aquífero e dimensões dos eixos longitudinal e

transversal dos feixes vasculares (Figura 5 A-B-C-D-E-F). Sob o regime de luz de 24 h as duas variedades apresentaram menores espessuras do parênquima aquífero e maiores comprimentos dos feixes longitudinais e transversais.



**Figura 5.** Parâmetros micromorfométricos foliares de abacaxi das variedades Pérola e Turiçu sob diferentes fotoperíodos (4, 8, 16, e 24h), após 45 dias de cultivo *in vitro*. **A)** Seção

transversal da folha, **B**) Espessura da epiderme adaxial (mm), **C**) Espessura da epiderme abaxial (mm), **D**) Espessura do parênquima aquífero (mm), **E**) Espessura do parênquima clorofilado (mm), **F**) Espessura do feixe vascular transversal (mm), e **G**) Espessura do feixe vascular longitudinal. Letras maiúsculas comparam as médias das duas variedades sob o mesmo fotoperíodo, enquanto letras minúsculas comparam a mesma variedade sob os fotoperíodos (teste de Tukey;  $P \leq 0,05$ ). Ade = epiderme adaxial, Abe = epiderme abaxial, Ap = parênquima aquífero, Cp = parênquima clorofilado, Vb = feixe vascular. Os valores são médias  $\pm$  erro padrão ( $n = 5$ ). Barra equivale a 200  $\mu\text{m}$

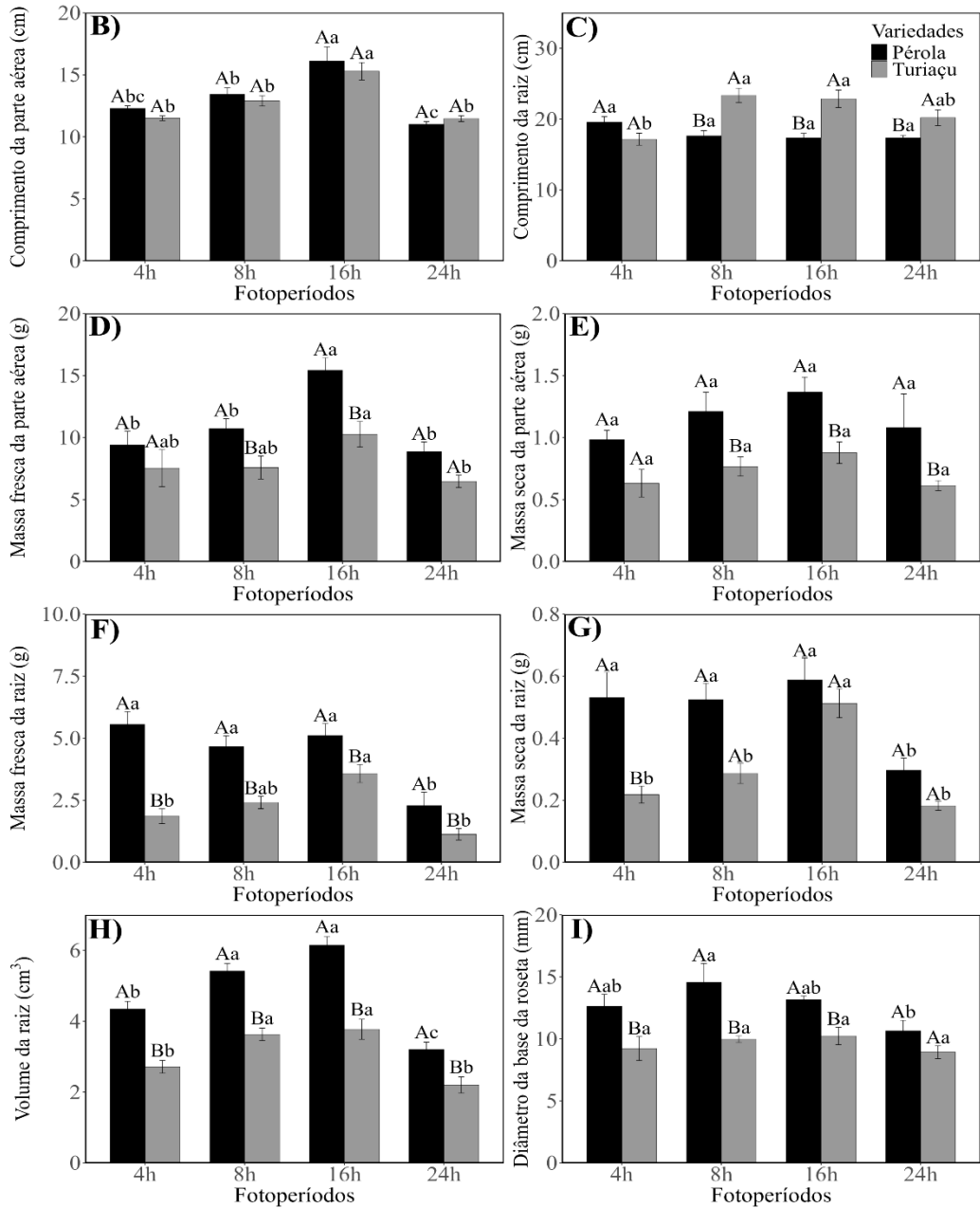
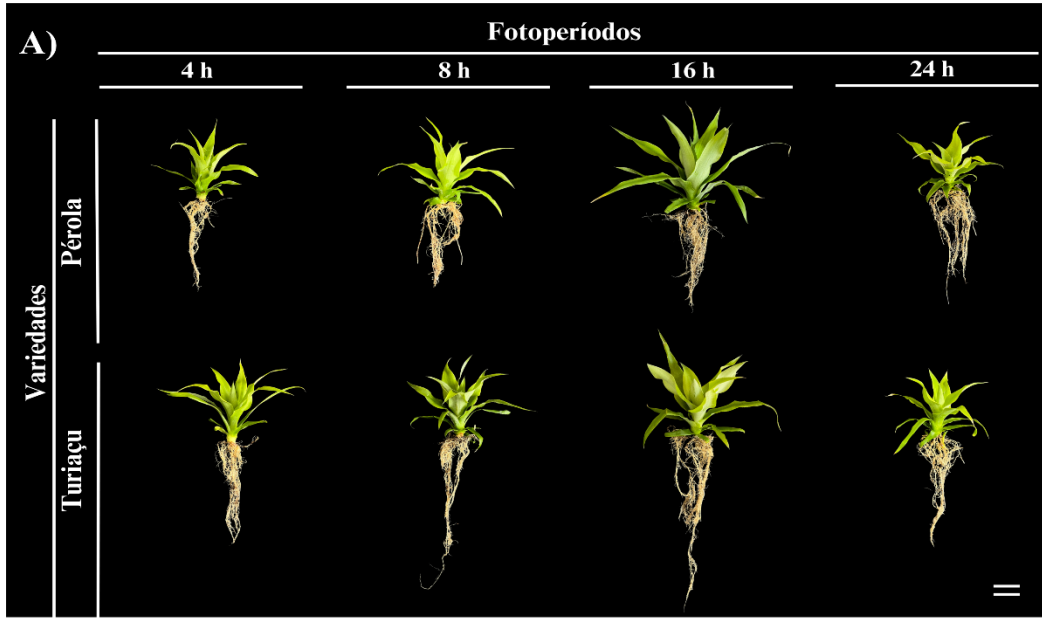
### **O crescimento das plantas foi influenciado pelo fotoperíodo também na fase *ex vitro***

As 120 plantas transferidas para as condições de cultivo *ex vitro* apresentaram 100% de sobrevivência. Considerando que os tratamentos fotoperiódicos foram aplicados exclusivamente durante o cultivo *in vitro*, as respostas observadas na fase *ex vitro* refletem efeitos fisiológicos residuais decorrentes das condições luminosas previamente impostas. Nesse contexto, verificou-se que os parâmetros de crescimento apresentaram diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre os fotoperíodos, bem como entre as variedades. Apenas para o comprimento da parte aérea não foram observadas diferenças entre as variedades, no entanto, entre fotoperíodos, o de 16 h propiciou um maior crescimento da parte aérea, enquanto o de 24 h proporcionou plantas menores (Figura 6 A e B).

O comprimento da raiz apresentou diferença significativa entre as variedades e em função dos fotoperíodos usados durante a fase *in vitro* ( $P \leq 0,05$ ), em que nos fotoperíodos de 8, 16 e 24 h a variedade Turiaçu apresentou as maiores raízes. Para a variedade Pérola não houve diferença significativa entre os fotoperíodos (Figura 6 A e C).

O abacaxi Pérola apresentou as maiores massas fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFR), em que o fotoperíodo de 16 h usado durante a fase *in vitro* foi o responsável pelos maiores valores de MFPA das plantas de Pérola aclimatadas. Já para a variedade Turiaçu, além de 16 h, os fotoperíodos de 4 h e 8 h também elevaram os valores de MFPA das plantas aclimatadas, enquanto 24 h diminuiu a MFPA e MFR em ambas variedades (Figura 6 D e F).

O acúmulo de biomassa da parte aérea foi semelhante entre os fotoperíodos, enquanto o acúmulo de biomassa das raízes reduziu 49% no Pérola e 64% no Turiaçu, provenientes do regime fotoperiódico de 24 h (Figura 6 E e G). O volume da raiz apresentou comportamento semelhante, em que as plantas provenientes dos fotoperíodos de 4 h e 24 h exibiram os menores valores (Figura 6 H). Para o diâmetro da base da roseta, somente o fotoperíodo de 24 h não apresentou diferença entre as variedades, nos demais, a variedade Pérola apresentou-se 33% superior à variedade Turiaçu (Figura 6 I).

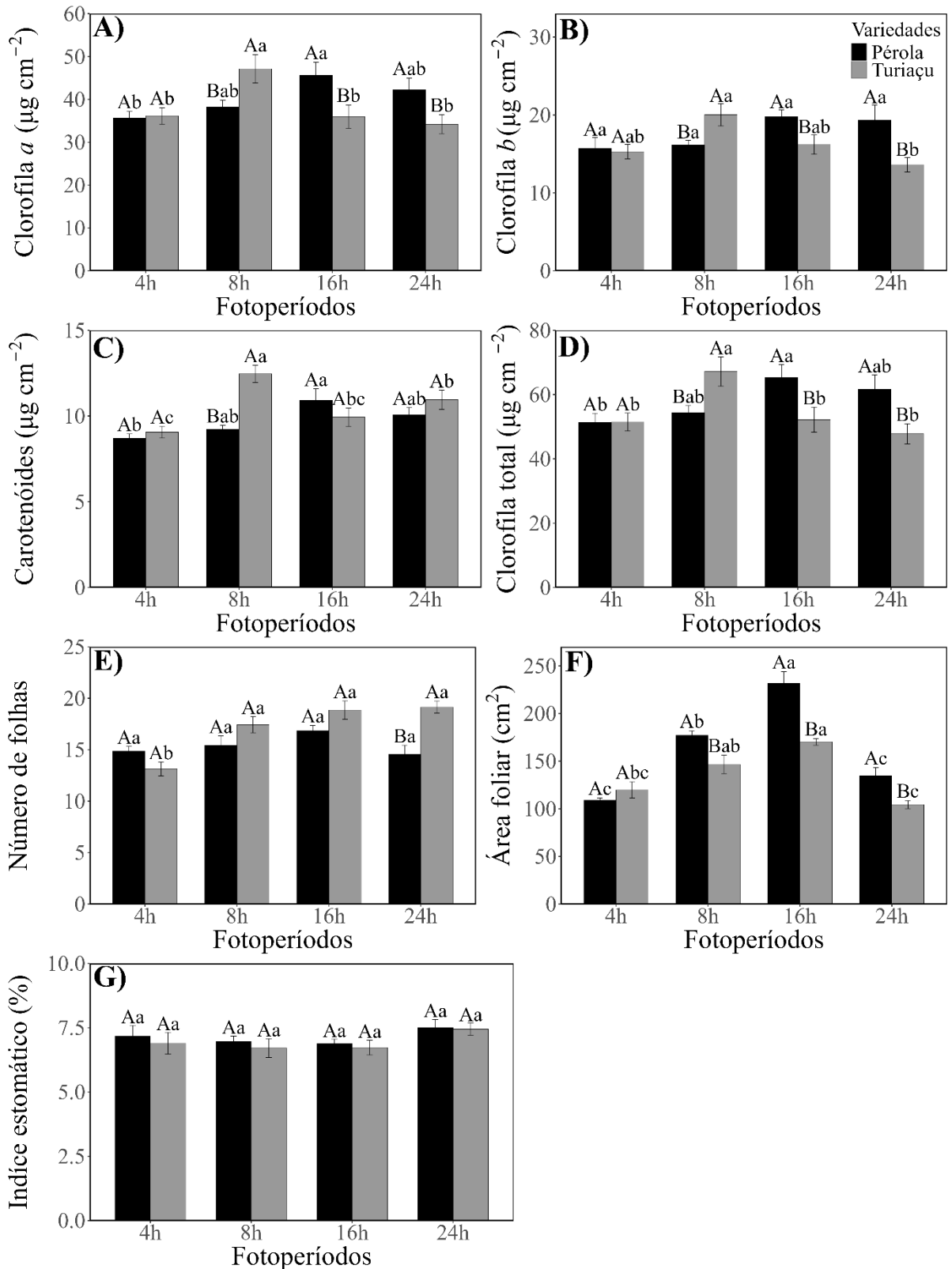


**Figura 6.** Parâmetros de crescimento das plantas de abacaxi das variedades Pérola e Turiaçu após 45 dias de cultivo *ex vitro*. **A)** Fenótipo das plantas, Barra equivale a 2 cm. **B)** Comprimento da parte aérea (cm), **C)** Comprimento da raiz (cm), **D)** Massa fresca da parte aérea (g), **E)** Massa seca da parte aérea (g), **F)** Massa fresca da raiz (g), **G)** Massa seca da raiz (g), **H)** Volume de raiz, **I)** Diâmetro da base da roseta (mm); Letras maiúsculas comparam as médias das duas variedades sob o mesmo fotoperíodo, enquanto letras minúsculas comparam a mesma variedade sob diferentes fotoperíodos (teste de Tukey;  $P \leq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão ( $n = 8$ ).

### **O fotoperíodo influenciou os parâmetros foliares, mas não os pigmentos fotossintéticos das variedades de abacaxi aclimatadas**

Nas plantas aclimatadas, o conteúdo de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides não apresentou diferença significativa entre os fotoperíodos usados durante o cultivo *in vitro* (Figura 7 A-B-C), no entanto, entre as variedades a concentração de clorofila *b* proveniente de 24 h de fotoperíodo foi 9% maior no Pérola (Figura 7 B). Com relação a concentração de clorofila total, o fotoperíodo de 16 h proporcionou as maiores concentrações em ambas as variedades (Figura 7 D).

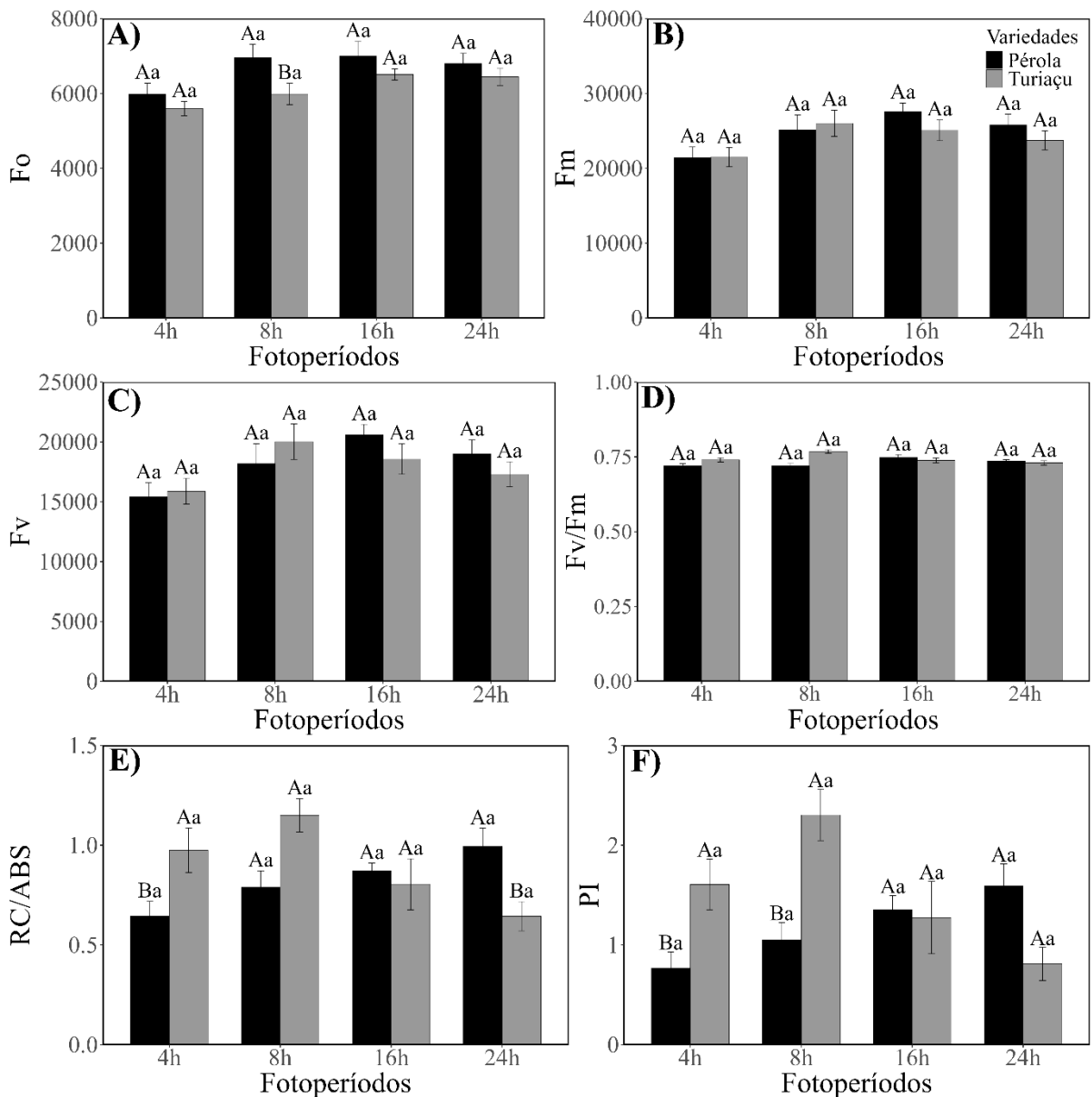
O fotoperíodo não influenciou no número de folhas das plantas aclimatadas, entretanto a variedade Turiaçu apresentou uma maior quantidade de folhas com 24 h de luz (Figura 7 E). Em contraste, a área foliar foi influenciada tanto pelas variedades quanto pelo fotoperíodo usados durante o cultivo *in vitro* (Figura 7 F), as plantas da variedade Pérola apresentaram-se superior a variedade Turiaçu nos fotoperíodos de 8, 16 e 24 h, comportamento semelhante ao observado quando as plantas estavam em cultivo *in vitro*, além disso as plantas que foram submetidas aos regimes de 16 h de luz tiveram as maiores áreas foliares na aclimação em ambas as variedades. Não foram observadas diferenças significativas para o índice estomático (Figura 7 G).



**Figura 7.** Parâmetros foliares e pigmentos fotossintéticos das plantas de abacaxi aclimatadas. **A)** Clorofila *a*, **B)** Clorofila *b*, **C)** Carotenóides, **D)** Índice estomático, **E)** Número de folhas, **F)** Área foliar e **G)** Índice estomático. Letras maiúsculas comparam as médias das duas variedades sob o mesmo fotoperíodo, enquanto letras minúsculas comparam a mesma variedade sob diferentes fotoperíodos (teste de Tukey;  $P \leq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão ( $n = 6$ ).

### O fotoperíodo não influenciou os parâmetros da Fluorescência da clorofila *a* das variedades de abacaxi aclimatadas

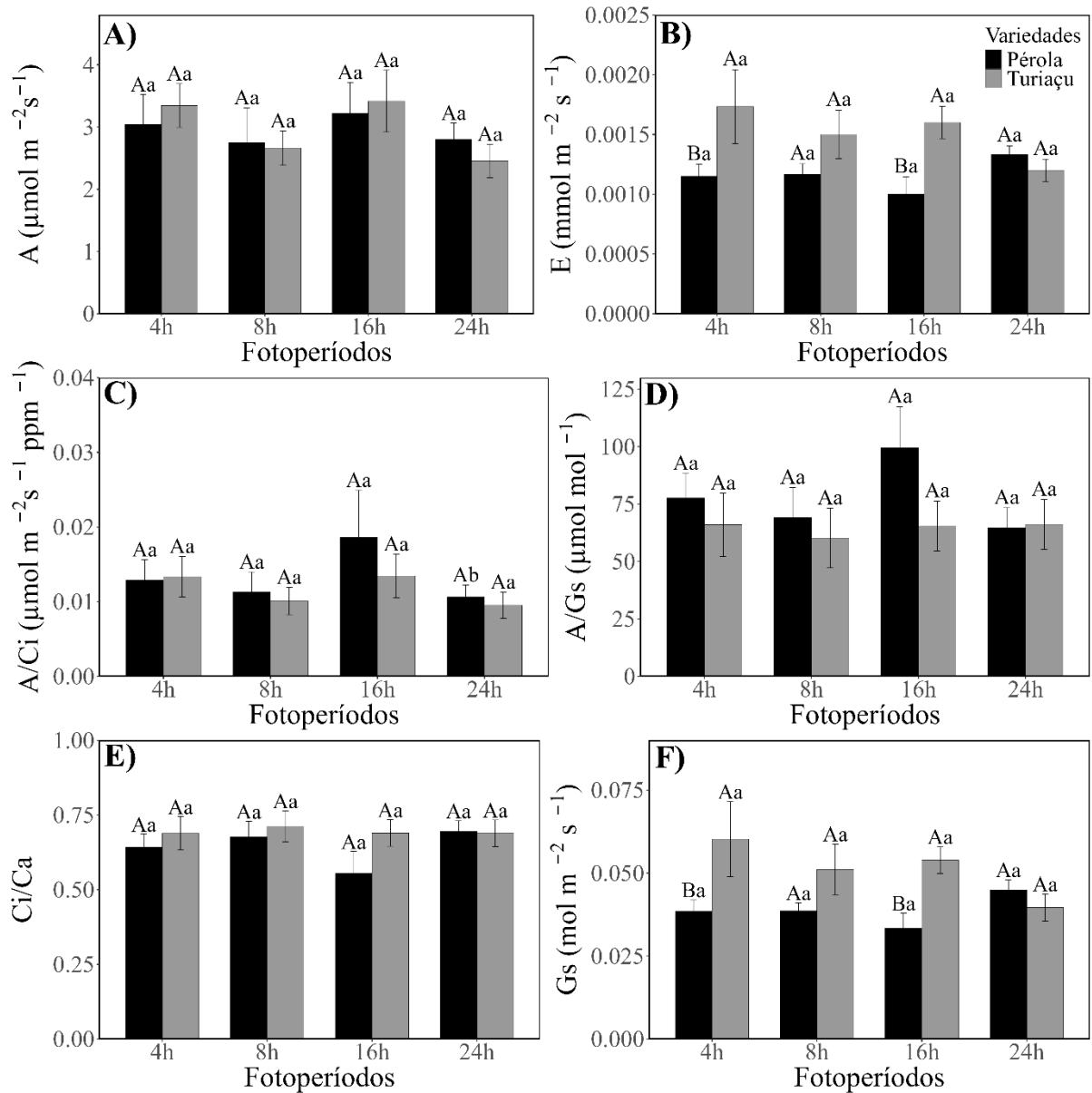
As plantas em condições *ex vitro* sofreram leve influência dos fotoperíodos quanto aos parâmetros da eficiência fotoquímica (Figura 8). A energia luminosa absorvida pelo centro de reação (RC/ABS) aumentou 6% na variedade Turiaçu em relação ao Pérola quando provenientes do fotoperíodo de 4 h aplicado durante o cultivo *in vitro*, enquanto que no fotoperíodo de 24 h de luz, a variedade Pérola, aumentou 56% em relação ao Turiaçu (Figura 8 E). Já o Índice de Perfomance (PI) não foi influenciado pelos fotoperíodos na fase *ex vitro*, no entanto as variedades se comportaram diferente, com 4 e 8 h a variedade Turiaçu teve um índice maior o Pérola (Figura 8 F).



**Figura 8.** Parâmetros da Fluorescência da clorofila *a*. **A)** Fluorescência inicial ( $F_o$ ), **B)** Fluorescência máxima ( $F_m$ ), **C)** Fluorescência variável ( $F_v$ ), **D)** Eficiência quântica máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ), **E)** energia luminosa absorvida pelo centro de reação (RC/ABS), **F)** Índice de Performance. Letras maiúsculas comparam as médias das duas variedades sob o mesmo fotoperíodo, enquanto letras minúsculas comparam a mesma variedade sob diferentes fotoperíodos (teste de Tukey;  $P \leq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão ( $n = 6$ ).

### **O fotoperíodo não influenciou os parâmetros fotossintéticos das variedades de abacaxi aclimatadas**

Nas plantas aclimatadas, não foram observadas diferenças significativas entre as variedades nem entre os fotoperíodos previamente aplicados durante o cultivo *in vitro* para a assimilação líquida de  $CO_2$  (A) (Figura 9 A). Para a taxa transpiratória (E), a variedade Turiaçu apresentou valores superiores ao Pérola para as plantas provenientes dos fotoperíodos de 4 h e 16 h (Figura 9 B). A taxa de assimilação de  $CO_2$  em função da concentração interna de  $CO_2$  ( $A/C_i$ ) evidenciou uma redução de desempenho no fotoperíodo de 24 h, particularmente na variedade Pérola (Figura 9 C). Quanto à eficiência intrínseca no uso da água ( $A/G_s$ ) e razão de  $CO_2$  intercelular/atmosférica ( $C_i/C_a$ ) não houve diferenças significativas entre os fotoperíodos estabelecidos durante o cultivo *in vitro* ou entre variedades, assim se mantiveram estáveis ao longo dos tratamentos (Figura 9 D-E). Já a condutância estomática ( $g_s$ ) foi maior na variedade Turiaçu nos fotoperíodos de 4 h e 16 h, enquanto em 8 h e 24 h não foram observadas diferenças entre as variedades (Figura 9 F).



**Figura 9.** Variáveis fotossintéticas das plantas de abacaxi aclimatadas. **A)** Taxa fotossintética (A), **B)** Transpiração (E), **C)** eficiência fotossintética (A/Ci), **D)** Eficiência intrínseca do uso da água (A/Gs), **E)** Razão intercelular/atmosférica de  $\text{CO}_2$  (Ci/Ca), **F)** Condutância estomática (Gs). Letras maiúsculas comparam as médias das duas variedades sob o mesmo fotoperíodo, enquanto letras minúsculas comparam a mesma variedade sob diferentes fotoperíodos (teste de Tukey;  $P \leq 0,05$ ). As barras representam o erro padrão ( $n = 6$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

Nas plantas, o fotoperíodo está relacionado a vários processos biológicos, que em resposta as informações de saída do relógio circadiano concedem a capacidade de se desenvolverem adequadamente, mesmo em relação às mudanças sazonais do ambiente (Hotta et al. 2007; Roeber et al. 2022; Osnato et al. 2022). Vários estudos relatam o efeito do fotoperíodo no crescimento, produção de metabólitos e em processos-chave como floração,

tuberização e acúmulo de biomassa (Fortini et al. 2020; El-Sayed et al. 2021; Bajwa et al. 2023; Lavie et al. 2024). No entanto, este estudo é o primeiro a investigar o efeito do fotoperíodo sobre variedades de *Ananas comosus* cultivadas *in vitro*, e seus reflexos no crescimento e nas respostas fisiológicas das mudas aclimatadas.

Nesta pesquisa, O crescimento das mudas foi modulado pela variedade e pelo fotoperíodo durante o cultivo *in vitro*, e com efeitos observados também na aclimação *ex vitro*, correspondente à expressão residual desse condicionamento fisiológico. Vale destacar que no cultivo *in vitro*, o desenvolvimento dos brotos sofre influência tanto das condições de cultivo, quanto das variedades botânicas utilizadas (Muktadir et al. 2016; Holmes et al. 2021).

A variedade Pérola apresentou desempenho superior ao Turiaçu, fato que pode estar relacionado ao seu histórico de seleção genética. Estudos indicam que cultivares amplamente difundidas comercialmente apresentam características como maior vigor vegetativo, maior eficiência no uso de recursos, uniformidade de crescimento, elevada capacidade de emissão de brotações e melhor adaptação a sistemas de cultivo intensivo e ambientes controlados (Calvete et al. 2009; Pereira et al. 2009). Essas características resultam de intervenções sucessivas de seleção e melhoramento conduzidas por agricultores e programas de propagação vegetal, que priorizaram plantas com maior produtividade, rápido estabelecimento e maior acúmulo de biomassa. Assim, tais intervenções podem ter contribuído para o maior crescimento e acúmulo de biomassa da variedade, independentemente do fotoperíodo, que refletiu em plantas mais desenvolvidas.

Os fotoperíodos de 4 h e de 24 h reduziram o crescimento e acúmulo de biomassa das variedades, o que indica que as plantas de abacaxizeiro respondem de forma diferencial a fotoperíodos extremos. Em fotoperíodos curtos (4 h) a assimilação fotoquímica diária é provavelmente insuficiente para suprir a demanda metabólica e produção de biomassa. O que também foi observado em plantas de *Arabidopsis thaliana* (Sulpice et al. 2014), *Lippia Alba* (Castro et al. 2019) e *Pfaffia glomerata* (Fortini et al. 2020) sob esse mesmo fotoperíodo.

Por outro lado, a exposição contínua à luz (24 h) resultou num menor crescimento da parte aérea e raiz, bem como num menor acúmulo de biomassa. Comportamento diferente foi observado em plantas dicotiledôneas de *Lippia Alba* (Castro et al. 2019) e *Pfaffia glomerata* (Fortini et al. 2020), que aumentaram a biomassa sob fotoperíodo de 24 h. Enquanto em plantas monocotiledôneas como *Huernia hystrix* (Amoo et al. 2009) e *Alocasia amazonica* (Jo et al. 2008), o fotoperíodo de 24 h diminuiu o tamanho dos brotos e o acúmulo de biomassa, o que corrobora com os dados dessa pesquisa e evidencia que os grupos de plantas se comportam de maneira distintas.

As plantas de *Ananas comosus* submetidas ao fotoperíodo de 24 h apresentaram menor área foliar, o que pode ter contribuído para a redução na concentração de pigmentos fotossintéticos, incluindo clorofilas *a*, *b* e fotoprotetores (carotenoides), o que indica o desregulamento do relógio biológico, sobrecarga dos pigmentos e do aparelho fotossintético, e favorecimento da participação da espécie em vias C3, porém com possível fotoinibição, o que reduz a eficiência fotossintética e produção de biomassa (Powles e Thorne, 1981).

Entretanto, embora esse conjunto de respostas possa indicar limitação funcional do sistema fotossintético, a redução dos pigmentos não implica necessariamente fotoinibição, pois, embora o rendimento quântico máximo do PSII ( $F_v/F_m$ ) tenha se mantido abaixo de 0,75 em ambas as variedades no cultivo *in vitro*, esses valores não indicam necessariamente dano fotoquímico permanente. No fotoperíodo de 24 horas, a exposição contínua à luz pode ter promovido ajustes fisiológicos no aparato fotossintético, o que levou a uma reorganização na composição de pigmentos como mecanismo de equilíbrio entre absorção e utilização de energia (Maxwell e Johnson 2000; Couto et al. 2014). Como consequência, observou-se o menor crescimento e menor acúmulo de biomassa das mudas, o que evidencia que a luz contínua comprometeu tanto a capacidade fotossintética quanto a eficiência de utilização da energia luminosa.

Em resposta as condições extremas de disponibilidade luminosa, também foram registradas alterações anatômicas, uma vez que plantas submetidas a fotoperíodos extremos, tanto prolongados (24 h) quanto extremamente curtos (4 h), apresentaram aumento do índice estomático em relação aos regimes intermediários. Esse aumento sugere uma resposta anatômica adaptativa das folhas frente a condições luminosas extremas, podendo ampliar o potencial de troca gasosa. Embora o índice estomático esteja frequentemente associado a maior capacidade de condutância estomática, a efetiva troca gasosa depende também da abertura dos estômatos e das condições ambientais (Justo et al. 2005; Lima Jr. et al. 2006).

Em plantas de *Alocasia amazonica* o aumento do índice estomático em fotoperíodo de 24 h foi relacionado com a diminuição do conteúdo relativo de água na folha (CRA), atribuída à transpiração excessiva durante a exposição prolongada à luz. No presente estudo, entretanto, a exposição contínua à luz aumentou o índice estomático, sem reduzir o CRA, indicando manutenção do estado hídrico e um ajuste estrutural sem comprometimento fisiológico. Em contraste, o fotoperíodo de 4 h provavelmente limitou o tempo de fotossíntese e estimulou a formação de mais estômatos por unidade de área foliar, possivelmente como estratégia compensatória para otimizar a captação de CO<sub>2</sub> no período reduzido de iluminação.

O maior índice estomático observado nas plantas sob 24 h de luz, aliado a valores altos de CRA, indicam que as plantas mantiveram adequado estado hídrico, o que pode explicar a redução do parênquima aquífero, tecido responsável pelo armazenamento de água (Neves et al. 2023). Isso indica que, nessas condições, as plantas passaram a adotar uma estratégia fisiológica baseada no controle mais eficiente da entrada de CO<sub>2</sub> e da perda de água por meio da regulação estomática, em vez de direcionar recursos para o armazenamento hídrico em tecidos especializados.

Esse ajuste funcional foi acompanhado por modificações anatômicas no sistema vascular, uma vez que fatores ambientais influenciam diretamente a organização e as dimensões dos elementos condutores, para assegurar a eficiência hidráulica e o transporte sob condições potencialmente estressantes (Lopes et al. 2021). O aumento progressivo dos eixos longitudinal e transversal dos feixes vasculares com o fotoperíodo ininterrupto indica maior capacidade de transporte de água e fotoassimilados, o que reforça a ideia de que a resposta adaptativa envolveu a otimização do fluxo interno, ao invés do acúmulo de água em tecidos especializados.

A ausência de mudanças na espessura das epidermes adaxial e abaxial entre os fotoperíodos e variedades sugere baixa plasticidade desses tecidos frente às variações do regime de luz. A epiderme desempenha função primordial de proteção e regulação das trocas gasosas e hídricas, frequentemente menos responsiva a alterações luminosas quando comparada aos tecidos fotossintéticos (Taiz et al. 2017; Karabourniotis et al. 2021).

As plantas aclimatadas conservaram o mesmo padrão de crescimento estabelecido na fase de cultivo *in vitro*, o que evidencia a persistência das respostas morfológicas após a transição para condições *ex vitro*, ligada a memória da planta e a ritmicidade circadiana. Os organismos celulares, incluindo as plantas, podem "lembrar" de experiências a diversos estímulos ambientais, como à luz, o que facilita a sua adaptação futura (Lüttge e Thellier, 2016; Charng et al. 2023; Karpiński e Szechyńska-Hebda, 2023).

Embora o fotoperíodo de 24 h tenha promovido redução no crescimento das plantas, observou-se 100% de sobrevivência durante a fase de aclimação das duas variedades, o que indica que, apesar da limitação no desenvolvimento vegetativo, as plantas mantiveram funcionalidade fisiológica suficiente para adaptação ao novo ambiente. Além disso, estudos demonstram que o *Ananas comosus* apresenta elevada eficiência na transição do cultivo *in vitro* para condições *ex vitro*, caracterizada por altas taxas de sobrevivência e rápida adaptação às condições ambientais, atribuídas à sua plasticidade fisiológica, eficiência no controle hídrico e capacidade de restabelecimento do aparato fotossintético após o transplante (Alves et al. 2023; Alves et al. 2024).

## 5. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra que a duração do fotoperíodo exerce influência sobre o desenvolvimento das plantas de abacaxi cultivadas *in vitro*. Fotoperíodos longos (24 h) limitam o crescimento das plantas, diminuem o acúmulo de biomassa vegetal e reduzem a eficiência quântica máxima do PSII, enquanto 8 e 16 h de luz promovem os melhores resultados em termos de crescimento da planta, o que os torna como os mais adequados para maximizar o desempenho das variedades estudadas. A variedade Pérola apresentou desempenho superior à variedade Turiaçu, fato que pode estar relacionado ao seu histórico de seleção genética, o que ressalta a importância de considerar a interação entre o fotoperíodo e o material genético utilizado. Portanto, conclui-se que fotoperíodos intermediários (8 e 16 horas) são os mais recomendáveis para o desenvolvimento das plantas avaliadas.

## REFERÊNCIAS

- Alves JP, Pinheiro MVM, Corrêa TR, Alves GL, Santos TRM, Batista DS, Figueiredo FAMMA, Reis FO, Ferraz TM, Campostrini E. (2023). Morphophysiology of *Ananas comosus* during *in vitro* photomixotrophic growth and *ex vitro* acclimatization. In *Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 59:106–120. <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10321-5>
- Alves GL, Pinheiro MVM, Marinho-Dutra TR, Vieira KS, Figueiredo FAMMA, Ferraz TM, Campostrini E, Ramalho JDC, Corrêa TR, Reis FO. (2024). Photoautotrophic potential and photosynthetic competence in *Ananas comosus* [L]. Merr. cultivar Turiaçu in *in vitro* culture systems. In *Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 60:131–146. <https://doi.org/10.1007/s11627-023-10410-z>
- Amoo SO, Finnie JF, Van Staden J. (2009). Effects of temperature, photoperiod and culture vessel size on adventitious shoot production of *in vitro* propagated *Huernia hystrix*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 99(2):233-238. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9592-0>
- Araujo JRG, Martins MR, Santos FN. (2007). Fruteiras nativas - ocorrência e potencial de utilização na agricultura familiar do Maranhão. 2ed. In: Moura, E.G. Agroambientes de transição entre o trópico úmido e o semi-árido do Brasil. São Luís: UEMA/IICA, p.257-312.
- Araujo JRG, Aguiar Júnior, R.A; Chaves, A. M. S; Reis, F. O; Martins, M. R. (2012). Abacaxi “Turiaçu”: cultivar tradicional nativa do Maranhão. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 34(4):1270–1276. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452012000400037>
- Bajwa MN, Khanum M, Zaman G, Ullah MA, Farooq U, Waqas M, Abbasi BH. (2023). Effect of Wide-Spectrum Monochromatic Lights on Growth, Phytochemistry, Nutraceuticals, and Antioxidant Potential of *In Vitro* Callus Cultures of *Moringa oleifera*. *Molecules*, 28(3):1497. <https://doi.org/10.3390/molecules28031497>
- Barr HD, Weatherley PE. (1962). A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences*, 15(3):413-428.
- Bello-Bello JJ, Schettino-Salomón S, Ortega-Espinoza J, Spinoso-Castillo JL. (2021). A temporary immersion system for mass micropropagation of pitahaya (*Hylocereus undatus*). *3 Biotech*, 11(10):437. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02984-5>
- Calvete EO, Grando MF, Gomide DG, Maran RE, Suzin M, Nienow AA, Cecchetti D. (2009). Desempenho *in vitro* e agrônômico de cultivares micropropagadas de morangueiro em vários subcultivos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31(4):943-949. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452009000400005>
- Castro KM, Batista DS, Fortini EA, Silva TD, Felipe SHS, Fernandes AM, Sousa RMJ, Nascimento LSQ, Campos VR, Grazul RM. (2019). Photoperiod modulates growth, morphoanatomy, and linalool content in *Lippia alba* L. (Verbenaceae) cultured *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 139:139-153. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01672-w>
- Cavallaro V, Pellegrino A, Muleo R, Forgione I. (2022). Light and plant growth regulators on *in vitro* proliferation. *Plants*, 11(7): 844-889. <https://doi.org/10.3390/plants11070844>

- Charng, YY, Mitra S, Yu SJ. (2023). Maintenance of abiotic stress memory in plants: Lessons learned from heat acclimation. *The Plant Cell*, 35(1):187-200. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac313>
- Couto TR, Silva JR, Torres Netto A, Carvalho VS, Campostrini E. (2014). Eficiência fotossintética e crescimento de genótipos de abacaxizeiro cultivados *in vitro* em diferentes qualidades de luz, tipos de frasco de cultivo e concentrações de sacarose. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(2):459–466. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-167/13>
- Cutter EG. (1986). *Anatomia vegetal. Parte I - Células e tecidos*, 2nd ed. Roca, São Paulo: Brasil 304p.
- El-Sayed SF, Taha SS, Darwish OS, Mwessongo SZ. (2021). Z. Effect of silver thiosulphate and photoperiod on *in vitro* tuberization of three potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars. *Plant Archives*, 21(1):308-317. <https://doi.org/10.51470/PLANTARCHIVES.2021.v21.S1.049>
- FAOSTAT. (2023). Food and agriculture organization of the United Nations Production of pineapples: top 10 producers. Available in: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Access in: june 10, 2024.
- Fortini EA, Batista DS, de Castro, KM, Silva TD, Felipe SHS, Correia LNF, Otoni WC. (2020). Photoperiod modulates growth and pigments and 20-hydroxyecdysone accumulation in Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] grown *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 142(3):595-611. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01886-3>
- 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 Amazonica*, 40(1):89–98. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672010000100012>
- Holmes JE, Lung S, Collyer D, Punja ZK. (2021). Variables affecting shoot growth and plantlet recovery in tissue cultures of drug-type *Cannabis sativa* L. *Frontiers in plant science*, 12:e732344. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.732344>
- Hotta, C. T. (2021). From crops to shops: how agriculture can use circadian clocks, *Journal of Experimental Botany*, 72(22): 7668–7679. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab371>
- Hotta CT, Gardner MJ, Hubbard KE, Baek SJ, Dalchau N, Suhita D, Webb AA. (2007). Modulation of environmental responses of plants by circadian clocks. *Plant, cell & environment*, 30(3):333-349. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01627.x>
- Jo EA, Tewari RK, Hahn EJ, Paek KY. (2008). Effect of photoperiod and light intensity on *in vitro* propagation of *Alocasia amazonica*. *Plant Biotechnology Reports*, v. 2, n. 3, p. 207-212. <https://doi.org/10.1007/s11816-008-0063-6>
- Johansen DA. (1940). *Plant microtechnique*. London, England: McGraw-Hill Publishing, 523 pp.
- Justo CF, Soares ÂM, Gavilanes ML, Castro EMD. (2005). Plasticidade anatômica das folhas de *Xylopiya brasiliensis* Sprengel (Annonaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 19(1):112-123. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062005000100011>

- Karabourniotis G, Liakopoulos G, Bresta P, Nikolopoulos D. (2021). The optical properties of leaf structural elements and their contribution to photosynthetic performance and photoprotection. *Plants*, 10(7):1455. <https://doi.org/10.3390/plants10071455>
- Karpiński S, Szechyńska-Hebda M. (2023). Systemic acquired acclimation, network acquired acclimation and cellular light memory in plants—Molecular, biochemical, and physiological mechanisms. *Advances in Botanical Research*, 105:277-310. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2022.11.005>
- Kessel-Domini A, Pérez-Brito D, Guzmán-Antonio A, Barredo-Pool FA, Mijangos-Cortés JO, Iglesias-Andreu LG, Cortés-Velázquez A, Canto-Flick A, Avilés-Viñas SA, Rodríguez-Llanes Y, Santana Buzzy N. (2022). Indirect somatic embryogenesis: an efficient and genetically reliable clonal propagation system for *Ananas comosus* L. Merr. hybrid “MD2”. *Agriculture*, 12(5):713. <https://doi.org/10.3390/agriculture12050713>
- Kumar PP, Loh CS. (2012). Plant Tissue Culture for Biotechnology. *Plant Biotechnology and Agriculture*, 131–138. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381466-1.00009-2>
- Lavie O, Buxdorf K, Eshed Williams L. (2024). Optimizing cannabis cultivation: an efficient *in vitro* system for flowering induction. *Plant Methods*, 20(1):141. <https://doi.org/10.1186/s13007-024-01265-5>
- Lima Jr. EC, de Alvarenga AA, de Castro EM, Vieira CV, Barbosa JPRAD. (2006). Aspectos fisiológicos de plantas jovens de *Cupania vernalis* Camb. submetidas a diferentes níveis de sombreamento. *Revista Árvore*, 30(1):33-41.
- Lopes MJS, Dias-Filho MB, Cruz ED, Gurgel ESC. (2021). Efeito da intensidade de luz no desenvolvimento vascular e na qualidade de mudas de Paricá. *Scientia Plena*, 17(12):121202.
- Lüttge U, Thellier M. (2016). Roles of memory and circadian clock in the ecophysiological performance of plants. *Progress in Botany 77*, Springer International Publishing. 77:73-104.
- Man AWC, Xia N, Li H. (2020). Circadian rhythm in adipose tissue: novel antioxidant target for metabolic and cardiovascular diseases. *Antioxidants*, 9(10):968. <https://doi.org/10.3390/antiox9100968>
- Maxwell K, Johnson GN. (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of experimental botany*, 51(345):659-668. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>
- McClung C.R. (2006). Plant circadian rhythms. *Plant Cell*. 18(4):792–803. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.040980>
- Miler N, Kulus D, Woźny A, Rymarz D, Hajzer M, Wierzbowski K, Nelke R, Szeffs L. (2019). Application of wide-spectrum light-emitting diodes in micropropagation of popular ornamental plant species: A study on plant quality and cost reduction. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55: 99-108. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9939-5>
- Ming R, VanBuren R., Wai CM., Tang H, Schatz MC, Bowers JE, Lyons E, Wang ML, Chen J, Yu, Q. (2015). The pineapple genome and the evolution of CAM photosynthesis. *Nature genetics*, 47(12): 1435-1442.
- Moher M, Jones M, Zheng Y. (2024). Photoperiodic response of *in vitro Cannabis sativa* plants. *HortScience horts*, 56(1):108-113. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI15452-20>

- Muktadir MA, Habib MA, Mian MAK, Akhond MAY. (2016). Regeneration efficiency based on genotype, culture condition and growth regulators of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Agriculture and natural resources*, 50(1):38-42. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2014.10.001>
- Murashige T, Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3):473. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nascimento ASM, Henschel JM, Felipe SHS, Rodrigues AAC, Figueiredo FAMMDA, Ferraz TM, Batista DS (2025). Photoperiod and Circadian Regulation in Plants: A Review of Insights from *In Vitro* Studies. *Biology*, 14(11):1502. <https://doi.org/10.3390/biology14111502>
- Neves P, dos Santos V, Tomazello-Filho M, Cabral MR, Junior HS (2023). Leaf anatomy and fiber types of Curaua (*Ananas comosus* var. *erectifolius*). *Cellulose*, 30:3429–3439. <https://doi.org/10.1007/s10570-023-05107-w>
- Osnato M, Cota I, Nebhnani P, Cereijo U, Pelaz S. (2022). Photoperiod Control of Plant Growth: Flowering Time Genes Beyond Flowering. *Frontiers in Plant Science*, 12:805635. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.805635>
- Pereira J, Costa FDS, Oliveira JD. (2009). Micropropagação de bananeira visando à produção massal de mudas de elevado padrão genético e fitossanitário. In: Goncalves RC, Oliveira LC (ed.). *Embrapa Acre: ciência e tecnologia para o desenvolvimento sustentável do Sudoeste da Amazônia*. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, p. 245-284.
- Powles SB, Thorne SW. (1981). Effect of high-light treatments in inducing photoinhibition of photosynthesis in intact leaves of low-light grown *Phaseolus vulgaris* and *Lastreopsis microsora*. *Planta*, 152(5):471-477. <https://doi.org/10.1007/BF00385365>
- R Core Team. R. (2023). A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Reinhardt DHR, Bartholomew DP, Souza FVD, Carvalho ACPP, Pádua TRP, Junghans DT, Matos AP. (2018). Advances in pineapple plant propagation. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 40(6):1-22. <https://doi.org/10.1590/0100-29452018302>
- Reis FO, Araujo JRG, Braun H, Neves Júnior AC, Pereira APA. (2019). Fruit quality of a traditional pineapple cultivar (Turiaçu) compared to the most popular cultivar (Pérola) in Brazil. *Australian Journal of Crop Science*, 13(4):546–551. <https://doi.org/10.21475/ajcs.19.13.04.p1452>
- Rezvani M, Nadimi S, Zaefarian F, Chauhan BS. (2021). Environmental factors affecting seed germination and seedling emergence of three Phalaris species. *Crop Protection*, 148:105743. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105743>
- Roeber VM, Schmülling T, Cortleven AO. (2022). The photoperiod: handling and causing stress in plants. *Frontiers in Plant Science*, 12, 781988. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.781988>
- Saldanha CW, Otoni CG, Azevedo JLF, Dias LLC, Rêvá MM, Otoni WC. (2012). A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 110(3): 413-422. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0162-5>

- Santos RP, Ferreira, ACC, Iarema L, Kuki KN, Campos Otoni W. (2008). Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. *Revista Ceres*, 55(24): 356–364. <https://ojs.ceres.ufv.br/ceres/article/view/3337>
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9:671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Serrano-Bueno G, Hernandez VSM, Valverde F. (2021). Photoperiodic signaling and senescence, an ancient solution to a modern problem?. *Frontier in Plant Science*, 12:634393. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.634393>
- Silva-Moraes VKO, Felipe SHS, Alves GL, Albuquerque IC, Pinheiro JF, Soares MNB, Corrêa TR. (2025). Combined effects of elevated CO<sub>2</sub> and salinity on photosynthesis, growth, and leaf anatomy of *Ananas comosus* grown *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 162(3):72. <https://doi.org/10.1007/s11240-025-03190-4>
- Souza FVD, Aud FF, Souza EH, Ferreira FR, Santos GS. (2021). Manual de gestão do banco ativo de germoplasma de abacaxi. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura. (Documentos 250).
- Srivastava D, Shamim MD, Kumar M, Mishra A, Maurya R, Sharma D. (2019). Role of circadian rhythm in plant system: An update from development to stress response. *Environmental and Experimental Botany*, 162:256–271. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1208-6>
- Sulpice R, Flis A, Ivakov AA, Apelt F, Krohn N, Encke B, Stitt M. (2014). *Arabidopsis* coordinates the diurnal regulation of carbon allocation and growth across a wide range of photoperiods. *Molecular plant*, 7(1):137-155. <https://doi.org/10.1093/mp/sst127>
- Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy, A. (2017). *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. Artmed Editora. 6th Edition. Porto Alegre, Brazil.
- Taniguchi T, Murayama N, Ario N, Nakagawa AC, Tanaka S, Tomoita Y, Ishibashi Y. (2020). Photoperiod sensing of leaf regulates pod setting in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.), *Plant Production Science*, 23(3):360-365. <https://doi.org/10.1080/1343943X.2019.1709512>
- Wellburn AR. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3):307-313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Wijerathna-Yapa A, Ramtekey V, Ranawaka B, Basnet BR. (2022). Applications of *in vitro* tissue culture technologies in breeding and genetic improvement of wheat, *Plants*, 11(17):2273. <https://doi.org/10.3390/plants11172273>
- Yan J, Kim YJ, Somers DE. (2021). Post-translational mechanisms of plant circadian regulation. *Genes*, 12(3):325. <https://doi.org/10.3390/genes12030325>

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo reforça a importância do fotoperíodo como um fator determinante na regulação do crescimento, do metabolismo e da eficiência fisiológica das plantas cultivadas *in vitro*. A revisão evidencia que a interação entre o fotoperíodo e o relógio circadiano controla processos essenciais, como fotossíntese, alocação de biomassa e expressão gênica, os quais podem ser significativamente alterados em condições artificiais de cultivo.

Nesse contexto, o trabalho demonstra que fotoperíodos longos, como 24 h de luz, desorganizam a regulação circadiana e refletem em limitações no crescimento, menor acúmulo de biomassa, redução da eficiência quântica máxima do PSII e ajustes anatômicos nas plantas de abacaxi cultivadas *in vitro*. Por outro lado, fotoperíodos intermediários (8 e 16 h de luz) mostraram-se mais compatíveis com os mecanismos morfofisiológicos das plantas. Além disso, as avaliações durante a aclimatização permitiram verificar que os efeitos do fotoperíodo se mantêm ao longo do crescimento *ex vitro* das plantas. Adicionalmente, o desempenho superior da variedade Pérola em relação à Turiaçu nos parâmetros de crescimento evidencia que a resposta ao fotoperíodo é dependente do material genético, e que o uso comercial e o histórico de seleção genética da variedade Pérola podem ter contribuído para esse resultado.

Dessa forma, a adoção de fotoperíodos intermediários (8 e 16 horas) é a estratégia mais adequada para otimizar o desenvolvimento de plantas de abacaxi cultivadas *in vitro*, deve-se considerar, adicionalmente, a interação entre fotoperíodo e genótipo. Esse trabalho contribui para o aprimoramento dos protocolos de cultivo *in vitro* de acordo com a especificidade genética de cada variedade e para a otimização da produção de mudas, o que favorece maior eficiência fisiológica, uniformidade e potencial produtivo. Investigações em nível molecular, especialmente relacionadas à expressão gênica associada à fotossíntese, ao metabolismo do carbono e ao controle circadiano, poderão contribuir para elucidar os processos subjacentes às respostas diferenciadas observadas entre os fotoperíodos e as variedades.