

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RHUANN CARLO VIERO TAQUES

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Colletia paradoxa* (RHAMNACEAE) SOB
EXPOSIÇÃO A DIODOS EMISSORES DE LUZ

CURITIBA

2024

RHUANN CARLO VIERO TAQUES

PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE *Colletia paradoxa* (RHAMNACEAE) SOB EXPOSIÇÃO A
DIODOS EMISSORES DE LUZ

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Botânica.

Orientadora: Luciana Lopes Fortes Ribas

Coorientadora: Patrícia Carla Giloni de Lima

CURITIBA

2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Taques, Rhuann Carlo Viero.

Propagação *in vitro* de *Colletia paradoxa* (Rhamnaceae) sob exposição a diodos emissores de luz. / Rhuann Carlo Viero Taques. – Curitiba, 2024.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Botânica.

Orientadora: Luciana Lopes Fortes Ribas.

Coorientadora: Patrícia Carla Giloni de Lima.

1. Fotossíntese. 2. Plantas - Metabolismo. 3. Plantas raras. 4. Antioxidantes. 5. Propagação vegetativa. 6. Revegetação. 7. Rhamnaceae. I. Ribas, Luciana Lopes Fortes, 1964-. II. Lima, Patrícia Carla Giloni de. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Botânica. IV. Título.

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BOTÂNICA

No dia dezoito de outubro de dois mil e vinte e quatro às 09 horas, na sala 421, Departamento de Botânica, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação do mestrando **RHUANN CARLO VIERO TAQUES**, intitulada: **Propagação *in vitro* de *Colletia paradoxa* (Rhamnaceae) sob exposição a diodos emissores de luz.**, sob orientação da Profa. Dra. LUCIANA LOPES FORTES RIBAS. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BOTÂNICA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: LUCIANA LOPES FORTES RIBAS (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), ROSETE PESCADOR (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA), HUGO PACHECO DE FREITAS FRAGA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, LUCIANA LOPES FORTES RIBAS, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

Curitiba, 18 de Outubro de 2024.

Assinatura Eletrônica

21/10/2024 07:40:21.0

LUCIANA LOPES FORTES RIBAS

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

20/10/2024 15:20:10.0

ROSETE PESCADOR

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica

21/10/2024 10:12:58.0

HUGO PACHECO DE FREITAS FRAGA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BOTÂNICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **RHUANN CARLO VIERO TAQUES** intitulada: **Propagação *in vitro* de *Colletia paradoxa* (Rhamnaceae) sob exposição a diodos emissores de luz.**, sob orientação da Profa. Dra. LUCIANA LOPES FORTES RIBAS, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 18 de Outubro de 2024.

Assinatura Eletrônica

21/10/2024 07:40:21.0

LUCIANA LOPES FORTES RIBAS

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

20/10/2024 15:20:10.0

ROSETE PESCADOR

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica

21/10/2024 10:12:58.0

HUGO PACHECO DE FREITAS FRAGA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica pela oportunidade de realizar este estudo. Ao Laboratório de Micropropagação Vegetal pela infraestrutura concedida. A Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida. A Prof. Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas pela paciência, cuidado, compreensão, preocupação e ensinamentos durante o período de orientação. A Prof. Dra. Patricia Carla Giloni de Lima e ao Prof. Dr. Vanderlei Aparecido de Lima pelas contribuições práticas e metodológicas a presente dissertação. A Rafaela Cristina Tome Souza pelo auxílio na execução dos experimentos realizados. Ao meu marido (Thiago), mãe (Rosana), pai (João Carlos), irmãs (Rhianne e Rhielli), sobrinha (Rhicielli) e tia (Viviane) pelo incentivo, amor e acolhimento. A minha mãe (Josianne) e família de santo pelo apoio em diversas esferas da minha vida. Aos Orixás pela conclusão do sonho de ser mestre!

RESUMO

Colletia paradoxa (Spreng.) Escal. (Rhamnaceae) é uma espécie endêmica do sul do Brasil ameaçada de extinção. Diante disto, a micropropagação se apresenta como uma alternativa viável para a produção em larga escala de mudas dessa planta. A utilização de diodos emissores de luz (LEDs) nas salas de cultivo *in vitro* têm demonstrado eficácia na regeneração de brotos, devido à capacidade de fornecer comprimentos de onda específicos que regulam a morfogênese dos vegetais. O objetivo do presente estudo foi avaliar o desenvolvimento das brotações e o metabolismo fotossintético de explantes de *C. paradoxa* submetidos a diferentes sistemas de iluminação com LEDs. Para o estabelecimento das culturas assépticas foram testados diferentes agentes desinfetantes (álcool 70%, hipoclorito de sódio - NaClO e cloreto de mercúrio - HgCl₂), isolados ou combinados, em distintas concentrações e tempos de imersão. O desenvolvimento dos explantes foi avaliado em meios de cultura MS, MS/2 (meio MS com concentração de sais reduzidas pela metade), MSM/2 (meio MS com macronutrientes reduzidos pela metade) e WPM. Na fase de regeneração de brotações, foram avaliadas citocininas, incluindo 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (CIN), zeatina (ZEA) e 2-isopenteniladenina (2IP), todas na concentração de 5,0 µM, além de diferentes concentrações de BAP (2,5; 5,0 e 10,0 µM) e um controle (sem BAP). O enraizamento foi induzido pela imersão da base das brotações (0,5 cm) em soluções de ácido indolbutírico (AIB) nas concentrações de 2,5, 5,0 e 10,0 mM por cinco minutos, além de um controle (sem AIB). Durante a regeneração de brotos, os explantes foram submetidos a quatro sistemas de iluminação: LEDs brancos (400-700 nm), LEDs azuis (450-495 nm), LEDs vermelhos (620-660 nm) e uma combinação equitativa de LEDs azuis e vermelhos (1:1), durante dois subcultivos de 30 dias. As avaliações incluíram a quantificação de pigmentos fotossintéticos e enzimas antioxidantes, bem como a fluorescência de clorofila *a* e as trocas gasosas dos explantes. Para o estabelecimento de culturas assépticas, as combinações de NaClO (1,0%) e HgCl₂ (0,1%), aplicadas por 10 minutos cada uma, foram as mais eficazes para sobrevivência dos explantes (78%). Os explantes cultivados no meio MS/2 apresentaram os maiores comprimentos (2,3 cm) e o maior número médio de brotos (2,1). A suplementação com 5,0 µM de BAP no meio de cultivo MS/2 resultou no maior comprimento médio dos brotos (3,86 cm), no maior número de nós (3,29) e maior número médio de brotos (4,35). Quando cultivados sob iluminação com LEDs azuis e vermelhos (1:1), os explantes apresentaram as melhores respostas de comprimento médio de brotos (4,13 cm), número de nós (3,68) e número médio de brotos (5,44). Além disso, essa condição luminosa favoreceu a síntese de clorofila, aumentando a eficiência fotossintética e a produção de biomassa, ao promover trocas gasosas mais eficientes. Conclui-se que os comprimentos de onda fornecidos pelos LEDs influenciaram o desenvolvimento das brotações e o metabolismo fotossintético dos explantes de *C. paradoxa* cultivados *in vitro*, evidenciando a importância da iluminação controlada no processo de micropropagação dessa espécie.

Palavras-chave: Fotossíntese; Metabolismo Antioxidante, Micropropagação; Reguladores Vegetais; Rhamnaceae.

ABSTRACT

Colletia paradoxa (Spreng.) Escal. (Rhamnaceae) is an endemic species from southern Brazil that is threatened with extinction. In this context, micropropagation presents itself as a viable alternative for the large-scale production of seedlings of this plant. The use of light-emitting diodes (LEDs) in vitro cultivation rooms has proven effective in shoot regeneration due to their ability to provide specific wavelengths that regulate plant morphogenesis. The objective of the present study was to evaluate the development of shoot buds and the photosynthetic metabolism of *C. paradoxa* explants subjected to different LED lighting systems. For the establishment of aseptic cultures, different disinfecting agents (70% alcohol, sodium hypochlorite - NaClO, and mercuric chloride - HgCl₂), either alone or in combination, at various concentrations and immersion times, were tested. Explant development was assessed in MS, MS/2 (MS medium with half-strength salts), MSM/2 (MS medium with half-strength macronutrients), and WPM media. During the shoot regeneration phase, cytokinins, including 6-benzylaminopurine (BAP), kinetin (CIN), zeatin (ZEA), and 2-isopentenyladenine (2IP), all at a concentration of 5.0 µM, were evaluated, along with different BAP concentrations (2.5, 5.0, and 10.0 µM) and a control (no BAP). Rooting was induced by dipping the base of the shoots (0.5 cm) in indolebutyric acid (IBA) solutions at concentrations of 2.5, 5.0, and 10.0 mM for five minutes, along with a control (no IBA). During shoot regeneration, the explants were exposed to four lighting systems: white LEDs (400-700 nm), blue LEDs (450-495 nm), red LEDs (620-660 nm), and a 1:1 combination of blue and red LEDs, during two subcultures of 30 days. The evaluations included the quantification of photosynthetic pigments, antioxidant enzymes, chlorophyll a fluorescence, and the gas exchanges of the explants. For aseptic culture establishment, the combinations of NaClO (1.0%) and HgCl₂ (0.1%), applied for 10 minutes each, were the most effective for explant survival (78%). Explants cultured in MS/2 medium exhibited the greatest lengths (2.3 cm) and the highest average number of shoots (2.1). Supplementing the MS/2 medium with 5.0 µM of BAP resulted in the greatest average shoot length (3.86 cm), the highest number of nodes (3.29), and the highest average number of shoots (4.35). When cultivated under blue and red LED lighting (1:1), the explants showed the best responses in terms of average shoot length (4.13 cm), number of nodes (3.68), and average number of shoots (5.44). Furthermore, this light condition favored chlorophyll synthesis, increasing photosynthetic efficiency and biomass production by promoting more efficient gas exchanges. It is concluded that the wavelengths provided by the LEDs influenced the development of shoots and the photosynthetic metabolism of *C. paradoxa* explants grown in vitro, highlighting the importance of controlled lighting in the micropropagation process of this species.

Keywords: Photosynthesis; Antioxidant Metabolism, Micropropagation; Plant Regulators; Rhamnaceae.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

FIGURA 1. INDIVÍDUO ADULTO DA ESPÉCIE <i>Colletia paradoxa</i>	06
--	----

CAPÍTULO I

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA CULTURA DE NÓS A PARTIR DOS BROTO AXILARES DE <i>Colletia paradoxa</i>	29
--	----

FIGURA 2 – ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS DE <i>Colletia paradoxa</i> , APÓS 30 DIAS DE CULTIVO, EM MEIO DE CULTURA MS/2 (MS COM A CONCENTRAÇÃO DE SAIS REDUZIDA PELA METADE).....	32
--	----

FIGURA 3 - ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS DE <i>Colletia paradoxa</i> , EM MEIO DE CULTURA MS/2 (MS COM A CONCENTRAÇÃO DE SAIS REDUZIDA PELA METADE), APÓS 30 DIAS DE CULTIVO.....	33
--	----

FIGURA 4 – RAZÕES DE CHANCES (RC) DE OCORRÊNCIA DE CONTAMINAÇÃO BACTERIANA E CONTAMINAÇÃO FÚNGICA NOS EXPLANTES DE <i>Colletia paradoxa</i> EM FUNÇÃO DOS TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO UTILIZADOS.....	34
--	----

FIGURA 5 – RAZÕES DE CHANCES (RC) DE OCORRÊNCIA DE NECROSE E SOBREVIVÊNCIA DOS EXPLANTES DE <i>Colletia paradoxa</i> EM FUNÇÃO DOS TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO UTILIZADOS.....	35
---	----

FIGURA 6 – BROTAÇÕES DE <i>Colletia paradoxa</i> EM FUNÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO MS, MS/2 (MS, COM OS SAIS REDUZIDOS PELA METADE), MSM/2 (MS, COM OS MACRONUTRIENTES REDUZIDOS PELA METADE), E WPM APÓS DOIS SUBCULTIVOS DE 30 DIAS.....	37
---	----

FIGURA 7 - RAZÕES DE CHANCES DE OCORREREM NECROSE, SOBREVIVÊNCIA E BROTAÇÕES NOS EXPLANTES DE <i>Colletia paradoxa</i> , CULTIVADOS EM DIFERENTES FORMULAÇÕES DE MEIOS DE CULTIVO.....	38
--	----

FIGURA 8 - BROTAÇÕES DE <i>Colletia paradoxa</i> OBTIDAS EM MEIO DE CULTURA MS/2 (MS COM A CONCENTRAÇÃO DE SAIS REDUZIDA PELA METADE), SUPLEMENTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 6-BENZILAMINOPURINA (BAP) APÓS DOIS SUBCULTIVOS, REALIZADOS A CADA 30 DIAS.....	40
---	----

FIGURA 9 - RAZÕES DE CHANCES (RC) DAS VARIÁVEIS DE DESENVOLVIMENTO DOS BROTO DE <i>Colletia paradoxa</i> , CULTIVADOS EM MEIO MS/2 (MS, COM OS SAIS REDUZIDOS PELA METADE), SUPLEMENTADO COM 2,5 μ M, 5,0 μ M E 10,0 μ M DE 6-BENZILAMINOPURINA (BAP), TENDO COMO REFERÊNCIA O MEIO SEM ADIÇÃO DE BAP.....	41
--	----

FIGURA 10 - BROTOS DE <i>Colletia paradoxa</i> DESENVOLVIDOS DE GEMAS AXILARES CULTIVADOS EM MEIO MS/2 (MS, COM OS SAIS REDUZIDOS PELA METADE), ACRESCIDO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 6-BENZILAMINOPURINA (BAP), APÓS DOIS SUBCULTIVOS DE 30 DIAS.....	42
FIGURA 11 – BROTAÇÕES DOS EXPLANTES DE <i>Colletia paradoxa</i> , CULTIVADOS EM MEIO MS/2 (MS COM A CONCENTRAÇÃO DE SAIS REDUZIDA PELA METADE), SUPLEMENTADO COM 5,0 µM DE DIFERENTES CITOCININAS, APÓS DOIS SUBCULTIVOS DE 30 DIAS.....	44
FIGURA 12 - RAZÕES DE CHANCES DO DESENVOLVIMENTO MÚLTIPLO DOS BROTOS DE <i>Colletia paradoxa</i> , APÓS 30 DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA MS/2, COM 5,0 µM DE DIFERENTES CITOCININAS.....	45
FIGURA 13 – DESENVOLVIMENTO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS EM <i>Colletia paradoxa</i> , CULTIVADAS EM MEIO MS/2 (MS COM A CONCENTRAÇÃO DE SAIS REDUZIDA PELA METADE), SUPLEMENTADO COM 5,0 µM DE DIFERENTES CITOCININAS, APÓS 30 DIAS DE CULTIVO.....	46
FIGURA 14 – ENRAIZAMENTO DOS EXPLANTES DE <i>Colletia paradoxa</i> CULTIVADOS EM MEIO MS/2, 45 DIAS APÓS TRATAMENTO PULSO COM 2,5 mM, 5,0 mM E 10,0 mM DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO (AIB), DURANTE CINCO MINUTOS.....	48
FIGURA 15 - RAZÕES DE CHANCES DE INDUÇÃO DE RAÍZES EM BROTOS DE <i>Colletia paradoxa</i> , CULTIVADOS EM MEIO MS/2 APÓS 45 DIAS DO TRATAMENTO PULSO COM 2,5 mM, 5,0 mM E 10,0 mM DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO (AIB) DURANTE CINCO MINUTOS.....	49
FIGURA 16 - BROTOS DE <i>Colletia paradoxa</i> COM RAÍZES, OBTIDAS EM MEIO MS/2 (MS COM A CONCENTRAÇÃO DE SAIS REDUZIDA PELA METADE), 45 DIAS APÓS TRATAMENTO PULSO, COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO (AIB).....	50
FIGURA 17 - SOBREVIVÊNCIA DOS EXPLANTES DE <i>Colletia paradoxa</i> ENRAIZADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO (AIB), APÓS 90 DIAS DE TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO EM SUBSTRATO COMERCIAL E VERMICULITA (1:1).....	51

CAPÍTULO II

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO ESPECTRAL DOS DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs) UTILIZADOS PARA MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Colletia paradoxa</i>	64
FIGURA 2 – REGENERAÇÃO DE BROTOS EM EXPLANTES DE <i>Colletia paradoxa</i> , CULTIVADOS EM MEIO MS/2 (MS COM A CONCENTRAÇÃO DE SAIS REDUZIDA PELA METADE), SUPLEMENTADO COM 5,0 µM DE BENZILAMINOPURINA (BAP), EM FUNÇÃO DA EXPOSIÇÃO A DIFERENTES DIODOS EMISSORES DE LUZ	

(LEDS).....70

FIGURA 3 - RAZÕES DE CHANCES DA REGENERAÇÃO DE BROTO DE *Colletia paradoxa*, CULTIVADOS EM MEIO MS/2, SUPLEMENTADO COM 5,0 μ M DE BENZILAMINOPURINA, EM FUNÇÃO DA EXPOSIÇÃO A DIFERENTES DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDS).....71

FIGURA 4 – BROTO DE *Colletia paradoxa*, APÓS O SEGUNDO SUBCULTIVO DE 30 DIAS, EM MEIO MS/2, SUPLEMENTADO COM 5,0 μ M DE 6-BENZILAMINOPURINA (BAP), SOB DIFERENTES SISTEMAS DE ILUMINAÇÃO POR DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDS).....72

FIGURA 5 – TEORES DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS (A) E ESPECTROS DE ABSORBÂNCIA DA LUZ VISÍVEL (B) EM BROTO DE *Colletia paradoxa*, APÓS DOIS SUBCULTIVOS DE 30 DIAS, EM MEIO MS/2, SUPLEMENTADO COM 5,0 μ M DE BENZILAMINOPURINA, EM FUNÇÃO DE DIFERENTES TRATAMENTOS LUMINOSOS POR DIODOS EMISSORES DE LUZ.....74

FIGURA 6 - CURVA POLIFÁSICA (OJIP) DA EMISSÃO DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A, EM BROTO DE *Colletia paradoxa*, APÓS DOIS SUBCULTIVOS DE 30 DIAS, EM MEIO MS/2, SUPLEMENTADO COM 5,0 μ M DE BENZILAMINOPURINA, EM FUNÇÃO DE DIFERENTES TRATAMENTOS LUMINOSOS POR DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDS).....76

FIGURA 7 - GRÁFICO RADAR DOS PARÂMETROS RELATIVOS AO JIP TESTE, EM BROTO DE *Colletia paradoxa*, APÓS DOIS SUBCULTIVOS DE 30 DIAS, EM MEIO MS/2, SUPLEMENTADO COM 5,0 μ M DE BENZILAMINOPURINA, EM FUNÇÃO DE DIFERENTES TRATAMENTOS LUMINOSOS POR DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDS).....77

FIGURA 8 – MODELO FENOMENOLÓGICO FOLIAR DOS BROTO DE *Colletia paradoxa*, APÓS DOIS SUBCULTIVOS DE 30 DIAS, EM MEIO MS/2 SUPLEMENTADO COM 5,0 μ M DE BENZILAMINOPURINA, EM FUNÇÃO DE DIFERENTES TRATAMENTOS LUMINOSOS POR DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDS).....79

FIGURA 9 - TROCAS GASOSAS FOLIARES DOS BROTO DE *Colletia paradoxa*, APÓS DOIS SUBCULTIVOS DE 30 DIAS, EM MEIO MS/2, SUPLEMENTADO COM 5,0 μ M DE BENZILAMINOPURINA, EM FUNÇÃO DE DIFERENTES TRATAMENTOS LUMINOSOS POR DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDS).....80

FIGURA 10 - ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS BROTO DE *Colletia paradoxa*, APÓS DOIS SUBCULTIVOS DE 30 DIAS, EM MEIO MS/2, SUPLEMENTADO COM 5,0 μ M DE BENZILAMINOPURINA, EM FUNÇÃO DE DIFERENTES TRATAMENTOS LUMINOSOS POR DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDS).....81

FIGURA 11 – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DAS VARIÁVEIS

MORFOMÉTRICAS E FISIOLÓGICAS, REGISTRADAS NOS BROTOS DE <i>Colletia paradoxa</i> , APÓS DOIS SUBCULTIVOS DE 30 DIAS, EM MEIO MS/2, SUPLEMENTADO DO 5,0 DE BENZILAMINOPURINA, EM FUNÇÃO DE DIFERENTES TRATAMENTOS LUMINOSOS POR DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDS).....	82
--	----

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

TABELA 1 - DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA RHAMNACEAE PARA O ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS.....	08
TABELA 2 – DESENVOLVIMENTO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA RHAMNACEAE.....	09
TABELA 3 - INDUÇÃO DE RAÍZES EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA RHAMNACEAE.....	11
TABELA 4 - SUBSTRATOS UTILIZADOS NA ETAPA DE ACLIMATIZAÇÃO EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA RHAMNACEAE.....	12

CAPÍTULO I

TABELA 1 –TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO DOS SEGMENTOS NODAIS DE <i>Colletia paradoxa</i> PARA O ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS.....	28
--	----

CAPÍTULO II

TABELA 1. SISTEMAS DE ILUMINAÇÃO POR DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDS) UTILIZADOS NA MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Colletia paradoxa</i>	63
TABELA 2 - PARÂMETROS RELATIVOS AO JIP TESTE CALCULADOS A PARTIR DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A.....	66

LISTA DE SIGLAS

2Ip, 2-isopenteniladenina;
ABS, absorção de fótons;
ABS/CS, número de fótons absorvidos por seção transversal da folha;
AIB, ácido indolbutírico;
AIA, ácido indolacético;
APX, ascorbato peroxidase;
BAP, benzilaminopurina;
CA, complexo antena;
Caroten, carotenoides;
CAT, catalase;
CE, condutância estomática;
Chla, clorofila a;
Chlb, clorofila b;
Chlt, clorofila total;
CI, carbono intrafoliar;
CIN, cinetina;
CR, centro de reação;
CTE, cadeia transportadora de elétrons;
DI, dissipação energética;
DI_o/CS, energia dissipada por seção transversal da folha;
ET, transporte de elétrons;
ET_o/CS, transporte de elétrons por seção transversal da folha;
Fchla, fluorescência da clorofila a;
Fd, ferredoxina;
FM, fluorescência máxima;
FSI, fotossistema I;
FSII, fotossistema II;
HgCl₂, cloreto de mercúrio;
LEDs, diodos emissores de luz;
LEDs B, diodos emissores de luz brancos;
LEDs A, diodos emissores de luz azuis;
LEDs V, diodos emissores de luz vermelhos;
LEDs V/A (1:1), diodos emissores de luz vermelhos e azuis;
MS, meio de cultura Murashige e Skoog;
M_o, taxa líquida de fotossistemas II fechados;
NaClO, Hipoclorito de sódio;
NADPH, fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina;
Nm, nanômetro;
OEC, complexo de evolução do oxigênio;
PC, plastocianina;
PICS, índice de desempenho, um indicador da atividade funcional do fotossistema II expresso por unidade de seção transversal da área iluminada.
PPFD, densidade do fluxo de fótons fotossinteticamente ativos;
POX, peroxidase;
QA, plastoquinona A
QB, plastoquinona B
RC, razão de chance;
RE, redução dos aceptores finais de FSII;

ROS, espécies reativas do oxigênio;

CS, secção transversal da folha;

SOD, superóxido dismutase;

TF, taxa fotossintética;

TR, aprisionamento da energia dos fótons;

TR_o/CS, Energia capturada por seção transversal da folha;

WPM, meio de cultura *woody plant medium*;

ZEA, zeatina.

δR_o, Probabilidade de o elétron ser transportado da plastoquinona para aceptor do fotossistema I;

ΨE_o, Probabilidade energia de excitação capturada pelo centro de reação mover um elétron após a plastoquinona A;

φP_o, Eficiência quântica máxima do fotossistema II;

φD_o, Eficiência quântica máxima de excitação não fotoquímica;

φE_o, Eficiência quântica máxima do transporte de elétrons;

φR_o, Eficiência quântica máxima dos elétrons que atingem o receptor;

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 OBJETIVOS.....	4
2.1 OBJETIVO GERAL	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 RHAMNACEAE.....	5
3.2 <i>Colletia paradoxa</i> (Spreng.) Escal.	5
3.3 PROPAGAÇÃO SEXUADA DE <i>Colletia paradoxa</i>	7
3.4 MICROPROPAGAÇÃO	7
3.5 DIODOS EMISSORES DE LUZ COMO ALTERNATIVA PARA OTIMIZAR O CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE PLANTAS	12
3.6 PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS	16
3.7 DISSIPAÇÕES ENERGÉTICAS E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A.....	17
3.8 FOTOSSÍNTESE E A GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO	18
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
CAPÍTULO I.....	25
1 INTRODUÇÃO.....	26
2 MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1 MICROPROPAGAÇÃO	27
2.1.1 Plantas matrizes	27
2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
3 RESULTADOS	31
3.1 ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS	31
3.2 MEIO DE CULTURA.....	36
3.3 DESENVOLVIMENTO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS E CULTURA DE NÓS.....	39
3.4 ENRAIZAMENTO DOS BROTOS.....	46
3.5 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO DOS BROTOS.....	50
4 DISCUSSÃO	51
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

CAPÍTULO II.....	59
1 INTRODUÇÃO.....	60
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	62
2.1 MATERIAL VEGETAL	62
2.2 ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS	62
2.3 DESENVOLVIMENTO DAS BROTAÇÕES	62
2.4 MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	63
2.5 ANÁLISES FISIOLÓGICAS	64
2.5.1 Pigmentos fotossintéticos	64
2.5.2 Fluorescência da clorofila a	65
2.5.3 Enzimas antioxidantes.....	67
2.5.4 Determinação do teor de proteínas.....	67
2.5.5 Determinação de superóxido dismutase (E.C. 1.15.1.1).....	67
2.5.6 Determinação da catalase (E.C. 1.11.1.6).....	67
2.5.7 Determinação das peroxidases totais (E.C. 1.11.1.7).....	68
2.5.8 Determinação da ascorbato peroxidase (E.C. 1.11.1.11).....	68
2.5.9 Determinação de trocas gasosas.....	68
2.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69
3 RESULTADOS	69
3.1 DESENVOLVIMENTO DOS BROTOS.....	69
3.2 ANÁLISES FISIOLÓGICAS	72
4 DISCUSSÃO	83
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	94
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
7 PERSPECTIVAS	94

1 INTRODUÇÃO GERAL

Colletia paradoxa (Spreng.) Escal. (Rhamnaceae) é uma espécie sul-americana com ocorrência no centro-leste da Argentina, Uruguai e sul do Brasil (MARCHIORI, 1983). Popularmente, a espécie é conhecida como curro, curumamil, quinacruzeiro, quina-do-rio-grande, quina-de-porto-alegre e “*espina-de-la-cruz*”. Os indivíduos de *C. paradoxa* são arbustivos e apresentam características xeromórficas (BASTOS-ZÁCHIA et al., 2021). A planta é considerada higrofilica e heliofítica (JOHNSTON e FREITAS SOARES, 1972). Apesar de sua utilização como planta ornamental em outros países, no Brasil é utilizada em comunidades tradicionais indígenas e quilombolas como planta medicinal, sendo reconhecidas as suas propriedades purgativas, antioxidantes, antiespasmódicas, antimicrobianas e antipiréticas (BASTOS-ZÁCHIA et al., 2020).

As populações de *C. paradoxa* identificadas no sul do Brasil são compostas por um número pequeno de indivíduos isolados, em virtude da fragmentação de seu habitat, majoritariamente, em função da exploração do ambiente por atividades agropecuárias (BASTOS-ZACHIA, 2021). O Centro Nacional de Conservação da Flora (CNCFlora, 2012) e o Ministério do Meio Ambiente (BRASIL, 2014) consideraram que *C. paradoxa* se encontra ameaçada de extinção na categoria “em perigo” (EN).

Na literatura científica são escassas as pesquisas que exploraram a propagação vegetativa de *C. paradoxa*. Sua propagação por semeadura direta e estacas caulinares foi testada por Passold (2018). As maiores porcentagens médias de germinação (34,3%) foram obtidas quando as sementes não sofreram embebição ou foram imersas em água por 24 horas a 80 °C e semeadas em ambiente com temperatura de 20°C. As estacas caulinares da espécie, submetidas à presença ou ausência de ácido indolacético (AIA), apresentaram baixa porcentagem de sobrevivência (16,6%). Diante disto, a micropropagação de *C. paradoxa* pode ser uma alternativa viável para produção de mudas a serem utilizadas por programas de recuperação de áreas degradadas e compensação ambiental.

A micropropagação consiste em técnicas de cultura de tecidos vegetais que objetivam a propagação vegetativa de plantas (GUPTA et al. 2020). Estas técnicas baseiam-se na totipotência das células vegetais, ou seja, na capacidade de produzir órgãos (organogênese) ou embriões (embriogênese somática) que darão origem a uma planta inteira em um meio de cultivo adequado (CARDOSO et al., 2018). As técnicas de

micropropagação apresentam como principais vantagens em relação à macropropagação uma produção de mudas livres de doenças, exigindo pouco espaço físico e taxa de multiplicação superior à obtida com a estaquia convencional (GUPTA et al., 2020).

O uso da micropropagação como técnica de propagação vegetativa apresenta algumas limitações, sendo a principal delas o alto custo envolvido na produção de mudas (CARDOSO et al., 2018). Dessa forma, é fundamental o desenvolvimento de protocolos específicos para cada espécie, com adaptações que visem não apenas otimizar as condições de cultivo, mas também reduzir os custos operacionais (GUPTA et al., 2020). Uma das abordagens mais relevantes para essa otimização, diz respeito ao ajuste das condições de iluminação nas salas de cultivo, uma vez que a luz desempenha um papel crucial no crescimento e no desenvolvimento das plantas cultivadas *in vitro* (BARCELO-MUNÓZ, 2022). Embora o meio de cultivo geralmente contenha sacarose, o que pode resultar em uma taxa fotossintética reduzida, estudos indicaram que a iluminação de lâmpadas fluorescentes brancas pode prejudicar a eficiência de multiplicação e o crescimento de brotos e plantas. Isso pode ocorrer devido à sua emissão de uma gama de comprimentos de onda entre 350 e 750 nm, dos quais apenas os comprimentos entre 400 e 700 nm são efetivamente absorvidos pelas plantas para o processo fotossintético (PARADISO et al., 2022; XU et al., 2020). Nesse contexto, os diodos emissores de luz (LEDs) surgiram como uma alternativa promissora nas práticas de cultivo *in vitro*, uma vez que oferecem vantagens consideráveis em relação às lâmpadas fluorescentes convencionais. Os LEDs são mais eficientes na conversão de energia em luz, emitem menos calor, permitem um controle preciso sobre a intensidade e a composição espectral da luz e, além disso, são mais econômicos e ecologicamente sustentáveis, pois não contêm componentes poluentes (PAWŁOWSKA et al., 2018; BATISTA et al., 2018). Além disso, o uso de LEDs, especialmente nas faixas de luz azul e vermelha, seja de forma isolada ou combinada, tem potencial para aumentar a taxa de multiplicação de explantes, favorecendo o crescimento das plantas, ao otimizar os processos fotoquímicos necessários à fotossíntese (BATISTA et al., 2018; XU et al., 2020).

A avaliação da quantificação de pigmentos fotossintéticos como clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, tem sido uma abordagem importante para entender os efeitos de diferentes regimes de luz, particularmente no uso de LEDs, sobre o desempenho fotossintético de plantas cultivadas *in vitro* (ABDALLA et al., 2022). Esses pigmentos exercem funções essenciais na captura da luz e na conversão em energia química,

sendo a clorofila *a* responsável pela maior parte da absorção de luz, enquanto a clorofila *b* e os carotenoides ampliam o espectro de luz utilizável para fotossíntese, além de atuarem na proteção contra danos oxidativos causados pela radiação luminosa excessiva (WANG et al., 2021). A fluorescência da clorofila *a* (fchl_a) é um fenômeno em que a luz absorvida é reemitida de forma não fotossintética e também tem sido amplamente utilizada como ferramenta para monitorar a eficiência fotoquímica das plantas cultivadas *in vitro*, sob diferentes fontes luminosas, incluindo a iluminação por LEDs. Estudos recentes foram conduzidos com *Cunninghamia lanceolata* (XU et al., 2020), *Helleborus* (NOWAKOWSKA et al., 2023), *Melaleuca alternifolia* (ALVARADO et al., 2024) e *Dendrobium* (HUO et al., 2024).

As enzimas antioxidantes desempenham um papel crucial na proteção das células vegetais contra os danos causados pelo estresse oxidativo, especialmente aqueles induzidos pela radiação luminosa intensa ou por condições ambientais adversas. Entre essas enzimas, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a ascorbato peroxidase (APX), as quais atuam de forma sinérgica para neutralizar radicais livres, como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, prevenindo danos às células vegetais (FOYER et al., 2018). A atividade dessas enzimas pode servir como um indicador importante da capacidade de adaptação das plantas a diferentes condições de iluminação, sendo especialmente relevante em cultivos *in vitro*, onde a intensidade e a qualidade da luz podem ser controladas para otimizar o crescimento e a fotossíntese das plantas (ELYAZID et al., 2021; PACHOLCZAK et al., 2024).

Considerando o status de ameaça de conservação de *C. paradoxa* e as dificuldades associadas à sua propagação vegetativa, levanta-se a hipótese de que a micropropagação utilizando LEDs possa ser uma ferramenta eficaz para otimizar tanto os processos fotossintéticos quanto morfogênicos desta espécie. O objetivo deste estudo foi otimizar o desenvolvimento *in vitro* dos brotos de *C. paradoxa* por meio da exposição a diferentes condições de luz fornecidas por LEDs nas salas de cultivo *in vitro*. Adicionalmente, foram realizadas avaliações fisiológicas, incluindo a quantificação de pigmentos fotossintéticos, a análise da atividade de enzimas antioxidantes, a medição da fluorescência da clorofila *a* e a análise de parâmetros de trocas gasosas, com o intuito de verificar a influência da iluminação com LEDs nas respostas fotossintéticas e morfogênicas da espécie em condições de cultivo *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desenvolvimento de brotações e metabolismo fotossintético de *C. paradoxa* cultivada *in vitro* com diferentes sistemas de iluminação por LEDs visando otimizar a propagação dos explantes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a concentração de agentes desinfetantes e o tempo de exposição ideal para o estabelecimento de culturas assépticas;
- Determinar a melhor concentração de reguladores vegetais (citocininas e/ou auxinas) para estimular a regeneração, alongamento e o enraizamento dos explantes.
- Estabelecer as condições de iluminação mais adequadas com LEDs para otimizar o desenvolvimento dos brotos.
- Avaliar os níveis de pigmentos fotossintéticos (como clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenoides), enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, peroxidase e ascorbato peroxidase) nos brotos, para compreender como diferentes condições de luz afetam o metabolismo fotossintético dos explantes.
- Mensurar a fluorescência da clorofila *a* nos brotos cultivados sob diferentes sistemas de iluminação por LEDs, para verificar como essas condições influenciam a eficiência da fotossíntese dos explantes;
- Analisar a condutância estomática, o conteúdo de carbono nas folhas e a taxa de transpiração dos brotos sob diferentes tipos de iluminação com LEDs, para verificar como as condições luminosas afetam as trocas gasosas e o metabolismo das plantas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 RHAMNACEAE

A família Rhamnaceae A. L. Jussieu, pertencente a ordem Rosales, compreende 55 gêneros e cerca de 950 espécies. Seus indivíduos apresentam distribuição cosmopolita, mesmo sendo mais comuns em regiões subtropicais (RICHARDSON et al., 2000). No Brasil, a família está representada por 14 gêneros e 48 espécies com distribuição em todos os biomas, ocorrendo, principalmente, em caatingas e restingas (LIMA, 2001).

As espécies de Rhamnaceae são caracterizadas como plantas lenhosas, perenifólias e com hábito majoritariamente arbustivo ou arbóreo (LIMA, 2001). As adaptações xeromórficas exibidas pelas espécies incluem folhas reduzidas ou ausentes, encurtamento dos eixos de galhos e presença de espinhos (RICHARDSON et al., 2000). São poucas as plantas de valor econômico em Rhamnaceae, sendo mais notáveis a jujuba (*Ziziphus jujuba*), uma espécie arbórea frutífera e os arbustos ornamentais e medicinais pertencentes ao gênero *Colletia* (MEDAN e SCHIRAREND, 2004).

3.2 *Colletia paradoxa* (Spreng.) Escal.

A descrição do gênero *Colletia* foi publicada por Antonii Laurentii Jussieu a cerca de três séculos na obra “*Genera Plantarum*” (JUSSIEU, 1789). Durante vários anos, plantas desse gênero foram classificadas como pertencentes ao gênero *Discaria*. Entretanto, durante uma revisão taxonômica realizada por Tortosa (1982), cinco espécies de *Colletia* apresentaram ocorrência na América do Sul, sendo elas: *Colletia spinosissima* J.F. Gmel., *Colletia hystrix* L.P., *Colletia ulicina* Wom., *Colletia spatioides* Bertero ex Colla e *Colletia paradoxa* (Spreng.) Escal.

Colletia paradoxa é uma espécie arbustiva, cuja altura varia de 1,0 a 3,5 metros, adaptada a viver em ambientes áridos (MARCHIORI, 1983) (Figura 1). A espécie possui distribuição pela região sul do Brasil, nos estados do Rio Grande Sul e Santa Catarina, na costa do Uruguai e no sudoeste da Província de Buenos Aires, Argentina. Habita preferencialmente solos pedregosos e arenosos, ladeiras rochosas, morros baixos e margens de rios e arroios (MARCHIORI, 1983). Possui espinhos que variam de 0,7 a 4,0 cm de comprimento, normalmente achatados na base e ápice agudo, de cor escura. Floresce de outubro a janeiro e frutifica apenas em junho (GOTTELI et al.,

2012). A espécie é amplamente utilizada na medicina popular por comunidades rurais (BASTOS-ZACHIA, 2019). Apesar de existirem poucos estudos sobre seu potencial medicinal, algumas pesquisas constataram a presença de triterpenóides e esteróides nas partes aéreas e subterrâneas da planta, conferindo aos seus extratos propriedades purgativas, antioxidantes, antiespasmódicas, antimicrobianas e antipiréticas (BANDONI et al., 1976; GIACOMELLI, 2005; BASTOS-ZÁCHIA et al., 2020).

FIGURA 1. INDIVÍDUO ADULTO DA ESPÉCIE *Colletia paradoxa*.



Fonte: Patricia Gurski – Sociedade Chauá.

A distribuição de *C. paradoxa* está intimamente relacionada com seu estado de conservação. Como sua ocorrência se dá em regiões que sofreram grande pressão antropogênica, a principal ameaça a esta espécie é a destruição de seus habitats por atividades de silvicultura, agricultura extensiva e invasão de espécies exóticas e madeiras (LIMA et al, 2014). Pelos motivos supracitados, as áreas de ocupação de *C. paradoxa* no Brasil foram estimadas em apenas 36 km² (MARTINELLI et al, 2013). Diante disto, a espécie encontra-se ameaçada de extinção na categoria “vulnerável” (VU) pelo processo de avaliação das listas da fauna e da flora do Rio Grande do Sul, organizado pela Comissão de Reavaliação e pelos Coordenadores de cada grupo taxonômico (CONSEMA, 2002) e na categoria "em perigo" (EN) na Lista Vermelha de Espécies de Flora Ameaçadas do Brasil (BRASIL, 2014).

3.3 PROPAGAÇÃO SEXUADA DE *Colletia paradoxa*

Colletia paradoxa possui reprodução do tipo xenógama, sendo majoritariamente polinizada por insetos das ordens Hymenoptera, Lepidoptera e Díptera (D'AMBROGIO e MEDAN, 1993). Como estratégia reprodutiva, a espécie apresenta uma floração com uma fase pós floral prolongada de quatro a oito meses passando por diferentes estações do ano. Este fenômeno permite que uma maior diversidade de insetos possa visitar as florações, já que elas possuem uma estrutura floral pouco especializada para polinização (D'AMBROGIO e MEDAN, 1993). Apenas uma flor em cada quatro forma fruto, e destes, apenas 6,1% amadurecem (D'AMBROGIO e MEDAN, 1993). Flores autopolinizadas de *C. paradoxa* não produzem frutos. Cerca de 2% dos óvulos disponíveis na antese são transformados em sementes viáveis que podem ser dispersas. Para um indivíduo maduro, cuja produção anual pode ser estimada em 225.000 flores e 675.000 óvulos, o sucesso reprodutivo representa a geração de 7.500 sementes por ano. Pelo baixo nível de frutificação desta espécie, D'Ambrogio e Medan (1993) sugeriram que o pólen não seja transportado pelo vento.

3.4 MICROPROPAGAÇÃO

A micropropagação consiste em um conjunto de técnicas com o objetivo da propagação vegetativa de plantas a partir do cultivo de tecidos ou órgãos vegetais *in vitro* (CARDOSO et al., 2018). As aplicações destas técnicas vão desde o melhoramento vegetal até a produção em larga escala de mudas para recuperação de áreas degradadas (WANG et al., 2022).

Em geral, as técnicas de culturas de tecidos são iniciadas com a desinfestação de partes vegetais selecionadas, denominadas como explantes, para a remoção superficial de microrganismos (BELLO et al., 2022). Diversas partes da planta-matriz podem ser utilizadas como fonte de explantes para a regeneração *in vitro*, como segmentos nodais, ápices caulinares, discos foliares, segmentos internodais, caulinares, de raízes, dentre outros (BELLO et al., 2022). A tabela 1 apresenta os tratamentos de desinfestação realizados em segmentos nodais de espécies pertencentes à família Rhamnaceae.

TABELA 1 - DESINFESTAÇÃO DE SEGMENTOS NODAIS EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA RHAMNACEAE PARA O ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS.

Espécie	Tratamento	Autor
<i>Ceanothus americanus</i>	0,54% NaClO - 15 min	Lubell-Brand et al. (2022)
<i>Frangula alnus</i>	2,5% NaClO + Tween 20 - 15 min	Kovačević e Grubišić (2005)
<i>Frangula rupestres</i>	1,5% NaClO + Tween 20 - 15 min	Kovačević e Grubišić (2005)
<i>Hovenia dulcis</i>	1,25% NaClO - 15 min	Ribeiro et al. (2015)
<i>Hovenia dulcis</i>	3,0% NaClO + Tween 20 - 15 min	Park et al. (2006)
<i>Hovenia dulcis</i>	2,0% NaClO + Tween 20 - 15 min	Saavedra et al. (2021)
<i>Ziziphus jujuba</i>	Captan (1,2 g L ⁻¹) + Topsin (2,0 g L ⁻¹) - 15 min	Hansika et al. (2017)
<i>Ziziphus mauritiana</i>	1,5% NaClO + Tween 20 - 15 min	Ashkanani et al. (2016)
<i>Ziziphus spinachristi</i>	1,0% NaClO + Tween 20 - 15 min	Ashkanani et al. (2013)
<i>Ziziphus spinachristi</i>	0,25% NaClO - 15 min	Hegazi et al. (2017)

Legenda: NaClO – Hipoclorito de sódio. Fonte: o autor.

Para o estabelecimento *in vitro*, os explantes são inoculados em meios de cultura com a presença de macro e micronutrientes, vitaminas e fontes de carboidratos (comumente a sacarose). O equilíbrio nutricional do meio de cultura e sua interação com o material genético ou explante representa um dos fatores que mais influenciam no sucesso da propagação *in vitro* (CARDOSO et al., 2018). A morfogênese *in vitro* é altamente dependente da interação entre os hormônios vegetais que ocorrem naturalmente na planta e os análogos sintéticos (reguladores vegetais), os quais são adicionados no meio de cultura (BELLO et al., 2022).

Uma das etapas mais importantes da micropropagação é a de desenvolvimento de brotações múltiplas, na qual os meios de cultura são geralmente suplementados com citocininas para remover a dominância apical e promover a proliferação das gemas axilares (BELLO et al., 2022). A citocinina mais utilizada é a 6-benzilaminopurina (BAP) de maneira isolada ou em combinações com outras citocininas e/ou auxinas. Essa etapa compreende vários subcultivos para meio de mesma composição de regeneração de brotos com o objetivo de obter novos brotos (WANG et al., 2022). Na literatura científica não foram encontrados estudos de brotações múltiplas com *C. paradoxa*. No entanto, alguns exemplos de taxas médias de regeneração de brotações obtidas com diferentes concentrações de reguladores vegetais testadas em outras espécies da família Rhamnaceae são apresentados na tabela 2.

TABELA 2 – DESENVOLVIMENTO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA RHAMNACEAE.

Espécie	Explant	Tratamento	TM	Cultivo	Dias	Autor
<i>Ceanothus americanus</i>	Gemas axilares a partir de uma planta matriz adulta	WPM + 9, 12 μ M ZEA	6,8	3º Subcultivo	30	Lubell-Brand et al. 2022
<i>Frangula alnus</i>	Gemas axilares a partir da germinação de embriões zigóticos	MS + 0,53 μ M AIA	7,65	Inicial	40	Sajc et al. 1999
<i>Frangula alnus</i>	Gemas axilares a partir da germinação de embriões zigóticos	WPM + 0,53 μ M AIA + 5,37 μ M ANA + 4,65 μ M CIN	1,55	2º Subcultivo	30	Kovačević e Grubišić, 2005
<i>Frangula rupestris</i>	Gemas axilares a partir da germinação de embriões zigóticos	MS + 2,22 μ M BAP	2,6	3º Subcultivo	40	Sajc et al. 1999
<i>Frangula rupestris</i>	Gemas axilares a partir da germinação de embriões zigóticos	MS + 0,44 μ M BAP + 5,37 μ M ANA	3,27	2º Subcultivo	30	Kovačević e Grubišić, 2005
<i>Hovenia dulcis</i>	Gemas axilares a partir da germinação <i>in vitro</i>	MS + 4,44 μ M BAP	0,87	Inicial	30	Park et al., 2006
<i>Hovenia dulcis</i>	Gemas axilares a partir da germinação <i>in vitro</i>	MS + 2,22 μ M BAP + 2,33 μ M CIN	1,33	3º Subcultivo	30	Saavedra et al., 2021
<i>Karwinskia humboldtiana</i>	Gemas axilares a partir da germinação de embriões zigóticos	WPM + 0, 06 μ M AIA + 0,03 μ M GA + 2,0 μ M BAP	9,60	Inicial	35	Liskova et al., 2003
<i>Rhamnus catharticus</i>	Gemas axilares a partir da germinação de embriões zigóticos	MS + 4,44 μ M BAP + 5,37 ANA	1,76	2º Subcultivo	30	Kovačević e Grubišić, 2005
<i>Rhamnus fallax</i>	Gemas axilares a partir da germinação de embriões zigóticos	MS + 2,22 μ M BAP	4,1	Inicial	30	Rosic et al., 2000
<i>Ziziphus jujuba</i>	Gemas axilares a partir de uma planta matriz adulta	MS + 6,66 μ M BAP + 0,93 μ M CIN	1,87	2º Subcultivo	20	Hansika et al., 2017

Espécie	Explante	Tratamento	TM	Cultivo	Dias	Autor
<i>Ziziphus mauritiana</i>	Gemas axilares a partir de uma planta matriz adulta	MS + 4,44 µM BAP	7,5	3º Subcultivo	30	Ashkanani et al., 2016
<i>Ziziphus spinachristi</i>	Gemas axilares a partir de uma planta matriz adulta	MS + 0,44 µM BAP	6,8	3º Subcultivo	45	Ashkanani et al., 2013
<i>Ziziphus spinachristi</i>	Gemas axilares a partir de uma planta matriz adulta	MS + 1,11 µM BAP	1,8	Inicial	35	Hegazi et al., 2017

Legenda: TM - taxa de multiplicação; MS - meio Murashige e Skoog; WPM - *woody plant medium*; ZEA - ZEATINA; AIA - ácido indolacético; ANA - ácido naftalenoacético; CIN - cinetina; BAP - benzilaminopurina; NE - não especificado. Fonte: o autor.

A próxima etapa, quando necessária, é a de alongamento, onde são adicionadas giberelinas para promover o crescimento dos brotos. Outras alternativas também vêm sendo utilizadas, como a adição de concentrações reduzidas da citocinina, ausência de regulador vegetal ou adição do carvão ativado. Posteriormente, o enraizamento é a fase na qual as microestacas são colocadas em meios contendo auxinas para a indução de raízes adventícias (MOLKANOV et al., 2019). Este processo pode ocorrer tanto em condições *in vitro*, como *ex vitro* e geralmente utiliza-se o ácido indolbutírico (AIB) devido aos bons resultados, baixo custo e baixa de fitotoxicidade (WANG et al., 2022). Exemplos de meios de culturas e reguladores vegetais utilizados para indução de raízes em espécies da família Rhamnaceae podem ser observados na tabela 3.

TABELA 3 - INDUÇÃO DE RAÍZES EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA RHAMNACEAE.

Espécie	Tratamento	Tempo	Enraizamento	Autor
<i>Ceanothus americanus</i>	MS + 9,80 µM AIB	30 dias	88%	Lubell-Brand et al. 2022
<i>Frangula alnus</i>	MS/2 + 0,49 µM AIB	NE	72%	Sajc et al. 1999
<i>Frangula rupestris</i>	MS + 2,69 µM ANA	NE	68%	Sajc et al. 1999
<i>Hovenia dulcis</i>	MS (sem citocininas)	45 dias	85%	Saavedra et al., 2021
<i>Karwinskia humboldtiana</i>	MS + 10 µM ANA + 14,0 µM GA	30 dias	95%	Liskova et al., 2003
<i>Rhamnus fallax</i>	MS/2 + 0,5 µM ANA	30 dias	74%	Park et al., 2006
<i>Ziziphus jujuba</i>	MS + 9,80 µM AIB	60 dias	79%	Hanska et al., 2017
<i>Ziziphus mauritiana</i>	MS + 0,53 µM ANA	30 dias	80%	Ashkanani et al., 2016
<i>Ziziphus spinachristi</i>	MS + 0,5 µM AIB	30 dias	82%	Ashkanani et al., 2013
<i>Ziziphus spinachristi</i>	MS + 0,26 µM ANA	30 dias	89%	Hegazi et al., 2017

Legenda: NE – não especificado; MS - meio Murashige e Skoog; MS/2 - meio MS com macro e micronutrientes reduzidos pela metade; AIB - ácido indolbutírico; ANA - ácido naftalenoacético. Fonte: o autor.

A última etapa é a de transplântio das mudas e aclimatização. Nessa etapa, as plantas obtidas da micropropagação são transferidas para condições *ex vitro* para adaptação em ambiente completamente diferente do cultivo em que estavam (CARDOSO et al., 2018). Para isso podem ser utilizados diferentes substratos comerciais como vermiculita, areia, fibras de coco, entre outros. Substratos utilizados durante a etapa de aclimatização de espécies pertencentes a família Rhamnaceae

são apresentados tabela 4. O controle da umidade relativa do ar da casa de vegetação pode ser feito por meio de coberturas com filme plástico de polietileno, nebulização frequente e sombrite (BELLO et al., 2022).

TABELA 4 - SUBSTRATOS UTILIZADOS NA ETAPA DE ACLIMATIZAÇÃO EM ESPÉCIES DA FAMÍLIA RHAMNACEAE.

Espécie	Estudo	Substrato	Observação
<i>Ceanothus americanus</i>	Lubell-Brand et al. 2022	Casca de pinheiro envelhecida, turfa, areia (1:2:1)	As plantas foram semanalmente irrigadas com solução NPK (20:8:16).
<i>Ziziphus spinachristi</i>	Ashkanani et al., 2013	Substrato comercial	Irrigação com NPK durante 20 dias.
<i>Ziziphus mauritiana</i>	Ashkanani et al., 2016	Areia esterilizada, turfa e terra (1:1:1)	Plantas irrigadas com solução de Benlate 0,5% por 20 dias.
<i>Ziziphus spinachristi</i>	Hegazi et al., 2017	Areia, turfa e vermiculita (1:1:1).	Antes do transplântio as plantas foram embebidas em solução fungicida 1,5 g L ⁻¹ (Benlate) por 3 minutos.
<i>Hovenia dulcis</i>	Park et al., 2006	Turfa, areia e vermiculita (1:1:1)	-

Fonte: o autor.

3.5 DIODOS EMISSORES DE LUZ COMO ALTERNATIVA PARA OTIMIZAR O CULTIVO *IN VITRO* DE PLANTAS

Nos processos de propagação *in vitro* a quantidade (densidade de fluxo de fótons) e a qualidade (comprimento de onda) da luz, absorvidas através de fotorreceptores, são de extrema importância para a regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas (BARCELO-MUNÓZ, 2022). Apesar da taxa fotossintética em plantas cultivadas *in vitro* serem baixas em virtude da presença de sacarose no meio de cultivo, a iluminação desempenha um papel fundamental no desenvolvimento das plantas cultivadas, uma vez que é essencial para ativação de enzimas, crescimento e a diferenciação celular (ARAÚJO et al., 2021). Os fatores supracitados modulam, dentre outras características, os processos fotossintéticos, a espessura foliar, diferenciação do mesofilo, desenvolvimento vascular e estomático e a biossíntese de metabólitos secundários nos vegetais cultivados (JIANG et al., 2019).

A luz branca de lâmpadas fluorescentes é majoritariamente utilizada para fornecer iluminação a plantas propagadas em ambientes de cultivo *in vitro* devido à intensidade de luz uniforme que emitem (HUNG et al., 2016). No entanto, essas lâmpadas concentram a maior parte de sua energia radiante dentro da faixa do espectro visível das cores verde e amarela. Isso, porque, é nesse segmento que o olho humano tem maior sensibilidade de estímulo (BARCELO-MUNÓZ, 2022). A fim de reduzir custos e melhorar a eficiência de produção e qualidade das plantas micropropagadas, há a necessidade de uma fonte de luz mais eficiente (BATISTA et al., 2018). A utilização de uma fonte de luz mais efetiva para regeneração e crescimento de plantas *in vitro* pode oferecer novas e importantes possibilidades para alcançar o sucesso na micropropagação comercial (PARADISO et al., 2022).

Nos últimos anos, as luzes fluorescentes estão sendo substituídas pelos LEDs em virtude de suas vantagens sobre os sistemas de iluminação convencionais (ATTAYA, 2021). Uma das vantagens do uso de LED no cultivo *in vitro* é a capacidade de controlar o espectro luminoso. As diferentes cores emitidas pelos LEDs permitem ajustar o espectro de luz para atender às necessidades específicas das plantas em diferentes estádios de desenvolvimento (CHEN et al., 2020). Outra vantagem dos LEDs é a sua alta eficiência energética; elas convertem a energia elétrica em luz de forma mais eficiente do que as lâmpadas convencionais, resultando em menor consumo de energia e redução dos custos operacionais (ATTAYA, 2021). Além disso, a baixa emissão de calor dos LEDs minimiza o risco de superaquecimento dos tecidos cultivados *in vitro*, garantindo um ambiente de cultivo mais estável e controlado (ARAÚJO et al., 2021).

Os LEDs também possuem uma vida útil mais longa em comparação com outras fontes de luz, reduzindo a necessidade de substituição frequente e os custos associados. Isso é particularmente benéfico no cultivo *in vitro*, onde os experimentos podem ser realizados por longos períodos exigindo uma iluminação constante e confiável (CHEN et al., 2020). Além disso, as lâmpadas de LEDs são compactas e podem ser facilmente ajustadas e posicionadas de forma a otimizar a distribuição da luz nos sistemas de cultivo *in vitro*.

A possibilidade de poder controlar a composição espectral dos LEDs permite com que as plantas cultivadas sejam expostas a comprimentos de ondas luminosas

específicas que maximizam seus processos fotoquímicos (PARADISO et al., 2022). Isto, porque, cada pigmento fotossintético absorve comprimentos de onda específicos do espectro eletromagnético (BARCELO-MUNÓZ, 2022).

LEDs com diferentes comprimentos de onda (< 400 nm ultravioleta; 400–450 nm violeta; 450–500 nm azul; 500–570 nm verde; 570–590 nm amarelo; 590–610 nm laranja; 610–760 nm vermelho; e > 760 nm de cor infravermelha) podem ser utilizados de maneira monocromática ou combinados para otimizar a morfogênese *in vitro* (CHEN et al., 2020). No entanto, para selecionar um LED de cor apropriada, os diferentes fotorreceptores presentes nas plantas devem ser considerados. Estes incluem os fitocromos que absorvem a luz vermelha e vermelha extrema e as fototropinas que absorvem a luz azul (CHENG et al., 2021).

Em geral, existem dois principais tipos de fitocromos: o fitocromo vermelho (Fv) e o fitocromo vermelho-distante (Fvd) (LABUZ et al., 2022). Esses pigmentos possuem a capacidade de se converter um no outro quando são expostos a diferentes comprimentos de onda da luz. O Fv é a forma inativa do fitocromo e é absorvido preferencialmente pela luz vermelha (660 nm) (HART et al., 2021). Quando a planta é exposta à luz vermelha, o Fv é convertido para sua forma ativa, o Fvd, por meio de um processo chamado fototransformação. O Fvd é então capaz de desencadear uma série de respostas fisiológicas nas plantas como, por exemplo, a regulação do alongamento do caule, expansão das folhas e desenvolvimento de cloroplastos (LABUZ et al., 2022).

Os fitocromos são cruciais na regulação de processos como a germinação de sementes, alongamento do caule, abertura dos estômatos, fototropismo (curvatura das plantas em direção à luz) e a transição entre os estádios de crescimento vegetativo e reprodutivo (CHENG et al., 2021). Os fitocromos também desempenham um papel importante na regulação do ritmo circadiano das plantas, ou seja, na capacidade das plantas de se ajustarem a ciclos diários de luz e escuridão (HART et al., 2021). A ação dos fitocromos é possível devido à sua capacidade de interagir com proteínas específicas no núcleo das células vegetais, ativando ou reprimindo a expressão de genes responsáveis por diversas respostas fisiológicas (CHENG et al., 2021). Essas interações entre fitocromos e proteínas ajudam a regular

o crescimento e desenvolvimento das plantas de acordo com as condições de iluminação (HART et al., 2021).

As fototropinas, por sua vez, são proteínas fotossensíveis encontradas em plantas e são responsáveis por mediar a resposta de fototropismo (DA-CUNHA et al., 2019). O fototropismo é o movimento direcional das plantas em resposta a estímulos de luz, resultando na curvatura dos órgãos vegetais em direção à fonte de luz (CHENG et al., 2021). Existem duas principais classes de fototropinas em plantas: fototropina 1 (PHOT1) e fototropina 2 (PHOT2) (DA-CUNHA et al., 2019). Essas proteínas são mais sensíveis à luz azul (entre 400 e 500 nm) e desempenham um papel crucial na percepção e na resposta a esse espectro de luz. Quando as células vegetais são expostas à luz azul, as fototropinas são ativadas e desencadeiam uma cascata de eventos bioquímicos e moleculares que levam à curvatura dos órgãos vegetais (CHENG et al., 2021). A luz azul é absorvida pelas fototropinas, resultando em uma mudança conformacional da proteína e ativando sua função. Uma vez ativadas, as fototropinas atuam como quinases, modificando e ativando outras proteínas-chave na cascata de sinalização do fototropismo (HART et al., 2021). Elas interagem com proteínas de transporte de íons, como as H^+ ATPases, que estão envolvidas no transporte de prótons para fora das células. Essa acidificação das células nas regiões iluminadas leva a mudanças no crescimento das células promovendo a curvatura em direção à fonte de luz (DA-CUNHA et al., 2019). Além do fototropismo, as fototropinas também estão envolvidas em outras respostas fotomorfogênicas, como a abertura e o fechamento dos estômatos, o desenvolvimento de cloroplastos e a regulação do ritmo circadiano das plantas (HART et al., 2021). Em síntese, as fototropinas desempenham um papel fundamental na percepção e na resposta das plantas à luz azul, coordenando o direcionamento do crescimento dos órgãos vegetais em resposta ao estímulo luminoso (DA-CUNHA et al., 2019).

Como já relatado anteriormente, os LEDs podem ser projetados para emitir luz em comprimentos de onda específicos, incluindo vermelho, azul e outros espectros necessários para o crescimento e desenvolvimento das plantas (CHEN et al., 2020). Dessa forma, os pesquisadores podem manipular o espectro de luz fornecido pelos

LEDs para ativar os fitocromos e as fototropinas influenciando o crescimento, a floração, a fotossíntese e outros processos fisiológicos das plantas. Essa capacidade de ajustar o espectro de luz com precisão torna os LEDs uma alternativa para proporcionar às plantas a luz necessária para um crescimento eficiente (XU et al., 2020).

3.6 PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS

Os pigmentos fotossintéticos são moléculas presentes em plantas, algas e algumas bactérias, que desempenham um papel fundamental na captura da luz solar e na conversão dessa energia em energia química durante o processo de fotossíntese (GU et al., 2021). Dentre os pigmentos, destacam-se as clorofilas e os carotenoides. Existem cinco tipos principais de clorofilas: *a*, *b*, *c* e *d*, além de outra encontrada nos procariontes denominada de bacterioclorofila. Nos vegetais a clorofila *a* (chl*a*) e a clorofila *b* (chl*b*) são os principais pigmentos fotossintéticos (HU et al., 2021). Os dois pigmentos absorvem comprimentos de onda da luz visível nas regiões do azul e do vermelho (WANG et al., 2021).

A chl*a* absorve a luz vermelha a aproximadamente 662 nm e luz azul a aproximadamente 430 nm. A chl*b*, por sua vez, absorve a luz vermelha a 642 nm e a luz azul a 453 nm. Deste modo, durante o processo de fotossíntese, a luz é absorvida pelas clorofilas abaixo de 480 nm e entre 550 e 700 nm (WANG et al., 2021). A luz no comprimento de onda entre 480 e 550 nm (ou seja, verde) não é absorvida, mas refletida; fazendo com que os vegetais, em sua maioria, apresentem esta coloração (GU et al., 2021).

Os carotenoides são pigmentos que complementam a ação das clorofilas na absorção da luz, capturando radiações luminosas nas regiões azul e verde do espectro. Esses pigmentos incluem o caroteno (de coloração laranja) e a xantofila (de coloração amarela) (SUN et al., 2022). Além de sua função na fotossíntese, os carotenoides desempenham um papel antioxidante, protegendo as células contra danos induzidos por radicais livres e radiação ultravioleta. Além disto, contribuem na dissipação do excesso de energia luminosa não utilizada em vias fotoquímicas em forma de calor ou fluorescência da clorofila *a* (fchl*a*) (SUN et al., 2022).

3.7 DISSIPAÇÕES ENERGÉTICAS E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A

Quando a luz solar incide sobre uma planta, a energia dos fótons (partículas de luz) é absorvida pelos pigmentos fotossintéticos, principalmente pela chl_a. Cada pigmento possui um espectro de absorção específico, que determina quais comprimentos de onda da luz ele pode capturar (MANOJ et al., 2021). A absorção da luz provoca uma elevação de energia nos elétrons dos pigmentos, isto é, quando um fóton é absorvido, um elétron de um estado de energia mais baixo (estado fundamental) é promovido para um estado de energia mais alto (estado excitado) (SWAMI et al., 2020). Esse processo resulta em uma maior energia cinética do elétron. Após a excitação, a energia do elétron não permanece isolada, sendo dissipada pelas moléculas de pigmentos fotossintéticos de duas principais maneiras: fotoquímica (energia utilizada para fotossíntese) e não fotoquímica (energia dissipada em forma de fluorescência da clorofila a) (MANOJ et al., 2021). Estes dois processos de dissipação da energia luminosa pelas moléculas de clorofilas são competitivos, ou seja, alterações nas taxas fotossintéticas causam alterações complementares na emissão da fluorescência (SWAMI et al., 2020).

A dissipação fotoquímica é aquela onde a energia proveniente dos fótons será destinada aos processos fotoquímicos dos vegetais, algas e cianobactérias. A energia de excitação eletrônica pode ser transferida para outras moléculas em um complexo de proteínas conhecido como fotossistema, sendo eles, o fotossistema II (FSII) e o fotossistema I (FSI). Esta transferência ocorre por meio de um processo de ressonância, onde a energia é passada de uma molécula de pigmento para outra até atingir um centro de reação (MANOJ et al., 2021). Os elétrons excitados são eventualmente transferidos por uma cadeia de transporte de elétrons com uma série de proteínas integradas na membrana dos tilacoides nos cloroplastos. Essa cadeia utiliza a energia liberada pela passagem dos elétrons para bombear prótons para o interior do tilacoide, criando um gradiente eletroquímico (MANOJ et al., 2021). O gradiente de prótons gerado é utilizado para sintetizar ATP por meio da ATP sintase, enquanto os elétrons são finalmente transferidos para a molécula de NADP⁺, a reduzindo a NADPH. Ambas as moléculas (ATP e NADPH) são essenciais para a fase química da fotossíntese, onde a energia química armazenada será utilizada na síntese de carboidratos (SWAMI et al., 2020). Por sua vez, a dissipação não fotoquímica se dá por meio da fchl_a. Este é um fenômeno ótico que ocorre quando a clorofila absorve a luz e posteriormente reemite uma fração

dessa energia na forma de luz visível (PORCAR-CASTELL, et al., 2021). O processo é de particular interesse na pesquisa fotossintética, pois fornece informações sobre a eficiência da absorção de luz e o estado funcional dos fotossistemas nas células vegetais. A fchla se manifesta como uma emissão em torno de 685-730 nm, o que corresponde ao infravermelho próximo (SWOCZYNA et al., 2022). Essa diferença entre os comprimentos de onda da luz absorvida e a luz emitida é um reflexo da energia perdida durante a transição dos elétrons em estado excitado para o estado fundamental (GOLTSEV et al., 2016).

Toda vez que um tecido vegetal é iluminado, irá realizar a dissipação energética fotoquímica (fotossíntese) e não fotoquímica (fchla). Para se obter informações válidas a partir da mensuração da fluorescência torna-se necessário avaliar e interpretar a cinética de sua emissão em determinado espaço de tempo (PORCAR-CASTELL, et al., 2021). Para isso, se faz necessário adaptar o tecido vegetal de 15 a 30 minutos no escuro para que seus centros de reação se abram em virtude das moléculas de plastoquinona A (QA) estarem em estado oxidado. Isso torna o fotossistema apto a receber elétrons das moléculas excitadas pelos fótons, fazendo com que as enzimas do Ciclo de Calvin sejam desativadas com o consequente declínio da taxa de fixação de CO₂ (PORCAR-CASTELL, et al., 2021). Após rápida iluminação deste tecido aclimatizado ao escuro, o número de complexos antena e centros de reação do FSII e FSI aptos a aceitarem os elétrons, rapidamente reduz a zero. Isto, porque, todos os sítios de redução, em especial a QA, estão reduzidos como consequência da ativação da fase fotoquímica pela luz. Em detrimento disto, a energia absorvida pelas moléculas de chla acaba sendo dissipada em forma de fchla (BHAGOOI et al., 2021).

3.8 FOTOSSÍNTESE E A GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO

Os processos metabólicos dependentes do oxigênio, como a fotossíntese, frequentemente levam à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos cloroplastos. Isto, porque, as cadeias transportadoras de elétrons (CTE) nos cloroplastos não são apenas a força motriz do metabolismo celular, mas também são geradoras de reações de oxidação e redução, que participam e regulam os processos biológicos das plantas (KHOROBRYKH et al., 2020). Os complexos fotossintéticos absorvem grande quantidade de energia luminosa nos tilacoides para convertê-la em energia química. No FSII, a formação do O₂ ocorre quando a energia armazenada na

clorofila em seu estado excitado não é dissipada, sendo então transferida para o oxigênio molecular. A formação do radical superóxido (O_2^-) durante a fotossíntese acontece na CTE, no lado aceptor de FSI (RAJPUT et al., 2021).

A geração do O_2^- nos cloroplastos também pode ser induzida pela baixa concentração de CO_2 , em função do fechamento dos estômatos, resultante de condições de estresses bióticos ou abióticos (MOUSTAKAS et al., 2021). A limitação da fixação de CO_2 no ciclo de Calvin em plantas sob tais condições diminui a oxidação do NADPH. Quando isso ocorre, o elétron da ferredoxina reduzida que seria transferido para o $NADP^+$ vai para o O_2 e forma O_2^- (KHOROBRYKH et al., 2020).

As plantas possuem diversas enzimas que se constituem como defesa antioxidante para prevenir o acúmulo de EROs em seus tecidos (FOYER et al., 2018). Enzimas são proteínas que catalisam reações químicas e mediam a enorme variedade de reações bioquímicas que constituem a vida. Portanto, são essenciais para a manutenção adequada de qualquer organismo. Dentre elas, destacam-se entre a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), peroxidase (POX, EC 1.11.1.7) e ascorbato peroxidases (APX, EC 1.11.1.1) (FOYER et al., 2018).

A SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido (O_2^-) em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (GIANNOPOLITIS e RIES, 1977). As CAT são algumas das principais enzimas na eliminação do H_2O_2 gerado durante a fotossíntese. Elas convertem duas moléculas de H_2O_2 a H_2O e oxigênio molecular (AZEVEDO et al., 1998). A APX, por sua vez, é uma heme-proteína que exige o ácido ascórbico como redutor de suas atividades. Tem alta afinidade com o H_2O_2 e, com uma constante de Michaelis-Menten na ordem de μM , permite a eliminação deste composto mesmo em baixas concentrações (ASADA, 1992). Por fim, as POX utilizam o H_2O_2 como oxidante e compostos de natureza fenólica como doadores de elétrons (AZEVEDO et al., 1998).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, Neama et al. An academic and technical overview on plant micropropagation challenges. **Horticulturae**, v. 8, n. 8, p. 677, 2022.

ARAÚJO, D. X. et al. Photon flux density and wavelength influence on growth, photosynthetic pigments and volatile organic compound accumulation in *Aeollanthus suaveolens* (Catinga-de-mulata) under in vitro conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 168, n. 1, p. 113597-113607 2021.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 85, n. 2, p. 235-241, 1992.

ASHKANANI, J. et al. Micropropagation and field evaluation of micropropagated plants of *Ziziphus spinachristi*. **Acta Horticulturae**, n. 993, p. 77-82, 2013.

ASHKANANI, J. et al. Micropropagation of *Ziziphus mauritiana* resistant to stem gall infection. **Acta Horticulturae**, n. 1116, p. 77-81, 2016.

ATTAYA, A. S. LED Light technology as a source of illumination and a promising method for *Stevia rebaudiana* Elite propagation. **Egyptian Journal of Agronomy**, v. 43, n.1, p. 123–132, 2021.

BANDONI A. L. et al. Survey of Argentine medicinal plants: folklore and phytochemical - Screening. II. **Economic Botany**, v. 30, n. 2, p. 161-185, 1976.

BARCELÓ-MUÑOZ, A. et al. Effect of LED lighting on physical environment and microenvironment on in vitro plant growth and morphogenesis: the need to standardize lighting conditions and their description. **Plants**, v. 11, n. 1, p. 60, 2022.

BASTOS-ZÁCHIA, N. R. et al. Genetic diversity and population structure of *Colletia paradoxa* (Rhamnaceae) a medicinal species threatened with extinction in Brazil. **Plant Biosystems**, v. 155, n. 3, p. 579-586, 2021.

BASTOS-ZÁCHIA, N. R. et al. Phytochemical analysis and evaluation of antioxidant and antimycobacterial activity of *Colletia paradoxa* from Brazil. **Natural Product Research**, v. 35, n. 5, p. 802-806, 2020.

BATISTA, D. S. et al. Light quality in plant tissue culture: does it matter? **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 54, n. 3, p. 195-215, 2018.

BELLO, A. M. et al. Determination of the best culture medium and plant growth regulators for micropropagation of neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss). **International Journal of Horticultural Science and Technology**, v. 9, n. 2, p. 237- 245, 2022.

BHAGOOI, R. et al. Chlorophyll fluorescence—A tool to assess photosynthetic performance and stress photophysiology in symbiotic marine invertebrates and seaplants. **Marine Pollution Bulletin**, v. 165, p. 112059, 2021.

BJÖRN, L. O et al. A viewpoint: why chlorophyll a? **Photosynthesis research**, v. 99, p. 85-98, 2009.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Portaria n. 443 de 17 de dezembro de 2014. Lista oficial da flora brasileira ameaçada de extinção. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, n. 245, p. 110-121, 18 dez. 2014.

CARDOSO, J. C. et al. Micropropagation in the twenty-first century. **Plant Cell Culture Protocols**, v. 1, n. 2, p. 17-46, 2018.

CENTRO NACIONAL DE CONSERVAÇÃO DA FLORA - CNCFlora. ***Colletia paradoxa* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012**. 2012. Disponível em: <<http://cncflora.jbrj.gov.br/porta1/pt-br/profile/Colletiaparadoxa>>. Acesso em 02/10/2022.

CHEN, Y. C. et al. Topolins and red light improve the micropropagation efficiency of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Hortscience**, v. 55, n. 1, p. 1337–1344, 2020.

CHENG, M. C. et al. Phytochrome signaling networks. **Annual Review of Plant Biology**, v. 72, p. 217-244, 2021.

CONSELHO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE - CONSEMA. 2002. Decreto estadual nº 42.099, de 31-XII-2002. Declara as espécies da flora nativa ameaçadas de extinção no estado do Rio Grande do Sul e de outras providências, **Palácio Piratini**, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Rio Grande Do Sul, 2002. Disponível em: <<http://ww1.sema.rs.gov.br/upload/>>. Acesso em 02/10/2022.

DA-CUNHA, S. H. B. et al. Influência da qualidade de luz no crescimento e acúmulo de voláteis de *Mentha spicata* cultivada *in vitro*. **Scientia Plena**, v. 15, n. 9, 2019.

D'AMBROGIO, A. N. A.; MEDAN, D. Comportamiento reproductivo de *Colletia paradoxa* (Rhamnaceae). **Darwiniana**, v. 3, p. 1-14, 1993.

FOYER, C. H. Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. **Environmental and Experimental Botany**, v. 154, p. 134-142, 2018

GIACOMELLI, S. R. et al. Estudo fitoquímico de três espécies pertencentes à família Rhamnaceae: *Discaria americana*, *Colletia paradoxa* e *Gouania ulmifolia*. 2005. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.

ALVARADO, A. C.; CARDOSO, J. C. Development, chlorophyll content, and nutrient accumulation in Vitro shoots of *Melaleuca alternifolia* under light wavelengths and 6-BAP. **Plants**, v. 13, n. 20, p. 2842, 2024.

GOTELLI, M. et al. Pollen, tapetum, and orbicule development in *Colletia paradoxa* and *Discaria americana* (Rhamnaceae). **The Scientific World Journal**, v. 3, p. 33-42, 2012.

GUPTA, N. et al. A review on micropropagation culture method. **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development**, v. 8, n. 1, p. 86-93, 2020.

HANSIKA, K. P. et al. Micro propagation of jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) through shoot tip and nodal segment culture. **Plants**, v. 12, n. 1, p. 26-39, 2017.

HART, J. E.; GARDNER, K. H. Lighting the way: Recent insights into the structure and regulation of phototropin blue light receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 296, p. 261-283, 2021.

HEGAZI, G. A. et al. In vitro propagation of nab tree (*Ziziphus spina-christi* (L.) Desf.). In: **IX International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding** 1187, p.

69-78, 2016.

HU, X. et al. Research progress in the interconversion, turnover and degradation of chlorophyll. **Cells**, v. 10, n. 11, p. 3134, 2021.

HUO, J. et al. The influence of varying wavelengths of LED Light on the development, physiology response, and metabolism activities of micropropagated *Dendrobium* Hybrid 'Shuijing' Plantlets. **Horticulturae**, v. 10, n. 8, p. 774, 2024.

JIANG, L. et al. Responses of *Favorita potato* plantlets cultured in vitro under fluorescent and light-emitting diode (LED) light sources. **American Journal of Potato Research**, v. 96, n. 4, p. 396-402, 2019.

JOHNSTON, M. C. FREITAS-SOARES, M. A. Ramnáceas. In: REITZ, P. R. [Org.]. **Flora Ilustrada Catarinense**, Herbário Barbosa Rodrigues, 1972.

JUSSIEU, A. **Genera plantarum secundum ordines naturales disposita juxta methodum in horto regio parisiensi exaratam**. Veuve Herissant, 1789.

KHOROBYKH, S. et al. Oxygen and ROS in photosynthesis. **Plants**, v. 9, n. 1, p. 91, 2020.

KOVACEVIC, N. et al. Comparative study of anthraquinones from embryogenic callus tissue and zygotic embryos of *Frangula alnus* and *Rhamnus catharticus*. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, n. 5, p. 321-325, 2005.

ŁABUZ, J. et al. Molecular insights into the phototropin control of chloroplast movements. **Journal of Experimental Botany**, v. 73, n. 18, p. 6034-6051, 2022.

LIMA, R. B. **A família Rhamnaceae no Brasil: diversidade e taxonomia**. 2001. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

LIMA, R. B. et al. **Rhamnaceae**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB108426>>. Acesso em: 04/10/2022.

LIMA, R. B.; GIULIETTI, A. M., 2014. Synonymies and typification of the Rhamnaceae of Brazil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 28, n. 3, p. 45-67, 2014.

LIŠKOVÁ, D. et al. *Karwinskia* species (buckthorn): *in vitro* culture, micropropagation, and the production of toxin anthracenone. In: **Medicinal and Aromatic Plants XI**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2003. p. 223-242.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings of International Plant Propagators' Society**, v. 30, n. 1, p. 421-427, 1980.

LUBELL-BRAND, J. D.; BRAND, M. H. Micropropagation of New Jersey tea (*Ceanothus americanus*), sand cherry (*Prunus pumila*), and sweetbells (*Eubotrys racemosa*). **Native**

Plants Journal, v. 22, n. 3, p. 355-363, 2021.

MANOJ, K. M.; MANEKKATHODI, A. Light's interaction with pigments in chloroplasts: The murburn perspective. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 5, p. 100015, 2021.

MARCHIORI, J. N. C. Anatomia da madeira de *Colletia paradoxa* (Spreng.) Escalante. **Ciência e Natura**, v. 1, n. 4, p. 161-170, 1983.

MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro Vermelho da Flora do Brasil**, 1 ed. Nacional de Conservação da Flora, Rio de Janeiro, 2013.

MEDAN, D.; SCHIRAREND, C. Rhamnaceae. In: **Flowering Plants Dicotyledons**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2004.

MOLKANOVA, O. I. et al. Conservation and clonal micropropagation of rare species *Gladiolus palustris* Gaudin. In: **I International Symposium on Botanical Gardens and Landscapes**, 2019.

MOUSTAKAS, M. Plant photochemistry, reactive oxygen species, and photoprotection. **Photochemistry**, v. 2, n. 1, p. 5-8, 2021.

NOWAKOWSKA, K. et al. Energy efficiency of LEDs during micropropagation of *Helleborus* 'Molly's White'. **Agriculture**, v. 13, n. 6, p. 1265, 2023.

PARADISO, R.; PROIETTI, S. Light-quality manipulation to control plant growth and photomorphogenesis in greenhouse horticulture: The state of the art and the opportunities of modern LED systems. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 41, n. 2, p. 742-780, 2022.

PARK, J. S. et al. HPLC determination of bioactive flavonoids in *Hovenia dulcis* fruit extracts. **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 2, p. 130-135, 2016.

PASSOLD, C. R. **Germinação, propagação vegetativa e adubação de plantas de *Colletia paradoxa* (Spreng.) Escal.** Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal do Paraná, 2018.

PAWŁOWSKA, B. et al. Impact of LED light sources on morphogenesis and levels of photosynthetic pigments in *Gerbera jamesonii* grown in vitro. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 115-123, 2018.

PORCAR-CASTELL, A. et al. Chlorophyll a fluorescence illuminates a path connecting plant molecular biology to Earth-system science. **Nature Plants**, v. 7, n. 8, p. 998-1009, 2021.

RICHARDSON, J. E. et al. A phylogenetic analysis of Rhamnaceae using *rbcl* and *trnL-F* plastid DNA sequences. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 9, p. 1309- 1324, 2000.

ROSIĆ, N. et al. In vitro cultures of *Rhamnus fallax* Boiss., (Rhamnaceae) and anthraquinone production. **Archives of Biological Sciences**, v. 52, n. 2, p. 1-19, 2000.

SAAVEDRA, A. M. et al. In vitro propagation and cryopreservation of the medicinal species *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 144, n. 3, p. 577-591, 2021.

SAJC, L. et al. Production of anthraquinones by immobilized *Frangula alnus* Mill. plant cells in a four-phase air-lift bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 416-423, 1995.

SWAMI, S. B. et al. Natural pigments from plant sources: A review. **The Pharma Innovation Journal**, v. 9, n. 10, p. 56, 2020.

SWOCZYNA, T. et al. Environmental stress-what can we learn from chlorophyll a fluorescence analysis in woody plants? A review. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 1048582, 2022.

WANG, M. et al. In Vitro micrografting of horticultural plants: method development and the use for micropropagation. **Horticulturae**, v. 8, n. 7, p. 576, 2022.

WANG, P.; GRIMM, B. Connecting chlorophyll metabolism with accumulation of the photosynthetic apparatus. **Trends in Plant Science**, v. 26, n. 5, p. 484-495, 2021.

XU, Y. et al. Effects of LED photoperiods and light qualities on in vitro growth and chlorophyll fluorescence of *Cunninghamia lanceolata*. **Plant Biology**, v. 20, n. 2, p. 269-281, 2020.

ZÁCHIA, N. R. B. et al. ***Colletia paradoxa* (Spreng.) Escalante (Rhamnaceae): identificação de flavonoides, diversidade genética e conservação**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria, 2019.

CAPÍTULO I

MICROPROPAGAÇÃO DE *Colletia paradoxa* (RHAMNACEAE) A PARTIR DE GEMAS AXILARES E CULTURA DE NÓS

Resumo: *Colletia paradoxa* (Spreng.) Escal. (Rhamnaceae) é uma espécie endêmica do Brasil, com importância ornamental e medicinal, que se encontra ameaçada de extinção. O objetivo do presente estudo foi determinar as melhores condições para o estabelecimento de culturas assépticas, o meio de cultura mais apropriado e o efeito de reguladores vegetais sobre a regeneração e enraizamento dos brotos de *C. paradoxa* para o estabelecimento de um protocolo eficaz para a produção de mudas. Para o estabelecimento das culturas assépticas foram testados agentes desinfestantes (álcool 70%, hipoclorito de sódio (NaClO) e cloreto de mercúrio (HgCl₂)), isolados ou combinados, em diferentes concentrações e tempos de imersão. Os explantes foram cultivados nos meios MS, MS/2 (meio MS, com a concentração de sais reduzida pela metade), MSM/2 (meio MS com a concentração de macronutrientes reduzida pela metade) e WPM. Na etapa de desenvolvimento de brotações foram testadas três concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP): 2,5; 5,0 e 10 µM e um controle (sem BAP), além da adição de 5,0 µM das citocininas BAP, cinetina (CIN), zeatina (ZEA) e 2-Isopenteniladenina (2IP). O enraizamento foi testado a partir da imersão da base (0,5 cm) das brotações em soluções de 2,5, 5,0 e 10,0 mM de ácido indolbutírico (AIB), durante cinco minutos, além de um controle (sem AIB). Constatou-se que as soluções combinadas de NaClO (1,5%) e HgCl₂ (0,1%), durante dez minutos cada uma, foram as mais eficazes em reduzir a contaminação microbiana e promover a sobrevivência dos explantes (78%). Os explantes inoculados em meio MS/2 foram os que apresentaram os maiores comprimentos (2,3 cm) e números médios dos brotos (2,1). O cultivo dos brotos em meio suplementado com 5,0 µM de BAP proporcionou o maior comprimento médio dos brotos (3,86 cm), número médio de nós (3,29) e número médio de brotos (4,35). A maior porcentagem de explantes enraizados (68%), o maior número médio de raízes (3,1) e a maior porcentagem de sobrevivência após aclimatização foram registradas nos brotos que receberam tratamento pulso com 10,0 mM de AIB. Conclui-se, portanto, que agentes desinfestantes, bem como os meios de cultura e os reguladores vegetais influenciaram as respostas morfogênicas dos brotos de *C. paradoxa* cultivados *in vitro*. Recomenda-se utilizar o meio MS/2, acrescido de 5,0 µM de BAP para a regeneração dos brotos e o tratamento pulso com 10 mM de AIB para o enraizamento.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*, meio de cultura, regulador vegetal, citocinina, regeneração de brotos.

1 INTRODUÇÃO

Colletia paradoxa é uma planta arbustiva que pertence à família Rhamnaceae (LIMA et al., 2014). A espécie é endêmica de regiões subtropicais e temperadas da América do Sul, encontrada principalmente no sul do Brasil e leste da Argentina (BANDONI et al., 1976). Além disto, se destaca por seus ramos com espinhos longos e curvos que conferem um aspecto ornamental (GOTELLI et al., 2012). *Colletia paradoxa* possui propriedades medicinais atribuídas às suas folhas e cascas. Tradicionalmente, é utilizada na medicina popular para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, como azia e gastrite, devido às suas propriedades antiácidas e digestivas (BASTOS-ZÁCHIA et al., 2020). Ainda, existe um possível potencial no combate a doenças inflamatórias e como agente antioxidante (BASTOS-ZÁCHIA et al., 2020).

A propagação convencional de *C. paradoxa* apresenta desafios. A reprodução por meio de sementes é pouco viável devido à baixa taxa germinação *ex vitro* (12%) (PASSOLD, 2018). Além disso, a clonagem por estacas também pode ser difícil devido à presença de espinhos e a baixa taxa de enraizamento (23%) (LIMA et al., 2014). Nesse contexto, a micropropagação surge como uma alternativa promissora para superar as limitações da propagação convencional de *C. paradoxa*. A micropropagação é uma técnica de cultura de tecidos, amplamente utilizada na multiplicação rápida e eficiente de plantas (GUPTA et al., 2020). Essa abordagem tem se mostrado valiosa na propagação de espécies vegetais com características desejáveis, como a preservação de genótipos superiores, a produção em larga escala de mudas uniformes e livres de doenças e a conservação de espécies raras e ameaçadas de extinção (WANG et al., 2022).

Uma das principais técnicas de micropropagação envolve o cultivo de brotos axilares em meios de cultura com nutrientes e reguladores vegetais específicos que promovem o desenvolvimento de novos brotos e raízes (BELLO et al., 2022). Este método permite a obtenção de um grande número de mudas geneticamente idênticas em um curto período e a partir de uma única planta matriz (CARDOSO et al., 2018). Embora a micropropagação tenha sido amplamente empregada em diversas espécies vegetais, sua aplicação na *C. paradoxa* ainda não foi explorada. Diante disso, o objetivo do presente estudo é investigar as condições ideais para o estabelecimento de culturas assépticas, o meio de cultura mais apropriado e o efeito de reguladores

vegetais sobre a regeneração e enraizamento dos brotos desta espécie. Espera-se que os resultados obtidos possam contribuir para a elaboração de um protocolo de fácil replicação, viabilizando a produção em larga escala de mudas da espécie, com vistas ao uso ornamental, florestal e ao aproveitamento de suas propriedades medicinais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICROPROPAGAÇÃO

2.1.1 Plantas matrizes

Foram utilizadas cerca de 350 plantas jovens, de dois a quatro anos de idade, provenientes da Sociedade Chauá, localizada em Campo Largo, Paraná (-25.4270, -49.4843). As plantas foram mantidas em casa de vegetação, pertencente ao Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR), sendo podadas mensalmente e pulverizadas quinzenalmente com 2 g L⁻¹ do fungicida Cercobin®. A casa de vegetação foi mantida com temperatura média de 25 ± 2 °C, radiação fotossinteticamente ativa de 56 µmol m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas de mercúrio (250 W) e fotoperíodo de 12 horas. As etapas laboratoriais de micropropagação foram desenvolvidas no Laboratório de Micropropagação Vegetal, pertencente ao Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

2.1.2 Meios de cultura e condições de cultivo

Foram testadas quatro formulações de meio de cultura: MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962); MS/2 (meio MS, com a concentração de nutrientes reduzida pela metade); MSM/2 (meio MS, com a concentração de macronutrientes reduzida pela metade) e WPM (LLOYD e McCOWN, 1980). Os meios de cultura tinham consistência semissólida, com adição de 5,7 g L⁻¹ de ágar Kasvi® e 30 g L⁻¹ de sacarose para o meio MS e 20 g L⁻¹ para o meio WPM. Todos os meios foram suplementados com 0,1% de *plant preservative mixture* (PPM). O pH dos meios de cultura foi ajustado em 5,8 com hidróxido de sódio (NaOH) 1,0 N ou ácido clorídrico (HCl) 1,0 N, antes da autoclavagem.

Na etapa de estabelecimento de culturas assépticas foram utilizados tubos de ensaio (200 x 100 mm) contendo 10 mL de meio de cultura. Nas outras etapas *in vitro*

(regeneração de brotações e enraizamento), os explantes foram inoculados em frascos do tipo pote (65 x 130 mm) contendo 40 mL de meio de cultura. Os tubos de ensaio e frascos foram fechados com tampas de polipropileno. Os meios foram esterilizados em autoclave (120°C e 1,06 Kg cm⁻² de pressão, durante 20 minutos). As culturas foram mantidas em sala de cultivo, com temperatura de 23 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e radiação fotossinteticamente ativa de 72 µmol m⁻² s⁻¹ fornecida por LEDs brancos da marca Electrolux®.

2.1.3 Estabelecimento de culturas assépticas

Brotações apicais com cerca de dois centímetros de comprimento foram coletadas, cortada a gema apical e as suas folhas e submetidas a cinco tratamentos desinfestantes (Tabela 1). Inicialmente, foi realizada lavagem dos explantes com água e detergente comercial. Posteriormente, em capela de fluxo laminar, as microestacas foram imersas nas soluções com os agentes desinfestantes, acrescidas de 0,1% de Tween 20 e em agitação. Os explantes foram lavados seis vezes em água destilada, esterilizada e posteriormente foram inoculados no melhor meio obtido na etapa de estabelecimento das culturas. Após quatro semanas, as culturas foram avaliadas conforme as seguintes variáveis: porcentagem de contaminação fúngica, bacteriana, de necrose e de sobrevivência.

TABELA 1 –TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO DOS SEGMENTOS NODAIS DE *Colletia paradoxa* PARA O ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS.

Tratamentos de desinfestação
NaClO 1,0% (10 min)
Álcool 70% (30 s) + NaClO 1,0% (10 min)
HgCl ₂ 0,1% (10 min)
Álcool 70% (30 s) + HgCl ₂ 0,1% (10 min)
NaClO 1,0% (10 min) + HgCl ₂ 0,1% (10 min)

Legenda: NaClO - hipoclorito de sódio; HgCl₂ – cloreto de mercúrio. Fonte: o autor.

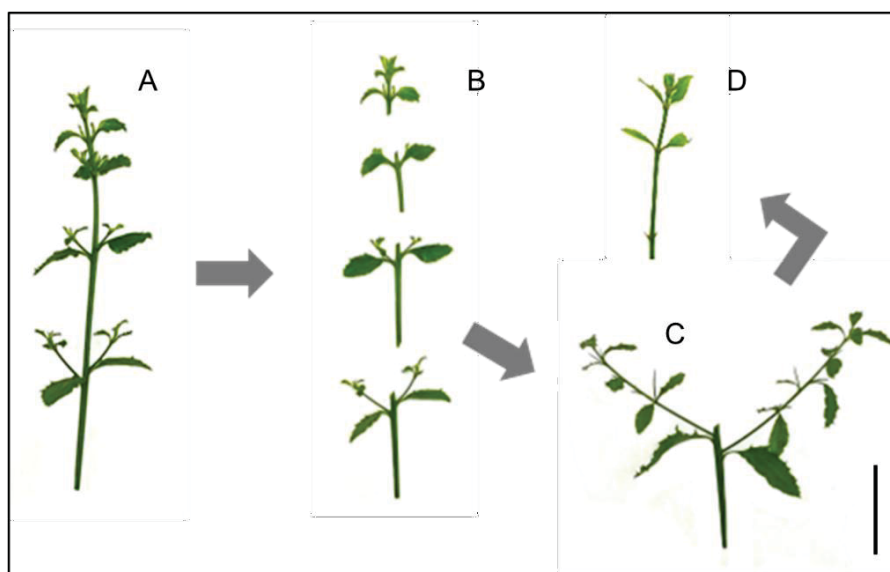
2.1.4 Desenvolvimento de brotações múltiplas e cultura de nós

Os explantes sobreviventes foram transferidos para o melhor meio obtido na etapa de estabelecimento das culturas, acrescido de 2,5; 5,0 ou 10 µM de benzilaminopurina (BAP – Sigma Aldrich), além de um controle sem adição do regulador. Os brotos axilares que apresentaram regiões de entrenós iguais ou

superiores a 1,0 cm foram submetidos à cultura de nós (Figura 1). Após dois subcultivos a cada 30 dias foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de explantes com brotos, número médio de brotos por explante e o comprimento médio dos brotos.

A concentração de BAP que demonstrou os resultados mais promissores também foi testada com outras citocininas: cinetina (CIN); zeatina (ZEA) e 2-Isopenteniladenina (2-iP) (Sigma Aldrich), além de um controle, sem adição de citocinina. Após dois subcultivos a cada 30 dias foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de explantes com brotos, número médio de brotos por explante e o comprimento médio dos brotos.

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA CULTURA DE NÓS A PARTIR DOS BROTO AXILARES DE *Colletia paradoxa*.



Legenda: A - brotos axilares de *Colletia paradoxa* após o subcultivo de 30 dias em meio de cultura MS/2 (MS com a concentrações de sais reduzida pela metade), acrescido de 5,0 μ M de 6-benzilaminopurina (BAP); B - brotos axilares com as suas regiões internodais separadas para um novo subcultivo; C - região internodal dando origem a novos brotos axilares; D - broto axilar originado a partir da cultura de nós. Barra: 1 cm. Fonte: o autor.

2.1.5 Enraizamento

Brotações individualizadas, pertencentes ao segundo subcultivo, medindo aproximadamente 2,0 cm de comprimento e com a extremidade basal cortada em forma de bisel simples foram utilizadas como explantes. O enraizamento foi avaliado com tratamentos de imersão da base (0,5 cm) das brotações em soluções de 2,5, 5,0 e 10,0 mM de ácido indolbutírico (AIB - Sigma Aldrich), durante cinco minutos, além

de um controle sem imersão em AIB. Os explantes foram transferidos para meio MS/2. Após seis semanas foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de explantes com raízes, número médio de raízes, comprimento das raízes (cm) e comprimento da parte aérea (cm).

2.1.6 Transplântio e aclimatização das mudas

Plantas enraizadas com no mínimo 2,0 cm de altura foram transplantadas para bandejas de semeadura de 128 células (cada célula de 3,0 cm de diâmetro) que continham substrato comercial Tropstrato HT® e vermiculita de granulometria fina (1:1 v/v). As plantas foram mantidas em casa de vegetação, com temperatura média de 25 ± 2 °C, radiação fotossinteticamente ativa de $56 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas de mercúrio (250 W) e fotoperíodo de 12 horas. Após 60 dias foi avaliada a porcentagem de sobrevivência das plantas.

2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com no mínimo 10 repetições de cinco explantes por tratamento, para todas as etapas *in vitro*. Os dados foram submetidos à análise de regressão logística a partir de Modelos Lineares Generalizados (MLG), com distribuição gama e função de ligação logarítmica. As diferenças estatísticas foram analisadas por comparação aos pares pelo teste de significância de Bonferroni. As análises foram realizadas no Ambiente R (CORE TEAM, 2020).

As análises de razões de chances (RC) foram realizadas a partir de regressões logísticas com um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Esta foi empregada como medida de associação que compara as chances de ocorrência de um evento entre tratamentos utilizados em experimentações biológicas (GOSHO et al., 2023). Para garantir RC positivas entre os resultados foram utilizados como referências os tratamentos com menores valores para cada uma das variáveis. A análise foi realizada no Ambiente R (CORE TEAM, 2020).

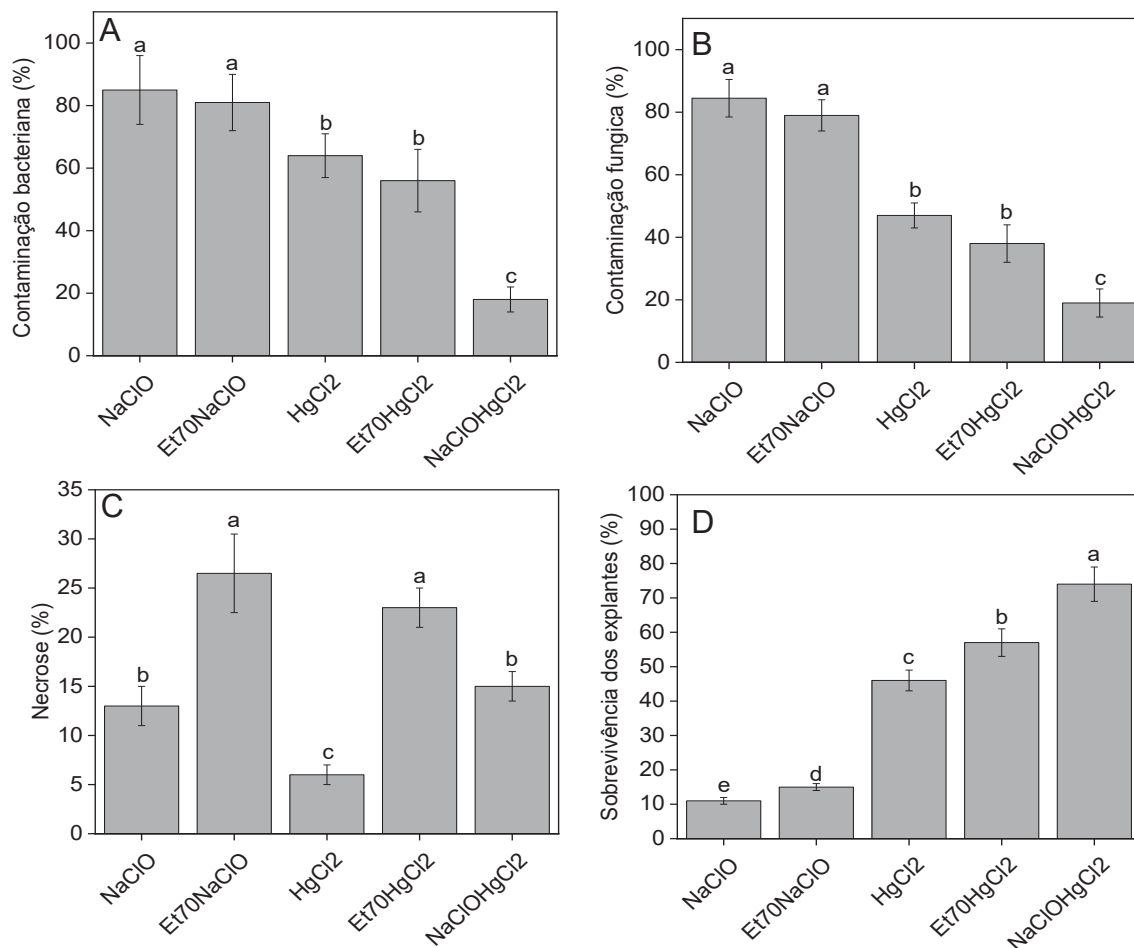
3 RESULTADOS

3.1 ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS

Após 30 dias de cultivo foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos de desinfestação realizados nos segmentos nodais de *C. paradoxa*. Os explantes desinfestados com a solução de 1,0% de NaClO (10 min), seguido da solução de 0,1% de HgCl₂ (10 min), apresentaram as menores porcentagens de contaminação bacteriana (18%) e fúngica (19%). Estes resultados foram significativamente inferiores aos observados nos outros tratamentos (Figuras 2A e 2B). Em contraste, os explantes submetidos à desinfestação com 1,0% de NaClO (10 min) ou com a imersão prévia em álcool 70% (30 s) apresentaram as maiores porcentagens de contaminação bacteriana e fúngica (superiores à 80%) (Figuras 2A e 2B). Os maiores percentuais de necrose (27% e 24%) ocorreram em explantes imersos em solução de álcool 70%, seguidos das soluções de 1,0% de NaClO (10 min) ou 0,1% de HgCl₂ (10 min), sendo significativamente superiores às dos outros tratamentos (Figura 2C). Por outro lado, a menor taxa de necrose (6,0%) foi obtida nos explantes imersos em solução de 0,1% de HgCl₂ (10 min) (Figura 2C).

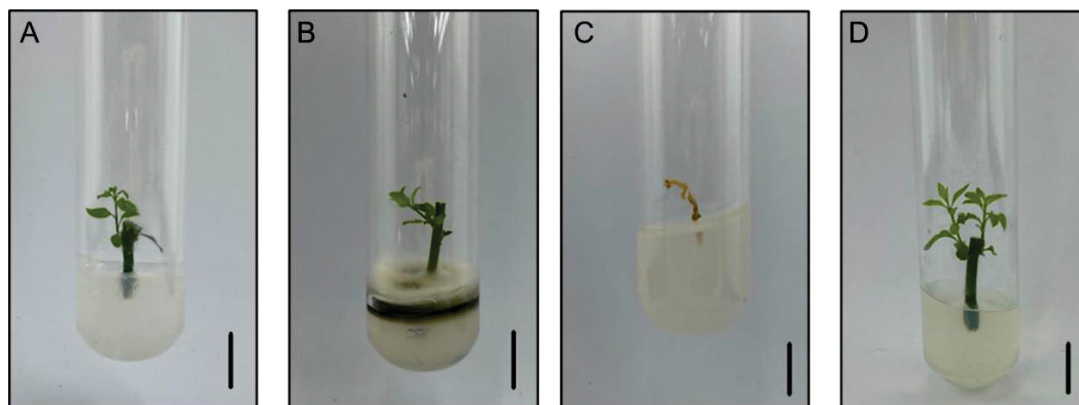
A partir da análise conjunta dos dados de contaminação bacteriana, fúngica e de necrose nos explantes, constatou-se que os explantes desinfestados com a solução de 1,0% de NaClO (10 min), seguida da solução de 0,1% de HgCl₂ (10 min) foram os que apresentaram a maior taxa de sobrevivência (81%), sendo este resultado estatisticamente superior ao de todos os tratamentos de desinfestação realizados (Figura 2D). Considerou-se, portanto, que a desinfestação realizada com a combinação de NaClO e HgCl₂ foi a mais adequada para o estabelecimento asséptico de *C. paradoxa*, sendo utilizada nos demais experimentos instalados. Na figura 3 é possível observar explantes contaminados com bactérias e fungos, necrosados, além daqueles que sobreviveram e permaneceram viáveis para a etapa de desenvolvimento de brotações múltiplas.

FIGURA 2 – ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS DE *Colletia paradoxa*, APÓS 30 DIAS DE CULTIVO, EM MEIO DE CULTURA MS/2 (MS COM A CONCENTRAÇÃO DE SAIS REDUZIDA PELA METADE).



Legenda: Et70 – etanol 70% (30s), NaClO - hipoclorito de sódio 1,0% (10 min); HgCl₂ - cloreto de mercúrio 0,1% (10 min). As barras representam erro padrão. Letras diferentes acima do erro padrão indicam diferenças significativas (Teste de Bonferroni, $p < 0,05$). Fonte: o autor.

FIGURA 3 - ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS DE *Colletia paradoxa*, EM MEIO DE CULTURA MS/2 (MS COM A CONCENTRAÇÃO DE SAIS REDUZIDA PELA METADE), APÓS 30 DIAS DE CULTIVO.

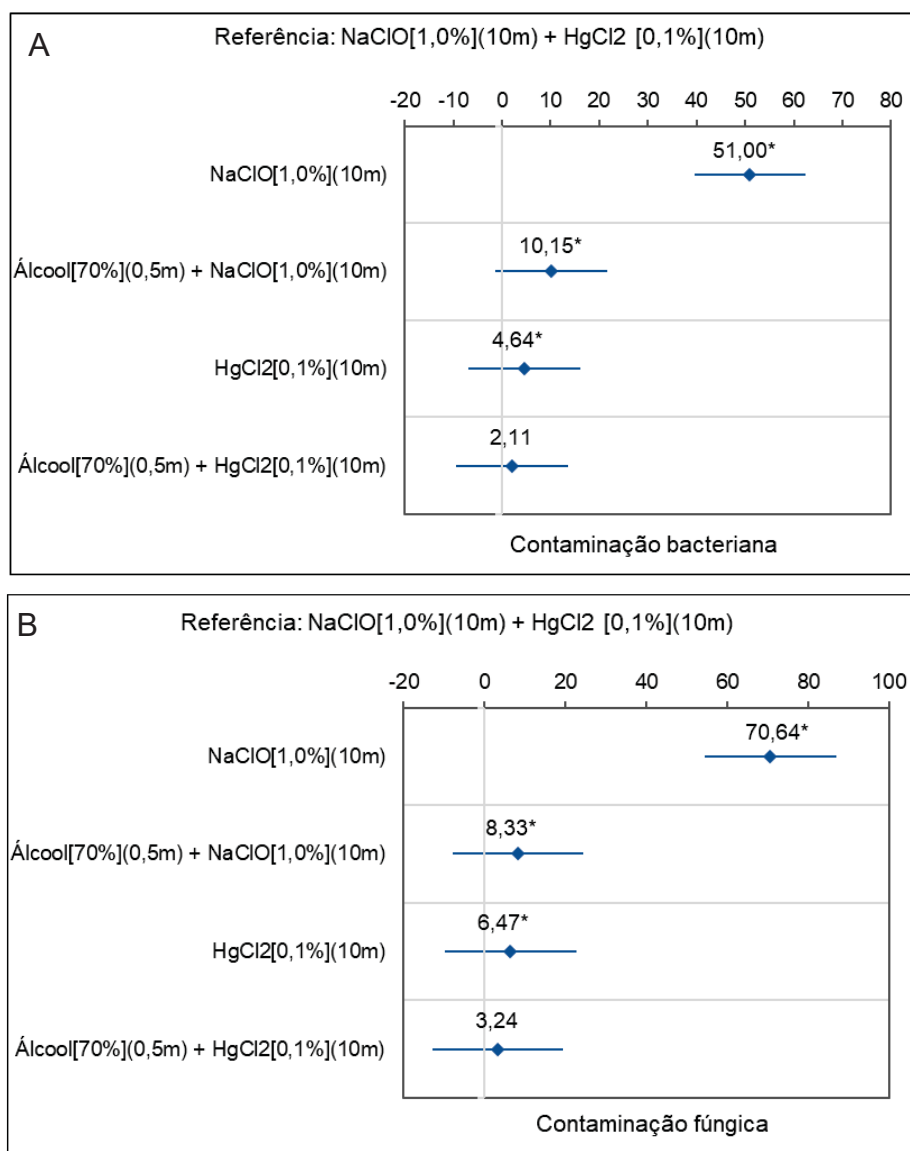


Legenda: A – explante apresentando contaminação bacteriana; B – explante com contaminação fúngica; C – explante necrosado; D – explante sobrevivente com o desenvolvimento de brotos axilares. Barras = 1 cm. Fonte: o autor.

Diante dos resultados supracitados, foram calculadas as chances de ocorrerem contaminações bacterianas, fúngicas, necroses e de sobrevivências dos explantes, a partir dos diferentes tratamentos de desinfestação utilizados. Tendo como referência a desinfestação dos explantes realizada com 1,0% de NaClO (10 min), seguida da solução de 0,1% de HgCl₂ (10 min), foi possível observar que o tratamento utilizando apenas 1,0% de NaClO (10 min) apresentou a maior razão de chance de proporcionar a ocorrência de contaminação bacteriana (RC = 51,0) e fúngica (RC = 70,64) nos explantes (Figuras 4A e 4B). Por sua vez, tendo como referência o tratamento de desinfestação realizado com 0,1% de HgCl₂ (10 min), as maiores chances de ocorrerem necroses nos explantes foram observadas após as desinfestações realizadas com álcool 70% (30s), seguida por imersão em solução de 1,0% de NaClO (10 min) ou 0,1% de HgCl₂ (10 min) (RC = 7,76) (Figura 5A). Por fim, tendo como referência o tratamento que ocasionou a menor porcentagem de sobrevivência dos explantes (1,0% de NaClO - 10 min), foi registrado que a desinfestação realizada com 1,0% de NaClO (10 min), seguida da solução de 0,1% de HgCl₂ (10 min) apresentou a maior razão de chance (RC = 13,63) de originar explantes viáveis para o desenvolvimento de novos brotos (Figura 5B). Diante disto, foi comprovado que o melhor tratamento de desinfestação dos segmentos nodais de *C. paradoxa* foi com 1,0% de NaClO (10 min), seguido da solução de 0,1% HgCl₂ (10 min). Não é recomendado utilizar o tratamento de imersão somente com a solução de NaClO (1,0%), durante 10 minutos porque a chance de ocorrer contaminação bacteriana

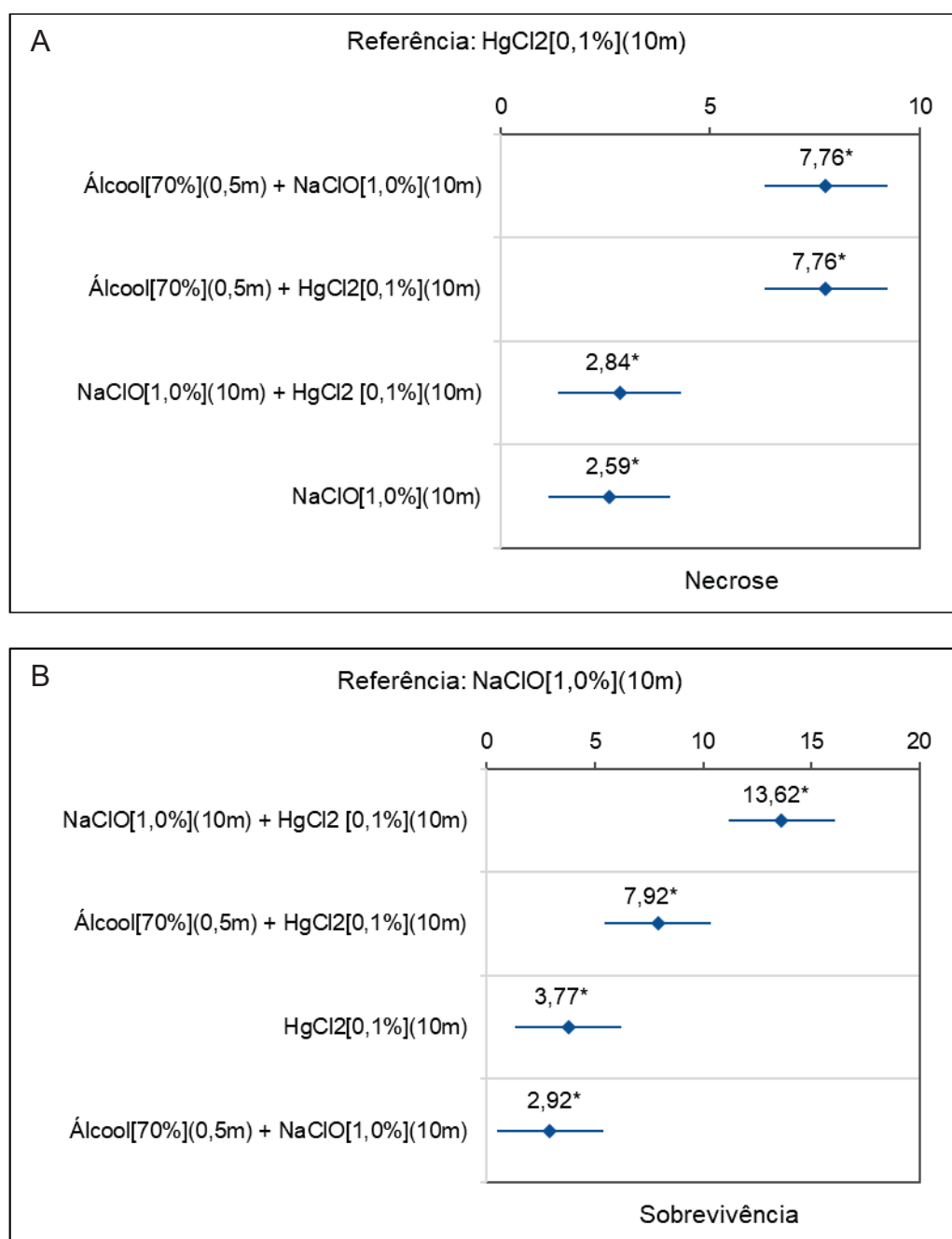
e fúngica é elevada (Figuras 4A e 4B). Também não é recomendado utilizar álcool 70%, pois este agente desinfestante tende a necrosar os explantes (Figura 5A).

FIGURA 4 – RAZÕES DE CHANCES (RC) DE OCORRÊNCIA DE CONTAMINAÇÃO BACTERIANA E CONTAMINAÇÃO FÚNGICA NOS EXPLANTES DE *Colletia paradoxa* EM FUNÇÃO DOS TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO UTILIZADOS.



Legenda: NaClO – hipoclorito de sódio; HgCl₂ – cloreto de mercúrio. Números entre colchetes representam as concentrações das soluções desinfestantes em porcentagem; valores entre parênteses indicam o tempo de exposição dos explantes a solução desinfestante em minutos. *Significância a nível de 0,05%. Fonte: o autor.

FIGURA 5 – RAZÕES DE CHANCES (RC) DE OCORRÊNCIA DE NECROSE E SOBREVIVÊNCIA DOS EXPLANTES DE *Colletia paradoxa* EM FUNÇÃO DOS TRATAMENTOS DE DESINFESTAÇÃO UTILIZADOS.



Legenda: NaClO – hipoclorito de sódio; HgCl₂ – cloreto de mercúrio. Números entre colchetes representam as concentrações das soluções desinfestantes em porcentagem; valores entre parênteses indicam o tempo de exposição dos explantes a solução desinfestante em minutos. *Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado com o tratamento de referência. Fonte: o autor.

3.2 MEIO DE CULTURA

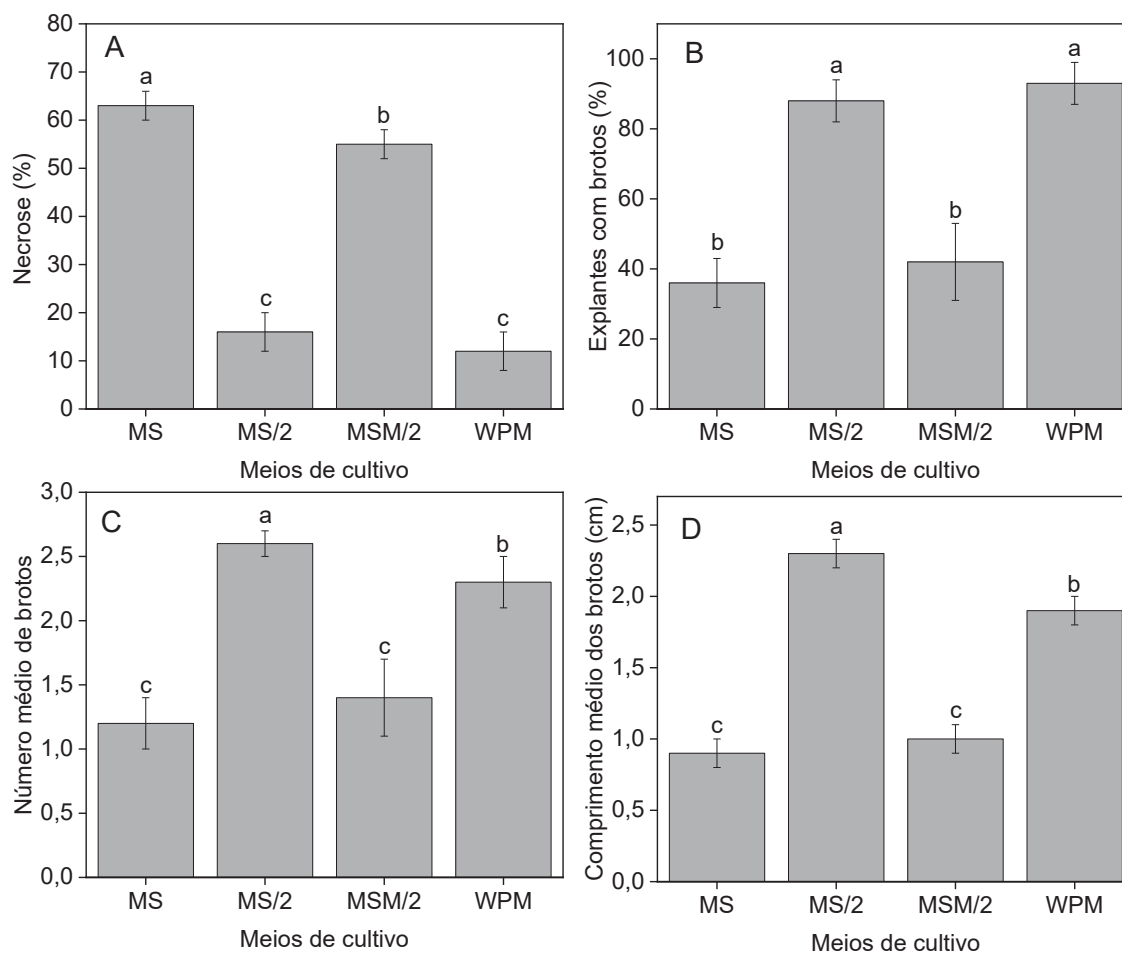
Após dois subcultivos de 30 dias foram identificadas diferenças significativas para as variáveis porcentagem de necrose, porcentagem de explantes com brotos, comprimento médio dos brotos e número médio de brotos nos explantes cultivados nos meios de cultura MS, MS/2, MSM/2 e WPM (Figura 6).

Os explantes cultivados nos meios de cultura WPM e MS/2 apresentaram porcentagens de necrose inferiores à dos demais tratamentos (12% e 15%, respectivamente) (Figura 6A). Os brotos inoculados em meio MS e MSM/2 apresentaram RC de 1,35 e 1,61, respectivamente, de ocasionarem necroses nos brotos em comparação com aqueles cultivados em meio WPM (Figura 7A).

As respostas dos meios de cultura WPM e MS/2 não diferiram entre si com relação à porcentagem de explantes com brotos (93% e 88%, respectivamente), sendo significativamente superior à dos meios MSM/2 e MS (Figura 6B). Em ambos os meios ocorreram RC de 2,39 de induzirem brotos nos explantes em comparação com o MS (Figura 7B).

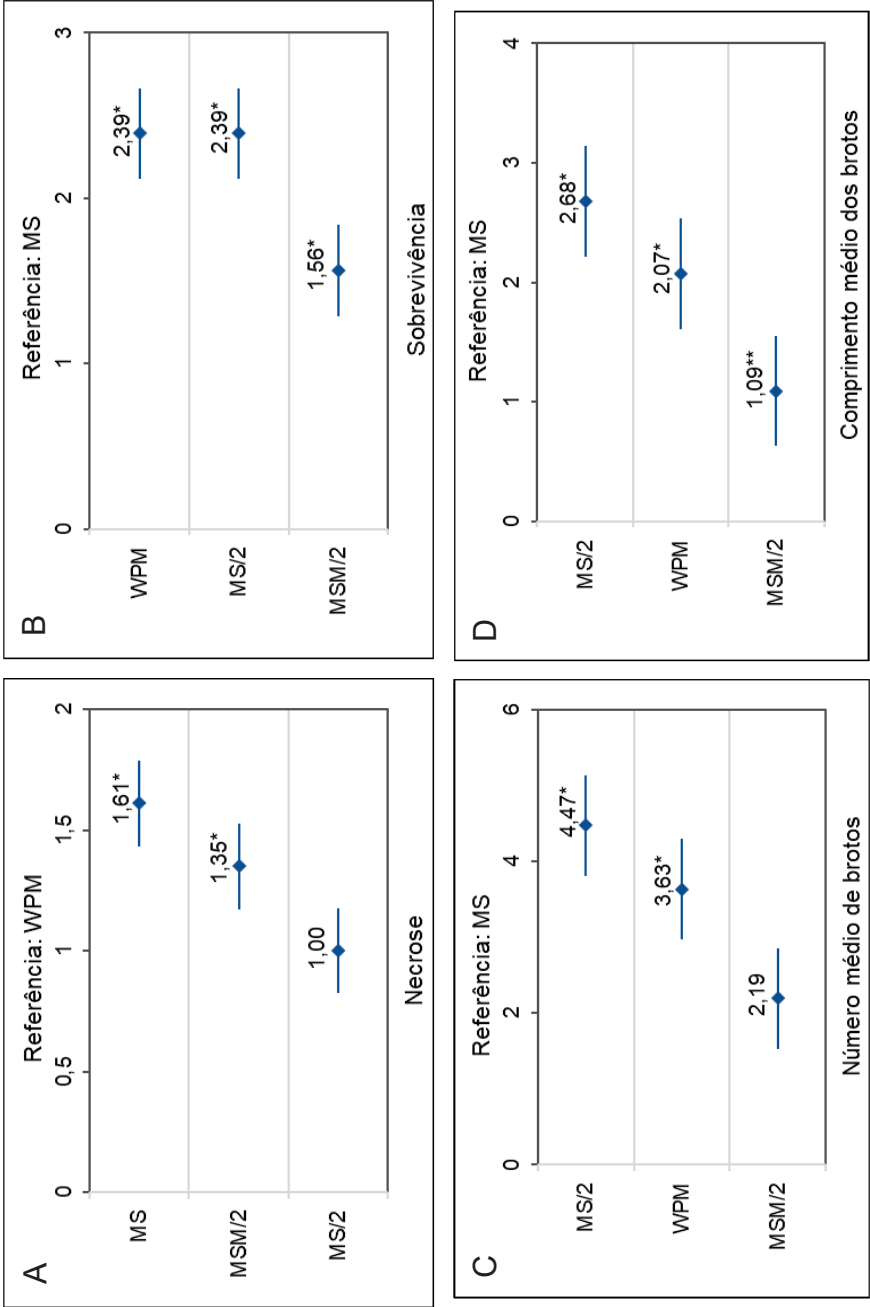
O número médio de brotos (2,7) no meio MS/2 foi estatisticamente superior ao do meio de cultura WPM e os menores valores para esta variável ocorreram nos meios MSM/2 e MS (Figura 6C). Os explantes cultivados na formulação MS/2 apresentaram RC de 4,47 de desenvolverem mais brotos em comparação com aqueles cultivados em meio MS, onde foi observado o menor número médio de brotos (1,2) (Figura 7C). Por fim, o maior comprimento médio dos brotos (2,3 cm) foi estatisticamente superior nos explantes cultivados em meio MS/2 (Figura 6D). Em comparação com o meio MS, onde os explantes apresentaram os menores comprimentos médios (0,8 cm), o meio MS/2 apresentou RC de 2,68 de desenvolver brotos mais alongados (Figura 7D). Diante disto, considerou-se que o meio MS/2 é o mais indicado para o cultivo de brotos de *C. paradoxa*.

FIGURA 6 – BROTAÇÕES DE *Colletia paradoxa* EM FUNÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO MS, MS/2 (MS, COM OS SAIS REDUZIDOS PELA METADE), MSM/2 (MS, COM OS MACRONUTRIENTES REDUZIDOS PELA METADE), E WPM APÓS DOIS SUBCULTIVOS DE 30 DIAS.



Legenda: MS – meio Murashige e Skoog, MS/2 – meio MS, com os sais reduzidos pela metade; MSM/2 – meio MS com os macronutrientes reduzidos pela metade, WPM – *wood plant medium*, A – explantes necrosados (%); B – explantes com brotos (%), C – número médio dos brotos; D – comprimento médio dos brotos (cm). Letras diferentes representam diferenças estatísticas (Teste de Bonferroni, $p < 0,05$).
Fonte: o autor.

FIGURA 7 - RAZÕES DE CHANCES DE OCORREREM NECROSE, SOBREVIVÊNCIA E BROTAÇÕES NOS EXPLANTES DE *Colletia paradoxa*, CULTIVADOS EM DIFERENTES FORMULAÇÕES DE MEIOS DE CULTIVO.



Legenda: A – necrose; B – sobrevivência dos explantes; C- número médio de brotos; D – comprimento médio dos brotos; MS (meio Murashige e Skoog); MS/2 (meio MS com a concentração de macro e micronutrientes reduzida pela metade); MSM/2 (meio MS com a concentração de macronutrientes reduzida pela metade); WPM (*wood plant medium*). *Diferença significativa ($p<0,05$) quando comparado com o tratamento de referência. Fonte: o autor.

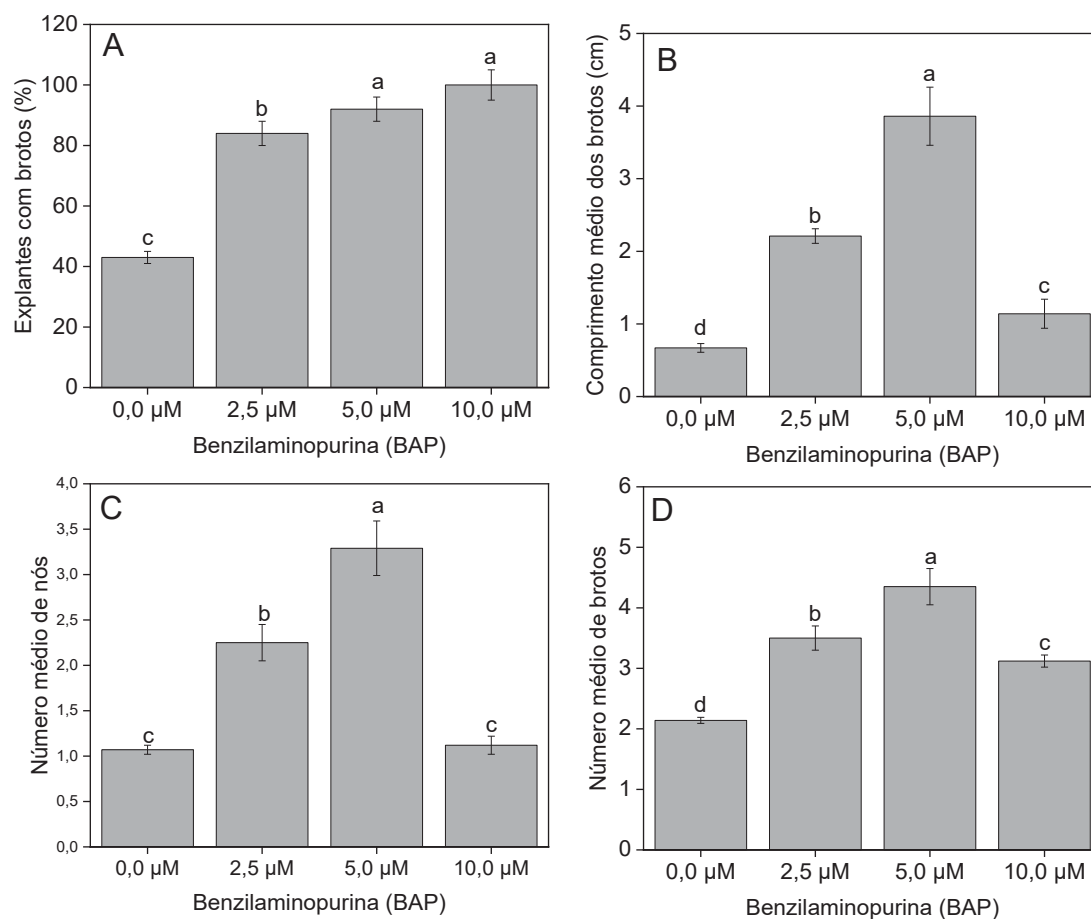
3.3 DESENVOLVIMENTO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS E CULTURA DE NÓS

3.3.1 Efeito de diferentes concentrações de BAP

Após dois subcultivos de 30 dias constatou-se que as maiores porcentagens de explantes com brotos foram obtidas naqueles cultivados com a presença de 5,0 μM e 10,0 μM de BAP no meio de cultura MS/2 (95% e 98%, respectivamente) (Figura 8A). Estes explantes apresentaram RC significativas de induzirem mais brotos quando comparados com aqueles cultivados em meio sem adição de BAP (RC = 1,72 e 1,91, respectivamente) (Figura 9A).

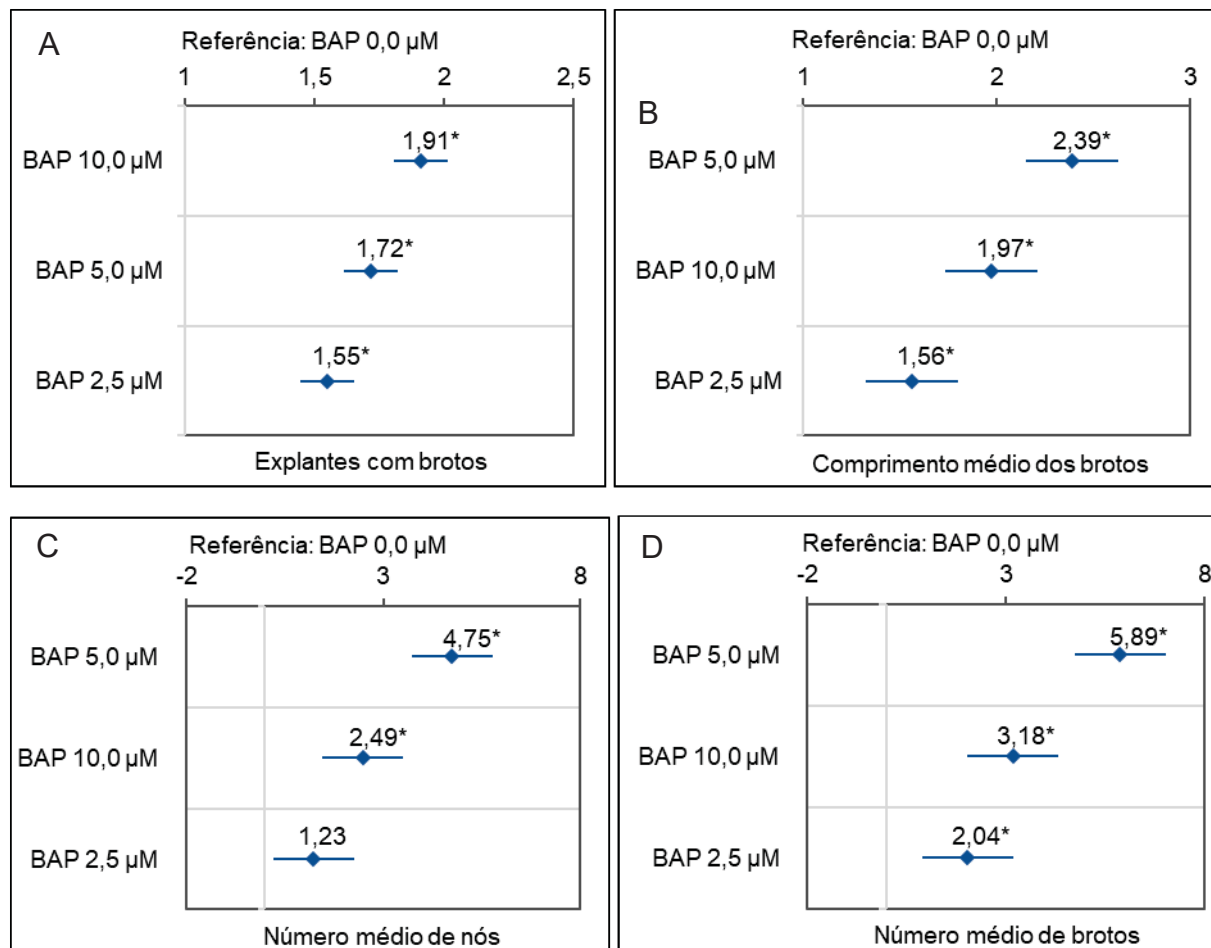
O comprimento médio dos brotos cultivados em meio contendo 5,0 μM de BAP (3,86 cm) foi significativamente superior ao dos cultivados nos outros tratamentos (Figura 8B). Os brotos nessas condições de cultivo apresentaram a RC de 2,39 de serem mais alongados em comparação com aqueles cultivados em meio sem suplementação de BAP (Figura 9B). Como os brotos alongaram, foi possível o cultivo de nós. O número médio de regiões internodais e o número médio de brotos axilares também foi estatisticamente superior nos explantes cultivados com 5,0 μM de BAP (3,29 e 4,35, respectivamente) (Figuras 8C e 8D). Isto ocorreu porque o comprimento médio dos brotos com essa concentração de BAP possibilitou o subcultivo de cerca de três secções nodais por explante. Diante disto, os brotos cultivados em meio de cultura com adição de 5,0 μM de BAP apresentaram RC de 5,89 de dar origem a novos brotos em comparação com aqueles cultivados em meio sem adição de BAP (Figura 9D). Na figura 10 é possível observar a regeneração dos brotos em meio MS/2 suplementado com 2,5 μM ; 5,0 μM e 10,0 μM de BAP, após dois subcultivos realizados a cada 30 dias.

FIGURA 8 - BROTAÇÕES DE *Colletia paradoxa* OBTIDAS EM MEIO DE CULTURA MS/2 (MS COM A CONCENTRAÇÃO DE SAIS REDUZIDA PELA METADE), SUPLEMENTADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 6-BENZILAMINOPURINA (BAP) APÓS DOIS SUBCULTIVOS, REALIZADOS A CADA 30 DIAS.



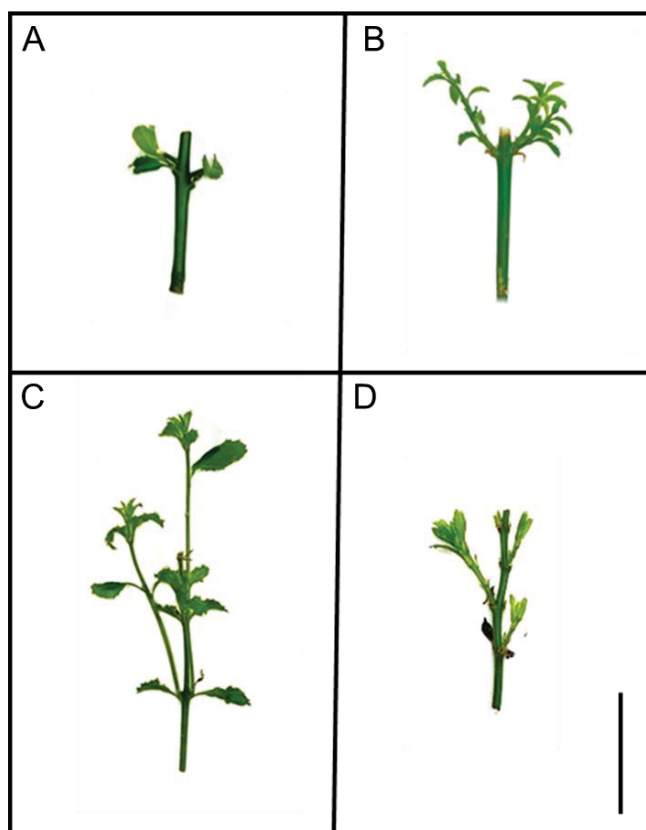
Legenda: A – explantes com brotos (%); B – comprimento médio dos brotos (cm); C – número médio de nós; D – número médio de brotos. Letras diferentes representam diferenças estatísticas (Teste de Bonferroni, $p < 0,05$). Fonte: o autor.

FIGURA 9 - RAZÕES DE CHANCES (RC) DAS VARIÁVEIS DE DESENVOLVIMENTO DOS BROTO DE *Colletia paradoxa*, CULTIVADOS EM MEIO MS/2 (MS, COM OS SAIS REDUZIDOS PELA METADE), SUPLEMENTADO COM 2,5 μ M, 5,0 μ M E 10,0 μ M DE 6-BENZILAMINOPURINA (BAP), TENDO COMO REFERÊNCIA O MEIO SEM ADIÇÃO DE BAP.



Legenda: A – explantes com brotos; B – comprimento médio dos brotos; C – número médio de nós; D – número médio de brotos. *Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado com o tratamento de referência. Fonte: o autor.

FIGURA 10 - BROTOS DE *Colletia paradoxa* DESENVOLVIDOS DE GEMAS AXILARES CULTIVADOS EM MEIO MS/2 (MS, COM OS SAIS REDUZIDOS PELA METADE), ACRESCIDO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 6-BENZILAMINOPURINA (BAP), APÓS DOIS SUBCULTIVOS DE 30 DIAS.



Legenda: Brotações em meio de cultura MS/2 suplementado com: A - 0,0 μM ; B - 2,5 μM ; C - 5,0 μM ; D - 10,0 μM de BAP. Barra: = 1 cm. Fonte: o autor.

3.3.2 Efeito de diferentes citocininas (5,0 μM) no desenvolvimento de brotações múltiplas e cultura de nós

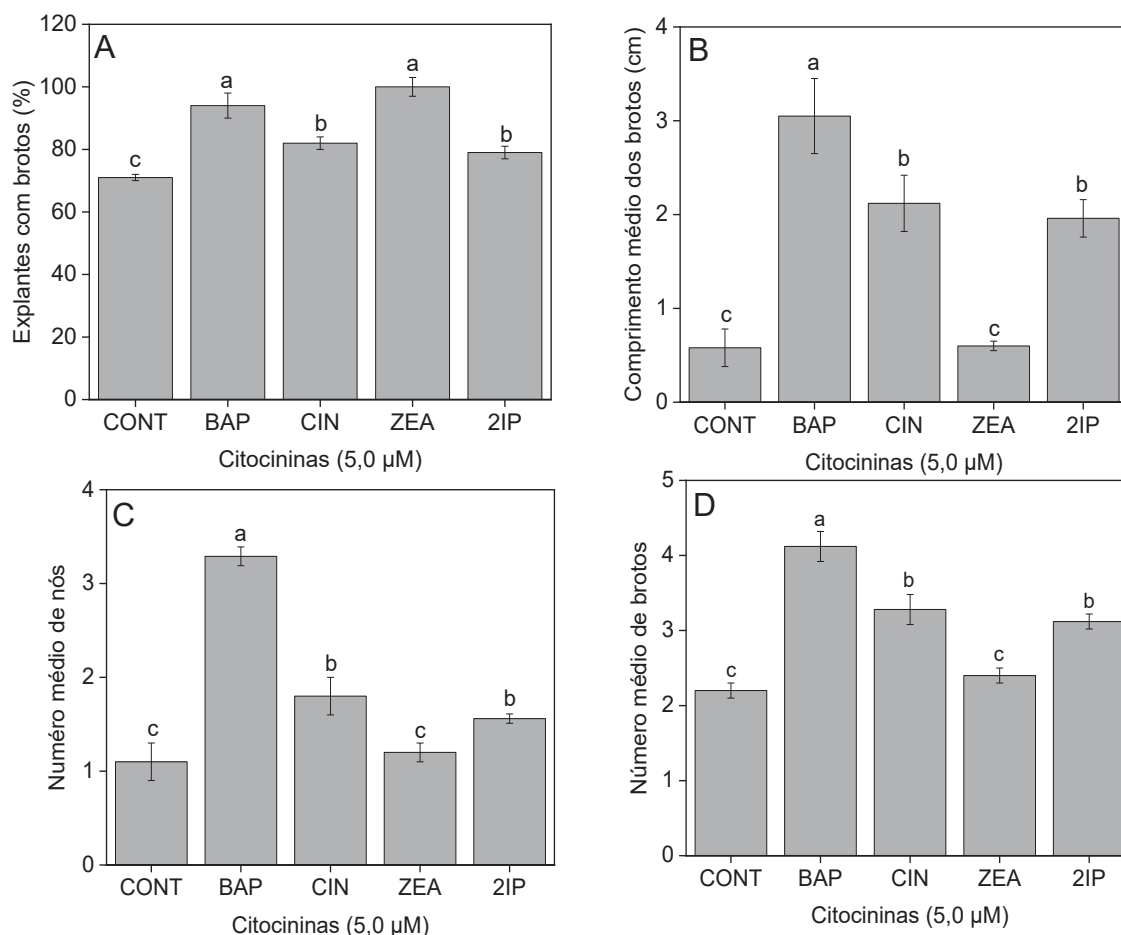
Após dois subcultivos de 30 dias, todas as citocininas testadas na concentração de 5,0 μM desenvolveram brotos axilares nos segmentos nodais de *C. paradoxa*. As porcentagens mais elevadas de explantes com brotos foram obtidas naqueles cultivados em meio MS/2, suplementado com ZEA e BAP (100% e 94%, respectivamente) (Figura 11A). Em comparação com o controle, os explantes cultivados com a presença de ZEA e BAP apresentaram RC significativas de induzirem um maior número de explantes com brotos (RC = 9,16 e 7,19, respectivamente) (Figura 12A).

O comprimento médio dos brotos cultivados com a adição de 5,0 μM de BAP (3,10 cm) foi estatisticamente superior ao das outras citocininas testadas (Figura 11B).

Diante disto, o maior número médio de regiões internodais (3,29) e o maior número médio de brotos axilares por explante inicial (4,12) também foi registrado neste tratamento (Figuras 11C e 11D). Apesar do cultivo com 5,0 μ M ZEA ter apresentado 100% de explantes com brotos, esses exibiram menor vigor e menor comprimento médio (0,6 cm), impossibilitando o subcultivo de suas regiões internodais e apresentando, após o segundo subcultivo, um menor número médio de brotos por explante (2,4) (Figura 11D).

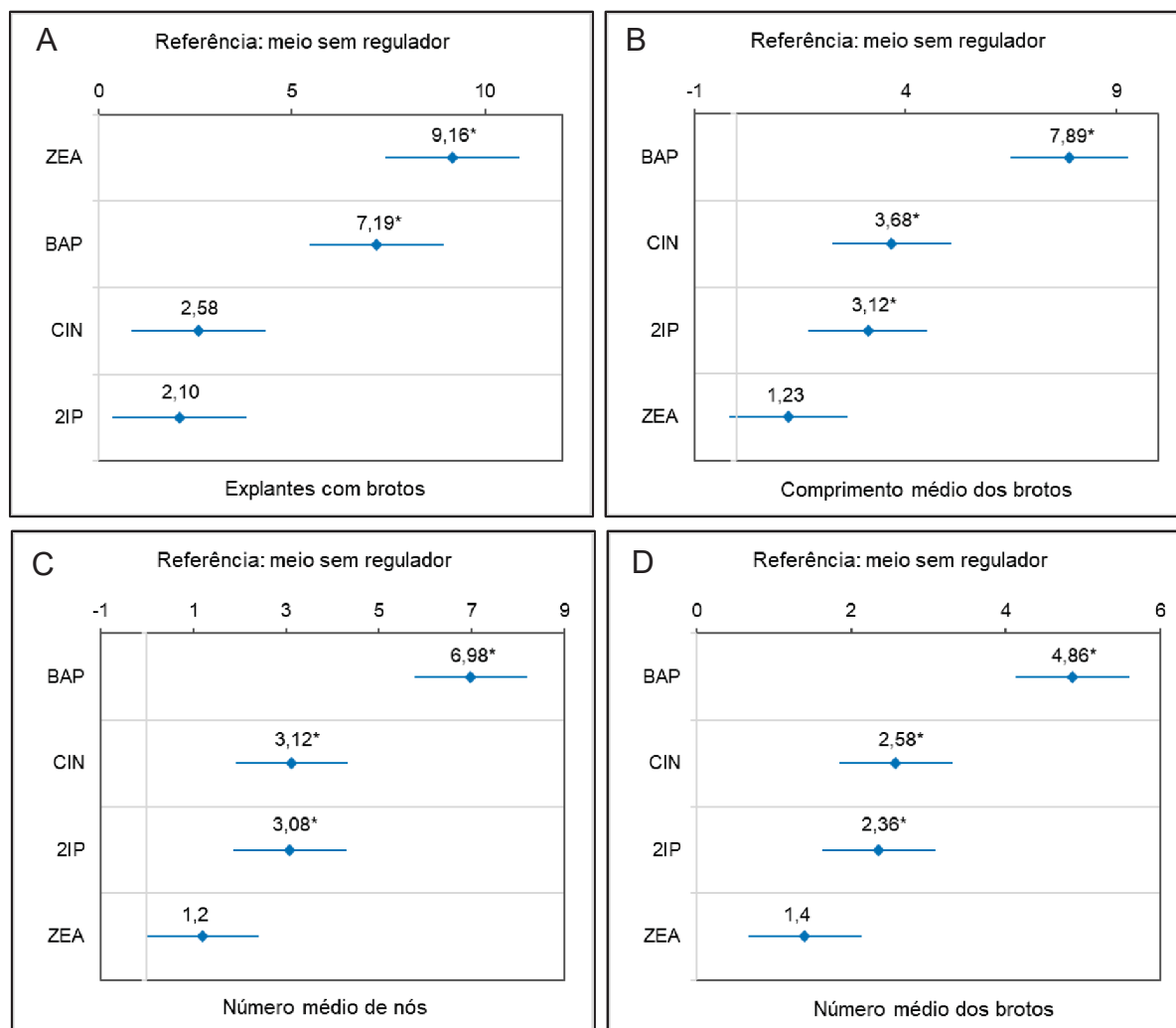
A adição de 5 μ M de CIN e 2-iP em meio de cultura não é recomendada para o desenvolvimento de brotações múltiplas em *C. paradoxa*, já que não apresentaram resultados satisfatórios para as variáveis supracitadas (Figura 11). Diante disto, não apenas para a regeneração dos brotos, mas também para os subseqüentes subcultivos recomenda-se a utilização de BAP como a citocinina mais favorável para morfogênese dos explantes de *C. paradoxa*. Em meio de cultura suplementado com este regulador, os brotos apresentaram as maiores RC de obterem os maiores comprimentos médios (RC = 7,89), maior número médio de nós (RC = 6,98) e maior número médio de brotos (RC = 4,86) (Figura 12). As piores respostas obtidas em todas as variáveis avaliadas ocorreram no meio sem adição de BAP (Figura 11).

FIGURA 11 – BROTAÇÕES DOS EXPLANTES DE *Colletia paradoxa*, CULTIVADOS EM MEIO MS/2 (MS COM A CONCENTRAÇÃO DE SAIS REDUZIDA PELA METADE), SUPLEMENTADO COM 5,0 μ M DE DIFERENTES CITOCININAS, APÓS DOIS SUBCULTIVOS DE 30 DIAS.



Legenda: A – explantes com brotos; B – comprimento médio dos brotos (cm); C – número médio de nós; D – número médio de brotos; CONT – controle (sem regulador); BAP – benzilaminopurina; CIN – cinetina; ZEA – zeatina; 2IP – 2-isopenteniladenina. Letras diferentes entre os tratamentos com citocininas representam diferenças estatísticas (Teste de Bonferroni, $p < 0,05$). Fonte: o autor.

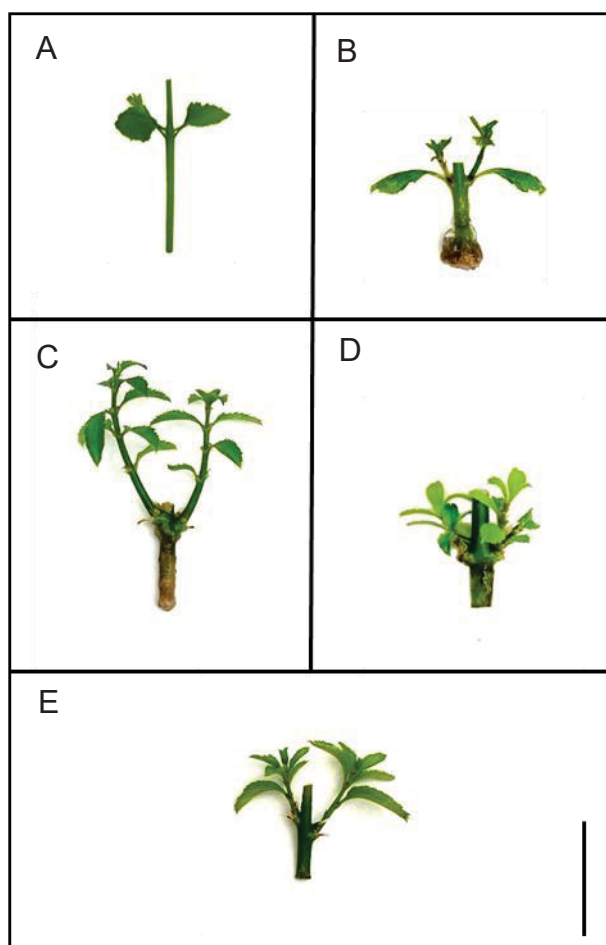
FIGURA 12 - RAZÕES DE CHANCES DO DESENVOLVIMENTO MÚLTIPLO DOS BROTOS DE *Colletia paradoxa*, APÓS 30 DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA MS/2, COM 5,0 μ M DE DIFERENTES CITOCININAS.



Legenda: A - explantes com brotos; B – comprimento médio dos brotos; C – número médio de nós; D – número médio de brotos; ZEA – zeatina; BAP – benzilaminopurina; CIN – cinetina; 2IP - 2-Isopenteniladenina. *Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado com o tratamento de referência. Fonte: o autor.

A figura 13 ilustra a regeneração de brotos axilares nos segmentos nodais de *C. Paradoxa*, cultivados em meio MS/2 suplementado com 5,0 μ M de diferentes citocininas (BAP, ZEA, CIN e 2IP). Os brotos mais desenvolvidos foram obtidos com adição de 5,0 μ M de BAP.

FIGURA 13 – DESENVOLVIMENTO DE BROTAÇÕES MÚLTIPLAS EM *Colletia paradoxa*, CULTIVADAS EM MEIO MS/2 (MS COM A CONCENTRAÇÃO DE SAIS REDUZIDA PELA EMTADE), SUPLEMENTADO COM 5,0 μM DE DIFERENTES CITOCININAS, APÓS 30 DIAS DE CULTIVO.



Legenda: A – controle (sem suplementação de citocinina); B - 2-isopenteniladenina.; C - benzilaminopurina; D - zeatina; E - cinetina. Barra: 1 cm. Fonte: o autor.

3.4 ENRAIZAMENTO DOS BROTOS

Os brotos cultivados em meio MS/2, sem tratamento pulso com AIB não enraizaram (Figura 14). Após 45 dias de cultivo, a maior porcentagem de enraizamento (68%) foi registrada nos brotos que receberam tratamento pulso com 10,0 mM de AIB, durante cinco minutos (Figura 14A), sendo significativamente superior à dos outros tratamentos. Nesta condição, os brotos apresentaram uma razão de chance significativa ($RC = 12,58$) de induzirem mais raízes em comparação com aqueles cultivados após o tratamento pulso com 2,5 mM de AIB (Figura 15A).

O maior comprimento médio das raízes (1,5 cm) foi obtido nos explantes com as bases imersas em solução de 5,0 mM de AIB (Figura 14B). A RC dos explantes apresentarem raízes mais compridas, com 5,0 mM de AIB em comparação com aqueles que tiveram pulso com 2,5 mM de AIB, foi de 7,56 (Figura 15B).

O número médio de raízes foi significativamente superior nos brotos que foram tratados com pulso de 10,0 mM de AIB (3,1) (Figura 14C). Nestas condições de cultivo, os explantes apresentaram uma razão de chance significativa (RC = 6,89) de aumentarem o número de raízes, quando comparados com aqueles tratados com 2,5 mM de AIB (Figura 15C). Por fim, o comprimento da parte aérea dos explantes não apresentou diferença significativa em nenhum dos tratamentos avaliados, independente da presença de raízes (Figura 14D). Portanto, a razão de chances dos explantes tratados com pulso de AIB darem origem a brotos com maiores comprimentos médios não foi significativa quando comparada com aqueles cultivados sem o pulso do regulador (Figura 15D).

FIGURA 14 – ENRAIZAMENTO DOS EXPLANTES DE *Colletia paradoxa* CULTIVADOS EM MEIO MS/2, 45 DIAS APÓS TRATAMENTO PULSO COM 2,5 mM, 5,0 mM E 10,0 mM DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO (AIB), DURANTE CINCO MINUTOS.

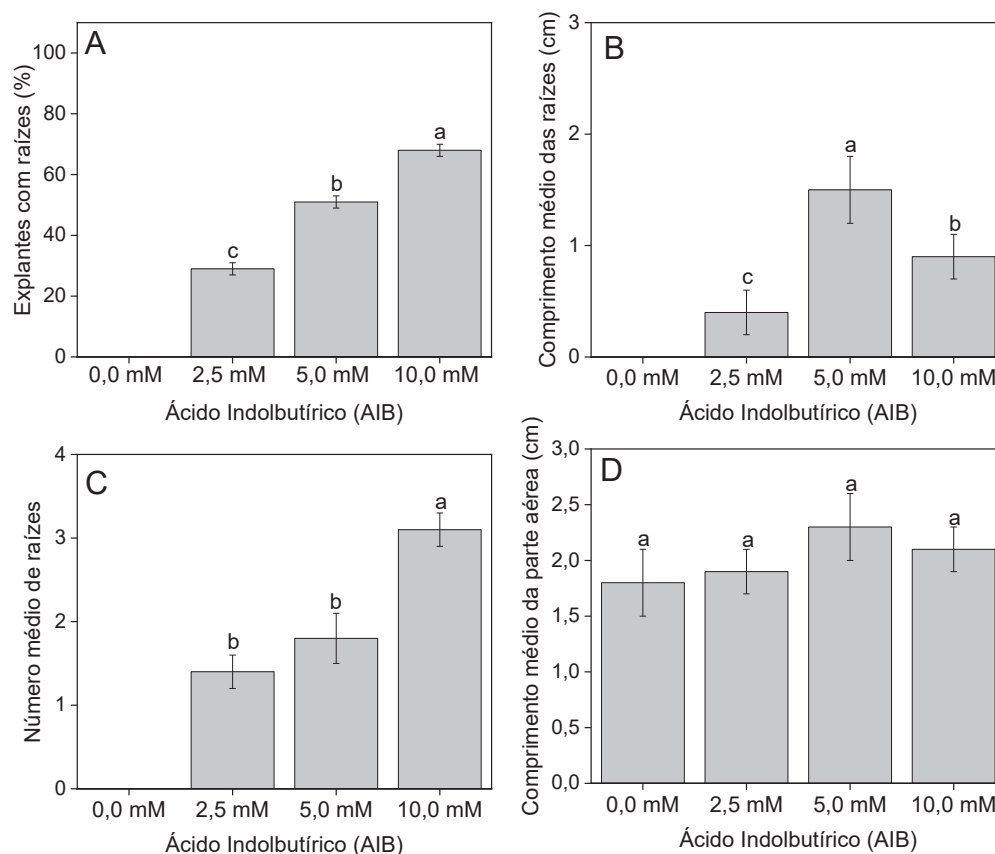
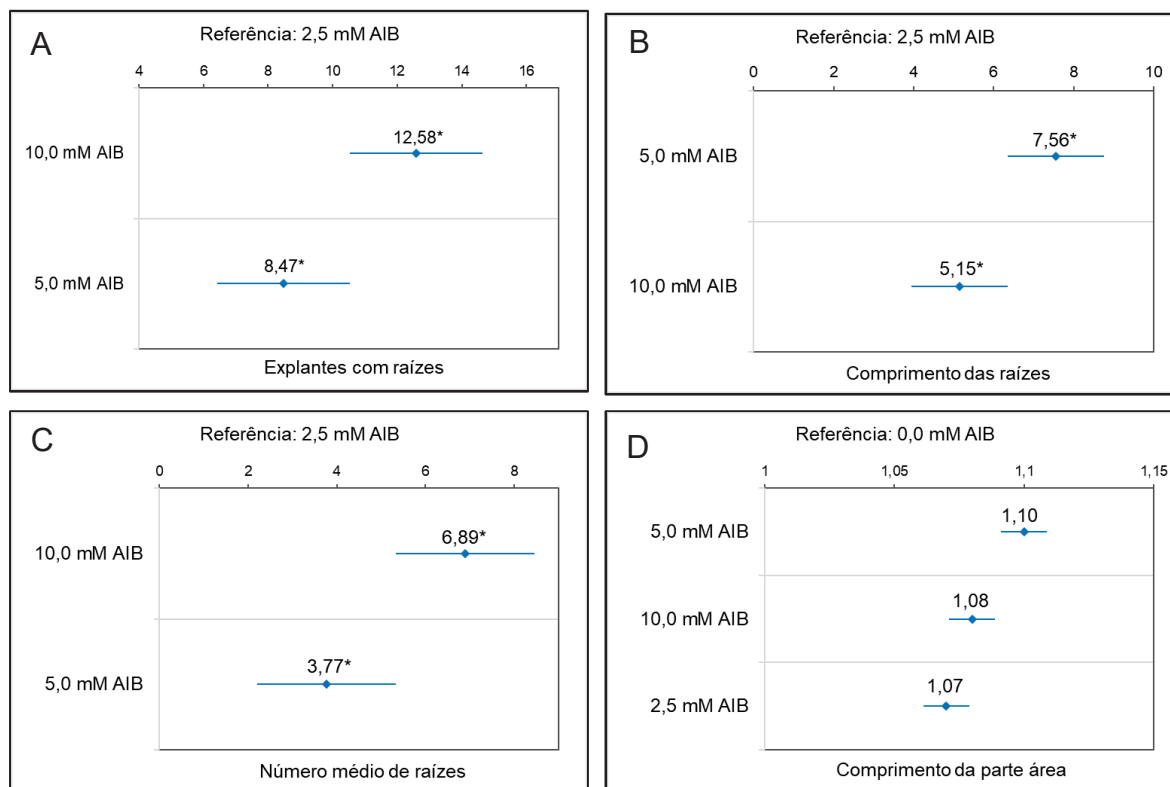
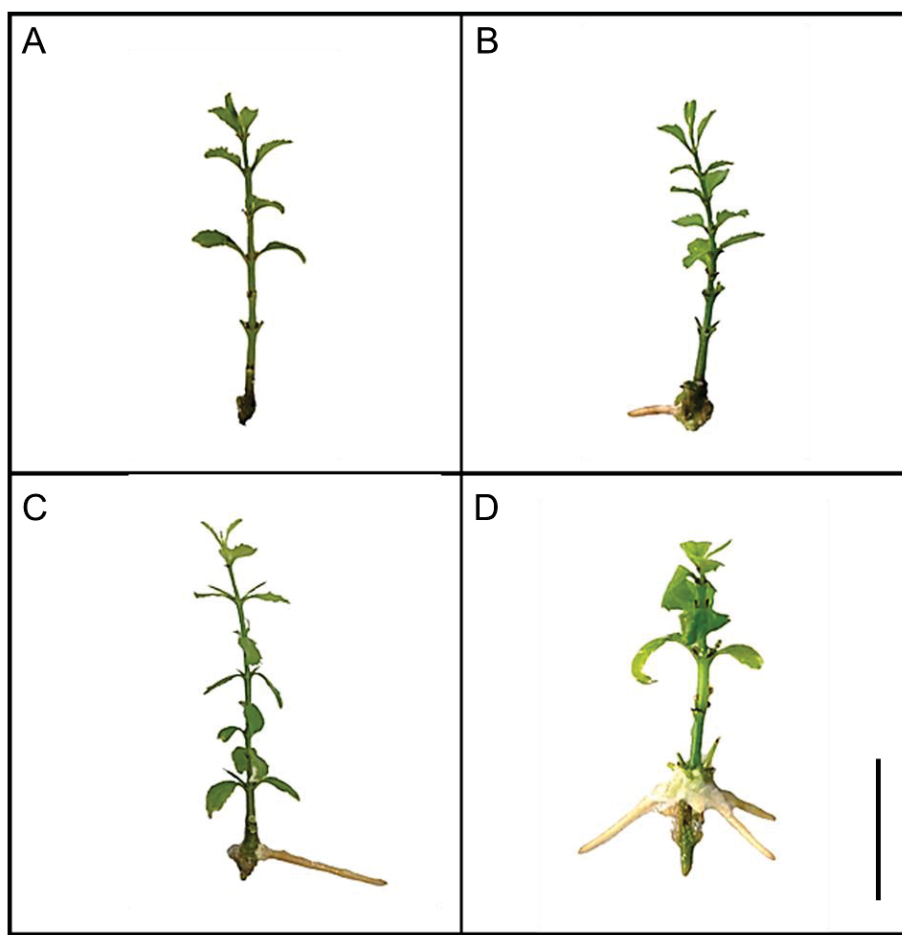


FIGURA 15 - RAZÕES DE CHANCES DE INDUÇÃO DE RAÍZES EM BROTO DE *Colletia paradoxa*, CULTIVADOS EM MEIO MS/2 APÓS 45 DIAS DO TRATAMENTO PULSO COM 2,5 mM, 5,0 mM E 10,0 mM DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO (AIB) DURANTE CINCO MINUTOS.



Legenda: A – explantes com raízes; B – número médio de raízes; C – comprimento médio das raízes; D – comprimento médio da parte aérea; AIB – ácido indolbutírico. *Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado com o tratamento de referência. Fonte: o autor.

FIGURA 16 - BROTOS DE *Colletia paradoxa* COM RAÍZES, OBTIDAS EM MEIO MS/2 (MS COM A CONCENTRAÇÃO DE SAIS REDUZIDA PELA METADE), 45 DIAS APÓS TRATAMENTO PULSO, COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO IDOLBUTÍRICO (AIB).

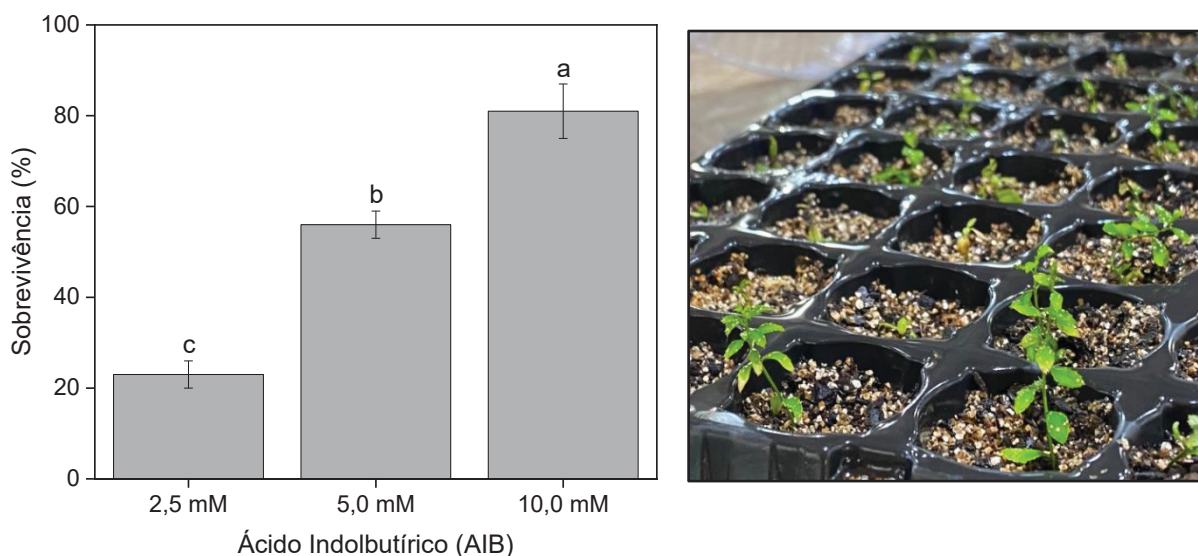


Legenda: brotações enraizadas após tratamentos pulsos com: A - 0,0 mM; B - 2,5 mM; C - 5,0 mM; D - 10,0 mM de ácido indolbutírico (AIB). Barra: = 1 cm. Fonte: o autor.

3.5 TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO DOS BROTOS

Após 90 dias do transplantio e aclimatização *ex vitro*, a maior porcentagem de sobrevivência (81%) foi obtida nos brotos enraizados com tratamento pulso de 10,0 mM de AIB. Os explantes enraizados com 2,5 mM e 5,0 mM de AIB apresentaram sobrevivência de 23% e 56%, respectivamente (Figura 17).

FIGURA 17 - SOBREVIVÊNCIA DOS EXPLANTES DE *Colletia paradoxa* ENRAIZADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO INDOLBUTÍRICO (AIB), APÓS 90 DIAS DE TRANSPLANTIO E ACLIMATIZAÇÃO EM SUBSTRATO COMERCIAL E VERMICULITA (1:1)



4 DISCUSSÃO

O estabelecimento de culturas assépticas de *C. paradoxa in vitro* foi eficiente com o tratamento de imersão em solução de 1,0% de NaClO, seguido da solução de 0,1% de HgCl₂, ambas durante 10 minutos (78% de sobrevivência). A atividade desinfestante do NaClO é reconhecida e está vinculada à sua habilidade de oxidar elementos celulares de microrganismos, o que culmina na eliminação de fungos, vírus e bactérias (DELGADO-PAREDES et al., 2023). Por outro lado, o HgCl₂ é conhecido por sua eficácia na erradicação de microrganismos alojados internamente, uma vez que consegue transpor as membranas celulares e neutralizar patógenos mesmo no interior das células vegetais (TAHIRI et al., 2023). Portanto, ao associar os efeitos do NaClO e HgCl₂, as vantagens individuais de cada agente desinfestante se tornaram sinérgicas.

No presente estudo, a desinfestação apenas com solução de 1,0% de NaClO, durante 10 minutos foi o tratamento que apresentou a maior contaminação bacteriana e fúngica (80%). Este resultado não corrobora com aqueles obtidos para outras espécies da família Rhamnaceae, onde a desinfestação foi recomendada com soluções entre 1,0 e 1,5 de NaClO, com um tempo de imersão maior de 15 minutos (ASHKANANI et al. 2013, 2016 e RIBEIRO et al, 2015).

Os explantes submetidos ao tratamento de imersão com álcool 70%, seguido da imersão com as soluções de 1,0% de NaClO ou 0,1% de HgCl₂ apresentaram um aumento

significativo nas taxas de necrose. Isso pode ser atribuído, em parte, à tendência do álcool 70% a se concentrar predominantemente na superfície dos explantes, sem efetivamente atingir os microrganismos localizados internamente (BABU et al., 2022). Han et al. (2023), relataram que a ação do álcool durante a desinfestação pode se concentrar nas membranas celulares, resultando em prejuízos para a integridade das estruturas celulares, desencadeando necrose nos vegetais. Diante disto, não se recomenda a utilização de álcool 70% para desinfestação dos explantes de *C. paradoxa*.

As maiores porcentagens de explantes com brotos foram obtidas nos meios WPM e MS/2 (93% e 88%, respectivamente), indicando um desempenho positivo dessas formulações na cultura in vitro de *C. paradoxa*. Contudo, o número médio de brotos do meio MS/2 (2,7 brotos) foi estatisticamente superior ao do meio WPM (2,1 brotos). Segundo Payghamzade e Kazemitaba (2011), o meio MS/2 apresenta concentrações superiores de nitrogênio total, na forma de NH_4NO_3 e KNO_3 , além de amônia, em comparação com o WPM. Adicionalmente, componentes como cobalto, iodeto, potássio e níquel estão presentes no meio MS/2, mas ausentes no WPM (PHILLIPS e GARDA, 2018). Estes fatores associados à formulação MS/2 podem ter favorecido o desenvolvimento de *C. paradoxa* no presente estudo. Ao se analisar a composição salina total dos meios, observa-se que, apesar do maior número de componentes nutricionais no meio MS/2, este apresenta menores concentrações de solutos em comparação com o WPM, devido à sua diluição a partir do meio MS (PAYGHAMZADE e KAZEMITABA, 2011). Esse aspecto sugere que o meio MS/2 possui um potencial osmótico mais baixo do que o WPM. O potencial osmótico refere-se à pressão exercida pelos solutos em uma solução, que determina a tendência da água se mover para a solução com maior concentração de solutos (PAIVA-NETO e OTONI, 2003). De acordo com esse conceito, quanto maior a concentração de solutos, maior será o potencial osmótico e, conseqüentemente, o potencial hídrico será mais baixo, uma vez que o potencial hídrico é a soma do potencial osmótico e do potencial de pressão ou turgor da planta (MARTÍNEZ-VILALTA e GARCIA-FORNER, 2017). Dessa forma, destaca-se que o maior potencial hídrico do meio MS/2 proporcionou condições ideais para a absorção mais eficiente dos nutrientes pelos explantes de *C. paradoxa* durante o cultivo in vitro. Esse fator pode ter sido determinante para o melhor desempenho observado com o uso do meio MS/2. Portanto, recomenda-se a utilização dessa formulação para a micropropagação da espécie *C. paradoxa*, dada sua capacidade de promover o desenvolvimento de brotos vigorosos.

Os explantes de *C. paradoxa* apresentaram um modelo interessante de regeneração de brotos, pois além do desenvolvimento de brotos axilares no cultivo inicial, ocorreu alongamento destes nos subcultivos posteriores, possibilitando utilizar simultaneamente, a cultura de nós. A concentração de 5,0 μM de BAP foi a que melhor estimulou este processo, pois 95% dos explantes regeneraram brotos, com comprimento médio de 3,95 cm. A técnica de cultura de nós também foi utilizada na micropropagação de *Handroanthus heptaphyllus* (LEZCANO et al., 2021). A constatação de que o número e comprimento médio mais elevado de brotos foi alcançado nos explantes cultivados em meio suplementado com 5,0 μM de BAP, enquanto o menor número médio foi observado em meio sem adição de citocininas, ressaltou a influência deste regulador na proliferação dos brotos de *C. paradoxa*. Estudos anteriores com *Alcantarea imperialis* (MARTINS et al., 2020) e *Echinacea angustifolia* (TYUB et al., 2021) também indicaram que concentrações próximas a 5,0 μM de BAP são mais propícias para estimular a divisão celular e viabilizar a multiplicação de células meristemáticas, responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento contínuo das plantas. Isso ocorre porque esse regulador vegetal estimula a organização e desenvolvimento de estruturas meristemáticas, contribuindo para a formação de múltiplos brotos a partir de um único explante inicial (MUHIE et al., 2023). Diante disto, recomenda-se a utilização de 5,0 μM de BAP para regeneração dos brotos de *C. paradoxa*.

A comparação das citocininas na concentração de 5,0 μM , indicou que as melhores respostas de porcentagem de explantes com brotos ocorreram nos brotos cultivados em meio contendo ZEA ou BAP. Ambos os reguladores vegetais desempenham o papel de agentes sinalizadores para as células vegetais, estimulando a divisão celular e, por conseguinte, o crescimento dos tecidos vegetais (KAMRAN et al., 2021). No entanto, a ZEA possui uma propriedade distinta de reduzir temporariamente as etapas G2 e S durante o ciclo celular. Essas etapas envolvem a síntese de proteínas como a tubulina, que forma os microtúbulos do fuso mitótico, e a replicação do DNA, respectivamente (JAMESON et al., 2023). A ação da ZEA, portanto, acelera o processo mitótico, prolongando a capacidade das células de se dividirem e formarem novos tecidos. Consequentemente, isso resulta em uma maior eficiência no desenvolvimento de brotos na sua presença (HALLMARK et al., 2020). Apesar de mais numerosos, os brotos induzidos em meio de cultura suplementado com ZEA eram pouco vigorosos e com os menores comprimentos médios. Protocolos de micropropagação obtidos para espécies

como *Olea europaea* (REGNI et al., 2023), *Zingiber officinale* (ZAHID et al., 2021), *Castanea* spp. (SONG et al., 2021) e *Diospyros crassiflora* (TCHOUGA et al., 2020) relataram que, com este regulador, o comprimento médio das brotações era inversamente proporcional à taxa proliferativa. Isso ocorre porque, embora a ZEA atue na expressão de genes que promovem a proliferação celular e a formação de brotos como, por exemplo, os da família WUS e CLV, ela também inibe a expressão de genes da família CKX, envolvidos nos processos de alongamento celular (HALLMARK et al., 2020).

As respostas de regeneração e desenvolvimento dos brotos foram melhores com a citocinina BAP, na concentração de 5,0 μ M, BAP, sendo indicada para esta etapa da micropropagação de *C. paradoxa*. Isso se deve não apenas à sua capacidade de promover a proliferação das partes aéreas, mas também ao fato de que possui uma taxa de degradação mais lenta em comparação com a ZEA (RUAN et al., 2022). Além disto, seu custo é expressivamente mais baixo em comparação com este último regulador, tornando o processo de produção de mudas mais economicamente viável.

O tratamento pulso com AIB apresentou eficiência na indução e desenvolvimento de raízes de *C. paradoxa*, pois no tratamento controle, sem adição de AIB ao meio MS/2, nenhum explante apresentou raízes. Este fenômeno corrobora com estudos anteriores que mostraram que explantes cultivados em meios de cultura, sem a adição de auxinas, geralmente não enraízam em condições de cultura *in vitro* (PINTO et al., 2020; SOURATI et al., 2022). A concentração mais alta testada do tratamento pulso de AIB (10,0 mM) resultou na maior porcentagem de explantes enraizados e no maior número médio de raízes. Além disto, as plantas enraizadas com esta concentração de AIB foram as que apresentaram maior sobrevivência, após o transplante e aclimatização (78%). Isto indicou que para *C. paradoxa* o número médio de raízes é um fator importante para sobrevivência *ex vitro* da espécie após a micropropagação.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os agentes desinfestantes, bem como os meios de cultura e os reguladores vegetais influenciaram as respostas morfogênicas dos brotos de *C. paradoxa* cultivados *in vitro*. Para o estabelecimento de culturas assépticas recomenda-se a desinfestação de segmentos nodais com solução 1,0% de NaClO, seguida da solução 0,1% de HgCl₂, ambas durante 10 minutos. O cultivo *in vitro* deve ser realizado em meio MS/2, com adição de 5,0 μ M de BAP para regeneração de brotos axilares e cultivo de nós. O

enraizamento deve ser induzido com tratamento pulso de 10,0 mM de AIB durante cinco minutos, seguido da transferência para meio MS/2. A aclimatização de mudas em casa de vegetação ocorreu com sucesso com o uso dos substratos Tropstrato Ht® e vermiculita (1:1).

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BABU, G. A. et al. Improved sterilization techniques for successful *in vitro* micropropagation. In: **Commercial Scale Tissue Culture for Horticulture and Plantation Crops**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2022. p. 1-21.

BANDONI A. L. et al. Survey of Argentine medicinal plants: folklore and phytochemical - screening. II. **Economic Botany**, v. 30, n. 2, p. 161-185, 1976.

BARCISZEWSKI, J. et al. Kinetin - a multiactive molecule. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, n. 3, p. 182-192, 2007.

BASTOS-ZÁCHIA, N. R. et al. Phytochemical analysis and evaluation of antioxidant and antimycobacterial activity of *Colletia paradoxa* from Brazil. **Natural Product Research**, v. 35, n. 5, p. 802-806, 2020.

BELLO, A. M. et al. Determination of the best culture medium and plant growth regulators for micropropagation of neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss). **International Journal of Horticultural Science and Technology**, v. 9, n. 2, p. 237-245, 2022.

CARDOSO, J. C. et al. Micropropagation in the twenty-first century. **Plant cell culture protocols**, v. 1, n. 2, p. 17-46, 2018.

DELGADO-PAREDES, G. E. et al. Protocol for *ex vitro* and *in vitro* micropropagation of *Cucurbita moschata* and *C. ecuadorensis*, native to Peru and Ecuador, of nutritional and medicinal importance. **Scientia Agropecuaria**, v. 14, n. 1, p. 127-137, 2023.

DINÇER, D. et al. Germination and micropropagation of *Crataegus monogyna* Jacq. seeds by tissue culture method. **Forest Science**, v. 69, n. 2, p. 178-186, 2023.

DOS-SANTOS, K. C. F. et al. *In vitro* multiplication of wild *Manihot* species with different naphthaleneacetic acid and benzylaminopurine concentrations. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v. 43, p. 52866-52866, 2021.

FAIZE, M. et al. Application of *Ascophyllum nodosum*-based soluble extract on micropropagation and regeneration of *Nicotiana benthamiana* and *Prunus domestica*. **Plants**, v. 10, n. 07, p. 1354, 2021.

FAVERO, B. T. et al. *Anthurium andraeanum* senescence in response to 6-benzylaminopurine: Vase life and biochemical aspects. **Postharvest Biology and**

Technology, v. 161, p. 111084-111098, 2020.

GAMMOUDI, N. et al. Establishment of optimized *in vitro* disinfection protocol of *Pistacia vera* L. explants mediated a computational approach: multilayer perceptron–multi– objective genetic algorithm. **Plant Biology**, v. 22, n. 1, p. 1-13, 2022.

GOSHO, M. et al. Bias in odds ratios from logistic regression methods with sparse data sets. **Journal of Epidemiology**, v. 33, n. 6, p. 265-275, 2023.

GOTELLI, M. et al. Pollen, tapetum, and orbicule development in *Colletia paradoxa* and *Discaria americana* (Rhamnaceae). **The Scientific World Journal**, v. 3, p. 33-42, 2012.

GUPTA, N. et al. A review on micropropagation culture method. **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development**, v. 8, n. 1, p. 86-93, 2020.

HALLMARK, H. Tucker et al. trans-zeatin-N-glucosides have biological activity in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS One**, v. 15, n. 5, p. e0232762, 2020.

HAN, S. et al. Tissue culture and rapid propagation technology for *Gentiana rhodantha*. **Open Life Sciences**, v. 18, n. 1, p. 2022-2036, 2023.

IOANNIDIS, K. et al. Potential and constraints on *In vitro* micropropagation of *Juniperus drupacea* Labill. **Forests**, v. 14, n. 1, p. 142, 2023.

ISDA, M. N. et al. Effect of 6-benzylaminopurine and honey for *in vitro* shoot initiation of mangosteen seed explant from riau, Indonesia. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1, n. 4, p. 012029-012042, 2019.

JAMESON, P. E. Zeatin: The 60th anniversary of its identification. **Plant Physiology**, v. 192, n. 1, p. 34-55, 2023.

KAMRAN, M. et al. Application of abscisic acid and 6-benzylaminopurine modulated morpho-physiological and antioxidative defense responses of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) by minimizing cobalt uptake. **Chemosphere**, v. 263, p. 128169-128182, 2021.

KHUN, S. et al. Effect of different concentrations and combinations of benzyl aminopurine and indole-3-butyric acid on micropropagation of *Vanilla planifolia*. **Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 90734- 90742, 2023.

LENCINA, K. H. et al. Introduction of nodal segments and *in vitro* rooting of *Apuleia leiocarpa*. **Ciência Florestal**, v. 30, p. 1290-1298, 2020.

LEZCANO, M. I. D. et al. Micropropagation of *Handroanthus heptaphyllus* (VELL.) Mattos from nodal segments. **Revista De La Sociedad Científica Del Paraguay**, v. 26, n. 1, p. 49-63, 2021.

LI, L. et al. Bending to auxin: fast acid growth for tropisms. **Trends in Plant Science**,

v. 27, n. 5, p. 440-449, 2022.

LIMA, R. B.; GIULIETTI, A. M., 2014. Synonymies and typification of the Rhamnaceae of Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 28, n. 3, p. 45-67, 2014.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, v. 15, p. 416-428, 1980.

MARTÍNEZ-VILALTA, J.; GARCIA-FORNER, Núria. Water potential regulation, stomatal behaviour and hydraulic transport under drought: deconstructing the iso/anisohydric concept. **Plant, Cell & Environment**, v. 40, n. 6, p. 962-976, 2017.

MARTINS, J. P. R. et al. 6-Benzylaminopurine and kinetin modulations during *in vitro* propagation of *Quercus robur* (L.): an assessment of anatomical, biochemical, and physiological profiling of shoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 151, n. 1, p. 149-164, 2022.

MUHIE, S. H. et al. Effects of benzylaminopurine and macro propagation techniques on multiplication of dessert banana (*Musa acuminata* L.). **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 11, p. 100515-100530, 2023.

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

PAIVA-NETO, V. B.; OTONI, W. C. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter?. **Scientia Horticulturae**, v. 97, n. 3-4, p. 193-202, 2003.

PAGE, S. R. G. et al. Media optimization for the micropropagation and callogenesis of *Cannabis sativa* L. **BioRxiv**, v. 1, p. 1-23, 2020.

PAYGHAMZADEH, K.; KAZEMITABAR, S. K. In vitro propagation of walnut: a review. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 290-311, 2011.

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

PINTO, K. G. D. et al. Indole-3-butyric acid improves root system quality in guaraná cuttings. **HortScience**, v. 55, n. 10, p. 1670-1675, 2020.

PONIEWOZIK, M. et al. The influence of disinfection methods and liquid phase media on *Paphiopedilum insigne* seeds germination and media supplements on morphological features of protocorms in tissue culture. **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus**, v. 19, n. 6, p. 7-14, 2020.

POTCHARA, S. et al. *In vitro* micropropagation of siamese rosewood *Dalbergia Cochinchinensis* Pierre, a timber yielding tree. **Pak. J. Bot**, v. 54, n. 5, p. 1879-1884, 2022.

RADMANN, E. B. et al. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de

plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata* L. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 7, n. 3, 2001.

REGNI, L. et al. Neem oil to reduce zeatin use and optimize the rooting phase in *Olea europaea* L. Micropropagation. **Plants**, v. 12, n. 3, p. 576, 2023.

RUAN, J.; YI, P. Exogenous 6-benzylaminopurine inhibits tip growth and cytokinesis via regulating actin dynamics in the moss *Physcomitrium patens*. **Planta**, v. 256, n. 1, p. 1, 2022.

SOKOLOV, R. S.; ATANASSOVA, B. Y.; IAKIMOVA, E. T. Physiological Response of Cultured. to Nutrient Medium Composition. **Journal of Horticultural research**, v. 22, n. 1, p. 49-61, 2014.

SONG, G. et al. Efficient micropropagation of chestnut hybrids (*Castanea* spp.) using modified woody plant medium and zeatin riboside. **Horticultural Plant Journal**, v. 7, n. 2, p. 174-180, 2021.

SOURATI, R. et al. Effects of naphthaleneacetic acid, indole-3-butyric acid and zinc sulfate on the rooting and growth of mulberry cuttings. **International Journal of Plant Biology**, v. 13, n. 3, p. 245-256, 2022.

TAHIRI, A. et al. Optimisation de la méthode de désinfection des explants et multiplication *in vitro* du safran (*Crocus sativus* L.). **African and Mediterranean Agricultural Journal-AI Awamia**, n. 139, p. 37-52, 2023.

TCHOUGA, A. O. et al. Micropropagation and effect of phloroglucinol on rooting of *Diospyros crassiflora* Hiern. **HortScience**, v. 55, n. 4, p. 424-428, 2020.

WANG, R. et al. Browning treatment in tissue culture of 'Miliang 1' Delicious kiwifruit. **Materials Science and Engineering**, v. 5, n. 2, p. 56-71, 2020.

WANG, M. et al. In Vitro Micrografting of horticultural plants: method development and the use for micropropagation. **Horticulturae**, v. 8, n. 7, p. 576, 2022

WEN, S. S. et al. Micropropagation of tree peony (*Paeonia* sect. Moutan): A review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 141, p. 1-14, 2020.

YANG, M. et al. Cardiotoxicity of zebrafish induced by 6-benzylaminopurine exposure and its mechanism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8438, 2022.

ZANELLO, C. A. et al. Micropropagation from inflorescence nodal segments of *Phalaenopsis* and acclimatization of plantlets using different substrates. **Horticulturae**, v. 8, n. 4, p. 340, 2022.

ZAHID, N. A. et al. Micropropagation of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and evaluation of its secondary metabolites and antioxidant activities compared with the conventionally propagated plant. **Plants**, v. 10, n. 4, p. 630, 2021.

CAPÍTULO II

DIODOS EMISSORES DE LUZ AFETAM A REGENERAÇÃO DE BROTO E O METABOLISMO FOTOSSINTÉTICO DE *Colletia paradoxa* (RHAMNACEAE) CULTIVADA *IN VITRO*

Resumo: *Colletia paradoxa* é uma planta arbustiva, endêmica do sul do Brasil e do leste da Argentina, atualmente ameaçada de extinção devido à fragmentação de seu habitat. A micropropagação surge como uma alternativa promissora para a produção em larga escala de mudas dessa espécie. No contexto dos cultivos *in vitro*, a utilização de diodos emissores de luz (LEDs) tem se mostrado eficaz no estímulo ao desenvolvimento de brotações, uma vez que os LEDs fornecem comprimentos de onda específicos que permitem um controle mais preciso sobre a morfogênese das plantas. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes comprimentos de onda de LEDs na regeneração de brotos e no metabolismo fotossintético de *C. paradoxa* cultivada *in vitro*. Segmentos nodais de 2 cm de comprimento foram desinfestados com imersão em solução de 1,0% de hipoclorito de sódio (NaClO) por 10 minutos, seguida de imersão em solução de 0,1% de cloreto de mercúrio (HgCl₂), com adição de 0,1% de Tween 20, por 10 minutos. Os explantes foram cultivados em meio MS/2, suplementado com 5,0 µM de benzilaminopurina (BAP) para o desenvolvimento dos brotos. Os explantes foram expostos a quatro diferentes sistemas de iluminação com LEDs: LEDs brancos (400–700 nm), LEDs azuis (450–495 nm), LEDs vermelhos (620–660 nm) e uma combinação equitativa de LEDs vermelhos e azuis (1:1) na sala de cultivo. O efeito desses sistemas foi avaliado por meio da quantificação de pigmentos fotossintéticos, da atividade de enzimas antioxidantes, da fluorescência de clorofila e das trocas gasosas dos explantes. Os resultados indicaram que os sistemas de iluminação com LEDs influenciaram significativamente o desenvolvimento e o metabolismo fotossintético dos brotos de *C. paradoxa*. Para otimizar o desenvolvimento das brotações, recomendou-se o cultivo sob iluminação combinada de LEDs vermelhos e azuis (1:1), que resultou em acréscimos no comprimento médio de brotos (4,13 cm), no número de nós (3,68) e no número médio de brotos (5,44). Além disso, essa condição luminosa promoveu os maiores níveis de pigmentos fotossintéticos, maior taxa de trocas gasosas, menores concentrações de enzimas antioxidantes e menor dissipação de energia por fluorescência da clorofila. Portanto, conclui-se que o cultivo *in vitro* de *C. paradoxa* deve ser realizado em meio MS/2, suplementado com 5,0 µM de BAP e sob iluminação combinada de LEDs vermelhos e azuis (1:1), para estimular o melhor desenvolvimento das brotações e otimizar o metabolismo fotossintético da espécie.

Palavras-chave: enzimas antioxidantes, fluorescência da clorofila, fotossíntese, trocas gasosas, pigmentos fotossintéticos.

1 INTRODUÇÃO

Colletia paradoxa (Spreng.) Escal., pertencente à família Rhamnaceae, é um arbusto, endêmico das regiões subtropicais da América do Sul (MARCHIORI, 1983). Além de seu valor ornamental, a espécie possui propriedades medicinais e é utilizada popularmente no tratamento de distúrbios gastrointestinais (BASTOS-ZÁCHIA et al., 2021). No entanto, devido à fragmentação de seu habitat por atividades agropecuárias, o Centro Nacional de Conservação da Flora (CNCFLORA, 2012) e o Ministério do Meio Ambiente (DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, 2021) classificaram a espécie como ameaçada de extinção. Diante disto e das dificuldades encontradas na propagação da espécie por germinação *ex vitro* e estaquia convencional (CHAUÁ, 2020), a micropropagação de *C. paradoxa* é uma alternativa viável para a produção de mudas.

A micropropagação tem sido amplamente utilizada para a propagação rápida e massal de plantas, visando obter mudas uniformes e livres de patógenos (MURTHY et al., 2023). Para o desenvolvimento de um protocolo eficiente de produção de mudas, é necessária a seleção do explante, do meio de cultura e dos reguladores vegetais (GUPTA et al., 2020). Outro fator que pode interferir no desenvolvimento das plantas são as condições da sala de cultivo, sendo que a manipulação adequada das fontes de iluminação é essencial para o sucesso das culturas *in vitro*, dado o papel crucial da luz na morfogênese das plantas (DJANGALINA, 2023).

A utilização de diodos emissores de luz (LEDs) nas salas de cultivo *in vitro* tem se destacado nos últimos anos por proporcionar maior precisão na emissão de luz em comprimentos de onda específicos, permitindo um controle mais rigoroso sobre os processos fisiológicos e de desenvolvimento das plantas (PANG et al., 2023). Outra vantagem dos LEDs é a sua alta eficiência energética, convertendo energia elétrica em luz de forma mais eficiente do que as lâmpadas fluorescentes convencionais, resultando em menor consumo de energia e redução dos custos operacionais (ATTAYA, 2021). Além disso, a baixa emissão de calor dos LEDs minimiza o risco de superaquecimento dos tecidos cultivados *in vitro*, garantindo um ambiente de cultivo mais estável e controlado (ATTAYA, 2021; BARCELÓ-MUÑOZ et al., 2022).

Apesar da baixa taxa fotossintética dos explantes em virtude da presença de carboidratos no meio de cultura (MURTHY et al., 2023), eventuais estresses causados

por fatores abióticos, como a iluminação, podem danificar o aparelho fotossintético, especialmente o fotossistema II (FSII), levando à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), fotoinibição, desequilíbrio nas vias de sinalização redox fotossintéticas e inibição da reparação do FSII (SGHAIER-HAMMAMI et al., 2023). As plantas mitigam os efeitos do estresse abiótico dispersando a energia absorvida por meio de processos não radiativos, reduzindo a taxa de transporte de elétrons ou convertendo a luz absorvida em excesso em energia térmica (MOUSTAKA e MOUSTAKAS, 2023). A dissipação da energia de excitação excedente é conhecida como dissipação não-fotoquímica ou fluorescência da clorofila *a* (fchl*a*) (MAGUIRE et al., 2020).

A fchl*a* é um indicador sensível da fotossíntese e tem sido amplamente utilizada para detectar os efeitos de estresses bióticos e abióticos em culturas *in vitro*. Esta dissipação energética se dá a partir da reemissão da energia luminosa em forma de iluminação vermelho-distante pelas moléculas de clorofila (KALAI et al., 2016). Sua intensidade é inversamente proporcional à fração de energia utilizada para a fotossíntese (GOLTSEV et al., 2016). Portanto, a análise de seu transiente fornece informações acerca da eficiência quântica fotoquímica e não fotoquímica das plantas. Isso é importante para a avaliação da fotossíntese e, em última análise, para a produtividade vegetal, já que as reações fotoquímicas fornecem energia e poder redutor para a assimilação de CO₂ (TSIMILLI-MICHAEL, 2020). A fchl*a* é emitida pelo FSII a partir do equilíbrio redox de seu acceptor primário de elétrons, a plastoquinona A (QA). Quando QA está no estado oxidado, o centro de reação do FSII está aberto e a emissão de fchl*a* é nula. No entanto, quando QA está no estado reduzido (QA⁻), o centro de reação do FSII está fechado e a emissão de fchl*a* ocorre. Diante disto, a fchl*a* reflete o resultado líquido da redução de QA devido à atividade do FSII e a reoxidação de QA⁻ pelas atividades do fotossistema I (FSI) (GUIDI et al., 2019).

A medição não invasiva da fotossíntese por meio da fchl*a* é capaz de fornecer informações sobre a viabilidade da planta e a eficiência de seu aparelho fotossintético (GOLTSEV et al., 2016). Mesmo com a presença de sacarose no meio de cultivo (NGUYEN et al., 2019), o desempenho fotossintético dos explantes é crucial para o sucesso das etapas subsequentes *in vitro*, especialmente a multiplicação de brotos e aclimatização (CIOĆ e PAWŁOWSKA, 2020; SHANG et al., 2023). Neste contexto, a ~~performance fotossintética~~ o desempenho fotossintético pode ser aprimorado pela

aplicação de um espectro específico de luz por meio de LEDs, durante a cultura *in vitro* (SHANG et al., 2023). Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi analisar os efeitos de diferentes espectros luminosos de LEDs no desenvolvimento de brotos e no metabolismo fotossintético e antioxidante de *C. paradoxa* cultivada *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Foram utilizadas 350 plantas jovens, de dois a quatro anos de idade, provenientes da Sociedade Chauá, localizada em Campo Largo, Paraná (-25.4270, -49.4843). As plantas foram mantidas em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR), sendo podadas mensalmente e pulverizadas semanalmente com 2 g L⁻¹ do fungicida Cercobin®. A casa de vegetação foi mantida com temperatura média de 25 ± 2 °C e radiação fotossinteticamente ativa de 56 µmol m⁻² s⁻¹, fornecida por lâmpadas de mercúrio (250 W) e fotoperíodo de 12 horas. As etapas laboratoriais de micropropagação foram desenvolvidas no Laboratório de Micropropagação Vegetal, pertencente ao Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

2.2 ESTABELECIMENTO DE CULTURAS ASSÉPTICAS

Para o estabelecimento das culturas assépticas, brotações apicais, com cerca de dois centímetros de comprimento, foram coletadas, cortadas as gemas apicais e as suas folhas e submetidas a desinfestação com solução de 1,0% de hipoclorito de sódio (NaClO), durante 10 min, seguida por solução de 0,1% de cloreto de mercúrio (HgCl₂) durante 10 min, acrescidas de 0,1% de Tween 20, em agitação. Os explantes foram lavados seis vezes em água destilada e esterilizada. Posteriormente, foram inoculados em meio MS (Murashige e Skoog, 1962), com a concentração de sais reduzida pela metade (MS/2).

2.3 DESENVOLVIMENTO DAS BROTAÇÕES

Os explantes foram cultivados em meio MS/2, acrescido de 5,0 µM de benzilaminopurina (BAP – Sigma Aldrich). Após dois subcultivos de 30 dias foram

avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de explantes com brotos, número médio de nós por explante, número médio de brotos por explante e o comprimento médio dos brotos.

2.4 MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

O meio de cultura utilizado foi o MS/2 de consistência semissólida com adição de 5,7 g L⁻¹ de ágar Kasvi®, 30 g L⁻¹ de sacarose e 0,1% de *plant preservative mixture* (PPM). O pH do meio de cultura foi ajustado em 5,8 com hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl) 1,0 N. Na etapa de estabelecimento de culturas assépticas foram utilizados tubos de ensaio (20 X 100 mm), contendo 10 mL de meio de cultura. Na etapa de regeneração de brotos, os explantes foram inoculados em frascos do tipo pote (65 x 130 mm) contendo 40 mL de meio de cultura. Os tubos de ensaio e frascos foram fechados com tampas de polipropileno. Os meios foram esterilizados em autoclave (120°C e 1,06 Kg cm⁻² de pressão, durante 20 minutos).

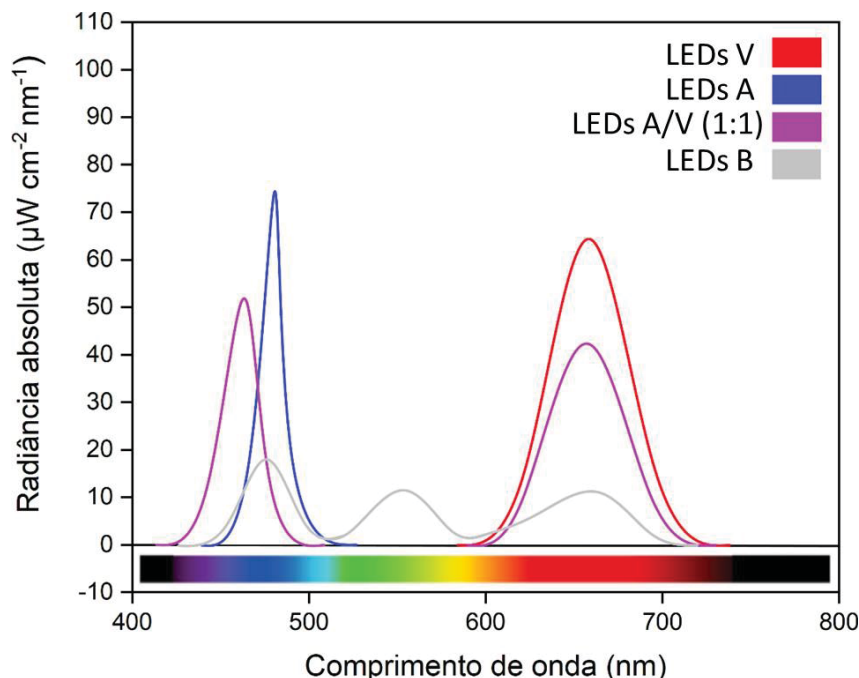
As culturas de *C. paradoxa* foram mantidas em sala de crescimento a 25 ± 2°C, com fotoperíodo de 16 horas. Foram utilizados quatro sistemas de iluminação por LEDs (Tabela 1). Cada sistema foi composto por quatro lâmpadas tubulares de 1,2 m, 18W, Electrolux® com ângulo de iluminação de 330°. A distribuição espectral dos LEDs utilizados nos experimentos pode ser observada na figura 1. A medição da radiância absoluta foi conduzida mediante o uso de um Luxímetro Data Logger DT-8809A.

TABELA 1. SISTEMAS DE ILUMINAÇÃO POR DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs) UTILIZADOS NA MICROPROPAGAÇÃO DE *Colletia paradoxa*.

Sistema de iluminação	Composição espectral	PPFD (μmol m ² s ⁻¹)
LEDs monocromáticos brancos	400-700 nm	9,0
LEDs monocromáticos vermelhos	620-660 nm	75,9
LEDs monocromáticos azuis	450-495 nm	42,9
LEDs vermelhos e azuis (1:1).	450-495 e 620-660 nm	59,7

Legenda: PPFD – densidade do fluxo de fótons fotossinteticamente ativos

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO ESPECTRAL DOS DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs) UTILIZADOS PARA MICROPROPAGAÇÃO DE *Colletia paradoxa*.



Legenda: LEDs B - LEDs brancos; LEDs V – LEDs vermelhos; LEDs A – LEDs azuis; LEDs A/V (1:1) - LEDs azuis e vermelhos na proporção 1:1. Fonte: o autor.

2.5 ANÁLISES FISIOLÓGICAS

As análises fisiológicas nos explantes submetidos aos diferentes sistemas luminosos por LEDs no cultivo *in vitro* foram realizadas após dois subcultivos de 30 dias, em meio MS/2, suplementado com 5,0 μM de BAP. Foram utilizadas 10 amostras vegetais cultivadas em cada sistema luminoso.

2.5.1 Pigmentos fotossintéticos

Para a extração e análise de clorofila *a* (chl*a*), clorofila *b* (chl*b*), clorofila total (chl*t*) e carotenoides, seguiu-se a metodologia proposta por Porra et al. (1989) e Lichtenthaler et al. (1983). A massa fresca do material vegetal foi obtida em balança analítica. O material vegetal foi macerado e homogeneizado utilizando graal e pistilo, com 2,0 mL de acetona a 80%. O volume foi ajustado para 4,0 mL do reagente. O extrato foi centrifugado a 3000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro nas seguintes absorvâncias: 470 nm, 663 nm e 646 nm. Os teores

de pigmentos clorofilianos e carotenoides foram calculados utilizando as seguintes equações:

- (1) Clorofila a ($\mu\text{g mL}^{-1}$) = $12,21 A_{663} - 2,81 A_{646}$
- (2) Clorofila b ($\mu\text{g mL}^{-1}$) = $20,13 A_{646} - 5,03 A_{663}$
- (3) Clorofila total a + b ($\mu\text{g mL}^{-1}$) = $17,76 A_{646} + 7,34 A_{663}$
- (4) Carotenoides ($\mu\text{g mL}^{-1}$) = $(1000A_{470} - 3.27[\text{clorofila a}] - 104[\text{clorofila b}]) / 229$

Além disto, os espectros de absorção dos extratos dos pigmentos foram analisados por varredura no espectrofotômetro, cobrindo a faixa de 350 a 750 nm em intervalos de 1 nm.

2.5.2 Fluorescência da clorofila a

A fluorescência da clorofila a (fchla) foi obtida por meio do Fluorômetro PAM-2500 (*Pulse Amplitud Modulated*, Heinz Walz, GmB). As folhas dos explantes foram adaptadas ao escuro por meio do clipe foliar, durante 10 minutos. Foi utilizada a avaliação da cinética rápida para obtenção da curva OJIP (*Fast Kinect*, protocolo Poly300ms). Os valores relativos à cinética da fluorescência foram submetidos ao JIP teste (STRASSER, 1981).

Os parâmetros relativos ao JIP teste foram obtidos por meio de cálculos baseados nos quatro processos principais da fotossíntese: absorção de elétrons pelos complexos antena (ABS), aprisionamento dos elétrons nos centros de reação (TR_o), transporte dos elétrons pela cadeia transportadora (ET_o) e a dissipação da energia por vias não fotoquímicas (DI_o). Os parâmetros foram estimados por secção transversal das folhas (CS). A partir destes, outros parâmetros condizentes a rendimentos quânticos dos processos fotossintéticos e índices de vitalidade das plantas também foram calculados (GOLTSEV et al., 2016) (Tabela 2).

TABELA 2 - PARÂMETROS RELATIVOS AO JIP TESTE CALCULADOS A PARTIR DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A.

Parâmetro	Fórmula	Definição
FM (P)	-	Fluorescência máxima
Mo	$= [4 \cdot (F_{300\mu s} - F_{50\mu s}) / (FM - F_{50\mu s})]$	Taxa líquida de fotossistemas II fechados.
δR_o (RE_o/ET_o)	$= (FM - FI) / (FM - FJ)$	Probabilidade de o elétron ser transportado da plastoquinona para aceptor do fotossistema I.
ΨE_o (ET_o/TR_o)	$= 1 - VJ$	Probabilidade energia de excitação capturada pelo centro de reação mover um elétron após a plastoquinona A.
ϕP_o (TR_o/ABS)	$= F_v/F_m = 1 - (F_{50\mu s} / FM)$	Eficiência quântica máxima do fotossistema II.
ϕD_o (Dl_o/ABS)	$= DI_o/ABS = 1 - \phi P_o = (F_{50\mu s} / FM)$	Eficiência quântica máxima de excitação não fotoquímica.
ϕE_o (ET_o/ABS)	$= \phi P_o \cdot \Psi_o = [1 - (F_{50\mu s} / FM)] (1 - VJ)$	Eficiência quântica máxima do transporte de elétrons.
ϕR_o (RE_o/ABS)	$= [1 - (F_o / FM)] (1 - VI) = 1 - FI / FM$	Eficiência quântica máxima dos elétrons que atingem o receptor.
ABS/CS	Proporcional a F_o	Número de fótons absorvidos por seção transversal da folha.
TR_o/CS	$= (ABS/CS) (TR_o/ABS)$	Energia capturada por seção transversal da folha
Dl_o/CS	$= (ABS/CS) - (TR_o/CS)$	Energia dissipada por seção transversal da folha
ET_o/CS	$= (ET_o/RC) (RC/CS)$	Transporte de elétrons por seção transversal da folha
PICS	$(RC \cdot \phi P_o \cdot \Psi_o) / (CS \cdot 1 - \phi P_o \cdot 1 - \Psi_o)$	Índice de desempenho, um indicador da atividade funcional do fotossistema II expresso por unidade de seção transversal da área iluminada.

Fonte: GOLTSEV et al., (2016).

Os parâmetros de fchla calculados para este estudo (Tabela 1) possuem alta multicolinearidade, ou seja, possuem relações lineares exatas ou aproximadamente exatas entre si (CHU et al., 2022). Para estimar a multicolinearidade desses dados foi realizada a análise de *variance inflation factor* (VIF). O cálculo do VIF serve para ajustar um modelo de regressão para cada variável independente, utilizando todas as outras variáveis independentes como preditores (AKINWANDE et al., 2015). O VIF foi calculado como a razão entre a variância da estimativa do coeficiente de regressão para um dos parâmetros (ϕP_o) e a variância média de todos os coeficientes de regressão para os demais parâmetros, assim como mostra a equação a seguir:

$$VIF = 1 / (1 - R^2)$$

Para análise de componentes principais foram selecionados os parâmetros que

apresentaram VIF > 10.

2.5.3 Enzimas antioxidantes

A extração das proteínas e análise de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, peroxidase, ascorbato peroxidase) foi realizada seguindo a metodologia proposta por Azevedo et al. (1998). A massa fresca do material submetido a extração de proteínas foi mensurada em balança analítica. O tampão fosfato utilizado na extração proteica foi constituído por 7,265g de fosfato dipotássico (K_2HPO_4) e 0,186g de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) com pH ajustado para 7,5. Todos os procedimentos de extração foram realizados em banho de gelo. O material foi macerado e homogeneizado em graal e pistilo sendo, posteriormente, centrifugado a 3000 rpm por 30 minutos em centrífuga refrigerada a 3°C.

2.5.4 Determinação do teor de proteínas

O método de Bradford (1976), utilizado na determinação do teor de proteínas, foi baseado na estimativa da ligação do azul brilhante de Coomassie e do extrato proteico em comparação ao extrato de soro albumina bovina. Para tanto, foram utilizados 1500 µl do azul brilhante de Coomassie, 1450 µl de água destilada e 50 µl do extrato centrifugado. Após cinco minutos, a absorbância da amostra foi analisada em espectrofotometria a 595 nm contra um branco analítico.

2.5.5 Determinação de superóxido dismutase (E.C. 1.15.1.1)

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi calculada pela adição de 50 µL do extrato proteico a uma solução tampão de fosfato de potássio (50 mM) com 13 mM de metionina, 75 µM de azul de nitrotetrazólio (NBT), 100 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e 2 µM de riboflavina, expostos a luz fluorescente (15W) durante 10 minutos (GIANNOPOLITIS e RIES, 1977). A leitura espectrofotométrica foi realizada a 560 nm e 1 unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima requerida para inibir 50% da fotoredução do NBT.

2.5.6 Determinação da catalase (E.C. 1.11.1.6)

As análises de catalases (CAT) foram baseadas na metodologia descrita por

Kraus et al. (1995), com modificações propostas por Azevedo et al. (1998). O meio de reação para estimativa da catalase consistiu em uma solução tampão de fosfato de potássio (1000 mM), com peróxido de hidrogênio a 25%, mantido a 25°C em banho-maria. O consumo do substrato (H_2O_2) foi acompanhado por espectrofotometria durante um minuto com leituras a cada segundo a 240 nm, comparadas com um branco analítico.

2.5.7 Determinação das peroxidases totais (E.C. 1.11.1.7)

A análise das peroxidases totais (POX) foi baseada na metodologia proposta por Peixoto et al. (1999). O meio de reação para estimativa dessas enzimas foi composto por solução tampão de fosfato de potássio (25 mM) contendo 1,2611g de ácido pirogálico e 680 μL de H_2O_2 a 50%. Foi também necessário preparar uma solução ácido sulfúrico, que correspondeu a 2,5 ml de H_2SO_4 em 50 ml de água destilada. Em tubos de ensaio, para produzir o branco analítico, foi solubilizado 4,9 ml do meio de reação, 100 μL de tampão fosfato de potássio (pH 6,8) e 0,5 ml de H_2SO_4 . Para as análises foi alocado em tubos de ensaio 4,9 ml do meio de reação e 100 μL do extrato vegetal. Após um minuto foi adicionado 0,5 ml de H_2SO_4 . A leitura em espectrofotômetro foi realizada a 420 nm.

2.5.8 Determinação da ascorbato peroxidase (E.C. 1.11.1.11)

A análise da ascorbato peroxidase (APX) foi baseada no método de Nakano e Asada (1981), monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm em espectrofotômetro. O meio de reação, incubado a 25°C, foi composto de tampão fosfato de potássio (80 mM) (pH 7,0), 0,03 M de H_2O_2 , 0,1 M de ácido ascórbico, água destilada e 20 μL do extrato proteico. Para cálculo da atividade da APX foi utilizado o coeficiente de estimação de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.5.9 Determinação de trocas gasosas

As características de trocas gasosas dos explantes foram avaliadas com analisador infravermelho de trocas gasosas (IRGA) modelo LI-6400. Foram avaliadas as seguintes variáveis: condutância estomática (CE), a taxa transpiratória (TT), a taxa fotossintética (TF) e a concentração interna de CO_2 (CI). A densidade de fluxo de

fótons fotossinteticamente ativos foi fixada na câmara do aparelho em $100 \text{ mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$

2.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de regressão logística a partir de Modelos Lineares Generalizados (MLG), sendo ajustados à distribuição gama com função de ligação Log. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$) foram analisadas por comparação aos pares pelo teste de significância de Bonferroni. As análises foram realizadas no Ambiente R (CORE TEAM, 2020).

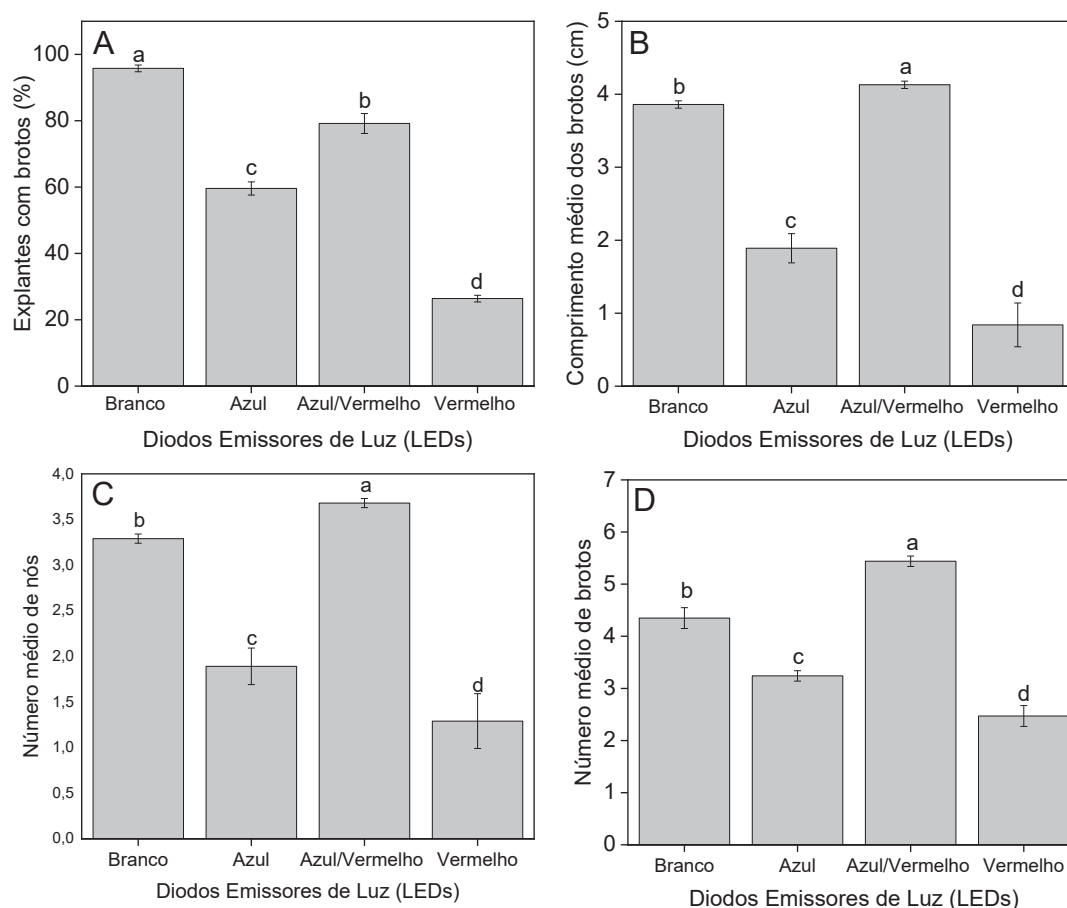
As análises de razões de chances (RC) foram realizadas a partir de regressões logísticas com um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Esta foi empregada como medida de associação que compara as chances de ocorrência de um evento entre tratamentos utilizados em experimentações biológicas (GOSHO et al., 2023). Para garantir RC positivas entre os resultados foram utilizados como referências os tratamentos controles ou com os menores valores para cada uma das variáveis. A análise foi realizada no Ambiente R (CORE TEAM, 2020).

3 RESULTADOS

3.1 DESENVOLVIMENTO DOS BROTO

Após dois subcultivos de 30 dias, a porcentagem de explantes com brotos cultivados sob a iluminação de LEDs brancos foi significativamente superior à daqueles cultivados em outros sistemas de LEDs (Figura 2A). No entanto, foi no cultivo sob LEDs V/A (1:1) que as plantas apresentaram os maiores comprimentos médios dos brotos (4,13 cm), o maior número de nós (3,68) e maior número médio de brotos (5,44) (Figuras 2B, 2C e 2D).

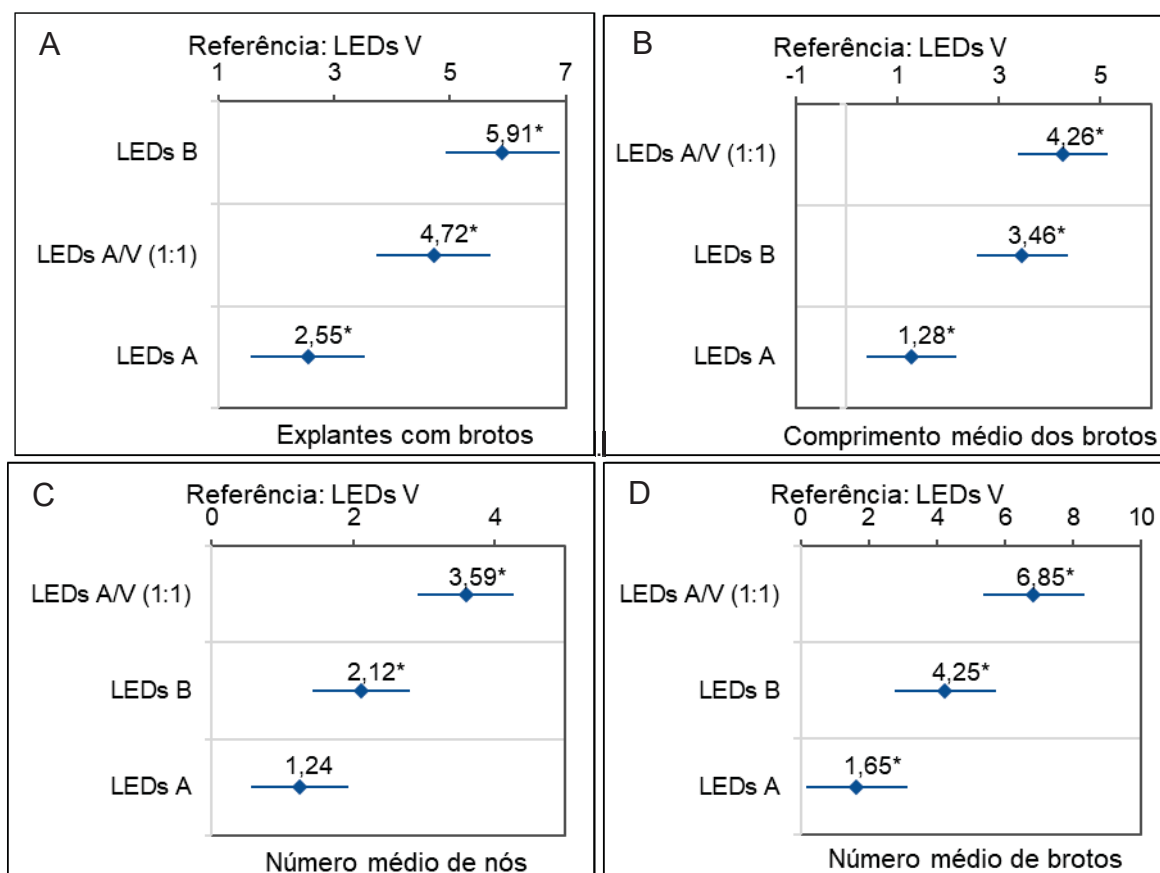
FIGURA 2 – REGENERAÇÃO DE BROTOS EM EXPLANTES DE *Colletia paradoxa*, CULTIVADOS EM MEIO MS/2 (MS COM A CONCENTRAÇÃO DE SAIS REDUZIDA PELA METADE), SUPLEMENTADO COM 5,0 μ M DE BENZILAMINOPURINA (BAP), EM FUNÇÃO DA EXPOSIÇÃO A DIFERENTES DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs).



Legenda: A - Explantes com brotos (%); B - Comprimento médio dos brotos (cm); C - Número médio de nós por brotos; D - número médio de brotos por explante. Letras diferentes entre os cultivos nos diodos emissores de luz representam diferenças estatísticas (Teste de Bonferroni, $p < 0,05$). Fonte: o autor.

Corroborando com os resultados supracitados, comprovou-se que as plantas cultivadas sob iluminação de LEDs brancos apresentaram a maior razão de chance (RC=5,91) de induzirem brotos nos explantes (Figura 3A). No entanto, as maiores razões de chance de ocorrerem brotos mais alongados (RC=4,26), com maior número de regiões internodais (RC=3,59) e, consequentemente, com maior número médio de brotos (RC=6,85) foram observadas nas plantas cultivadas sob iluminação combinada de LEDs V/A (1:1) (Figura 3A, 3B e 3C).

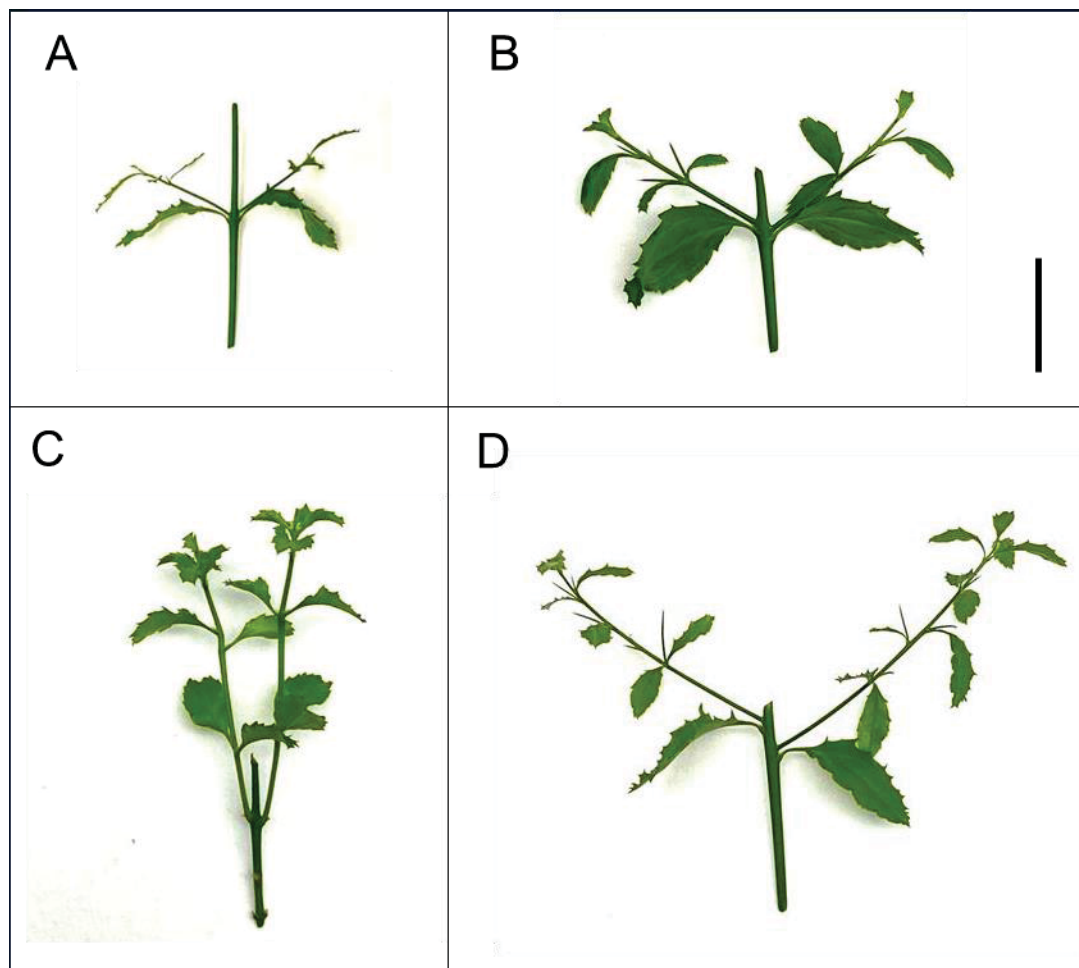
FIGURA 3 - RAZÕES DE CHANCES DA REGENERAÇÃO DE BROTOS DE *Colletia paradoxa*, CULTIVADOS EM MEIO MS/2, SUPLEMENTADO COM 5,0 μ M DE BENZILAMINOPURINA, EM FUNÇÃO DA EXPOSIÇÃO A DIFERENTES DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs).



Legenda: A - Explantes com brotos (%); B - Comprimento médio dos brotos (cm); C - Número médio de nós por brotos; D - número médio de brotos por explante. Fonte: o autor. *Diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado com o tratamento de referência. Fonte: o autor.

A figura 4 ilustra a regeneração de brotações nos explantes de *C. paradoxa*, cultivados em meio MS/2, suplementado com 5,0 μ M de BAP, sob os diferentes sistemas iluminação por LEDs.

FIGURA 4 – BRODOS DE *Colletia paradoxa*, APÓS O SEGUNDO SUBCULTIVO DE 30 DIAS, EM MEIO MS/2, SUPLEMENTADO COM 5,0 μM DE BENZILAMINOPURINA (BAP), SOB DIFERENTES SISTEMAS DE ILUMINAÇÃO POR DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs).



Legenda: A – explantes cultivados sob LEDs vermelhos; B - explantes cultivados sob LEDs azuis; C - explantes cultivados sob LEDs brancos; D – explantes cultivados sob LEDs vermelhos/azuis (1:1). Barra: 1 cm. Fonte: o autor.

3.2 ANÁLISES FISIOLÓGICAS

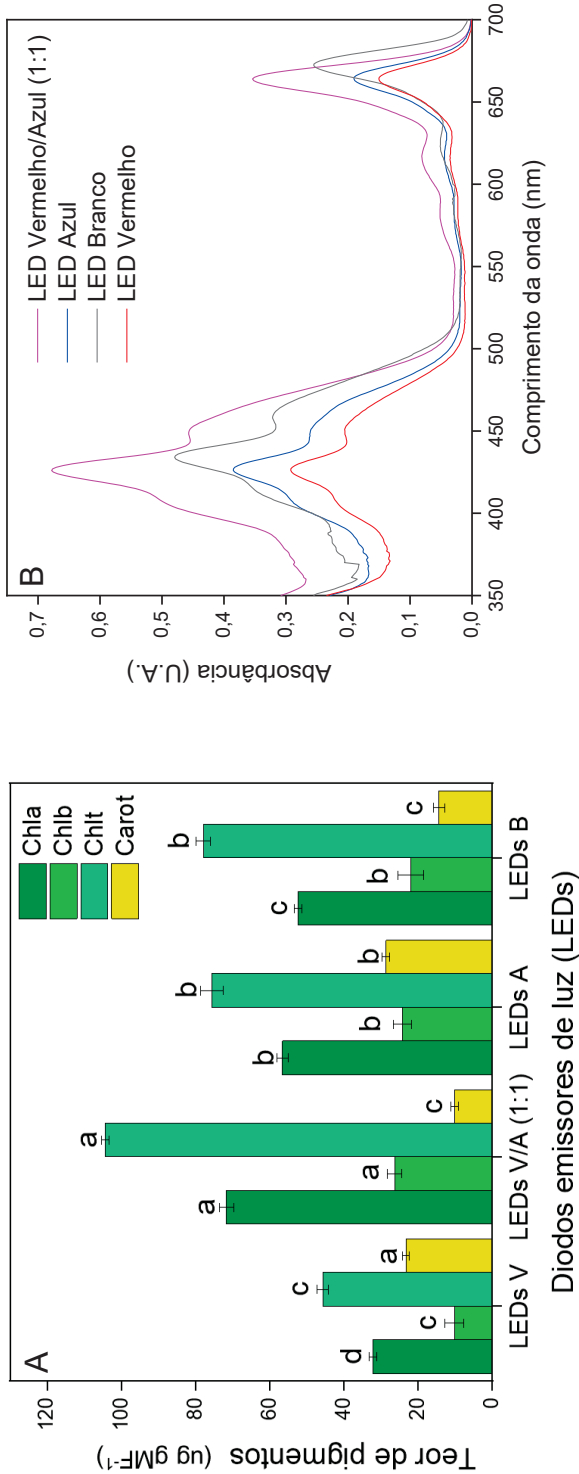
3.2.1 Pigmentos fotossintéticos

Os níveis de *chl a*, *chl b* e *chl t* obtidos nos brotos de *C. paradoxa* cultivados sob a iluminação combinada de LEDs V/A (1:1) foram estatisticamente superiores aos dos outros LEDs (Figura 5A). Por outro lado, os níveis mais baixos desses pigmentos foram observados nos brotos sujeitos à irradiação monocromática de LEDs vermelhos. Nessa condição, os brotos também apresentaram a mais alta concentração de carotenoides (Figura 5A). As menores concentrações de carotenoides foram obtidas nos brotos cultivados, sob a iluminação combinada de LEDs V/A (1:1)

e LEDs brancos, sem diferenças significativas entre esses dois tratamentos (Figura 5A).

Os brotos de *C. paradoxa* submetidos aos diferentes sistemas de iluminação por LEDs exibiram um padrão consistente no espectro de absorbância de energia luminosa (Figura 5B). A maior absorbância foi registrada nas plantas cultivadas sob a iluminação combinada de LEDs V/A (1:1), seguida por aquelas sujeitas à iluminação de LEDs B. Os menores espectros de absorção de luz pelos pigmentos fotossintéticos foram observados nos brotos cultivados sob a iluminação monocromática de LEDs vermelhos ou azuis (Figura 5B).

FIGURA 5 – TEORES DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS (A) E ESPECTROS DE ABSORBÂNCIA DA LUZ VISÍVEL (B) EM BROTOS DE *Colletia paradoxa*, APÓS DOIS SUBCULTIVOS DE 30 DIAS, EM MEIO MS/2, SUPLEMENTADO COM μM 5,0 DE BENZILAMINOPURINA, EM FUNÇÃO DE DIFERENTES TRATAMENTOS LUMINOSOS POR DIODOS EMISSORES DE LUZ.



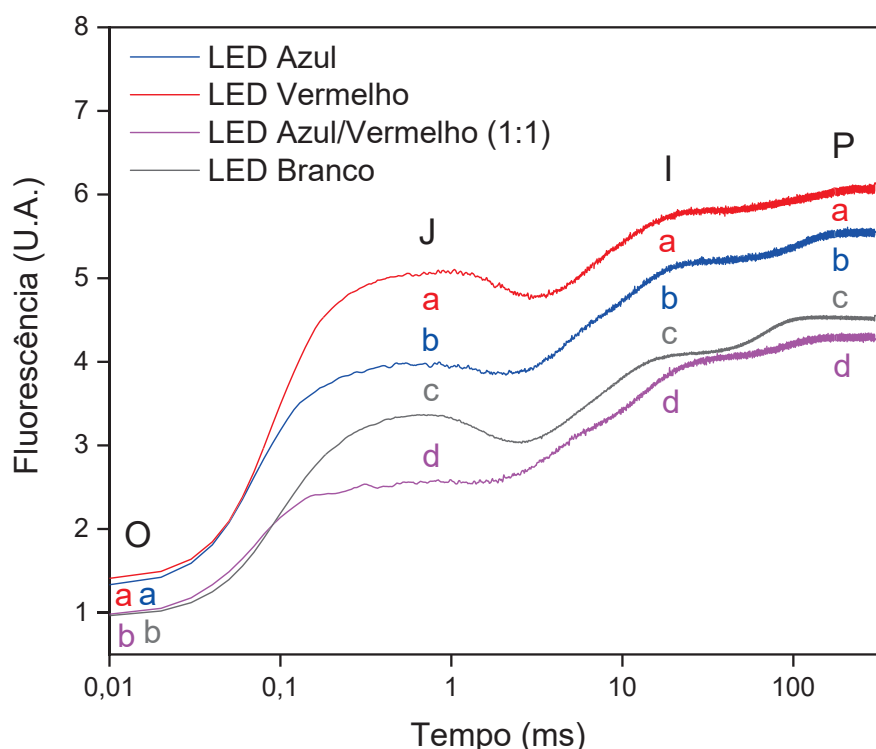
Legenda: Chla – clorofila a; Chlb – clorofila b; Chlt – clorofila total; Carot – carotenoides; LED – Diodos Emissores de Luz; LED V – LED Vermelho; LED V/A (1:1) – LED Vermelho/azul (1:1); LED A – LED azul; LED B – LED branco. No gráfico A letras diferentes representam diferenças estatísticas (Teste de Bonferroni, $p<0,05$) entre os teores de pigmentos fotossintéticos de um mesmo tratamento luminoso.

3.2.2 Fluorescência da clorofila *a*

Em todos os tratamentos luminosos, os brotos de *C. paradoxa* exibiram padrões consistentes nas curvas polifásicas de emissão fchl_a (curva OJIP) (Figura 6). Cada ponto de inflexão da curva, representado pelas letras O, J, I e P, caracteriza um momento específico desta dissipação energética. O ponto O corresponde à emissão inicial da fchl_a aos 50 µs após a aplicação do pulso de luz, enquanto o ponto J corresponde a 2 ms, o ponto I a 30 ms e o ponto P à fluorescência máxima (F_M).

As plantas cultivadas sob iluminação exclusiva de LEDs vermelhos demonstraram a maior emissão de fchl_a (Figura 6). Os pontos de inflexão da curva OJIP sob essa condição luminosa foram estatisticamente superiores aos dos demais tratamentos, com exceção da fluorescência inicial (O), que não apresentou diferenças significativas em relação aos brotos submetidos à iluminação de LEDs azuis. Em contraste, a menor emissão de fchl_a foi observada nas plantas cultivadas sob iluminação combinada de LEDs V/A (1:1). Seus pontos de inflexão foram estatisticamente inferiores dos demais tratamentos, com exceção, mais uma vez, da fluorescência inicial (O) que não diferiu estatisticamente dos brotos submetidos à iluminação de LEDs brancos (Figura 6).

FIGURA 6 - CURVA POLIFÁSICA (OJIP) DA EMISSÃO DA FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A, EM BROTO DE *Colletia paradoxa*, APÓS DOIS SUBCULTIVOS DE 30 DIAS, EM MEIO MS/2, SUPLEMENTADO COM 5,0 μ M DE BENZILAMINOPURINA, EM FUNÇÃO DE DIFERENTES TRATAMENTOS LUMINOSOS POR DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs).

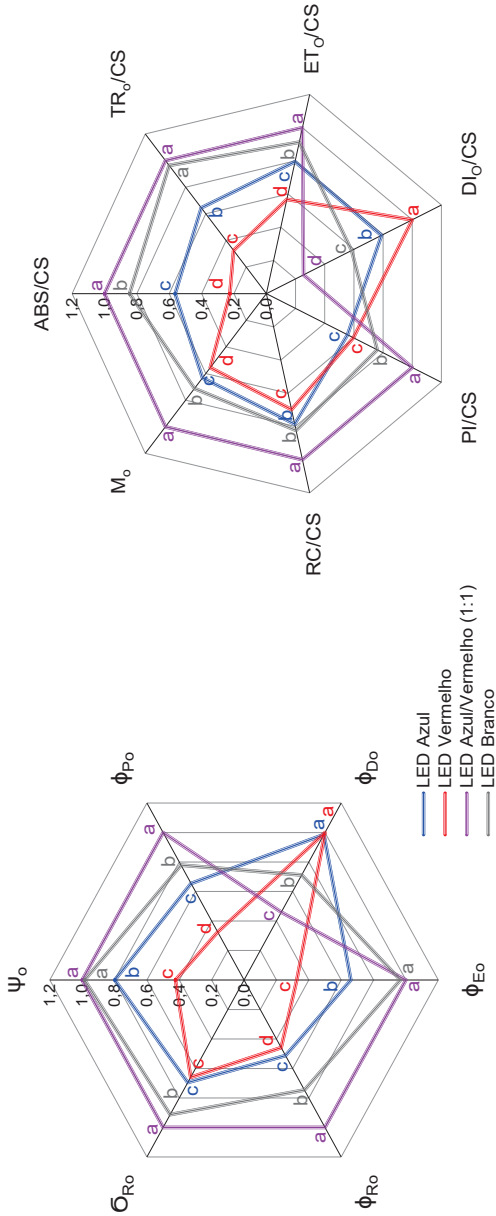


Legenda: LED – diodos emissores de luz; U.A. – unidade arbitrária; ms – milissegundos; O – fluorescência a 50 μ s; J – fluorescência a 2 ms; I – fluorescência a 30 ms; P – fluorescência máxima. As letras de A a D representam diferenças estatísticas (Teste de Bonferroni, $p < 0,05$) entre os valores de O, J, I, P registrados nos brotos cultivados em diferentes sistemas de iluminação por LEDs.

Foram registradas diferenças estatísticas entre os valores dos rendimentos quânticos fotossintéticos (ABS/CS , TR_o/CS , DI_o/CS e ET_o/CS), fluxos fenomenológicos por secção transversal da folha (M_o , δR_o , ΨE_o , ϕP_o , ϕD_o , ϕE_o e ϕR_o) e índices de vitalidade (PI/CS e RC/CS) entre os brotos cultivados sob diferentes sistemas de iluminação por LEDs (Figura 7).

Os valores de DI_o/CS e ϕD_o foram estatisticamente superiores nas plantas cultivadas sob iluminação de LEDs vermelhos (Figura 7). Todos os outros parâmetros mensurados foram significativamente superiores nos brotos cultivados sob a iluminação combinada de LEDs V/A (1:1). Os brotos cultivados sob LEDs V/A (1:1) e LEDs brancos não apresentaram diferenças estatísticas quanto aos parâmetros TR_o/CS , ΨE_o e ϕE_o (Figura 7).

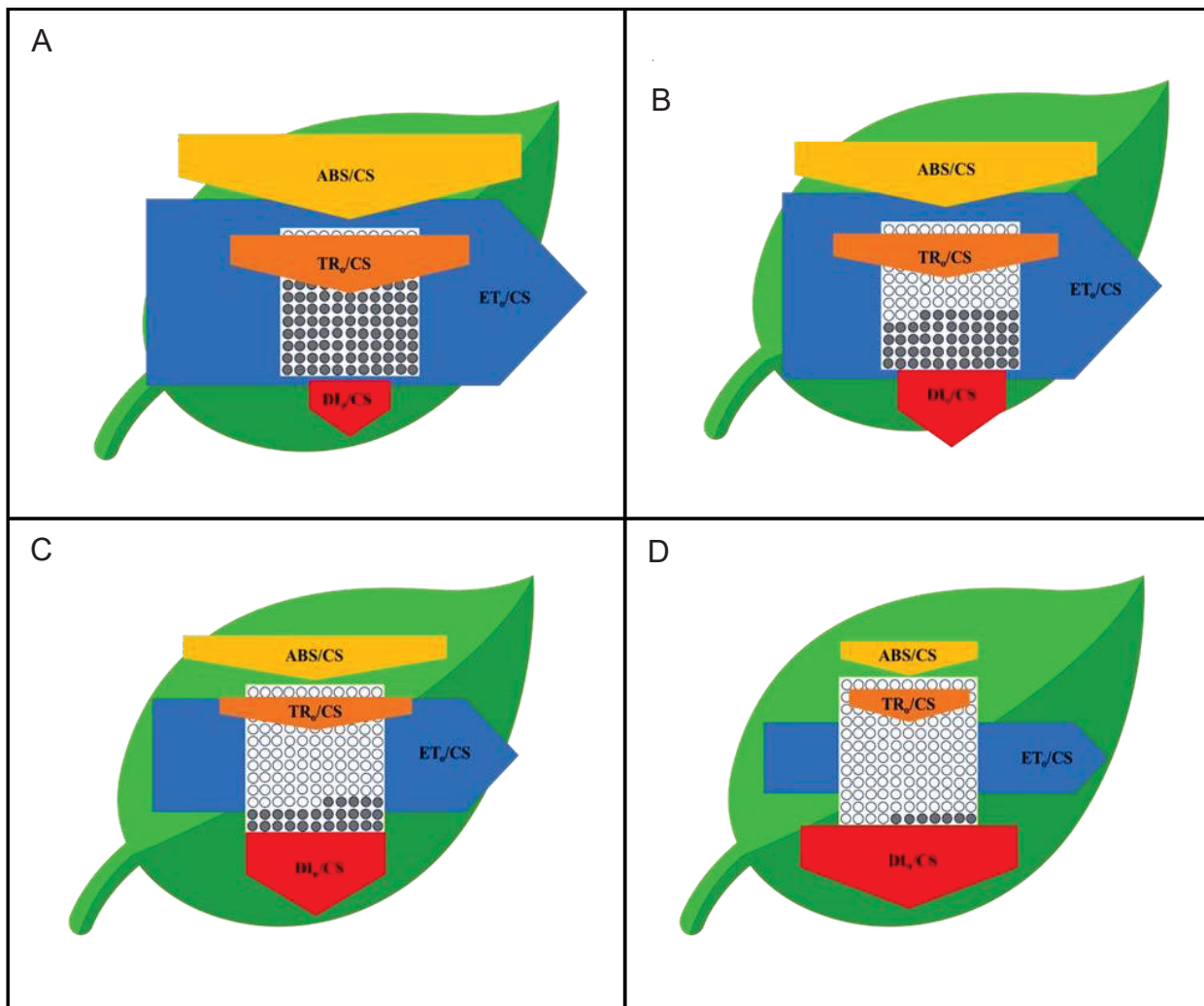
FIGURA 7 - GRÁFICO RADAR DOS PARÂMETROS RELATIVOS AO JIP TESTE, EM BROTOS DE *Colletia paradoxa*, APÓS DOIS SUBCULTIVOS DE 30 DIAS, EM MEIO MS/2, SUPLEMENTADO COM μM 5,0 DE BENZILAMINOPURINA, EM FUNÇÃO DE DIFERENTES TRATAMENTOS LUMINOSOS POR DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs).



Legenda: Mo - taxa líquida de centros de reação no fotossistema II fechados; δRo - probabilidade de o elétron ser transportado da plastoquinona para o receptor do fotossistema I; ψEo - probabilidade da energia de excitação capturada pelo centro de reação mover um elétron após a plastoquinona A; ϕPo - eficiência máxima do fotossistema II; ϕDo - eficiência máxima de excitação não fotoquímica; ϕEo - eficiência máxima de excitação máxima do transporte de elétrons; ϕRo - eficiência máxima dos elétrons que atingem o receptor; ABS/CS - número de fótons absorvidos por centro de reação; TRo/CS - energia capturada pelo centro de reação; DIo/CS - energia dissipada pelo centro de reação; ETo/CS - transporte de elétrons por centro de reação; PI/CS - atividade funcional do fotossistema II expresso por unidade de seção transversal da área iluminada; RC/CS - centros de reação ativos por seção transversal da folha. Letras diferentes, de A a D, representam diferenças estatísticas (Teste de Bonferroni, $p < 0,05$) dos parâmetros registrados entre os tratamentos luminosos. Fonte: o autor.

As alterações nos processos fotoquímicos do FSII dos brotos de *C. paradoxa* cultivados sob diferentes sistemas de iluminação por LEDs podem ser observadas a partir de modelos fenomenológicos de suas folhas (Figura 8). Observou-se que as plantas submetidas a iluminação de LEDs V/A (1:1) foram as que apresentaram o maior fluxo de fótons que foram absorvidos pelos pigmentos fotossintéticos (ABS), presos pelos centros de reação (TR_o) e conduzidos à cadeia transportadora de elétrons (ET_o) para a síntese de ATP e NADPH (Figura 8A). Além disto, sob este sistema de iluminação, os brotos apresentaram o maior número de centros de reação ativos. Por sua vez, as plantas cultivadas sob iluminação monocromática de LEDs vermelhos foram as que apresentaram a maior taxa de energia luminosa dissipada pelo FSII (DI_o) e o menor número de centros de reação ativos (Figura 8D).

FIGURA 8 – MODELO FENOMENOLÓGICO FOLIAR DOS BROTOS DE *Colletia paradoxa*, APÓS DOIS SUBCULTIVOS DE 30 DIAS, EM MEIO MS/2 SUPLEMENTADO COM 5,0 μ M DE BENZILAMINOPURINA, EM FUNÇÃO DE DIFERENTES TRATAMENTOS LUMINOSOS POR DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs).

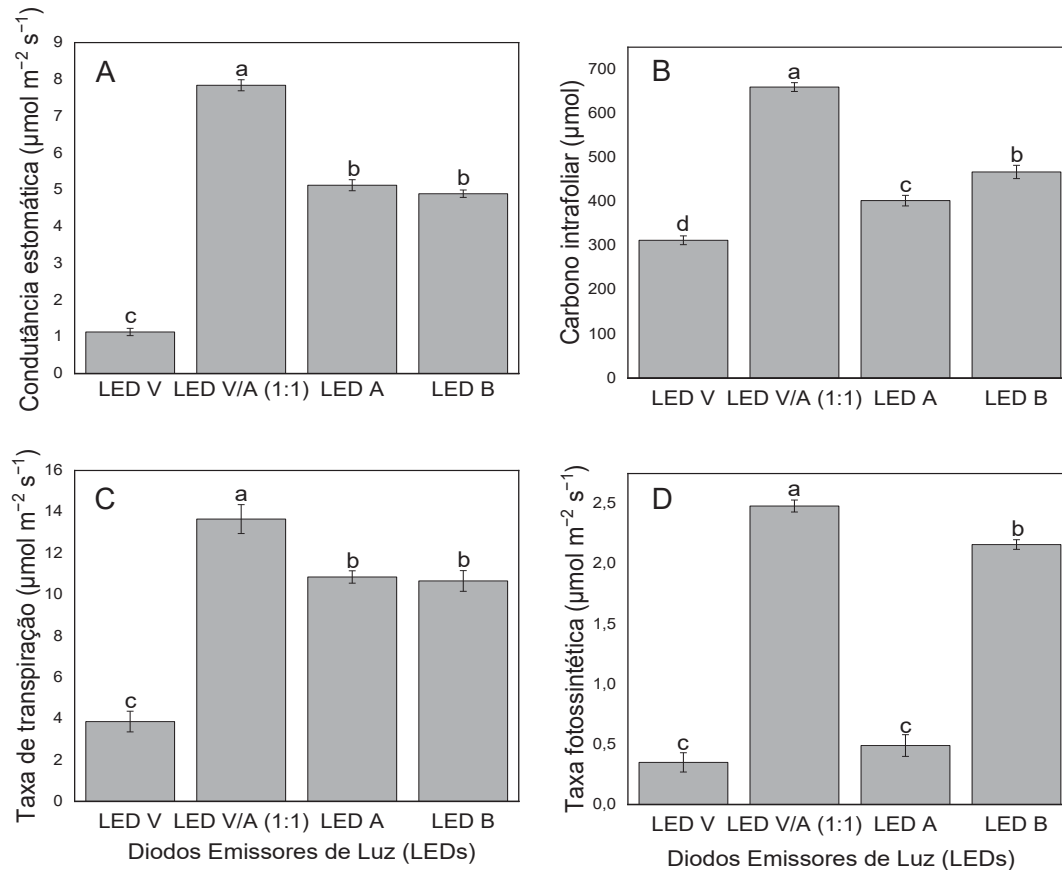


Legenda: Plantas cultivadas sob incidência de A – LEDs vermelhos/azuis (1:1); B – LEDs Brancos; C – LEDs azuis; D – LEDs vermelhos. Parâmetros: ABS/CS - número de fótons absorvidos por centro de reação; TRo/CS - energia conduzida pelos centros de reação; Dlo/CS - energia dissipada pelo centro de reação; ETo/CS - transporte de elétrons por centro de reação. Os valores de cada parâmetro são observados pelas mudanças relativas das larguras de cada seta. Os centros de reação inativos são mostrados como círculos abertos e os centros de reação ativos são círculos fechados. Fonte: o autor.

3.2.3 Trocas gasosas

Os brotos de *C. paradoxa* cultivados sob a iluminação de LEDs V/A (1:1) demonstraram os mais elevados índices de condutância estomática (Figura 9A), teor intracelular de carbono (Figura 9B), taxa de transpiração (Figura 9C) e taxa fotossintética (Figura 9D). Por contraste, os valores mais baixos das variáveis mencionadas foram obtidos nas plantas cultivadas sob a iluminação monocromática de LEDs vermelhos (Figura 9).

FIGURA 9 - TROCAS GASOSAS FOLIARES DOS BROTO DE *Colletia paradoxa*, APÓS DOIS SUBCULTIVOS DE 30 DIAS, EM MEIO MS/2, SUPLEMENTADO COM μM 5,0 DE BENZILAMINOPURINA, EM FUNÇÃO DE DIFERENTES TRATAMENTOS LUMINOSOS POR DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs).

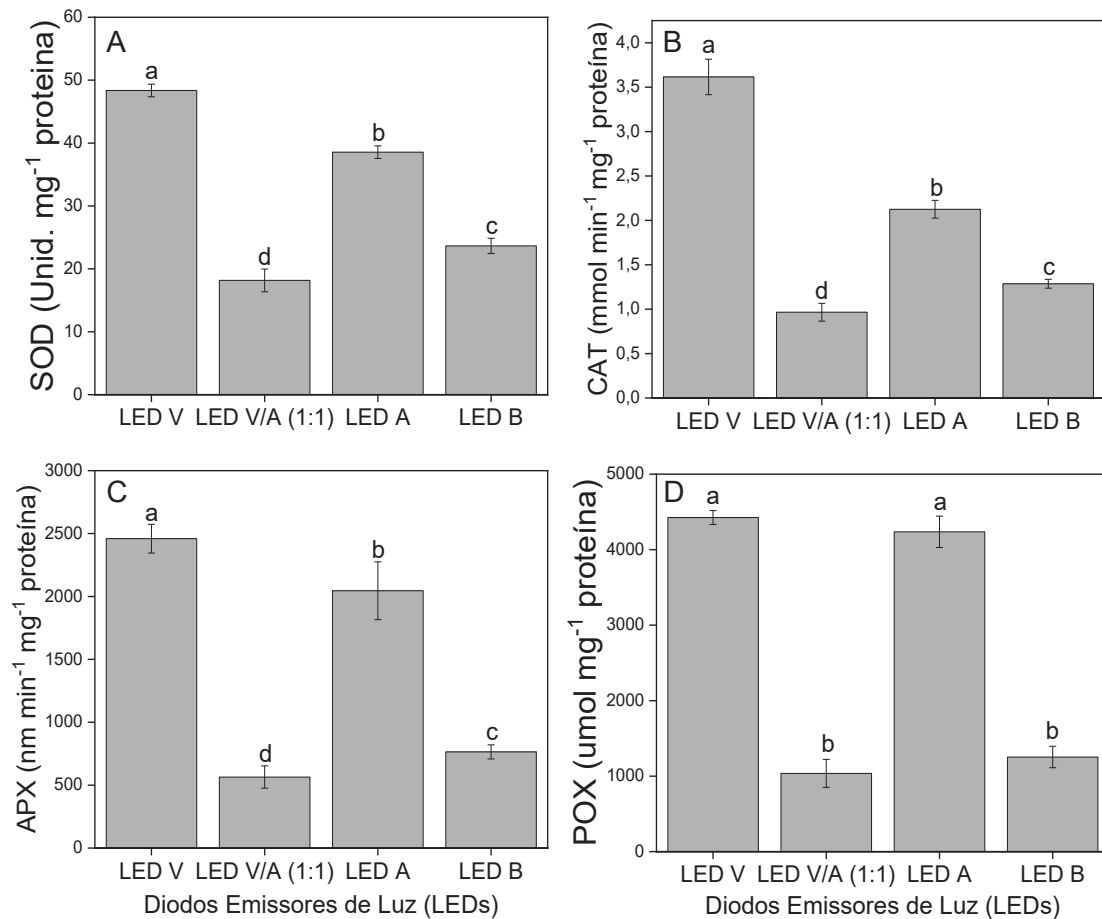


Legenda: LED V – LEDs vermelhos; LED V/A (1:1) – LEDs vermelhos e azuis (1:1); LED A – LEDs azuis; LED B – LEDs Brancos. Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças estatísticas (Teste de Bonferroni, $p < 0,05$) das variáveis entre os tratamentos luminosos. Fonte: o autor.

3.2.4 Atividades enzimáticas específicas

Os teores de SOD, CAT, APX e POX foram estatisticamente superiores nos brotos de *C. paradoxa* cultivados sob iluminação monocromática de LEDs vermelhos (Figura 10). Os menores teores destas enzimas foram registrados nas plantas cultivadas sob incidência de LEDs V/A (1:1) (Figura 10).

FIGURA 10 - ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DOS BROTO DE *Colletia paradoxa*, APÓS DOIS SUBCULTIVOS DE 30 DIAS, EM MEIO MS/2, SUPLEMENTADO COM 5,0 μ M DE BENZILAMINOPURINA, EM FUNÇÃO DE DIFERENTES TRATAMENTOS LUMINOSOS POR DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs).



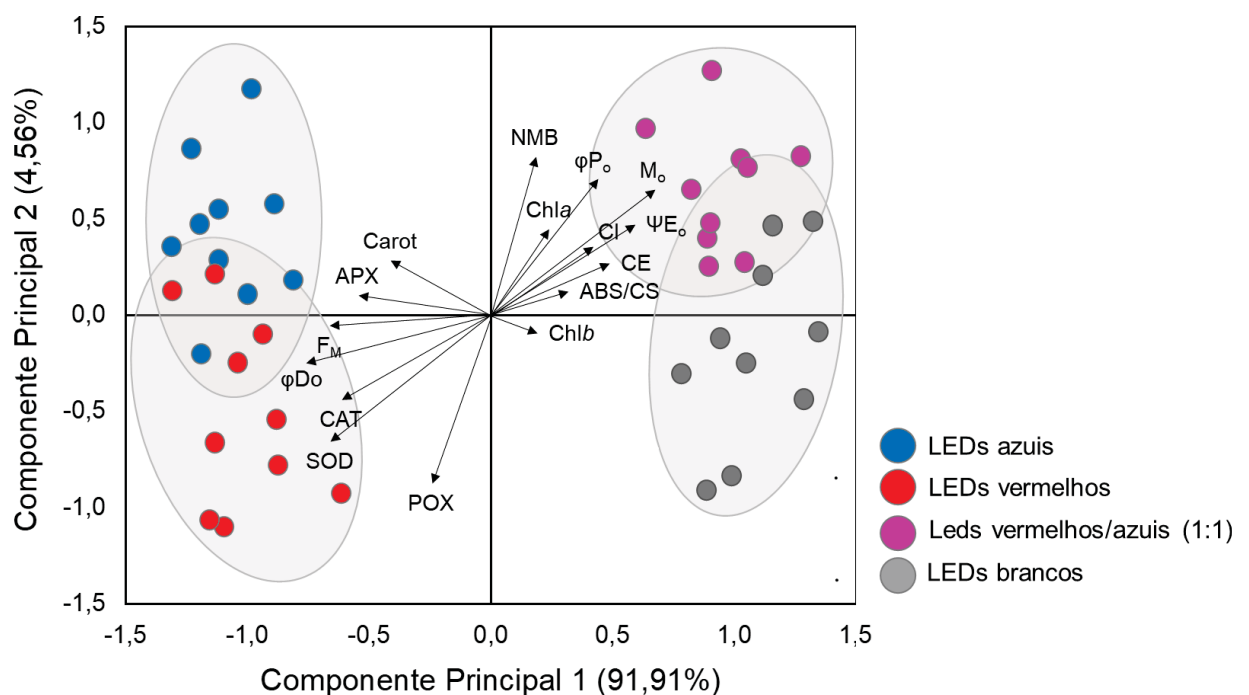
Legenda: SOD – superóxido dismutase; CAT – catalase; APX – ascorbato peroxidase; POX – peroxidases totais; LED V – LEDs vermelhos; LED V/A (1:1) – LEDs vermelhos e azuis (1:1); LED A – LEDs azuis; LED B – LEDs Brancos. Letras diferentes sobre as barras de desvio padrão representam diferenças estatísticas (Teste de Bonferroni, $p < 0,05$) das variáveis entre os tratamentos luminosos. Fonte: o autor.

3.2.5 Análise de componentes principais

A correlação entre as variáveis respostas com seus respectivos tratamentos foram avaliadas por meio da análise de componentes principais (PCA). As duas primeiras componentes explicaram juntas 96,4% da variabilidade dos dados (Figura 11). As variáveis altamente correlacionadas entre si (explantos com brotos, comprimento médio de brotos, número médio de regiões internodais, clorofila total, δR_o , ϕE_o , ϕR_o , TR_o/CS , ET_o/CS , DI_o/CS , Pl_{CS} , RC_{CS} , taxa de transpiração e taxa fotossintética) não foram consideradas para essa análise, pois apresentaram VIF > 10.

Os vetores no gráfico (Figura 11) apontaram a direção e a magnitude de cada parâmetro em relação aos componentes principais. Isto indica que o número médio de brotos, os teores de pigmentos fotossintéticos (chl a e chl b), alguns parâmetros de fchl a (M_o , ϕP_o , ΨE_o e ABS/CS) e parâmetros que estimam as trocas que ocorrem nas folhas (condutância estomática e carbono intrafoliar) estiveram altamente correlacionados com os brotos cultivados sob iluminação de LEDs V/A (1:1). Por sua vez, os pigmentos carotenoides, os parâmetros da fchl a F_M e ϕD_o e teores de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, APX e POX) estiveram altamente correlacionados aos brotos cultivados sob iluminação monocromática de LEDs vermelhos.

FIGURA 11 – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DAS VARIÁVEIS MORFOMÉTRICAS E FISIOLÓGICAS, REGISTRADAS NOS BROTO DE *Colletia paradoxa*, APÓS DOIS SUBCULTIVOS DE 30 DIAS, EM MEIO MS/2, SUPLEMENTADO DO 5,0 DE BENZILAMINOPURINA, EM FUNÇÃO DE DIFERENTES TRATAMENTOS LUMINOSOS POR DIODOS EMISSORES DE LUZ (LEDs).



Legenda: Chl a – clorofila a , Chl b – clorofila b , Carot – carotenoides, POX – peroxidases totais, SOD – superóxido dismutase, CAT – catalase, APX – ascorbato peroxidases, F_M – fluorescência máxima, ϕD_o - eficiência quântica máxima de excitação não fotoquímica, ABS/CS - número de fótons absorvidos por seção transversal da folha, ϕP_o - eficiência quântica máxima do fotossistema II, ΨE_o - probabilidade energia de excitação capturada pelo centro de reação mover um elétron após a plastoquinona A, M_o - taxa líquida de fotossistemas II fechados, CE – condutância estomática, CI – carbono intrafoliar, NMB – número médio de brotos.

4 DISCUSSÃO

O impacto dos diferentes comprimentos de onda emitidos por LEDs foi evidenciado pelas respostas morfogênicas dos brotos de *C. paradoxa* cultivados *in vitro*. A utilização de LEDs brancos resultou na maior porcentagem de explantes com brotos. Notavelmente, este sistema de iluminação exibiu o menor PPFD medido, equivalente a $9,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, entre as condições testadas. Apesar disso, observou-se uma resposta morfogênica positiva, que pode ser atribuída à ampla composição espectral dos LEDs brancos, a qual inclui picos significativos nas regiões do vermelho (620-630 nm), verde (520-530 nm), azul (450-470 nm) e amarelo (550-580 nm) (KLIMEK et al., 2022). Outros estudos já ressaltaram a eficácia da luz branca em estimular a regeneração de brotos no cultivo *in vitro* de *Eucalyptus urophylla* (MIRANDA et al., 2020) e *Zingiber officinale* (GNASEKARAN et al., 2022). Estudos adicionais sugeriram que a morfogênese dos vegetais não depende exclusivamente do PPFD, mas também da qualidade espectral da luz (BARCELO-MUNOZ et al., 2021). Assim, a interação entre a intensidade luminosa e o espectro de luz pode influenciar de maneira significativa o desenvolvimento dos brotos, uma vez que diferentes comprimentos de onda podem ativar caminhos metabólicos específicos e promover o desenvolvimento das plantas.

Os melhores resultados em relação ao comprimento médio dos brotos, bem como ao número médio de regiões internodais e ao número médio de brotos, foram obtidos nos explantes cultivados sob iluminação combinada de LEDs azul e vermelho na proporção de 1:1. Este sistema de iluminação apresentou um PPFD intermediário de $59,7 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, situando-se entre os valores observados para LEDs monocromáticos vermelhos ($75,9 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) e azuis ($42,9 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

Independentemente da intensidade luminosa, as respostas morfogênicas positivas observadas podem ser atribuídas à presença de pigmentos fotossensíveis nos explantes, como fototropinas e fitocromos. Esses pigmentos são capazes de absorver luz nas regiões do vermelho, do vermelho distante e, em menor grau, da luz azul. As fototropinas, que respondem a comprimentos de onda específicos da luz, desempenham um papel crucial na orientação do crescimento vegetal e na alocação de fotoassimilados para diversos órgãos vegetais (CIOCI et al., 2020). Por outro lado, os fitocromos, que reagem predominantemente à luz vermelha, regulam processos essenciais do desenvolvimento vegetal, como germinação, alongamento do caule e

floração (LABUZ et al., 2022). A combinação dessas respostas sugere uma sinergia entre os comprimentos de onda azul e vermelho no desenvolvimento dos brotos, conforme evidenciado por Li et al. (2020). Além disso, como destacado por Silos-Espino et al. (2023), diferentes comprimentos de onda da luz podem exercer efeitos complementares nas vias de sinalização que regulam o desenvolvimento das plantas. Os resultados indicaram que os comprimentos de onda amarelos e verdes, presentes nos LEDs brancos, não tiveram um impacto significativo no alongamento dos brotos, embora possam desempenhar um papel na sua regeneração inicial. Essa complexa interação entre os diferentes espectros de luz sublinha a importância de uma abordagem integrada na otimização de condições de cultivo em ambientes controlados. Por outro lado, foi observado que o desenvolvimento de brotações múltiplas foi inferior nos explantes cultivados sob iluminação de LEDs monocromáticos azuis ou vermelhos. Investigações anteriores apontaram que a exclusividade de um desses comprimentos de onda pode ter ativado apenas uma classe desses pigmentos fotossensíveis, conforme observado em *Lilium candidum* (PALKA et al., 2023) e *Gerbera jamesonii* (CIOC et al., 2022), resultando em respostas morfogênicas anormais. Portanto, as conclusões derivadas da presente avaliação indicaram que a iluminação exclusivamente azul ou vermelha não proporcionou um espectro suficientemente adequado para induzir a regeneração e alongamento de brotos *in vitro* de *C. paradoxa*.

Os experimentos também comprovaram o efeito de diferentes comprimentos de onda emitidos por LEDs nos teores de pigmentos dos brotos de *C. paradoxa* cultivados *in vitro*. Os maiores teores de *chl a*, *chl b* e *chl t* foram registrados nas plantas cultivadas sob a iluminação combinada de LEDs V/A (1:1). Resultados semelhantes foram obtidos na micropropagação de *Aeollanthus suaveolens* (ARAÚJO et al., 2021), *Verbena officinalis* (KUBICA et al., 2020), *Brassica oleracea*, *Raphanus sativus* e *Eruca vesicaria* (NTSOANE et al., 2024). Os altos níveis de *chl a*, *chl b* e *chl t* nas plantas cultivadas sob iluminação combinada de LEDs azuis e vermelhos na proporção de 1:1 sugeriram maior adaptabilidade dos brotos a esta condição de iluminação. Essa sinergia favorece tanto a síntese de clorofilas, quanto a absorção de elétrons para as atividades fotossintéticas.

As maiores concentrações de carotenoides foram identificadas nas plantas cultivadas sob iluminação de LEDs monocromáticos azuis ou vermelhos. Estudos

como os de Moreno-Jiménez et al. (2017) com *Capsicum annuum* e Araújo et al. (2021) com *Aeollanthus suaveolens* também constataram que as luzes monocromáticas, tanto azuis, quanto vermelhas, favorecem a produção de carotenoides e antocianinas. Esses pigmentos são componentes essenciais do complexo do centro de reação e desempenham papéis cruciais na coleta de energia luminosa e na proteção contra a foto-oxidação. Carotenoides captam energia luminosa em comprimentos de onda de 450 a 570 nm, nos quais as clorofilas não absorvem eficientemente, aumentando a eficiência fotossintética e protegendo a planta contra danos oxidativos (HERMANN et al., 2020). Diante disso, a elevada concentração de carotenoides nas plantas que apresentaram os níveis mais baixos de clorofilas sugeriu que a sua síntese pode ter sido induzida para compensar a deficiência desses pigmentos. Este fenômeno otimiza a absorção de energia luminosa e garante a alocação de carbono adequada às plantas, assim como observado por Park et al. (2019).

Os brotos de *C. paradoxa* cultivados *in vitro* apresentaram diferentes espectros de absorção de energia luminosa por seus pigmentos fotossintéticos em cada sistema luminoso de LEDs. As mudanças nas absorbâncias de cada comprimento de onda pelos vegetais constituem-se como reflexos de variações nas concentrações dos pigmentos fotossintéticos nas folhas (DE-BONI et al., 2007). A proporção relativa entre estes também influi na determinação do espectro, já que cada tipo de clorofila tem picos de absorção em distintos comprimentos de onda (MAGNEY et al., 2020). As clorofilas têm elevados picos de absorbância nas regiões vermelha e azul do espectro, de 660 a 680 e 420 a 440 nm (CHAZAUX et al., 2022). Diante disto, pode-se concluir que a alta absorbância da energia luminosa pelas plantas cultivadas em LEDs V/A (1:1) ou brancos, bem como a baixa absorbância destas quando cultivadas sob incidência de LEDs monocromáticos azuis ou vermelhos podem ter ocorrido por conta de seus altos ou baixos conteúdos de clorofila que se tornam suficientes ou não para saturar a absorção da energia luminosa.

As maiores dissipações de energia eletromagnética na forma de fluorescência da clorofila *a* (fchl_a) foram obtidas nos brotos cultivados sob LEDs monocromáticos vermelhos. Em contraste, as menores emissões de fChl_a foram registradas nas plantas cultivadas sob um sistema luminoso que utilizou LEDs na proporção de verde a azul (V/A) (1:1). As alterações nas cinéticas de emissão de fChl_a estão diretamente

relacionadas às principais reações físicas e químicas que ocorrem nos fotossistemas, incluindo a fotólise da água, o transporte de elétrons, a geração de gradientes de pH nas membranas tilacoides e a síntese de ATP (GOLTSEV et al., 2016).

É importante destacar que quanto maior a emissão de fluorescência (dissipação não fotoquímica), menor é a energia destinada à fotossíntese (dissipação fotoquímica), indicando, assim, potenciais danos estruturais e/ou fisiológicos nas vias metabólicas fotossintéticas (ERIEF et al., 2023). A elevada emissão de fchl_a pelos brotos de *C. paradoxa*, cultivados sob iluminação exclusivamente com LEDs vermelhos, sugeriu que essas fontes de luz monocromáticas induzem desequilíbrios na absorção de luz e na distribuição de energia redox, resultando em menores rendimentos fotossintéticos e em potenciais estresses foto-oxidativos.

Adicionalmente, os sistemas de iluminação com LEDs monocromáticos vermelhos apresentaram, entre os avaliados, os maiores valores de PPFD, com um total de $75,9 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Contudo, mesmo sob essas condições de alta intensidade luminosa, as plantas cultivadas sob sua incidência exibiram os menores rendimentos fotoquímicos. Uma hipótese que se pode considerar para esse fenômeno é que a composição espectral das lâmpadas utilizadas exerce uma influência significativa sobre a morfogênese das plantas, independentemente do fluxo de fótons disponível.

Este cenário evidencia a complexidade da relação entre a qualidade da luz, mensurada pelo PPFD, e as respostas fisiológicas das plantas, sugerindo que a simples intensidade luminosa não é um fator determinante isolado para a eficiência fotossintética. Portanto, a escolha do espectro de luz, juntamente com a intensidade, é fundamental para otimizar o desempenho das plantas em sistemas de cultivo controlados, ressaltando a necessidade de um entendimento mais profundo sobre as interações entre diferentes comprimentos de onda e suas implicações na fisiologia vegetal.

Os maiores valores de fchl_a a 0,01 ms (fase O – fluorescência inicial) e 1,0 ms (fase J) foram obtidos nos brotos de *C. paradoxa*, cultivados sob LEDs monocromáticos vermelhos. Durante a fase O-J a plastoquinona A (Q_A), aceptora primária de elétrons presente na proteína D1 do FSII, é gradualmente reduzida até alcançar um equilíbrio dinâmico com a oxidação da plastoquinona B (Q_B) pelo *pool* de plastoquinonas (PQ) (HAMMAMI et al., 2024). No entanto, um acúmulo de Q_A em estado reduzido (Q_A⁻) na cadeia transportadora de elétrons pode ocorrer quando

existem danos fotoinibitórios na proteína D1 do FSII (GOLTSEV et al., 2016). Este fenômeno pode ser detectado por um incremento na fluorescência inicial, indicando maior dissipação da energia luminosa de maneira não fotoquímica pelos complexos antena nos FSII (MURCHIE e LAWSON, 2013).

Os maiores valores da fchla a 30 ms (fase I) e a 150 ms (fase P, fluorescência máxima) também foram registrados nas plantas cultivadas sob LEDs monocromáticos vermelhos. Na fase I há um equilíbrio entre a redução e a reoxidação do *pool* de PQ pelo fotossistema I (FSI) (TSIMILLI-MICHAEL 2020). Este fenômeno reflete a redução dos receptores finais de elétrons no lado acceptor deste fotossistema como a ferredoxina (FR), o citocromo b6f (cb6f) e a plastocianina (PC) (KUMAR et al., 2020). Na fase P todos os aceptores de elétrons nos FSII e FSI são reduzidos para metabolizar NADPH e ATP (REN et al., 2024). O pronunciamento da fase I-P (assim como observado nas plantas cultivadas sob LEDs monocromáticos vermelhos) reflete situações de estresses para os vegetais diante de desequilíbrios nas reações redox realizadas pelas moléculas na cadeia transportadora de elétrons. Esses desequilíbrios causam acúmulo de transportadores em estado reduzido, bloqueando temporariamente as reações fotoquímicas e resultando em um aumento acentuado no rendimento de fluorescência (GOLTSEV et al., 2016). Diante disto, conclui-se que os explantes cultivados sob LEDs monocromáticos vermelhos foram os que mais sofreram com estresses em seus complexos fotoquímicos.

Os maiores valores dos parâmetros δR_o e ΨE_o foram registrados nas plantas cultivadas sob iluminação de LEDs V/A (1:1). Eles indicaram, respectivamente, a probabilidade de um elétron ser transportado da Q_A até o acceptor de elétrons do FSI e também a probabilidade da energia de excitação capturada pelos centros de reação do FSII moverem um elétron após a Q_A nos aparatos fotossintéticos (GOLTSEV et al., 2016). Portanto, estes resultados indicaram que nas plantas cultivadas sob LEDs V/A (1:1), os brotos de *C. paradoxa* apresentaram os maiores rendimentos quânticos fotossintéticos. Outros estudos corroboram com esses resultados, indicando que a combinação de luzes vermelhas e azuis pode otimizar o desempenho fotossintético das plantas. Segundo Xu et al. (2020), a luz vermelha é eficaz na promoção da atividade do FSII, enquanto a luz azul é crucial para a abertura estomática e a fotomorfogênese. A sinergia entre esses comprimentos de onda pode, portanto, melhorar a eficiência do transporte de elétrons e a utilização da energia fotossintética,

resultando em um aumento do rendimento quântico fotossintético, assim como observado na micropropagação de *Cunninghamia lanceolata* (XU et al., 2020), *Artemisia argyi* (SU et al., 2024) e *Arthrospira platensis* (ZITTELLI et al., 2022).

Os maiores valores de ϕP_o , ϕE_o e ϕR_o também foram registrados nos explantes cultivados sob irradiação de LEDs V/A (1:1). Os parâmetros correspondem, respectivamente, a eficiência quântica máxima do FSII, a eficiência de transporte de elétrons e a eficiência dos elétrons em atingirem os aceptores do FSI (GOLTSEV et al., 2016). De acordo com Strasser et al. (2004), plantas fisiologicamente saudáveis apresentam valores de ϕP_o iguais ou superiores a 0,83. Diante disto, conclui-se que os explantes de *C. paradoxa* cultivados sob LEDs V/A (1:1) ou brancos apresentam-se com aparatos fotossintéticos ativos, com valores respectivos de 0,92 e 0,86. Em contrapartida, aqueles cultivados sob iluminação monocromática de LEDs azuis ou vermelhos estavam sujeitos à fotoinibição por danos nos mecanismos fotoquímicos, já que apresentaram valores de ϕP_o de 0,74 e 0,53, respectivamente.

Os maiores valores de ϕD_o foram registrados nas plantas cultivadas sob LEDs monocromáticos vermelhos. Isto explicita que nestas condições de iluminação, as plantas apresentaram as maiores eficiências quânticas máximas de excitação não fotoquímica (GOLTSEV et al., 2016). Este fenômeno favorece maior dissipação de energia como calor e fluorescência já que a planta, sob condições de estresse, torna-se incapaz de armazenar a energia de excitação como energia redox (SPANIC et al., 2021). Diante disto, conclui-se que sob iluminação monocromática vermelha, os brotos de *C. paradoxa* cultivados *in vitro* destinaram menor energia luminosa aos processos fotossintéticos do que os brotos presentes nos outros sistemas luminosos avaliados.

A maior taxa líquida de centros de reação oxidados no FSII (M_o) foi registrada nos brotos de *C. paradoxa*, cultivados sob a combinação de LEDs vermelhos e azuis (1:1). Este parâmetro do perfil da fluorescência da clorofila indica a quantidade de centros de reação ativos ao longo da bicamada lipídica da célula por secção transversal da folha (GOLTSEV et al., 2016). Quanto maior essa taxa, melhor será a adaptação da planta para dissipar energia sob condições luminosas adversas (ARIEF et al., 2023). Em condições favoráveis ao desenvolvimento das plantas, teores mais elevados de clorofilas estão associados a maiores valores de M_o , os quais são essenciais para absorver o fluxo de fótons oriundos da energia luminosa (KUMAR et al., 2020).

No sistema de iluminação por LEDs vermelhos/azuis (1:1), foram observado os mais altos valores dos fluxos fenomenológicos por área de secção transversal da folha, incluindo absorção de luz (ABS/CS), eficiência de captura de elétrons (TR_o/CS) e eficiência de transporte de elétrons (ET_o/CS). Os altos valores destes parâmetros proporcionam sinergia metabólica dos complexos fotossintéticos que permitem melhorar a capacidade das plantas de absorver e conduzir elétrons por meio da cadeia transportadora de elétrons durante a fotossíntese (GOLTSEV et al., 2016). Outros estudos com a micropropagação de espécies como *Cunninghamia lanceolata* (XU et al., 2020), *Artemisia argyi* (SU et al., 2024) e *Arthrospira platensis* (CHINI-ZITTELLI et al., 2022) corroboraram com os resultados do presente estudo, indicando que a combinação de luzes vermelhas e azuis pode otimizar o desempenho fotossintético das plantas.

Os maiores valores de dissipação de energia por área de secção transversal da folha (DI_o/CS) foram registrados nos explantes de *C. paradoxa* cultivados sob iluminação monocromática de LEDs vermelhos. Este parâmetro representa a proporção da dissipação total de energia de excitação não capturada de todos os centros de reação por seção transversal da folha (SPANIC et al., 2021). O alto valor de DI_o/CS nas plantas sob esta condição luminosa pode ser atribuído à inatividade de seus centros de reação (seus baixos valores de M_o), resultando na ineficaz captura de fótons pelos centros ativos. Consequentemente, a energia eletromagnética é predominantemente dissipada como calor ou fluorescência. Como consequência, os explantes sob iluminação exclusivamente vermelha apresentaram os mais baixos níveis de ABS/CS, TR_o/CS e ET_o/CS. Esses resultados indicaram que a iluminação monocromática de LEDs vermelhos resultou em baixo aproveitamento da energia luminosa pelas plantas, devido à baixa atividade dos centros de reação e a ineficiente condução de elétrons através da cadeia transportadora durante a fotossíntese.

Os parâmetros PI/CS e RC/CS baseiam-se na premissa de que o potencial total de um sistema pode ser calculado multiplicando a equação de Nernst para seus componentes individuais (ARIEF et al., 2023). O índice de desempenho, PI, é calculado de maneira similar à equação de Goldman, com base em três componentes: 1) eficiência de absorção de elétrons pelo FSII; 2) eficiência de aprisionamento de elétrons nos centros de reação do FSII; e 3) eficiência de transporte de elétrons pelos transportadores intersistema como a ferredoxina, citocromo b6f e a plastocianina

(REN et al., 2024). Diante disto, os altos valores de PI/CS e RC/CS registrados nos explantes cultivados sob LEDs vermelhos/azuis (1:1) podem ter sido reflexos da alta absorção e conservação de energia luminosa que foi utilizada para o metabolismo fotossintético. O contrário se aplica para os explantes cultivados sob LEDs monocromáticos vermelhos, onde os baixos valores de PI/CS e RC/CS mostram que a energia luminosa foi rapidamente dissipada, diminuindo a fotoinibição e reduzindo o rendimento do transporte de elétrons da Q_A^- para o intersistema de aceptores de elétrons.

O presente estudo demonstrou que os diferentes comprimentos de ondas por LEDs influenciaram os parâmetros relativos a trocas gasosas nos brotos de *C. paradoxa* cultivados *in vitro*. Sabe-se que na micropropagação os explantes são cultivados em frascos vedados, os quais impedem a realização de trocas gasosas com o ambiente externo e favorecem o aumento da umidade relativa do ar (CARDOSO et al., 2018). No entanto, trabalhos recentes vêm destacando que mesmo com parte de seus estômatos não funcionais, as plantas realizam trocas gasosas no microambiente dentro dos frascos de cultivo, sendo a avaliação deste fenômeno um fator importante para estabelecer as melhores condições para morfogênese dos explantes (SILVA et al., 2022; PEPE et al., 2022; MIRANDA et al., 2024).

Os brotos cultivados sob iluminação de LEDs V/A (1:1) apresentaram os valores mais elevados de condutância estomática, teor intracelular de carbono, taxa de transpiração e taxa fotossintética. Estes resultados indicaram que a sinergia destes dois comprimentos luminosos é capaz de favorecer a eficiência na absorção de CO_2 e a conversão de energia luminosa em energia química pelos explantes cultivados *in vitro*. Estudos realizados com *Brassica napus* corroboraram com esses resultados, destacando o papel crucial da luz vermelha e azul na abertura estomática e transpiração foliar durante o cultivo *in vitro* (SALEEM et al., 2020). Por outro lado, os brotos cultivados sob iluminação exclusiva de LEDs vermelhos apresentaram os valores mais baixos de condutância estomática, teor intracelular de carbono, taxa de transpiração e taxa fotossintética. Isso sugere que a ausência de outros comprimentos de onda, como o azul, pode ter impactado negativamente na fisiologia de *C. paradoxa*. Uma pesquisa que investigou o cultivo *in vitro* de *Cyclocarya paliurus* também demonstrou que LEDs monocromáticos vermelhos podem ter efeitos inibitórios na abertura estomática da planta, diminuindo sua taxa de transpiração e sua taxa

fotossintética (LIU et al., 2018).

Um fator importante para destacar é que mesmo em diferentes escalas espaciais e levando em consideração a coexistência da respiração mitocondrial, a taxa fotossintética mensurada pelo IRGA corroborou com os resultados obtidos pela avaliação de fchla. A fotossíntese medida pelo equipamento infravermelho representa a troca líquida de CO₂, ou seja, a fotossíntese bruta menos o CO₂ produzido pela respiração e fotorrespiração (BUSCH et al., 2024). Kalaji et al., (2016) destacaram uma relação deste fenômeno com o parâmetro ET₀/CS da fchla, já que este corresponde a eficiência de transporte linear de elétrons da H₂O (ou seja, do FSII) até o NADPH para o ciclo de Calvin-Benson (ET₀/CS). Esta relação foi comprovada pelo presente estudo, já que no tratamento onde foram obtidas as maiores taxas fotossintéticas pelo IRGA (plantas cultivadas sob LEDs V/A), também foi obtido o maior valor de ET₀/CS. Por sua vez, no tratamento que ocorreu as menores taxas fotossintéticas pelo IRGA (plantas cultivadas sob LEDs monocromáticos vermelhos), também foi obtido o menor valor de ET₀/CS.

Além das trocas gasosas, os comprimentos de ondas luminosas emitidos por LEDs também afetaram o metabolismo antioxidante dos brotos de *C. paradoxa* cultivados *in vitro*. Observou-se que os cultivos sob iluminação monocromática de LEDs vermelhos apresentaram os maiores teores de SOD, CAT, APX e POX. Sabe-se que a utilização inadequada da energia luminosa durante a fotossíntese leva ao acúmulo de substâncias oxidativas como as espécies reativas do oxigênio (EROs) (RAJPUT et al., 2021). Estas são principalmente originadas a partir da fotossíntese nos cloroplastos e na respiração celular nas mitocôndrias (AZEVEDO et al., 1998). As enzimas antioxidantes são cruciais na eliminação do oxigênio reativo em vegetais (RAJPUT et al., 2021). A primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica é a enzima SOD. A SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido (O₂⁻) em oxigênio (O₂) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (GIANNOPOLITIS e RIES, 1977). As CAT, APX e POX, por sua vez, removem H₂O₂ dos peroxissomas e do citoplasma das células sob estresse oxidativo (AZEVEDO et al., 1998). No presente estudo, os altos conteúdos destas enzimas nos explantes cultivados sob LEDs monocromáticos vermelhos indicaram condições de estresse oxidativo. Por outro lado, os menores registros de atividade de SOD, CAT, APX e POX nas plantas cultivadas sob incidência de LEDs V/A (1:1) podem ser atribuídos a presença de menores índices

de EROs nos tecidos vegetais nestas condições dos cultivos. Outros estudos com *Cunninghamia lanceolata* (XU et al., 2020b) e *Nasturtium officinale* (KLIMEK-SZCZYKUTOWICZ et al., 2022) evidenciaram que sob a sinergia de LEDs vermelhos e azuis, os vegetais estariam em condições de menos estresse, eliminando com efetividade o excesso de EROs, diminuindo a peroxidação lipídica e os danos ao aparelho fotossintético.

Na análise de PCA, o número médio de brotos, os teores de pigmentos fotossintéticos (chl_a e chl_b) e alguns parâmetros da fchl_a (M_o , ϕP_o , ΨE_o e ABS/CS) correlacionaram-se positivamente entre si e também com o sistema de iluminação por LEDs V/A (1:1). Isto confirmou que além de favorecer a síntese de clorofilas, a sinergia entre as luzes vermelhas e azuis também favoreceram a fotossíntese dos explantes de *C. paradoxa*. A correlação foi observada, possivelmente, porque os teores de clorofilas são indicadores da capacidade fotossintética das plantas, já que estas são as principais moléculas envolvidas na captura de luz para a fotossíntese (CHAZAUX et al., 2022). De acordo com Li e Yi (2020), em condições favoráveis ao desenvolvimento das plantas, os teores mais elevados de clorofilas estão associados a um maior número de centros de reação em estado oxidado (M_o), os quais são essenciais para absorver o fluxo de elétrons originado pela energia luminosa (ABS/CS). Isto favorece uma maior eficiência quântica no FSII (ϕP_o) que contribuiu para redução e reoxidação dos receptores de elétrons. Este processo garantiu um gradiente de transporte de elétrons (ΨE_o) que culmina na síntese de ATP e NADPH.

Os parâmetros relativos as trocas gasosas (condutância estomática e carbono intrafoliar) também foram correlacionados positivamente com o sistema de iluminação por LEDs V/A (1:1). Nessas condições luminosas, com uma alta condutância estomática, os brotos de *C. paradoxa* apresentaram altos níveis de carbono intrafoliar. Este fenômeno pode explicar, por exemplo, porque sob LEDs V/A (1:1) obteve-se o maior número médio dos brotos, visto que o carbono intracelular, resultado da fixação de CO₂ durante a fotossíntese, é utilizado na síntese de carboidratos e, conseqüentemente, de biomassa para as plantas crescerem e se desenvolverem. Estes resultados corroboraram com o estudo de Haworth et al., (2018), que destacou a correlação positiva entre ϕP_o e a condutância estomática. Além disto, a correlação negativa observada entre as trocas gasosas e a dissipação da fchl_a pode ser entendida

como um reflexo de maior eficiência de carboxilação ribulose-1,5- bifosfato (Rubisco) nas plantas cultivadas sob LEDs V/A (1:1). Isto, porque, conforme observado por Murchie e Lawson (2013), os eventos de carboxilação são os maiores contribuintes para dissipação fotoquímica da energia luminosa, sucedendo em uma menor dissipação em forma de fchl_a (dissipação não fotoquímica). Diante do apresentado, observou-se que a regeneração dos brotos de *C. paradoxa in vitro* foi altamente dependente da interação entre o teor de clorofilas, a eficiência quântica do FSII, a condutância estomática e o carbono intrafoliar. Esses parâmetros não atuaram isoladamente, mas sim em uma complexa rede de inter-relações que determinaram a eficiência fotossintética e, conseqüentemente, o crescimento e desenvolvimento das plantas.

Os parâmetros de fchl_a F_M e ϕD_o , além dos níveis de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, APX e POX) correlacionaram-se positivamente entre si e também com o sistema composto por LEDs monocromáticos vermelhos. Como discutido anteriormente, os níveis de enzimas antioxidantes refletiram a geração de EROs como resultado do acúmulo de (Q_A⁻) na cadeia transportadora de elétrons. Esses radicais livres são os principais responsáveis por danos estruturais na proteína D1 do FSII e também pela destruição do *cluster* Mn presente no complexo de evolução de oxigênio (GUIDI et al., 2019). Em instâncias finais, os fenômenos supracitados tenderam a aumentar a eficiência quântica máxima de excitação não fotoquímica (ϕD_o) das plantas analisadas; fazendo com que a energia eletromagnética fosse dissipada em forma de fluorescência (F_M). Assim como apontaram Murchie e Lawson (2013), o aumento da fchl_a nestas condições se configura como um recurso fotoprotetor que remove o excesso de energia de excitação dos complexos fotoquímicos, prevenindo a formação de mais radicais livres prejudiciais para as membranas cloroplastídeas.

A correlação positiva entre a fchl_a (F_M e ϕD_o) e os níveis de carotenoides obtida na PCA foi sustentada pelos estudos de Murchie e Niyogi (2011) e Ruban et al., (2012). Os autores apontaram que os níveis de carotenoides possuem um papel fundamental na dissipação de energia na forma de fchl_a. De acordo com os seus estudos, estes pigmentos contribuíram para acidificação do lúmen do tilacoide resultando em mudanças conformacionais no complexo antena do FSII que induziram a dissipação de energia não fotoquímica.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os diferentes comprimentos de onda fornecidos pelos LEDs influenciaram o desenvolvimento das brotações e o metabolismo fotossintético dos explantes de *C. paradoxa* cultivados *in vitro*. Para a regeneração dos brotos, recomenda-se o cultivo em meio MS/2, suplementado com 5,0 μ M de BAP, sob iluminação combinada de LEDs vermelhos e azuis na proporção de 1:1, com dois subcultivos de 30 dias. Essas condições luminosas favoreceram a síntese de clorofilas, resultando em maior eficiência fotossintética, aumento no número de brotos e maior produção de biomassa, além de promoverem intensificação nas trocas gasosas. A combinação de LEDs vermelhos e azuis também contribuiu para o aumento da condutância estomática e para níveis elevados de carbono intrafoliar, otimizando o processo fotossintético.

A exposição à luz monocromática, tanto azul quanto vermelha, gerou maior estresse oxidativo nos brotos. Esses achados sugerem que, mesmo em condições de cultivo *in vitro*, caracterizadas pela presença de carboidratos no meio de cultura e vedação dos frascos, o crescimento de *C. paradoxa* depende de uma rede complexa de interações entre a luz, a eficiência fotoquímica, as trocas gasosas no microambiente de cultivo e os mecanismos antioxidantes. Portanto, condições de iluminação adequadas podem otimizar a micropropagação da espécie, melhorando o seu desenvolvimento *in vitro*.

6 PERSPECTIVAS

- Investigar novas combinações de comprimentos de onda de LEDs ou até outros tipos de iluminação (como luz ultravioleta ou infravermelha) para verificar se há um efeito sobre o crescimento, morfogênese e fotossíntese de *C. paradoxa*.
- Testar a influência dos LEDs durante o enraizamento e aclimatização dos explantes propagados *in vitro*.
- Estudos histológicos podem complementar as análises fisiológicas do presente estudo, demonstrando as possíveis alterações anatômicas e estruturais dos tecidos e cloroplastos diante de diferentes composições luminosas no cultivo *in vitro*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, N. et al. An academic and technical overview on plant micropropagation challenges. **Horticulturae**, v. 8, n. 8, p. 677, 2022.

AKINWANDE, M. O. et al. Variance inflation factor: as a condition for the inclusion of suppressor variable (s) in regression analysis. **Open Journal of Statistics**, v. 5, n. 07, p. 754, 2015.

ALVARADO, A. C.; CARDOSO, J. C. Development, chlorophyll content, and nutrient accumulation in Vitro shoots of *Melaleuca alternifolia* under light wavelengths and 6-BAP. **Plants**, v. 13, n. 20, p. 2842, 2024.

ARAÚJO, D. X. et al. Photon flux density and wavelength influence on growth, photosynthetic pigments and volatile organic compound accumulation in *Aeollanthus suaveolens* (catinga-de-mulata) under in vitro conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 168, p. 113597, 2021.

ARIEF, M. A. A. et al. Chlorophyll fluorescence imaging for early detection of drought and heat stress in strawberry plants. **Plants**, v. 12, n. 6, p. 1387, 2023.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 85, n. 2, p. 235-241, 1992.

ASHKANANI, J. et al. Micropropagation and field evaluation of micropropagated plants of *Ziziphus spinachristi*. **Acta Horticulturae**, n. 993, p. 77-82, 2013.

ASHKANANI, J. et al. Micropropagation of *Ziziphus mauritiana* resistant to stem gall infection. **Acta Horticulturae**, n. 1116, p. 77-81, 2016.

ATTAYA, A. S. LED Light technology as a source of illumination and a promising method for *Stevia rebaudiana* Elite propagation. **Egyptian Journal of Agronomy**, v. 43, n.1, p. 123–132, 2021.

AZEVEDO, R. A. et al. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v. 12, n. 3, 1998

BABU, G. A. et al. Improved sterilization techniques for successful *in vitro* micropropagation. In: **Commercial Scale Tissue Culture for Horticulture and Plantation Crops**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2022. p. 1-21.

BANDONI A. L. et al. Survey of Argentine medicinal plants: folklore and phytochemical Screening **Economic Botany**, v. 30, p. 161-185, 1976.

BARCELÓ-MUÑOZ, A. et al. Effect of LED lighting on physical environment and microenvironment on in vitro plant growth and morphogenesis: the need to standardize lighting

conditions and their description. **Plants**, v. 11, n. 1, p. 60, 2022.

BARCISZEWSKI, J. et al. Kinetin - a multiactive molecule. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, n. 3, p. 182-192, 2007.

BASTOS-ZÁCHIA, N. R. et al. Genetic diversity and population structure of *Colletia paradoxa* (Rhamnaceae) a medicinal species threatened with extinction in Brazil. **Plant Biosystems**, v. 155, n. 3, p. 579-586, 2021.

BASTOS-ZÁCHIA, N. R. et al. Phytochemical analysis and evaluation of antioxidant and antimycobacterial activity of *Colletia paradoxa* from Brazil. **Natural Product Research**, v. 35, n. 5, p. 802-806, 2020.

BATISTA, D. S. et al. Light quality in plant tissue culture: does it matter? **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 54, n. 3, p. 195-215, 2018.

BELLO, A. M. et al. Determination of the best culture medium and plant growth regulators for micropropagation of neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss). **International Journal of Horticultural Science and Technology**, v. 9, n. 2, p. 237- 245, 2022.

BHAGOOOI, R. et al. Chlorophyll fluorescence—A tool to assess photosynthetic performance and stress photophysiology in symbiotic marine invertebrates and seaplants. **Marine Pollution Bulletin**, v. 165, p. 112059, 2021.

BJÖRN, L. O et al. A viewpoint: why chlorophyll a? **Photosynthesis research**, v. 99, p. 85-98, 2009.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, 1976.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Portaria n. 443 de 17 de dezembro de 2014. Lista oficial da flora brasileira ameaçada de extinção. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, n. 245, p. 110-121, 18 dez. 2014.

CARDOSO, J. C. et al. Micropropagation in the twenty-first century. **Plant cell culture protocols**, p. 17-46, 2018.

CENTRO NACIONAL DE CONSERVAÇÃO DA FLORA - CNCFlora. *Colletia paradoxa*. <<http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Colletiaparadoxa>>. Acesso em 02/10/2022.

CHAZAUX, M. et al. Precise estimation of chlorophyll a, b and carotenoid content by deconvolution of the absorption spectrum and new simultaneous equations for Chl determination. **The Plant Journal**, v. 109, n. 6, p. 1630-1648, 2022.

CHEN, Y. C. et al. Topolins and red light improve the micropropagation efficiency of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Hortscience**, v. 55, n. 1, p. 1337–1344, 2020.

CHENG, M. C. et al. Phytochrome signaling networks. **Annual Review of Plant Biology**, v. 72, p. 217-244, 2021.

CIOĆ, M. et al. Changes in endogenous phytohormones of *Gerbera jamesonii* axillary shoots multiplied under different light emitting diodes light quality. **Molecules**, v. 27, n. 6, p. 1804, 2022.

CIOĆ, M.; PAWŁOWSKA, B. Leaf response to different light spectrum compositions during micropropagation of *Gerbera* axillary shoots. **Agronomy**, v. 10, n. 11, p. 1832, 2020.

CUONG, D. M. et al. Effects of LED lights on expression of genes involved in phenylpropanoid biosynthesis and accumulation of phenylpropanoids in wheat sprout. **Agronomy**, v. 9, n. 6, p. 307, 2019.

DA-SILVA, L. M. et al. Micropropagation of interspecific hybrids of *Vitis* spp. in microenvironments with different gas exchanges. **Scientia Horticulturae**, v. 305, p. 111413, 2022.

DA-CUNHA, S. H. B. et al. Influência da qualidade de luz no crescimento e acúmulo de voláteis de *Mentha spicata* cultivada *in vitro*. **Scientia Plena**, v. 15, n. 9, 2019.

D'AMBROGIO, A. N. A.; MEDAN, D. Comportamiento reproductivo de *Colletia paradoxa* (Rhamnaceae). **Darwiniana**, v. 3, p. 1-14, 1993.

DE-BONI, L. et al. Excited state absorption spectrum of chlorophyll a obtained with white-light continuum. **The Journal of Chemical Physics**, v. 126, n. 16, 2007.

DELGADO-PAREDES, G. E. et al. Protocol for *ex vitro* and *in vitro* micropropagation of *Cucurbita moschata* and *C. ecuadorensis*, native to Peru and Ecuador, of nutritional and medicinal importance. **Scientia Agropecuaria**, v. 14, n. 1, p. 127-137, 2023.

DINÇER, D. et al. Germination and micropropagation of *Crataegus monogyna* Jacq. seeds by tissue culture method. **Forest Science**, v. 69, n. 2, p. 178-186, 2023.

DJANGALINA, E. D. et al. Influence of light-emitting diodes on the efficiency of valuable woody plants micropropagation. **International Journal of Biology and Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 49-57, 2023.

DOS-SANTOS, K. C. F. et al. *In vitro* multiplication of wild *Manihot* species with different naphthaleneacetic acid and benzylaminopurine concentrations. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v. 43, p. 52866-52866, 2021.

FAIZE, M. et al. Application of *Ascophyllum nodosum*-based soluble extract on micropropagation and regeneration of *Nicotiana benthamiana* and *Prunus domestica*. **Plants**, v. 10, n. 07, p. 1354, 2021.

FAVERO, B. T. et al. *Anthurium andraeanum* senescence in response to 6-

benzylaminopurine: Vase life and biochemical aspects. **Postharvest Biology and Technology**, v. 161, p. 111084-111098, 2020.

FOYER, C. H. Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. **Environmental and Experimental Botany**, v. 154, p. 134-142, 2018

GAMMOUDI, N. et al. Establishment of optimized *in vitro* disinfection protocol of *Pistacia vera* L. explants mediated a computational approach: multilayer perceptron– multi– objective genetic algorithm. **Plant Biology**, v. 22, n. 1, p. 1-13, 2022.

GIACOMELLI, S. R. et al. **Estudo fitoquímico de três espécies pertencentes à família Rhamnaceae: *Discaria americana*, *Colletia paradoxa* e *Gouania ulmifolia*. Tese de Doutorado.** Universidade Federal de Santa Maria, 2005.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: II. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. **Plant physiology**, v. 59, n. 2, p. 315-318, 1977.

GNASEKARAN, P. et al. Regulation of chloroplast ultrastructure, adventitious bud anatomy and clonal fidelity of in vitro *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade plantlets in response to LED spectral quality. **Industrial Crops and Products**, v. 181, p. 114825, 2022.

GOSHO, M. et al. Bias in odds ratios from logistic regression methods with sparse data sets. **Journal of Epidemiology**, v. 33, n. 6, p. 265-275, 2023.

GOTELLI, M. et al. Pollen, tapetum, and orbicule development in *Colletia paradoxa* and *Discaria americana* (Rhamnaceae). **The Scientific World Journal**, v. 3, p. 33-42, 2012.

GUPTA, N. et al. A review on micropropagation culture method. **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development**, v. 8, n. 1, p. 86-93, 2020.

HALLMARK, H. Tucker et al. trans-zeatin-N-glucosides have biological activity in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS One**, v. 15, n. 5, p. e0232762, 2020.

HAN, S. et al. Tissue culture and rapid propagation technology for *Gentiana rhodantha*. **Open Life Sciences**, v. 18, n. 1, p. 20220565, 2023.

HANSIKA, K. P. et al. Micro propagation of jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) through shoot tip and nodal segment culture. **Plants**, v. 12, n. 1, p. 26-39, 2017.

HART, J. E.; GARDNER, K. H. Lighting the way: Recent insights into the structure and regulation of phototropin blue light receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 296, p. 261-283, 2021.

HEGAZI, G. A. et al. In vitro propagation of nab tree (*Ziziphus spina-christi* (L.) Desf.). In: **IX International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding** 1187, p. 69-78, 2016.

HU, X. et al. Research progress in the interconversion, turnover and degradation of

chlorophyll. **Cells**, v. 10, n. 11, p. 3134, 2021.

HUO, J. et al. The influence of varying wavelengths of LED Light on the development, physiology response, and metabolism activities of micropropagated *Dendrobium* Hybrid 'Shuijing' Plantlets. **Horticulturae**, v. 10, n. 8, p. 774, 2024.

IOANNIDIS, K. et al. Potential and constraints on *In vitro* micropropagation of *Juniperus drupacea* Labill. **Forests**, v. 14, n. 1, p. 142, 2023.

ISDA, M. N. et al. Effect of 6-benzylaminopurine and honey for *in vitro* shoot initiation of mangosteen seed explant from riau, Indonesia. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1, n. 4, p. 012029-012042, 2019.

JAMESON, P. E. Zeatin: The 60th anniversary of its identification. **Plant Physiology**, v. 192, n. 1, p. 34-55, 2023.

JIANG, L. et al. Responses of *Favorita potato* plantlets cultured in vitro under fluorescent and light-emitting diode (LED) light sources. **American Journal of Potato Research**, v. 96, n. 4, p. 396-402, 2019.

JOHNSTON, M. C. FREITAS-SOARES, M. A. Ramnáceas. In: REITZ, P. R. [Org.]: **Flora Illustrada Catarinense**, 1972.

JUSSIEU, A. **Genera plantarum secundum ordines naturales disposita juxta methodum in horto regio parisiensi exaratam**. Veuve Herissant, 1789.

KAMRAN, M. et al. Application of abscisic acid and 6-benzylaminopurine modulated morpho-physiological and antioxidative defense responses of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) by minimizing cobalt uptake. **Chemosphere**, v. 263, p. 128169- 128182, 2021.

KHOROBYKH, S. et al. Oxygen and ROS in photosynthesis. **Plants**, v. 9, n. 1, p. 91, 2020.

KHUN, S. et al. Effect of different concentrations and combinations of benzyl aminopurine and indole-3-butyric acid on micropropagation of *Vanilla planifolia*. **Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 90734- 90742, 2023.

KLIMEK-SZCZYKUTOWICZ, M. et al. The influence of different wavelengths of LED light on the production of glucosinolates and phenolic compounds and the antioxidant potential in in vitro cultures of *Nasturtium officinale* (watercress). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 149, n. 1, p. 113-122, 2022.

KOCHETOVA, G. V. et al. Effects of red and blue LED light on the growth and photosynthesis of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 42, n. 3, p. 1804-1820, 2023.

KOVACEVIC, N. et al. Comparative study of anthraquinones from embryogenic callus tissue and zygotic embryos of *Frangula alnus* and *Rhamnus catharticus*. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, n. 5, p. 321-325, 2005.

KRAUS, T. E. et al. Paclobutrazol-induced Tolerance of Wheat Leaves to Paraquat May Involve Increased Antioxidant Enzyme Activity. **Journal of Plant Physiology**, v. 145, n. 4, p. 570–576, 1995.

KUBICA, P. et al. *Verbena officinalis* (common vervain)—a review on the investigations of this medicinally important plant species. **Planta Medica**, v. 86, n. 17, p. 1241-1257, 2020.

ŁABUZ, J. et al. Molecular insights into the phototropin control of chloroplast movements. **Journal of Experimental Botany**, v. 73, n. 18, p. 6034-6051, 2022.

LENCINA, K. H. et al. Introduction of nodal segments and *in vitro* rooting of *Apuleia leiocarpa*. **Ciência Florestal**, v. 30, p. 1290-1298, 2020.

LEZCANO, M. I. D. et al. Micropropagation of *Handroanthus heptaphyllus* (VELL.) Mattos from nodal segments. **Revista De La Sociedad Científica Del Paraguay**, v. 26, n. 1, p. 49-63, 2021.

LI, L. et al. Bending to auxin: fast acid growth for tropisms. **Trends in Plant Science**, v. 27, n. 5, p. 440-449, 2022

LI, R. et al. Addition of white light to monochromatic red and blue lights alters the formation, growth, and dormancy of in vitro-grown *Solanum tuberosum* L. microtubers. **HortScience**, v. 55, n. 1, p. 71-77, 2020.

LICHTENTHALER, H. K. et al. Photosynthesis Research. **Photosynthesis**, v. 2, n. 1, p. 83-105, 1983.

LIMA, R. B. **A família Rhamnaceae no Brasil: diversidade e taxonomia**. 2001. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

LIMA, R. B. et al. **Rhamnaceae**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB108426>>. Acesso em: 04/10/2022.

LIMA, R. B.; GIULIETTI, A. M., 2014. Synonymies and typification of the Rhamnaceae of Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 28, n. 3, p. 45-67, 2014.

LIŠKOVÁ, D. et al. *Karwinskia* species (buckthorn): *in vitro* culture, micropropagation, and the production of toxin anthracenone. In: **Medicinal and Aromatic Plants XI**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2003. p. 223-242.

LIU, Y. et al. Responses of morphology, gas exchange, photochemical activity of photosystem II, and antioxidant balance in *Cyclocarya paliurus* to light spectra. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 419445, 2018.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings of International Plant Propagators' Society**, v. 30, n. 1, p. 421-427, 1980.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. **HortScience**, v.1, n. 1, p. 416-417, 1980.

LUBELL-BRAND, J. D.; BRAND, M. H. Micropropagation of New Jersey tea (*Ceanothus americanus*), sand cherry (*Prunus pumila*), and sweetbells (*Eubotrys racemosa*). **Native Plants Journal**, v. 22, n. 3, p. 355-363, 2021.

MAGNEY, T. S. et al. On the covariation of chlorophyll fluorescence and photosynthesis across scales. **Geophysical Research Letters**, v. 47, n. 23, p. e2020GL091098, 2020.

MANOJ, K. M.; MANEKKATHODI, A. Light's interaction with pigments in chloroplasts: The murburn perspective. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 5, p. 100015, 2021.

MARCHIORI, J. N. C. Anatomia da madeira de *Colletia paradoxa* (Spreng.) Escalante. **Ciência e Natura**, p. 161-170, 1983.

MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro Vermelho da Flora do Brasil**, 1 ed. Nacional de Conservação da Flora, Rio de Janeiro, 2013.

MARTÍNEZ-VILALTA, J.; GARCIA-FORNER, Núria. Water potential regulation, stomatal behaviour and hydraulic transport under drought: deconstructing the iso/anisohydric concept. **Plant, Cell & Environment**, v. 40, n. 6, p. 962-976, 2017.

MARTINS, J. P. R. et al. 6-Benzylaminopurine and kinetin modulations during *in vitro* propagation of *Quercus robur* (L.): an assessment of anatomical, biochemical, and physiological profiling of shoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 151, n. 1, **Materials Science and Engineering**, v. 5, n. 2, p. 56-71, 2020.

MEDAN, D.; SCHIRAREND, C. Rhamnaceae. In: **Flowering Plants Dicotyledons**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2004.

MIRANDA, N. A. et al. Gas exchange rates and sucrose concentrations affect development in microstumps of *Eucalyptus urophylla* grown in vitro. **Forest Science**, v. 70, n. 3, p. 250-258, 2024.

MOLKANOVA, O. I. et al. Conservation and clonal micropropagation of rare species *Gladiolus palustris* Gaudin. In: **I International Symposium on Botanical Gardens and Landscapes**, 2019.

MORENO-JIMÉNEZ, A. M. et al. Efecto de luz LED sobre semillas de *Capsicum annuum* L. var. *serrano*. **Biotecnología Vegetal**, v. 17, n. 3, 2017.

MOUSTAKAS, M. Plant photochemistry, reactive oxygen species, and photoprotection. **Photochemistry**, v. 2, n. 1, p. 5-8, 2021.

MUHIE, S. H. et al. Effects of benzylaminopurine and macro propagation techniques on multiplication of dessert banana (*Musa acuminata* L.). **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 11, p. 100515-100530, 2023.

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

MURCHIE E. H., NIYOGI K. Manipulation of photoprotection to improve plant photosynthesis. **Plant Physiology** 155, 86–92, 2011.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867- 880, 1981.

NOWAKOWSKA, K. et al. Energy efficiency of LEDs during micropropagation of Helleborus 'Molly's White'. **Agriculture**, v. 13, n. 6, p. 1265, 2023.

NTSOANE, M. L. L. et al. Brassica microgreens cabbage (*Brassica oleracea*), radish (*Raphanus sativus*) and rocket (*Eruca vesicaria*) (L.) Cav: application of red-light emitting diodes lighting during postharvest storage and in vitro digestion on bioactive compounds and antioxidant activity. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 59, n. 3, p. 1432-1442, 2024.

PAGE, S. R. G. et al. Media optimization for the micropropagation and callogenesis of *Cannabis sativa* L. **BioRxiv**, v. 1, p. 1-23, 2020.

PAIVA-NETO, V. B.; OTONI, W. C. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter?. **Scientia Horticulturae**, v. 97, n. 3-4, p. 193-202, 2003.

PARADISO, R.; PROIETTI, S. Light-quality manipulation to control plant growth and photomorphogenesis in greenhouse horticulture: The state of the art and the opportunities of modern LED systems. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 41, n. 2, p. 742-780, 2022.

PARK, J. S. et al. HPLC determination of bioactive flavonoids in *Hovenia dulcis* fruit extracts. **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 2, p. 130-135, 2016.

PASSOLD, C. R. **Germinação, propagação vegetativa e adubação de plantas de *Colletia paradoxa* (Spreng.) Escal.** Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal do Paraná, 2018.

PAWŁOWSKA, B. et al. Impact of LED light sources on morphogenesis and levels of photosynthetic pigments in *Gerbera jamesonii* grown in vitro. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 115-123, 2018.

PAYGHAMZADEH, K.; KAZEMITABAR, S. K. In vitro propagation of walnut: a review. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 290-311, 2011.

PEPE, M. et al. A noninvasive gas exchange method to test and model photosynthetic proficiency and growth rates of in vitro plant cultures: preliminary implication for *Cannabis sativa* L. **Biology**, v. 11, n. 5, p. 729, 2022.

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

PINTO, K. G. D. et al. Indole-3-butyric acid improves root system quality in guaraná cuttings. **HortScience**, v. 55, n. 10, p. 1670-1675, 2020.

PONIEWOZIK, M. et al. The influence of disinfection methods and liquid phase media on *Paphiopedilum insigne* seeds germination and media supplements on morphological features of protocorms in tissue culture. **Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus**, v. 19, n. 6, p. 7-14, 2020.

PORCAR-CASTELL, A. et al. Chlorophyll a fluorescence illuminates a path connecting plant molecular biology to Earth-system science. **Nature Plants**, v. 7, n. 8, p. 998-1009, 2021.

PORRA, R. J. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. **Photosynthesis research**, v. 73, n. 1–3, p. 149–156, 2002.

POTCHARA, S. et al. *In vitro* micropropagation of siamese rosewood *Dalbergia Cochinchinensis* Pierre, a timber yielding tree. **Pak. J. Bot**, v. 54, n. 5, p. 1879-1884, 2022.

RADMANN, E. B. et al. Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata* L. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 7, n. 3, 2001.

REGNI, L. et al. Neem oil to reduce zeatin use and optimize the rooting phase in *Olea europaea* L. Micropropagation. **Plants**, v. 12, n. 3, p. 576, 2023.

RICHARDSON, J. E. et al. A phylogenetic analysis of Rhamnaceae using rbcL and trnL-F plastid DNA sequences. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 9, p. 1309- 1324, 2000.

ROSIĆ, N. et al. In vitro cultures of *Rhamnus fallax* Boiss., (Rhamnaceae) and anthraquinone production. **Archives of Biological Sciences**, v. 52, n. 2, p. 1-19, 2000.

RUAN, J.; YI, P. Exogenous 6-benzylaminopurine inhibits tip growth and cytokinesis via regulating actin dynamics in the moss *Physcomitrium patens*. **Planta**, v. 256, n. 1,

RUBAN A.V. et al. The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1817, n. 1, p. 167-181, 2012.

SAAVEDRA, A. M. et al. *In vitro* propagation and cryopreservation of the medicinal species *Hovenia dulcis* Thunb. (Rhamnaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 144, n. 3, p. 577-591, 2021.

SAJC, L. et al. Production of anthraquinones by immobilized *Frangula alnus* Mill. plant cells in a four-phase air-lift bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 416-423, 1995.

SALEEM, M. H. et al. Leaf gas exchange, oxidative stress, and physiological attributes of rapeseed (*Brassica napus* L.) grown under different light-emitting diodes. **Photosynthetica**, v. 58, n. 3, p. 33-45, 2020.

SHIN, Yu Kyeong et al. Effect of drought stress on chlorophyll fluorescence parameters, phytochemical contents, and antioxidant activities in lettuce seedlings. **Horticulturae**, v. 7, n. 8, p. 238-251, 2021.

SILOS ESPINO, Hector et al. Interaction of Culture Medium and Artificial Light Type on Pigmentation of Micro-Propagated Opuntia Plants. **Horticulturae**, v. 9, n. 12, p. 1348- 1365, 2023.

SOKOLOV, R. S.; ATANASSOVA, B. Y.; IAKIMOVA, E. T. Physiological Response of Cultured. to Nutrient Medium Composition. **Journal of Horticultural research**, v. 22, n. 1, p. 49-61, 2014.

SONG, G. et al. Efficient micropropagation of chestnut hybrids (*Castanea* spp.) using modified woody plant medium and zeatin riboside. **Horticultural Plant Journal**, v. 7, n. 2, p. 174-180, 2021.

SOURATI, R. et al. Effects of naphthaleneacetic acid, indole-3-butyric acid and zinc sulfate on the rooting and growth of mulberry cuttings. **International Journal of Plant Biology**, v. 13, n. 3, p. 245-256, 2022.

SPANIC, V. et al. Field study of the effects of two different environmental conditions on wheat productivity and chlorophyll fluorescence induction (OJIP) parameters. **Agriculture**, v. 11, n. 11, p. 1154, 2021.

STRASSER, R. J. et al. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: **Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2004. p. 321-362.

SU, P. et al. Plant morphology, secondary metabolites and chlorophyll fluorescence of *Artemisia argyi* under different LED environments. **Photosynthesis Research**, v. 159, n. 2, p. 153-164, 2024.

SWAMI, S. B. et al. Natural pigments from plant sources: a review. **The Pharma Innovation Journal**, v. 9, n. 10, p. 56, 2020.

SWOCZYNA, T. et al. Environmental stress-what can we learn from chlorophyll a fluorescence analysis in woody plants? A review. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 1048582, 2022.

TAHIRI, A. et al. Optimisation de la méthode de désinfection des explants et multiplication *in vitro* du safran (*Crocus sativus* L.). **African and Mediterranean Agricultural Journal-AI Awamia**, n. 139, p. 37-52, 2023.

TANG, Y. et al. Effects of LED spectra on growth, gas exchange, antioxidant activity and nutritional quality of vegetable species. **Life Sciences in Space Research**, v. 26, p. 77-84, 2020.

TCHOUGA, A. O. et al. Micropropagation and effect of phloroglucinol on rooting of *Diospyros crassiflora* Hiern. **HortScience**, v. 55, n. 4, p. 424-428, 2020.

WANG, M. et al. In Vitro Micrografting of horticultural plants: method development and the use for micropropagation. **Horticulturae**, v. 8, n. 7, p. 576, 2022

WANG, P.; GRIMM, B. Connecting chlorophyll metabolism with accumulation of the photosynthetic apparatus. **Trends in Plant Science**, v. 26, n. 5, p. 484-495, 2021.

WANG, R. et al. Browning treatment in tissue culture of 'Miliang 1' Delicious kiwifruit. In: **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**. IOP Publishing, 2020. p. 012194

WEN, S. S. et al. Micropropagation of tree peony (*Paeonia* sect. Moutan): A review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 141, p. 1-14, 2020.

XU, Y. et al. Effects of LED photoperiods and light qualities on in vitro growth and chlorophyll fluorescence of *Cunninghamia lanceolata*. **Plant Biology**, v. 20, n. 2, p. 269- 281, 2020.

XU, Y. et al. Red and blue light promote tomato fruit coloration through modulation of hormone homeostasis and pigment accumulation. **Postharvest Biology and Technology**, v. 207, p. 112588, 2024.

YANG, M. et al. Cardiotoxicity of zebrafish induced by 6-benzylaminopurine exposure and its mechanism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8438, 2022.

ZÁCHIA, N. R. B. et al. ***Colletia paradoxa* (Spreng.) Escalante (Rhamnaceae): identificação de flavonoides, diversidade genética e conservação**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria, 2019.

ZAHD, N. A. et al. Micropropagation of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and evaluation of its secondary metabolites and antioxidant activities compared with the conventionally propagated plant. **Plants**, v. 10, n. 4, p. 630, 2021.

ZANELLO, C. A. et al. Micropropagation from inflorescence nodal segments of *Phalaenopsis* and acclimatization of plantlets using different substrates. **Horticulturae**, v. 8, n. 4, p. 340, 2022.

ZITTELLI, G. C. et al. Effects of blue, orange and white lights on growth, chlorophyll fluorescence, and phycocyanin production of *Arthrospira platensis* cultures. **Algal Research**, v. 61, p. 102583, 2022.

ZUSHI, K. et al. Chlorophyll a fluorescence OJIP transient as a tool to characterize and evaluate response to heat and chilling stress in tomato leaf and fruit. **Scientia Horticulturae**, v. 148, p. 39-46, 2012.