



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

Suelen Martinez Guterres

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES ESPECTROS LUMINOSOS NA RECUPERAÇÃO
DE CULTURAS NODULARES CRIOPRESERVADAS E NA GERMINAÇÃO DE
SEMENTES DE *Vriesea reitzii* LEME & A.F. COSTA**

Florianópolis

2022

Suelen Martinez Guterres

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES ESPECTROS LUMINOSOS NA RECUPERAÇÃO
DE CULTURAS NODULARES CRIOPRESERVADAS E NA GERMINAÇÃO DE
SEMENTES DE *VRIESEA REITZII* LEME & A.F. COSTA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade
Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de
mestre em Ciências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosete Pescador

Coorientador: Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Guterres, Suelen Martinez
INFLUÊNCIA DE DIFERENTES ESPECTROS LUMINOSOS NA
RECUPERAÇÃO DE CULTURAS NODULARES CRIOPRESERVADAS E NA
GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Vriesea reitzii* LEME & A.F.
COSTA / Suelen Martinez Guterres ; orientador, Rosete
Pescador, coorientador, Valdir Marcos Stefenon, 2022.
52 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis,
2022.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. LEDs. 3.
Vitrificação. 4. Conservação ex situ. 5. Análises
morfoanatômicas . I. Pescador, Rosete . II. Stefenon,
Valdir Marcos . III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais. IV. Título.

Suelen Martinez Guterres

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES ESPECTROS LUMINOSOS NA RECUPERAÇÃO
DE CULTURAS NODULARES CRIOPRESERVADAS E NA GERMINAÇÃO DE
SEMENTES DE *VRIESEA REITZII* LEME & A.F. COSTA**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Lírío Luiz Dal Vesco
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Paulo Cezar Poeta Firmino Junior
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Leocir José Welter
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Ciências.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a) Dr.(a) Rosete Pescador
Orientador(a)

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado à minha mãe Sueid Martinez Guterres (*in memoriam*), que nunca saiu do meu pensamento e sempre foi minha maior incentivadora.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, da razão e do discernimento.

Agradeço a minha mãe Sueid (*in memoriam*) que sempre me incentivou a estudar e que foi o meu maior exemplo, essa conquista também é tua.

Ao meu pai Rene, que é meu exemplo de carinho, amor, trabalho e principalmente de superação, obrigada por me apoiar, e por estar sempre comigo. Te amo.

Ao meu irmão Rafael, que é o meu anjo da guarda. Sem o teu suporte, o teu apoio, e por vezes palavras de incentivo, talvez eu não estivesse aqui hoje. Obrigada por ser a minha base, o meu chão, sem ti eu nem sonharia em alcançar voos maiores. Te amo infinitamente.

Aos meus avós Francisco e Sueli, por estarem sempre comigo e me apoiando, amo muito vocês.

Aos meus sobrinhos Luiz Henrique e Maria Fernanda, por serem a minha luz, e por tirarem meu sorriso mais bobo, e por fazerem eu me sentir a tia mais legal do mundo, eu amo vocês.

À minha prima Manoella Corcini Sanchotene, por ser meu exemplo de dedicação e de determinação, que apesar dos seus dias de mau humor, mantém o sorriso no rosto (pelo menos quando está comigo), minha esperança de prima rica que vai pagar a viagem pra Nova York.

Ao Sebastián Francisco Montoya, por todas as conversas, dicas, planejamentos, desabafos e reclamações, e principalmente, por me ensinar a cultivar as bromélias. Obrigada!

À Priscila Fernandes de Souza e ao Edison Cardona Medina, pela disponibilidade constante e pela ajuda com as microscopias.

À Samya Uchôa Bordallo, pelas conversas, pela amizade e pela ajuda com as análises no espectrofotômetro.

À Anna Flávia Neri, por todas as conversas, risadas, e trocas de experiências, e por último, mas não menos importante, por aquele café maroto direto de minas que dava aquela animação para seguir com o trabalho.

Ao Leonardo Giovanetti, pela amizade, pelas conversas, e por toda a ajuda durante o mestrado, principalmente durante as disciplinas, das quais eu tive bastante dificuldade e tu estava lá para me ajudar, obrigada por toda ajuda e paciência.

À Tainara Gris por todos os desabafos ouvidos, pela amizade, pelas festinhas, por toda a ajuda no laboratório e por me ajudar a me manter na linha da calma, não se estressa tanto, no final da tudo certo.

Aos meus amigos alegretenses, Lucas, Sabrina, Camila, Nathália, e por todos os outros que não vou citar. Obrigada pela amizade de anos e por sempre me apoiarem e entenderem a minha ausência.

A Carolina Sasso Simon e ao Jonathan Marques, obrigada pela amizade de vocês, pela ajuda, pelos conselhos dados, por todos os drinks e petiscos na sacada, por toda sessão de terapia na hora do almoço e principalmente pelo fato de não apenas dividirmos uma casa, mas sim um lar. Com vocês não tem como eu me sentir sozinha. Obrigada por tudo!

Ao Gabriel Girardello, primeiro estagiário sob minha responsabilidade. Obrigada por toda a ajuda na execução desse trabalho, por toda a troca de experiência e por todas as risadas. Através de ti, eu pude perceber melhor as minhas qualidades e as coisas que eu posso e devo melhorar como pesquisadora e como alguém que quer um dia poder ensinar tudo que sabe.

Ao Dalvan Carlos Beise, pela amizade, companheirismo, por todo chocolate em momentos de tristeza e desespero, e principalmente por toda a ajuda no laboratório na parte molecular, obrigada!

À Andressa Hilha, por toda a amizade, companheirismo e troca de ideias e por todos os Sushis fora de hora para descontrair!

À Carolina Kades Marchetti, primeira amizade que o mestrado me trouxe, que me “salvou” durante a pandemia nos momentos de isolamento máximo, que me ajudou em momentos de dificuldades pessoais, durante as disciplinas e durante as incontáveis horas em laboratório na execução desse trabalho. Obrigada pela amizade e companheirismo de sempre.

À Nadhine Nostrani Cabral, pela amizade, pelo companheirismo, pelas incontáveis risadas e momentos de orgias gastronômicas. Por toda a ajuda na execução e nas análises desse trabalho, e por ser o meu exemplo de dedicação e comprometimento.

À Roberta Silveira e ao Henrique Alende, do Alegrete para o mundo! Obrigada pela amizade, carinho, ajuda, e por todos os almoços e passeios em família, vocês são demais!

Ao Lenon Modesto, pela amizade, essa que chegou de forma surpreendente, que em pouco tempo se tornou um dos meus melhores amigos e minha inspiração de equilíbrio. Você me mostrou na prática que podemos ser leves, descontraídos, festeiros, levar uma vida social “agitada” e ainda sim sermos competentes em nosso trabalho. Você é incrível!

À Eliana de Medeiros, por toda a ajuda com a microscopia eletrônica de varredura.

Ao Yohan Fritsche pela disponibilidade e troca de ideias e por toda a ajuda oferecida nesse trabalho, e em outro que virá na continuação desse.

Ao prof. Dr^o Lírio Luiz Dal Vesco e a Anna Karolinne Meirelles, pela coleta e disponibilização das sementes utilizadas nesse estudo.

Agradeço a toda a equipe do LFDGV. Sempre muito receptivos e dispostos a ajudar.

À minha orientadora prof Dr^a Rosete Pescador, que foi quem abriu as portas da UFSC e do NPBV para que eu pudesse vir e realizar o meu trabalho. Obrigada por acreditar em mim e no meu potencial, e por estar sempre disposta a ajudar todos a sua volta, pelo seu carinho e pela sua atenção. Levarei sempre um pouquinho da senhora comigo. Obrigada.

Ao meu coorientador prof Dr^o Valdir Marcos Stefenon, a ti que me acompanhou desde a graduação, e me incentivou a seguir na carreira acadêmica, obrigada por toda a ajuda oferecida, por todas as conversas muitas delas fora de hora, e principalmente por nos meus momentos de dúvidas dizer que eu não estou maluca e que o meu raciocínio está certo e faz sentido. Obrigada.

Agradeço a UFSC por tudo que ela me proporcionou.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, o qual me aceitou como pós-graduanda e me ensinou muitas coisas que poderei passar a diante como mestre em ciências.

Agradeço a CAPES pela bolsa de estudo fornecida, que além de proporcionar a minha vinda para Florianópolis para a execução desse trabalho, também deixou a minha vida mais feliz.

Gratidão. Seguimos em frente.

Faça o teu melhor, na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores, para fazer melhor ainda! (CORTELLA, 2018).

RESUMO

O bioma Mata Atlântica é considerado um *Hotspot* de biodiversidade. Nesse bioma, encontra-se a família Bromeliaceae. *Vriesea* Lindl é considerado o terceiro maior gênero de bromélia no Brasil. *Vriesea reitzii* Leme & A.F. Costa é uma bromélia epífita e endêmica considerada na categoria "Vulnerável" (VU). No cultivo *in vitro* de bromélias além da micropropagação tradicional, baseado em organogênese e embriogênese somática, é possível observar um padrão de resposta morfogênico característico e diferencial. Este padrão é definido como culturas nodulares (CNs). Protocolos para a indução de CNs em *V. reitzii* já foram estabelecidos. A criopreservação é utilizada para a conservação dos recursos genéticos vegetais a longo prazo. A vitrificação é uma das técnicas existentes de criopreservação. A luz é um fator muito importante para o desenvolvimento e recuperação das plantas após a criopreservação. As alterações luminosas no ambiente de cultivo proporcionam ajustes do aparelho fotossintético das plantas, os quais resultam na maior eficiência na absorção e transferência de energia para os processos fotossintéticos. Nesse sentido, os teores dos pigmentos cloroplastídicos, como as clorofilas e carotenóides, podem ser utilizados como importantes marcadores de adaptação do vegetal. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito de diferentes espectros luminosos na recuperação de cultura nodulares de *Vriesea reitzii* criopreservadas, e na germinação de suas sementes. CNs foram induzidas, previamente, foram desidratadas por 15min em solução PVS2 e submetidas criopreservação. Na fase de recuperação, as culturas foram expostas a diferentes espectros luminosos por 45 dias. Os maiores percentuais obtidos na recuperação de culturas nodulares, no sistema *in vitro*, foram no espectro de luz branco (75%) e fluorescente (56,25%). Não foi possível observar alterações anatômicas e histológicas nas culturas criopreservadas, bem como, nos diferentes espectros de luz na recuperação. Na germinação de sementes em diferentes espectros de luz, de forma geral, os resultados mais expressivos obtidos foram nos espectros de luz fluorescente, principalmente, na variável altura de plântula (5,47cm), massa fresca (0,0785g), massa seca (0,0070g), comprimento de raiz (1,45cm) e número de folhas por plântula (4,50folhas). Plântulas submetidas ao espectro de luz azul não desenvolveram raízes. Os maiores teores de clorofila *a* e *b* foram observados em plântulas cultivados em espectro de luz fluorescente (0,29 mg.g⁻¹ MF) e em azul (0,44 mg.g⁻¹ MF). O maior teor de clorofila totais foi encontrado no espectro de luz fluorescente (0,63 mg.g⁻¹ MF). Enquanto que, o maior teor de carotenóides em plântulas submetidos ao espectro de luz azul (0,88 mg.g⁻¹ MF). As maiores taxas de recuperação após a criopreservação foram obtidas nos espectros fluorescente e branco. Em relação as taxas de germinação, todos os tratamentos obtiveram bons índices de germinação, porém o espectro de luz fluorescente teve destaque na variável tamanho de plântula quando comparado aos demais tratamentos. No entanto, os maiores teores de clorofila total e carotenóides foram observados no cultivo com o espectro de luz azul. Concluímos que a recuperação de CNs de *Vriesea reitzii* após a criopreservação é afetada por diferentes espectros luminosos e que todos os tratamentos obtiveram bons índices de germinação.

Palavras-chave: LEDs, Vitrificação, Conservação *ex situ*, análises morfoanatômicas, teor de pigmentos.

ABSTRACT

The Atlantic Forest biome is considered a biodiversity hotspot. In this biome, the Bromeliaceae family is found. *Vriesea* Lindl is considered the third largest genus of bromeliads in Brazil. *Vriesea reitzii* Leme & A.F. Costa is an epiphytic and endemic bromeliad considered in the "Vulnerable" (VU) category. In the *in vitro* culture of bromeliads, in addition to traditional micropropagation, based on organogenesis and somatic embryogenesis, it is possible to observe a characteristic and differential morphogenic response pattern. This pattern is defined as nodular cultures (NCs). Protocols for the induction of NCs in *V. reitzii* have already been established. Cryopreservation is used for the long-term conservation of plant genetic resources. Vitrification is one of the existing cryopreservation techniques. Light is a very important factor in the development and recovery of plants after cryopreservation. Light changes in the cultivation environment provide adjustments to the photosynthetic apparatus of plants, which result in greater efficiency in the absorption and transfer of energy for photosynthetic processes. In this sense, the levels of chloroplast pigments, such as chlorophylls and carotenoids, can be used as important markers of plant adaptation. The objective of this work was to investigate the effect of different light spectra on the recovery of cryopreserved nodular cultures of *Vriesea reitzii* and the germination of their seeds. NCs were induced, previously dehydrated for 15min in PVS2 solution, and submitted to cryopreservation. In the recovery phase, the cultures were exposed to different light spectra for 45 days. The highest percentages obtained in the recovery of nodular cultures, in the *in vitro* system, were in the white (75%) and fluorescent (56.25%) light spectrum. It was not possible to observe anatomical and histological alterations in the cryopreserved cultures, as well as in the different light spectra in the recovery. In the germination of seeds in different light spectra, in general, the most expressive results were obtained in the fluorescent light spectra, mainly in the variable seedling height (5.47cm), fresh mass (0.0785g), dry mass (0.0070g), root length (1.45cm) and several leaves per seedling (4.50leaves). Seedlings subjected to the blue light spectrum did not develop roots. The highest levels of chlorophyll a and b were observed in seedlings grown in fluorescent light spectrum (0.29 mg.g⁻¹ MF) and in blue (0.44 mg.g⁻¹ MF). The highest total chlorophyll content was found in the fluorescent light spectrum (0.63 mg.g⁻¹ MF). While the highest carotenoid content in seedlings subjected to the blue light spectrum (0.88 mg.g⁻¹ MF). The highest recovery rates after cryopreservation were obtained in the fluorescent and white spectra. Regarding germination rates, all treatments had good germination rates, but the fluorescent light spectrum was highlighted in the seedling size variable when compared to the other treatments. However, the highest levels of total chlorophyll and carotenoids were observed in the cultivation with the blue light spectrum. We concluded that the recovery of NCs from *Vriesea reitzii* after cryopreservation is affected by different light spectra and that all treatments had good germination rates.

Keywords: LEDs, Vitrification, Ex-situ conservation, morphoanatomical analyses, pigment content.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: *Vriesea reitzii* *in situ*. 16
- Figura 2: Fluxograma do protocolo de vitrificação para a criopreservação de culturas nodulares de *Vriesea reitzii* adaptado (PRADELLA, 2019). 26
- Figura 3. Análise morfológicas das Culturas Nodulares (CNs) *Vriesea reitzii* recuperadas em meio de cultura MS, suplementado com vitaminas de Morel, 30 g L⁻¹ de sacarose e 4μM ácido naftaleno acético (ANA) 45 dias após submetidas a diferentes espectros luminosos: (A) CNs recuperadas em luz fluorescente; (B), espectro branco; azul/vermelho (C), vermelho (D) e azul (E). Microscopia óptica de CNs recuperadas nos espectros fluorescente (F), branco (G), azul/vermelho (H), vermelho (I) e azul (J). Imagens em microscopia eletrônica de varredura (MEV) de CNs após 45 dias recuperadas nos espectros fluorescente (K), branco (L), azul/vermelho (M), vermelho (N) e azul (O). N: núcleo; V: vacúolo; PC: parede celular; A: amido, AL: CN com coloração albina, B: CN com brotações, O: células com oxidação, CD: células em divisão, EP: células com elevada proliferação. Barras: 1cm. 32
- Figura 4: Plântulas obtidas de sementes de *Vriesea reitzii* germinadas em meio de cultura MS isento de fitorreguladores e submetidas a diferentes espectros luminosos. após 90 dias de cultivo *in vitro*. (A) fluorescente com presença de raiz, (B) branco com algumas folhas, (C) azul/vermelho com presença de algumas raízes, (D) vermelho com algumas folhas e apresentando foto dano, (E) azul com algumas folhas e sem a presença de raízes. Indução de culturas nodulares e regeneração de brotações múltiplas obtidas a partir de semente em: (F) espectro branco que apresentou inúmeras brotações (G) espectro de luz azul/vermelho e; (H) culturas nodulares com oxidação. Barras: 2cm. 34

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Tratamentos com diferentes espectros luminosos e seus respectivos comprimentos de onda utilizado no experimento. 28
- Tabela 2: Percentual de recuperação das Culturas Nodulares (CNs) *Vriesea reitzii* aos 45 dias de cultivo em meio de cultura MS, suplementado com vitaminas de Morel, 30 g L⁻¹ de sacarose e 4μM ácido naftaleno acético (ANA), submetidas a diferentes espectros luminosos. 30
- Tabela 3: Números médios de plântulas, folhas, número de raiz e tamanho de raiz, altura de plântulas, massa fresca e massa seca a partir da germinação de sementes de *Vriesea reitzii*, cultivadas em meio de cultura MS gelificado e isento de fitorreguladores e submetidas a diferentes espectros luminosos aos 90 dias de cultivo *in vitro*. 35
- Tabela 4: Concentrações de clorofila, a, b carotenoides e clorofila total em brotos oriundos da germinação de sementes de *Vriesea reitzii* aos 90 dias de cultivo *in vitro* submetidas a diferentes espectros luminosos. 35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA- Ácido a-naftaleno acético

BAP- 6-Benzilaminopurina

CCA- Centro de Ciências Agrárias

CN – Cultura Nodular

DMSO – Dimetilsulfóxido

LED – Diodo emissor de luz

LFDGV- Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

mg- Miligrama

mL- Mililitro

MS- Meio de cultura de Murashige e Skoog (1962)

MO – Microscopia Óptica

nm- Nanômetro

NPBV- Núcleo de Pesquisas em Biotecnologia e Desenvolvimento Vegetal

NL- Nitrogênio Líquido

pH- Potencial Hidrogeniônico

PVS – Solução de vitrificação de plantas

rpm- Rotações por minuto

SC- Santa Catarina

UFSC- Universidade Federal de Santa Catarina

µL- Microlitro

°C – Graus Celcius

SUMÁRIO

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA.....	15
1.1 OBJETIVOS	22
1.1.1 Objetivo geral:.....	22
1.1.2 Objetivos específicos:	22
2 HIPÓTESES	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1.1 Indução das culturas nodulares (CNs).....	23
3.1.2 Criopreservação das culturas nodulares e recuperação em diferentes espectros luminosos	23
3.1.3 Análises Anatômicas	27
3.2 INFLUÊNCIA DE DIFERENTES ESPECTROS LUMINOSOS NA GERMINAÇÃO	28
3.2.1 Germinação de sementes de <i>Vriesea reitzii</i> em diferentes espectros luminosos	28
3.2.2 Análises morfométricas.....	28
3.2.3 Análises Bioquímicas.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 RECUPERAÇÃO DE CNs CRIOPRESERVADAS	30
4.2 GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>VRIESEA REITZII</i>	33
5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVA.....	40

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

O bioma Mata Atlântica é considerado um *Hotspot* de biodiversidade (MYERS et al., 2000) e um dos mais ameaçados do planeta. Devido ao grande avanço dos centros urbanos e rurais do país, esse bioma foi o que sofreu as maiores perdas (METZGER, 2009). Entre os diversos elementos florísticos da Mata Atlântica, encontra-se a família Bromeliaceae, que representa um importante componente deste bioma. As espécies pertencentes a essa família formam um micro-habitat estabelecendo relações com outras espécies, o que contribui significativamente para a estabilidade e biodiversidade do ecossistema onde estão inseridas (BENZING, 2000; MARTINELLI, 2000; DÉZERALD et al., 2018). Infelizmente, o número de espécies ameaçadas desta família vem crescendo devido principalmente à devastação dos seus habitats naturais (REITZ, 1983; MARTINELLI et al., 2008). Na tentativa de preservar esse bioma, e conseqüentemente as espécies que dependem dele, vários cientistas têm concentrados seus esforços no maior entendimento das relações ecológicas existente entre as espécies, visando a proteção de seus remanescentes florestais ou de sua restauração (RIBEIRO et al., 2009).

Com ocorrência em todo o continente americano, a família Bromeliaceae é dividida em oito subfamílias, sendo elas: Bromelioideae; Tillandsioideae; Navioideae; Brocchinioideae; Lindmanioideae; Pitcairnioideae; Hechtioideae; Puyoideae. A família compreende 3584 espécies, as quais distribuem-se em 75 gêneros. Mais de 50% das espécies de bromélias encontradas atualmente são epífitas e 40% das bromélias registradas na Mata Atlântica se enquadram em alguma categoria de ameaça (MATTINELLI et al., 2008). A subfamília Tillandsioideae Harms, é a maior das oito subfamílias que ocorre desde os Estados Unidos até o sul do Chile e que compreendendo cerca de 40% de espécies (BARFUSS et al., 2016). *Vriesea* Lindl é considerado o terceiro maior gênero de bromélia no Brasil, com aproximadamente 290 espécies (DA COSTA et al. 2014, BARFUSS et al. 2016), o segundo gênero mais diverso de Tillandsioideae compreendendo cerca de 226 espécies e é também considerado o quinto gênero com maior diversidade dentre as angiospermas da Mata Atlântica (STEHMANN et al., 2009).

O bioma Mata Atlântica é considerado o principal centro de diversidade do gênero *Vriesea* (DA COSTA et al., 2014), com novos táxons e novas localidades desse gênero sendo continuamente descobertos (KESSOUS et al; 2018). A exuberância de suas formas e cores, bem como a sua baixa demanda de manutenção e sua fácil adaptação a pequenos jardins, tornam as bromélias populares entre os paisagistas e jardineiros que reconhecem seu potencial ornamental (ALINE et al., 2015).

Vriesea reitzii Leme & A.F. Costa (Figura 1) é uma bromélia epífita e endêmica, ocorre no sul do Brasil em altitudes entre 750 e 1.200m, nos domínios da Floresta Ombrófila Mista (LEME; COSTA, 1991). A espécie é considerada “quase ameaçada” segundo a Lista Vermelha de Ameaça da Flora Brasileira 2014 do CNCFlora, devido ao fato de que a *Araucaria angustifolia*, que é o seu habitat epífita primário, teve suas populações naturais extremamente reduzidas e encontra-se na categoria "Vulnerável" (VU) (CNCFlora, 2012; CONSEMA-RS, 2002; FLORA DIGITAL, 2012;).



Figura 1: *Vriesea reitzii* *in situ*.
Fonte: Pescador, R., 2022.

As técnicas de propagação são importantes instrumentos de conservação *ex situ* de espécies nativas. A conservação *ex situ* pode ser definida como o processo pelo qual uma determinada planta é conservada fora do seu habitat natural (VEIGA et al., 2009). E a propagação *in vitro* ou micropropagação, em especial, tem sido um procedimento *ex situ* muito eficaz na propagação de bromélias, minimizando a retirada de espécies da natureza, permitindo a manutenção e o conhecimento que vise à sua utilização de maneira sustentável. Assim como tem sido considerada importante estratégia para conservação do germoplasma vegetal (CARVALHO et al., 2008)

A propagação natural das bromélias pode ser realizada de duas maneiras: vegetativa (assexuada) e reprodutiva (sexuada). A propagação reprodutiva é realizada por sementes. Esse processo é considerado de grande importância na conservação de germoplasma de bromélias

ameaçadas de extinção, uma vez que assegura a variabilidade natural e a diversidade genética dessas espécies (JUNGHANS & SOUZA, 2009). Na propagação assexuada formam-se brotos a partir da planta-mãe. Essas brotações – que normalmente saem por estolhos ou rizomas da base da planta – surgem durante ou após a floração, e podem ser separados da planta-mãe para a formação de novas mudas. As desvantagens desse processo são: o número limitado de brotações, originando poucos filhos/planta/ano; a maior chance de disseminação de doenças; além de agravar ainda mais a situação de muitas espécies ameaçadas, uma vez que a planta matriz pode ser danificada ou retirada no processo (KÄMPLF, 2005).

A micropropagação de bromélias silvestres ou ornamentais tem sido uma estratégia que vem sendo adotada com a finalidade de minimizar os efeitos da pressão antrópica sobre o germoplasma dessas espécies. A possibilidade de obtenção de um grande número de plantas faz dessa tecnologia uma ferramenta de importância significativa para a conservação dessas espécies. Adicionalmente, o estabelecimento de protocolos de multiplicação *in vitro* permite a produção de mudas em larga escala para comercialização, evitando, assim, a atividade extrativista e de conotação ilegal que vem sendo realizada com essas plantas (WITHERS & WILLIAMS, 1998; KÄMPLF, 2005).

Quando se fala de cultivo *in vitro* de bromélias, além da micropropagação tradicional é possível observar também um padrão de resposta morfogênico diferente dos quais estamos acostumados baseados em organogênese e embriogênese somática. Este padrão observado é definido como culturas nodulares (CNs) (GEORGE, 1993). CNs nada mais são do que aglomerados de nódulos organogênicos com coloração verde-amarelada a translúcida e textura friável ou levemente compacta. Protocolos para a indução de CNs em *V. reitzii* foram estabelecidos e este modelo regenerativo representa uma estratégia eficiente para a micropropagação dessa espécie em larga escala (GUERRA; DAL VESCO, 2010; SCHERER et al., 2013; DAL VESCO et al., 2014). As CNs por apresentarem uma elevada capacidade regenerativa, resultando na produção de brotos adventícios, faz com que elas sejam fortes candidatas para atuarem em processos de criopreservação, auxiliando assim na conservação a longo prazo dessa espécie ameaçada.

Existem diferentes estratégias que podem ser utilizadas para a indução de CNs em bromélias. Sua origem pode ser encontrada a partir da base foliar (ALVES et al., 2004; GUERRA; DAL VESCO 2010; SCHERER et al., 2013; DAL VESCO et al., 2014; CORREDOR-PRADO et al., 2015), de sementes (DAL VESCO et al. 2014) e segmentos nodais (DAL VESCO et al. 2011). Estudos relacionados às características histoquímicas durante a

indução de CNs a partir da base foliar e de sementes de *V. reitzii*, demonstraram que a formação dessas estruturas parece estar associada ao meristema radicular e caulinar do embrião quando originadas a partir das sementes (DAL VESCO et al., 2014; CORREDOR-PRADO et al., 2015), e relacionada com os meristemas intercalar e marginal quando gerada a partir dos explantes foliares (CORREDOR-PRADO et al., 2015).

Dentre as técnicas de conservação, a criopreservação é considerada uma técnica promissora para a conservação dos recursos genéticos vegetais, incluindo espécies raras ou ameaçadas de extinção (ENGELMANN, 2011; WYSE et al., 2018). A técnica consiste principalmente no armazenamento de materiais biológicos em temperaturas ultrabaixas (-196°C), capazes de interromper a divisão celular e a maioria dos processos metabólicos e físicos, garantindo assim a conservação do material biológico a longo prazo (ENGELMANN, 2013). Além disso, apresenta algumas vantagens em relação a outros métodos de conservação como menor necessidade por espaço e mão-de-obra, bem como menor risco de variações somaclonais (VILLA; 1995; ENGELMANN; 2013).

Atualmente existem diversas técnicas de criopreservação (FUNNEKOTTER et al., 2017), que se baseiam no princípio da vitrificação. A vitrificação é definida como a transição da água diretamente da fase líquida para uma fase amorfa ou vítrea, evitando assim a formação de cristais de gelo intracelular (FAHY et al. 1984). Para que seja possível conseguir atingir este estado, se faz o uso de soluções crioprotetoras concentradas, que proporcionam o aumento da viscosidade celular, causando uma desidratação celular adequada e resultando na supressão da formação de gelo (VOLK et al., 2006). Dessa forma, é possível evitar a ruptura de membranas celulares e a perda de permeabilidade das células, geralmente decorrentes do congelamento/descongelamento (SAKAI et al., 1990). Esta etapa, conhecida por desidratação, é de extrema importância para garantir a sobrevivência e a integridade genética e fisiológica após a criopreservação do material biológico (GONZÁLEZ-ARNAO et al., 2013).

As soluções de vitrificação PVS (*Plant Vitrification Solution*) são as soluções mais conhecidas e utilizadas de desidratação e foram desenvolvidas justamente para desidratar materiais antes da criopreservação (VOLK et al., 2006; STEGANI et al., 2017). Os componentes destas soluções podem ser ou não ser permeáveis à membrana celular (PANIS et al., 2006). Dentre os componentes mais utilizados estão: glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol, propilenoglicol e metanol, seguidos por uma grande variedade de açúcares, particularmente sacarose, trealose e rafinose (SAKAI et al., 1990; SAKAI; ENGELMANN, 2007; BENSON 2008). Alguns destes agentes podem ser tóxicos para determinadas espécies,

como é o caso do DMSO. Sendo assim, é de suma importância a definição do tipo de solução a ser utilizada para o processo de desidratação, bem como o tempo de contato dos materiais com a solução definida (SAKAI et al., 2008).

Algumas espécies vegetais não conseguem suportar as condições adversas da criopreservação e nem do uso de soluções PVS. A partir disso, foi desenvolvida uma metodologia baseada no encapsulamento do explante por gelificação chamada de encapsulamento-desidratação. Nessa técnica, o explante é envolto em uma gota de alginato de sódio (2-3%), e com o auxílio de uma pipeta, é colocado em uma solução catiônica de cloreto de cálcio por aproximadamente 30 minutos para que seja possível formar uma cápsula protetora ao redor do explante. Esses explantes encapsulados são desidratados osmoticamente em soluções de sacarose ou com sílica gel em câmara de fluxo laminar antes da imersão em nitrogênio líquido (NL) (NIINO et al., 2015; KULUS; ZALEWSKA, 2014; ROQUE-BORDA et al.; 2021). Por sua vez o encapsulamento-vitrificação, baseia-se na mesma técnica do encapsulamento-desidratação, porém, ao invés do uso de soluções de sacarose ou da sílica gel para a desidratação, se faz o uso de soluções de vitrificação como a PVS2 (LI et al., 2017; BI et al., 2017).

Quando se fala de criopreservação na família Bromeliaceae, o uso dessa técnica foi relatado em espécies selvagens e domesticadas do gênero *Ananas* spp., sendo criopreservados ápices, calos organogênicos e pólen (MARTÍNEZ-MONTERO et al., 2012; SOUZA et al., 2016; SOUZA et al., 2018). Outros trabalhos descrevem a criopreservação de grãos de pólen de espécies dos gêneros *Aechmea* spp., *Guzmania* spp., *Tillandsia* spp. e *Vriesea* spp. (PARTON et al., 2002; SOUZA et al., 2018), além do êxito na criopreservação de sementes de espécies dos gêneros *Alcantarea* Spp., *Dyckia* spp., *Encholirium* spp., *Nidularium* spp., *Pitcairnia* spp., *Vriesea* spp., *Wittrockia* Sp. (TARRÉ et al., 2007; PEREIRA et al., 2010; HMELJEVSKI et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014; FERRARI et al., 2016).

Estudos relacionados as sementes sugerem comportamento ortodoxo das espécies avaliadas, uma vez que sobreviveram à dessecação e ao congelamento (MONTROYA-SERRANO). As informações existentes sobre o processo de criopreservação e armazenamento *ex situ* de bromélias endêmicas da Mata Atlântica ainda são insuficientes. Entretanto, este conhecimento é essencial para o desenvolvimento de programas efetivos para a conservação da flora nativa (RODRIGUES et al., 2014). Além disso, o emprego da criopreservação na conservação de sementes ortodoxas também é uma tendência, tendo em vista a baixa

longevidade apresentada por algumas espécies nos bancos convencionais de sementes (LI; PRITCHARD, 2009).

A luz é um fator muito importante tanto para o desenvolvimento da planta quando para a recuperação destas após a criopreservação. As plantas utilizam a luz como fonte de energia no processo da fotossíntese e respondem a essa energia de acordo com a intensidade, comprimento de onda e direção de onde são emitidas. A luz tem efeito fotomorfogênico cuja percepção dos espectros luminosos é realizada através de fotorreceptores, como os fitocromos e os criptocromos, e a forma como reagem a esses receptores gera uma série de resposta fisiológicas (MUNNER et al., 2014). Portanto, o espectro da fonte de radiação deve atender as exigências da planta para que seja possível realizar a fotossíntese e o desenvolvimento fotomorfogênico (BULA et al., 1991).

Um dos fatores mais importantes e que afetam de forma significativa a recuperação das plantas após a criopreservação, é a luz na qual o material vegetal é exposto. De maneira geral, o material criopreservados recupera-se na ausência de luz ou em luz difusa por alguns dias até sete dias após a criopreservação (GONZALES-ARNÃO; ENGELMANN., 2008). A luz intensa é conhecida principalmente por causar estresse oxidativo após a criopreservação, causando assim um efeito negativo na sobrevivência após a criopreservação (BENSON., 1990).

As fontes de luz mais comumente utilizadas em ambientes controlados como a sala de crescimento de plantas são as lâmpadas fluorescentes, iodetos metálicos, sódio em alta pressão e lâmpadas incandescentes, porém essas lâmpadas foram projetadas para a iluminação de ambientes internos humanos e sabemos que sua utilização para o cultivo *in vitro* de plantas apresenta limitações, pois os fotorreceptores de plantas diferem dos seres humanos (BULA et al, 1991). Além disso, as lâmpadas fluorescentes emitem um amplo espectro luminoso que varia de 350 a 750nm, incluindo comprimentos de onda desnecessários e que são de baixa qualidade espectral para promoção do crescimento vegetal (RAMIREZ-MOSQUEDA et al., 2017).

Devido a isso, um balanço espectral da fonte de luz, ou seja, uma forma que torne possível balancear os espectros mais vantajosos para a planta, pode contribuir para a sua eficiência fotossintética e para a manutenção do balanço térmico da sala de crescimento (BULA et al, 1991). A fonte de radiação que possui maior eficiência elétrica, é capaz de gerar maior eficiência fotossintética e seria um benefício significativo em termos de pesquisa e aplicações na produção de culturas (LAZZARINI, 2017). Devido a esse fator, sistemas que utilizem diodos emissores de luz, ou seja lâmpadas LED, vem sendo utilizado em ambientes de crescimento

controlado, principalmente pelos benefícios que podem trazer para as plantas (BULA et al., 1991).

O uso das lâmpadas LED possui diversas vantagens, das quais podemos citar, tamanho reduzido, intensidade e qualidade de luz ajustáveis, comprimento de onda específico, bem como a alta de conversão fotoelétrica (SILVA et al, 2014). Vantagens essas, que tornam o uso das lâmpadas LED perfeitas para suportar o crescimento de plantas em ambientes controlados (CHUNG et al., 2010). Lâmpadas LED são um tipo único de diodo semicondutor, e podem ter um pico de emissão de luz variando de 220 a 1.000nm, é o primeiro dispositivo com a capacidade do controle espectral que permite que os comprimentos de onda sejam ajustados aos fotorreceptores vegetais, influenciando de forma satisfatória a composição e a morfologia nas plantas (OLLE ; VIRSILÈ, 2013).

A fisiologia e o desenvolvimento das plantas são influenciados pelo espectro de luz do ambiente proporcionado pelos LEDs, podemos citar o espectro de luz vermelha, verde, azul e combinação de espectros (LAZZARINI, 2017). O espectro de luz azul por exemplo, está envolvido em vários processos fisiológicos, como o fototropismo, abertura dos estômatos, morfogênese e funcionamento fotossintético das folhas (HALLIDAY, 2007). As lâmpadas LEDs vermelha, imitem um espectro de luz próximo do máximo de absorbância tanto da clorofila como dos fitocromos (SUN et al., 1998).

Um dos fatores ligados à eficiência fotossintética das plantas, ao seu crescimento e a adaptabilidade a diversos ambientes é o conteúdo de clorofila e carotenoides (ZANELLA et al., 2006). A clorofila *a* é o pigmento utilizado para realizar a fase fotoquímica da fotossíntese, enquanto os demais pigmentos auxiliam na absorção de luz e na transferência de energia aos centros de reação, esses são chamados de pigmentos acessórios, e os principais pigmentos acessórios são a clorofila *b* e os carotenoides (TAIZ et al., 2021). A clorofila *b* garante uma maior eficiência na absorção de energia luminosa, pois a sua captação de energia é feita em comprimentos de onda diferentes daqueles obtidos nos demais pigmentos (LÜTTGE, 2007). Os carotenoides, além de serem extremamente importantes para a captação da luz, também auxiliam no processo de fotoproteção dos pigmentos e dos cloroplastos (MERZLYAK; SOLOVCHENKO, 2002), além de ser fundamental para o aparato fotossintético pois impede o dano fotoinibitório (CARPENTIER, 1996). As alterações luminosas no ambiente de cultivo proporcionam ajustes do aparelho fotossintético das plantas, os quais resultam na maior eficiência na absorção e transferência de energia para os processos fotossintéticos. Nesse

sentido, os teores dos pigmentos cloroplastídicos, como as clorofilas e carotenoides, podem ser utilizados como importantes marcadores de ambientação do vegetal (SOUZA, 2011).

INSERIR AQUI INFORMAÇÕES SOBRE AS LUZES NA RECUPERAÇÃO PÓS CRIO E INFORMAÇÕES SOBRE GERMINAÇÃO DE SEMENTES

Além dos aspectos fisiológicos e bioquímicos, características morfológicas das plantas e das células devem ser monitoradas. Nesta perspectiva, análises microscópicas são grandes aliadas da criobiologia, principalmente porque nas diferentes etapas da criopreservação, podem ocorrer danos estruturais/mecânicos nas células, os quais podem ser verificados com auxílio destas análises. Dentre os danos já relatadas estão a plasmólise (ZHANG et al., 2014; VOLK; CASPERSEN et al., 2007), o aumento da vacuolização celular, podendo ser seguido por autofagia e morte celular programada (MCP) (WESLEY-SMITH et al., 2015), o aumento na proporção de heterocromatina em relação a eucromatina (WEN et al., 2012; HERINGER et al., 2013) e maior conteúdo de mitocôndrias (BERJAK et al., 2012; ZHANG et al., 2014) bem como alterações anatômicas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral:

Este estudo teve como objetivo geral investigar a influência de diferentes espectros luminosos na recuperação de cultura nodulares de *Vriesea reitzii* criopreservadas, bem como, na germinação de sementes de *Vriesea reitzii*.

1.1.2 Objetivos específicos:

- Identificar a relação dos espectros luminosos com a sobrevivência de cultura nodulares criopreservadas;
- Analisar as alterações anatômicas e histológicas nas culturas nodulares criopreservadas em relação aos espectros de luz;
- Observar as variações morfológicas das plântulas em relação aos diferentes espectros de luz;
- Avaliar alterações no teor de pigmentos em plântulas de *Vriesea reitzii*.

2 HIPÓTESES

- A utilização de diferentes espectros luminosos influenciará na recuperação das culturas nodulares criopreservadas e na germinação das sementes de *Vriesea reitzii* e poderá ser observada alterações anatômicas e histológicas, bem como, produzirá variações morfológicas nas plântulas em tamanho e teores de pigmentos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina no Núcleo de Pesquisas em Biotecnologia Vegetal e no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, durante os meses de março de 2020 a dezembro de 2021. As sementes de *Vriesea reitzii* utilizadas no trabalho foram obtidas de uma única população natural, no município de Curitiba (SC), Brasil (27°17'02.7"S, 50°32'05.5"W). As sementes foram coletadas e armazenadas a -6°C até a utilização no experimento. As sementes foram coletadas durante a sua maturidade fisiológica e tiveram seus apêndices plumosos removidos.

3.1.1 Indução das culturas nodulares (CNs)

Culturas nodulares foram obtidas de acordo com a metodologia descrita abaixo, desenvolvida por Dal Vesco et al. (2014a). Após a desinfestação das sementes, foi realizada a sua inoculação em tubos de ensaio com pontes de papel filtro contendo 10ml de meio de cultura, composto pela formulação salina MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e suplementado com vitaminas de Morel, 30 g L⁻¹ de sacarose e 4μM ácido naftaleno acético (ANA). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C, 1,3atm, durante 15 minutos. As CNs permaneceram nesse meio de cultura por um período de sete semanas em sala de crescimento a 25 ± 2°C com fotoperíodo de 16h de luz com intensidade luminosa de 50-60μmol m⁻² s⁻¹, através de lâmpadas fluorescentes Philips 100W até a implementação do experimento de vitrificação.

3.1.2 Criopreservação das culturas nodulares e recuperação em diferentes espectros luminosos

Culturas nodulares foram submetidas ao processo de vitrificação antes de serem criopreservadas, através da metodologia desenvolvida por Pradella (2019). Primeiramente, aproximadamente oito amostras de CNs ($\pm 150\text{mg}$ de amostra) foram colocadas em criotubos de 2mL e foram pré-cultivadas em meio de cultura MS líquido suplementado com sacarose 0,3 M a 25 °C por 1 h, logo após, o meio foi retirado e colocado a solução *loading* (meio MS líquido + 2,0 M de glicerol + 0,4 M de sacarose) a 25 °C durante 20 min. Ambas as soluções foram colocadas até cobrir as amostras (aproximadamente 1300 μL). Posteriormente, a solução de *loading* foi retirada e adicionada a solução de vitrificação PVS2 (30% de glicerol, 15% de etilenoglicol, 15% DMSO e 0,4 M de sacarose diluídos em meio MS líquido composto por macro e micronutrientes e vitaminas de Morel) (SAKAI et al. 1990) a 25 °C por 15 min, essa solução foi colocada até encher por completo os criotubos (aproximadamente 1900 μL). Após os 15 min, os criotubos foram imersos em nitrogênio líquido (NL). Após 24h em NL, os criotubos foram retirados destas condições e então descongelados em banho-maria a 40 °C durante 2 min, seguindo pela substituição dessa solução PVS2 pela solução de diluição *unloading* (aproximadamente 1600 μL) meio MS líquido + sacarose 1,2 M) a 25 °C por 20 min. Após esse período, as CNs passaram por uma segunda diluição composta, por meio de cultura MS líquido suplementado com sacarose 0,3 M a 25 °C por 60 min, conforme esquematizado (Figura 2).

Para a recuperação, quatro amostras de CNs ($\pm 150\text{mg}$ /amostra) foram transferidas para placas de Petri contendo 15 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) gelificado (Phytigel® 2,0 g L⁻¹) e suplementado com ANA (4 μM). As placas foram mantidas em condições de escuro por sete dias e por fim, transferidas para diferentes condições de luz (Tabela 1). Nesta etapa, as CNs permaneceram em sala de crescimento com 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h dia. O pH de todas as soluções descritas acima foi previamente corrigido para 5,8 e esterilizados em autoclave a 121 °C, 1,3 atm durante 15 minutos.

Após 45 dias de cultivo *in vitro* sob diferentes espectros de luz, representados na Tabela 1, avaliou-se a recuperação através da contagem do número de CNs que não apresentaram oxidação e que mantiveram sua cor habitual (verde). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos. Cada unidade experimental foi constituída de uma placa de Petri contendo quatro amostras ($\pm 150\text{mg}$ /amostra) de culturas nodulares por placa e oito repetições por tratamento. Dados de porcentagem foram comparados com tabelas de contingência e testes de χ^2 ($p \leq 0,05$).

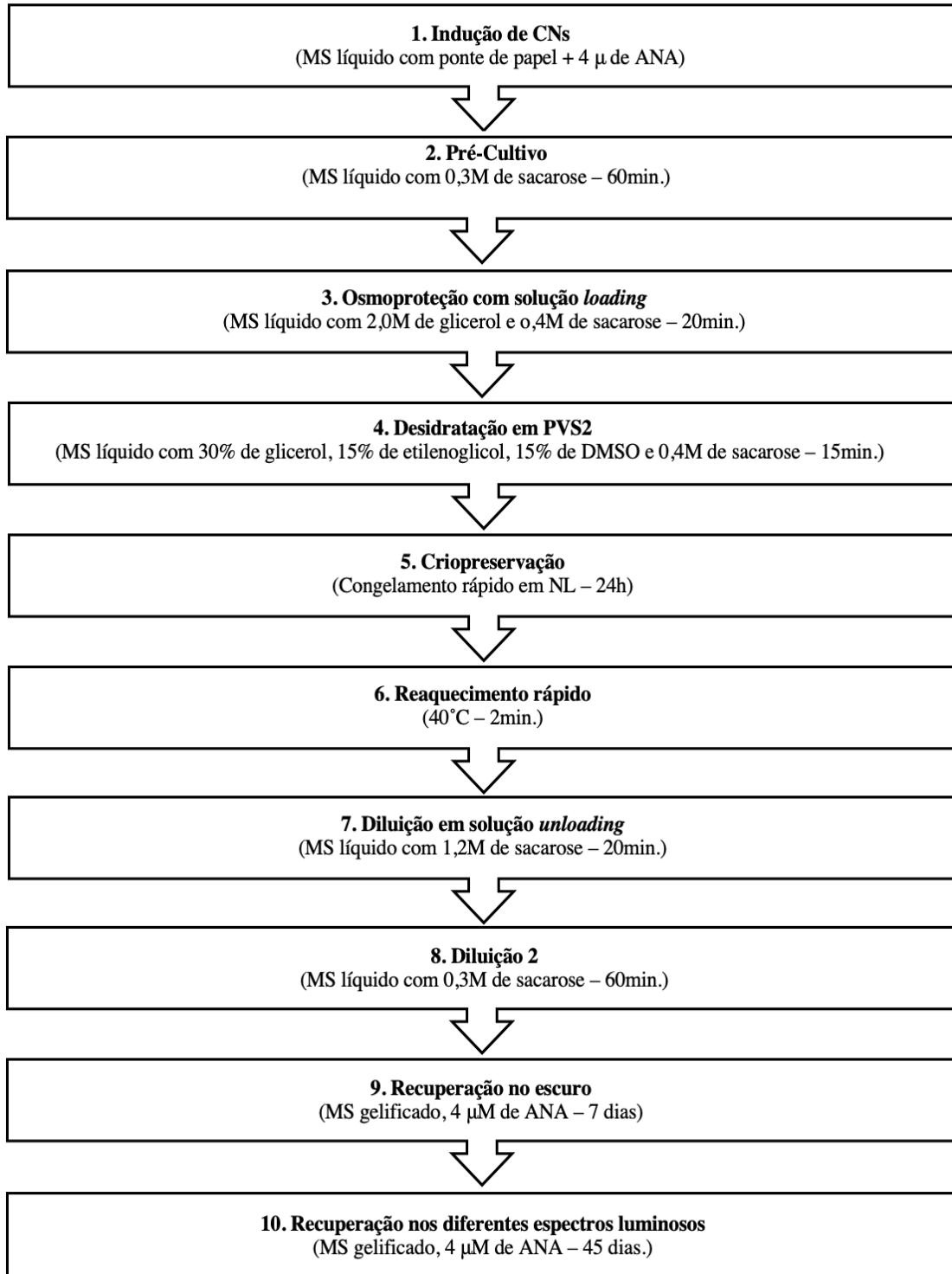


Figura 2: Fluxograma do protocolo de vitrificação para a criopreservação de culturas nodulares de *Vriesea reitzii* adaptado (PRADELLA, 2019).

3.1.3 Análises Anatômicas

Amostras representativas de CNs desidratadas por 15 minutos em solução PVS2 e criopreservadas de acordo com a figura 2, foram coletadas para análises morfológicas, histológicas e anatômicas após 45 dias em exposição aos diferentes espectros luminosos. Estas análises foram realizadas utilizando-se microscópio estereoscópio (Olympus® SZH10) equipado com uma câmera (Olympus DP71), microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Para a microscopia luz, as amostras de CNs foram fixadas em paraformaldeído (5%) em tampão fosfato 0,2 M (pH 7,2) por uma semana. Após a fixação, as amostras foram lavadas três vezes em tampão fosfato 0,2M, por 30 min. (BOUZON, 2006) e desidratadas em série etílica gradual por 60 minutos (adaptado de Sanders et al., 1999). Após a desidratação, as amostras foram pré-infiltradas em historesina (Leica® HistoResin, Heidelberg, Alemanha) e etanol 100% (PA) por uma semana e infiltradas com historesina por uma semana. Secções longitudinais e transversais de 5µm das CNs foram obtidas com micrótomo rotativo (SleeTechnik®), distendido em lâminas com gota de água, e mantido a uma temperatura de 42 ± 2° C. Após a evaporação da água, as secções foram submetidas à coloração com azul de toluidina (O'BRIEN et al., 1965). Aspectos relevantes foram identificados e capturados utilizando microscópio (Olympus® BX-40) equipado com uma câmera (Olympus DP71) do Laboratório de Fisiologia de Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDG-- UFSC).

Para as análises de microscopia eletrônica de varredura, amostras de CNs foram fixadas em solução de paraformaldeído 5%, sacarose 2% e tampão fosfato de sódio 0,2M em vácuo por uma semana, seguida de lavagem e desidratação em série crescente de gradiente etílico (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%) durante 60 minutos (adaptado de Schmidt et al. 2012). Após a desidratação as amostras foram submetidas ao ponto crítico (Leica CPD030) e aderidas sobre suportes de alumínio (stubs), com o auxílio de fita de carbono dupla face. Posteriormente foi realizado o recobrimento das amostras com 20nm de ouro, em metalizador (Leica SCD500) (Schmidt et al., 2012). As amostras foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6390LV), no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME-UFSC).

3.2 INFLUÊNCIA DE DIFERENTES ESPECTROS LUMINOSOS NA GERMINAÇÃO

3.2.1 Germinação de sementes de *Vriesea reitzii* em diferentes espectros luminosos

Sementes de *Vriesea reitzii* foram desinfestadas seguindo o protocolo desenvolvido por Dal Vesco et al. (2014) que sugere que as sementes sejam desinfestadas por álcool 70% (3min.), seguido por hipoclorito de sódio 2% por um período de 35 minutos, seguido por tríplice lavagem em água destilada autoclavada. Após a desinfestação, as sementes foram colocadas em frascos contendo 25ml de meio de cultura, gelificado com 6,0 g L⁻¹ de ágar, composto pela formulação salina MS isento de fitorreguladores, e suplementado com vitaminas de Morel, e 30 g L⁻¹ de sacarose. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121°C, 1,3atm, durante 15 minutos.

Após a inoculação das sementes, os frascos foram vedados com plástico filme e acondicionados sob diferentes espectros luminosos para germinação (Tabela 1). As análises morfométricas e bioquímicas foram realizadas após 90 dias de cultivo. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos. Cada repetição foi composta por 1 frasco contendo 10 sementes cada. Foi realizada 4 repetições por tratamento.

Tabela 1: Tratamentos com diferentes espectros luminosos e seus respectivos comprimentos de onda utilizado no experimento.

Tratamentos	Comprimento de Onda
Luz Fluorescente Branca	350 a 750nm
Luz LED Branco	400 a 700nm
Luz LED Azul/Vermelho	450nm e 665nm
Luz LED Vermelho	660nm
Luz LED Azul	470nm

3.2.2 Análises morfométricas

As análises realizadas foram: massa fresca (mg), massa seca (mg) número de plântulas, número de folhas por plântulas, altura das plântulas, comprimento de raiz e número de raiz. O número de plântulas, folhas por plântulas e número de raiz, foram minuciosamente observados e quantificados. Os comprimentos das plântulas e raízes foram determinados com o auxílio de um paquímetro medindo sempre da base da plântula até a altura da maior folha (altura da

plântula), e da base da plântula até o final da raiz (comprimento de raiz). As análises foram realizadas após 90 dias de cultivo *in vitro*.

Posteriormente, os brotos foram pesados em balança analítica Shimadzu AUY 220, para quantificação da massa fresca. Após, as mesmas plantas foram utilizadas para análise de massa seca. Para isso as plantas foram colocadas em placas de petri de vidro abertas e posteriormente depositadas em estufa de secagem e esterilização Solab SL100 a 65°C por 72 horas. Após esse período, as plantas foram pesadas e obteve-se a massa seca. O delineamento experimental para essa análise foi composto por 4 repetições por tratamento sendo cada repetição composta por uma placa de petri contendo 5 brotos aleatórios.

As análises estatísticas foram feitas pelo software Genes/UFV. Os dados foram convertidos em $\log(x+2)$ e submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

3.2.3 Análises Bioquímicas

Os parâmetros bioquímicos analisados foram os teores de clorofilas *a* e *b*, e carotenoides, além do teor de clorofilas totais. Todos os parâmetros citados foram determinados no 90º dia da fase de cultivo *in vitro*. Foram utilizadas 3 repetições por tratamento.

Para a quantificação dos teores de clorofilas e carotenoides foram utilizados 0,05g de massa fresca, por repetição. A massa fresca foi medida e após depositada em tubos de ensaio de 10mL envolvidos com papel alumínio contendo 5mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Os tubos foram mantidos por 48 horas no escuro sob temperatura de 25 ± 2 °C, sem maceração. Após esse tempo, as amostras foram depositadas em cubetas de quartzo e procedeu-se com a dosagem por meio de espectrofotômetro PRÓ-ANÁLISE V-1600. Os cálculos para a determinação da concentração das clorofilas *a* e *b* e carotenoides foram realizados utilizando as fórmulas de Wellburn (1994). Os comprimentos de onda utilizados foram 665nm para clorofila *a*, 649nm para clorofila *b* e 470nm para carotenoides.

Os cálculos da concentração de clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides, e clorofilas totais foram realizados de acordo com as equações abaixo (Wellburn, 1994).

$$\text{Clorofila } a = 12,19 \cdot A_{665} - 3,45 \cdot A_{649}$$

$$\text{Clorofila } b = 21,99 \times A_{649} - 5,3 \times A_{665}$$

$$\text{Carotenoides} = (1000 \times A_{470} - 2,86 \times \text{Clorofila } a - 129,2 \times \text{Clorofila } b) / 221$$

$$\text{Clorofila Total} = \text{Clorofila } a + \text{Clorofila } b$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RECUPERAÇÃO DE CNS CRIOPRESERVADAS

O percentual de culturas nodulares recuperadas, ou seja, que sobreviveram após a desidratação por 15 minutos em PVS2 e após 45 dias sob exposição a diferentes espectros de luz são apresentados na Tabela 2. Como pode ser observado, os valores de culturas nodulares submetidos aos espectros do tipo fluorescente (controle) e branco não apresentaram diferença estatística entre si, e apresentaram valores superiores de percentual de recuperação quando comparados com os demais tratamentos.

No presente estudo, foram utilizadas CNs de primeira indução que após 7 semanas de cultivo foram criopreservadas e recuperadas em diferentes espectros, dentre eles o espectro fluorescente. Pradella (2019) utilizou como explante CNs que passaram pelo processo da repicagem e foi sugerido ao final de seu estudo, que CNs que não passassem pela repicagem poderiam ter resultados ainda mais proeminentes após a criopreservação, nesse trabalho o processo de recuperação das CNs após a criopreservação foi realizado na luz florescente e foi obtido percentual de regeneração de 79,2%, superior ao percentual obtido no presente estudo no qual foi utilizado CNs obtidos do primeiro cultivo in vitro, cujos valores podem ser observado (Tabela 2).

Tabela 2: Percentual de recuperação das Culturas Nodulares (CNs) *Vriesea reitzii* aos 45 dias de cultivo em meio de cultura MS, suplementado com vitaminas de Morel, 30 g L⁻¹ de sacarose e 4μM ácido naftaleno acético (ANA), submetidas a diferentes espectros luminosos.

Espectros Luminosos	Recuperação (%)
Fluorescente (Controle)	56,25a
Branco	75,00a
Azul/Vermelho	31,25b
Vermelho	18,75b
Azul	6,25b

* Valores médios seguidos de letras diferentes pela mesma letra na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey (5%), e testes de χ^2 ($p \leq 0,05$).

Em *Vriesea reitzii* ainda não foram realizados estudos que apresentem qual o melhor estágio de desenvolvimento para a repicagem de CNs na qual os índices de divisões celulares fossem satisfatórios. Dias et al (2020) trabalhando com embriogênese somática de *Araucaria augustifolia*, sugeriu que os embriões durante o seu desenvolvimento passavam por quatro fases: inicial, exponencial, linear, e estacionária, sendo que o final da exponencial e início da linear eram as fases em que os embriões tiveram as taxas de divisão celular mais elevadas, enquanto na fase estacionária, os níveis de divisão celular foram os mais baixos. Trabalho realizado por Rodrigues et al (2022), com calos de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. mostraram que a curva de crescimento sigmoide com cinco fases, sendo elas: exponencial, linear, desaceleração, estacionário e declínio, e que no final da fase de desaceleração em média após 28 dias de cultivo, seria o momento ideal para realizar a repicagem dos calos.

Estudo relacionados com as fases de desenvolvimento foram realizados em *Uncaria guianensis* (PEREIRA, et al., 2007), *Myracrodruon urundeuva* (SILVA et al., 2020), *Tabebuia roseo* (ABBADÉ et al., 2010), *Campomanesia adamantium* (ROSSATO et al., 2019) entre outros. Logo, estudos para entender melhor as fases de desenvolvimento de CNs em *Vriesea reitzii* poderiam explicar a razão pela qual CNs que passaram pelo processo de repicagem se saíram com células mais capazes do que aquelas de primeira indução após a criopreservação.

É possível observar que as CNs recuperadas submetidas ao espectro de luz fluorescente (Figura 3A), destacam-se pelo seu tom mais verde quando comparados àquelas submetidas aos demais tratamentos (Figura 3). Na figura 3 pode-se observar que as CNs B, C, D, recuperadas nos espectros, branco, azul/vermelho e vermelho respectivamente, desenvolveram um tom amarelado e algumas partes levemente oxidadas como pode ser observado na figura 3 C. Na figura 3 E as CNs apresentam um tom albino e um aspecto mais compacto mantendo índice de divisão celular como pode-se observar na figura 3 J.

Imagens a partir de microscopia de luz é possível observar células com elevada proliferação e células em divisão conforme indicado (Figura 3 F, J), respectivamente. Na figura 3 G, H é possível visualizar um índice maior de vacuolização das células, mas mantendo algumas células em divisão, enquanto na figura 3 I fica difícil distinguir o núcleo do citoplasma mais denso. Já nas análises realizadas em microscopia eletrônica de varredura, CNs não demonstraram alterações anatômicas após 45 dias de recuperação nos diferentes espectros luminosos como podemos observar (Figura 3 K, L, M, N, O).

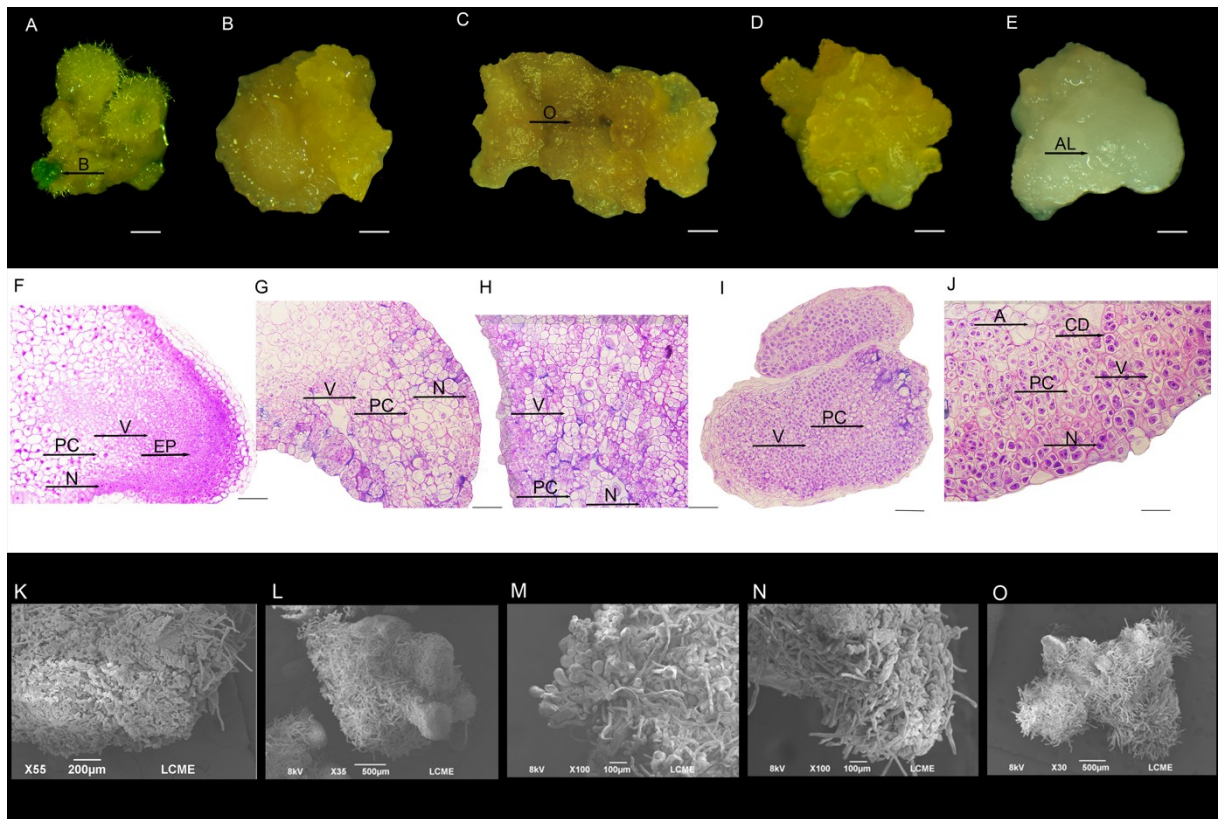


Figura 3. Análise morfológicas das Culturas Nodulares (CNs) *Vriesea reitzii* recuperadas em meio de cultura MS, suplementado com vitaminas de Morel, 30 g L⁻¹ de sacarose e 4µM ácido naftaleno acético (ANA) 45 dias após submetidas a diferentes espectros luminosos: (A) CNs recuperadas em luz fluorescente; (B), espectro branco; azul/vermelho (C), vermelho (D) e azul (E). Microscopia óptica de CNs recuperadas nos espectros fluorescente (F), branco (G), azul/vermelho (H), vermelho (I) e azul (J). Imagens em microscopia eletrônica de varredura (MEV) de CNs após 45 dias recuperadas nos espectros fluorescente (K), branco (L), azul/vermelho (M), vermelho (N) e azul (O). N: núcleo; V: vacúolo; PC: parede celular; A: amido, AL: CN com coloração albina, B: CN com brotações, O: células com oxidação, CD: células em divisão, EP: células com elevada proliferação. Barras: 1 cm.

No presente trabalho, em *Vriesea reitzii* é possível observar que a sobrevivência de CNs após a criopreservação é afetada em função dos espectros luminosos no qual o material vegetal, que pode estar relacionado com tempo de exposição e com a intensidade luminosa na qual o material foi submetido. Estudos relacionados com a recuperação de material vegetal quando submetidos a diferentes espectros luminosos após a criopreservação ainda são escassos. Edesi (2014), utilizando brotos de diferentes variedades de *Solanum tuberosum* avaliou os efeitos dos diferentes espectros luminosos na sobrevivência e regeneração dos brotos após a criopreservação, e observou que o efeito na sobrevivência variou de forma significativa entre as cultivares estudadas e não de forma significativa entre os espectros luminosos, e que a

composição espectral na qual os brotos foram submetidos tiveram um efeito significativo na sobrevivência e regeneração após a criopreservação.

Em *Solanum tuberosum*, o número de brotações nos diferentes espectros luminosos permaneceu baixa, apesar da alta sobrevivência, exceto no tratamento azul/vermelho onde observou-se um aumento significativo no número de brotações. Os resultados desse trabalho indicaram que o alto índice de luz vermelha (90%) e azul (10%) melhoraram a formação de brotos após a criopreservação, mas ele não se repetiu quando azul e vermelho foram fornecidos separadamente, indicando que a presença de ambos os espectros é essencial para a regeneração de brotos após a criopreservação e que a otimização na relação entre os espectros azul/vermelho pode fornecer resultados ainda melhores (EDESI et al., 2014).

Da mesma forma, estudos relacionados com a composição espectral pré-criopreservação tiveram um efeito significativo na sobrevivência pós-criopreservação de brotos em diferentes variedades de *Solanum tuberosum*, sendo os melhores resultados obtidos a partir do espectro azul após 4 semanas de descongelamento e os piores resultados obtidos com espectro vermelho e branco (EDESI et al., 2017). Em *Vriesea reitzii* a regeneração em microbrotos após a criopreservação de CNs foi somente estudado no espectro fluorescente (PRADELLA, 2019). No presente estudo, não foi possível saber se os diferentes espectros luminosos afetam a regeneração em microbrotos ou não, mas sabe-se que afeta a sobrevivência.

Logo, estudos relacionados com a regeneração de microbrotos de *Vriesea reitzii* após a criopreservação em diferentes espectros bem como o uso desses na pré-criopreservação, podem esclarecer melhor como os diferentes espectros influenciam na regeneração de microbrotos após a criopreservação.

4.2 GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Vriesea reitzii*

Em relação ao número de sementes germinadas, foi possível observar um alto índice de germinação em todos os espectros de luz avaliados após 90 dias de cultivo *in vitro* de sementes de *V. reitzii* (Figura 4), não sendo possível observar diferença estatística significativa nos resultados obtidos nessa variável. Com relação a variável número de folhas, plântulas submetidas a luz fluorescente (Figura 4A) o valor foi de 4,50 e no espectro de luz azul (Figura 4E) foi de 4,15, sendo as médias de maiores valores, seguido pelos materiais vegetais submetidos ao espectro de luz branco 3,92 e espectro de luz azul/vermelho 3,64. O menor valor encontrado foi em plântulas submetidas ao espectro de luz vermelho (2,73), mas não diferiu estatisticamente dos demais valores encontrados. (Tabela 3).

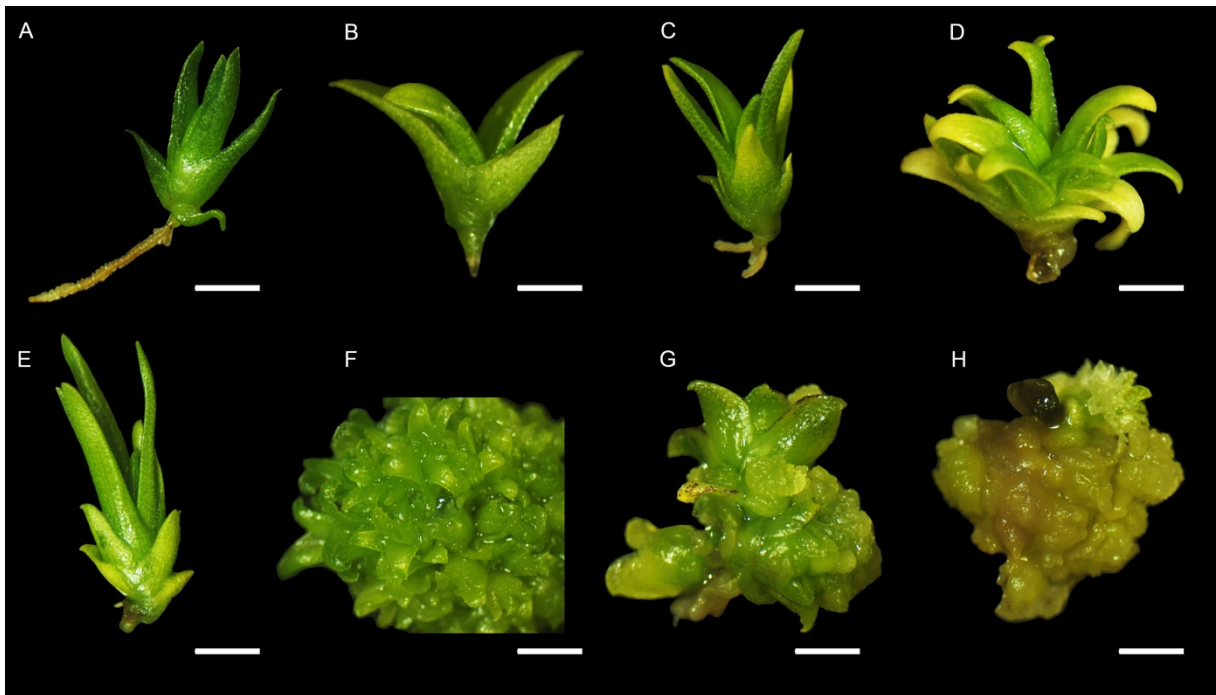


Figura 4: Plântulas obtidas de sementes de *Vriesea retizii* germinadas em meio de cultura MS isento de fitoreguladores e submetidas a diferentes espectros luminosos, após 90 dias de cultivo *in vitro*. (A) fluorescente com presença de raiz, (B) branco com algumas folhas, (C) azul/vermelho com presença de algumas raízes, (D) vermelho com algumas folhas e apresentando foto dano, (E) azul com algumas folhas e sem a presença de raízes. Indução de culturas nodulares e regeneração de brotações múltiplas obtidas a partir de semente em: (F) espectro branco que apresentou inúmeras brotações (G) espectro de luz azul/vermelho e; (H) culturas nodulares com oxidação. Barras: 2cm.

Com relação ao número de raízes, plântulas submetidas ao espectro de luz fluorescente o número médio foi de 0,57, sendo esse o maior valor encontrado diferindo estatisticamente dos demais valores e não diferindo de plântulas submetidas ao espectro de luz vermelho que obteve valor médio de 0,24. Os menores valores encontrados foram em plântulas submetidas ao espectro de luz branco, 0,17, e azul/vermelho 0,05. Plântulas germinadas no espectro azul (Figura 4E) não emitiram raízes como pode ser observado na Tabela 3. A variável comprimento de raízes, material vegetal submetido aos espectros de luz fluorescente foi de 1,45, sendo esse o maior valor encontrado diferindo estatisticamente dos demais valores obtidos para essa variável. Plântulas submetidas ao espectro de luz branco 0,34, azul/vermelho 0,05 e vermelho 0,24, foram os menores valores observados não diferindo entre si. Enquanto no espectro azul não houve emissão de raízes, como visto na Tabela 3.

Tabela 3: Números médios de plântulas, folhas, número de raiz e tamanho de raiz, altura de plântulas, massa fresca e massa seca a partir da germinação de sementes de *Vriesea reitzii*, cultivadas em meio de cultura MS gelificado e isento de fitorreguladores e submetidas a diferentes espectros luminosos aos 90 dias de cultivo *in vitro*.

Tratamento	Nº de Plântulas	Nº de folhas	Nº de raiz	Comprimento de Raiz(mm)	Altura da plântula (mm)	Massa Fresca (mg)	Massa Seca (mg)
Fluorescente	0,92a	4,50a	0,57a	1,45a	5,47a	0,0785a	0,0070a
Branco	0,98a	3,92a	0,17b	0,34b	3,21ab	0,0504ab	0,0050ab
Azul/Vermelho	0,85a	3,64a	0,05b	0,05b	2,79b	0,0466ab	0,0050ab
Vermelho	0,73a	2,73a	0,24ab	0,24b	2,58b	0,0309b	0,0031b
Azul	0,82a	4,15a	0,00b	0,00b	3,00b	0,0323b	0,0039b
CV (%)	6,22	10,27	8,94	14,71	9,33	1,04	0,08

* Média de quatro repetições. Média seguida de letras diferentes na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Tabela 4: Concentrações de clorofila, a, b carotenoides e clorofila total em brotos oriundos da germinação de sementes de *Vriesea reitzii* aos 90 dias de cultivo *in vitro* submetidas a diferentes espectros luminosos.

Tratamento	Clorofila a (mg.g-1 MF)	Clorofila b (mg.g-1 MF)	Clorofilas Totais (mg.g-1 MF)	Caratenoides (mg.g-1 MF)
Fluorescente	0,29a	0,35ab	0,63a	0,84ab
Branco	0,13bc	0,40a	0,53ab	0,78ab
Azul/Vermelho	0,07bc	0,30ab	0,38bc	0,56bc
Vermelho	0,04c	0,21b	0,25c	0,38c
Azul	0,16b	0,44a	0,61a	0,88a
CV (%)	25,12	17,49	16,99	16,85

* Média de quatro repetições. Média seguida de letras diferentes na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Com relação a altura das plântulas, essas quando submetidos ao espectro de luz fluorescente, (5,47), obtiveram as maiores médias não diferindo estatisticamente do espectro branco (3,21), mas diferindo estatisticamente dos espectros azul/vermelho (2,79), vermelho (2,58) e azul (3,00) que obtiveram as menores médias (Tabela 3). De forma geral, plântulas de *Vriesea reitzii* obtidos através de sementes germinadas no espectro de luz fluorescente (Figura 4A), obtiveram os melhores resultados nas análises morfométricas, principalmente na variável altura de plântulas, o que é um resultado interessante, visto o tamanho reduzido que é normalmente observado em plântulas da espécie, esse resultado pode estar relacionado com o fato da luz fluorescente promover uma maior aquecimento, e pela espécie estudada requer temperaturas mais elevadas para promover a germinação.

Para as variáveis de massa seca e massa fresca plântulas de *Vriesea reitzii* após 90 dias de cultivo *in vitro*, verificou-se diferença estatística significativa para os valores obtidos no espectro fluorescente e os espectros de luz vermelho e azul, embora vermelho e azul não difiram estatisticamente entre si (Tabela 3). Para massa fresca ao 90.º dia de cultivo *in vitro*, as plântulas submetidas ao espectro de luz fluorescente apresentaram a maior massa média, cujo valor foi de 0,0785mg, seguido pelos valores obtidos de plântulas submetidas ao espectro luz branco (0,0504mg) e azul/vermelho (0,0466mg), embora não apresentem diferença estatística significativa entre eles (Tabela 3). As plântulas cultivadas no espectro de luz vermelho os valores de massa fresca foram de 0,0309 mg e aquelas submetidas ao espectro de luz azul foi de 0,0323mg, sendo os menores valores de massa fresca e não apresentando diferença estatística significativa entre si, e diferem-se estatisticamente do tratamento com espectro de luz fluorescente.

No que diz respeito a massa seca das plântulas, aos 90 dias de cultivo, os valores obtidos seguiram a mesma tendência apresentada nas médias de massa fresca, o que era esperado. Plântulas submetidas ao tratamento de luz fluorescente apresentaram a maior média de massa seca equivalente a 0,0070mg, seguido pelas plântulas submetidas aos espectros branco (0,0050 mg) e azul/vermelho (0,0050mg). Os valores não apresentaram diferença estatística entre si (Tabela 3). Para as plântulas cultivadas no espectro de luz vermelho, a matéria seca foi de 0,0031mg e no espectro de azul foi de 0,0039 mg, esses foram os menores valores médios apresentados de massa seca e diferem estatisticamente do valor obtido no tratamento de luz fluorescente.

Com relação aos pigmentos aos 90 dias de cultivo *in vitro*, o teor de clorofila *a* obtido a partir do material vegetal proveniente do tratamento no espectro de luz fluorescente (Figura

4A), foi a maior média, equivalente a $0,29 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$, enquanto em material vegetal submetido ao espectro de luz vermelho (Figura 4D) observou-se o menor valor médio ($0,04 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$) diferindo estatisticamente dos valores obtidos no espectro de luz fluorescente (Tabela 4). Com relação aos teores de Clorofila *b*, as maiores médias foram obtidas em material vegetal obtidos em espectros luminosos azul ($0,44 \text{ mg.g-1 MF}$), branco ($0,40 \text{ mg.g-1 MF}$), fluorescente ($0,35 \text{ mg.g-1 MF}$) e azul/vermelho ($0,30 \text{ mg.g-1 MF}$), cujos valores não apresentaram diferença estatística significativa entre si. Enquanto o material vegetal submetido ao espectro de luz vermelho foi de $0,21 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$, sendo a menor média observada, diferindo estatisticamente dos valores obtidos quando o material vegetal foi obtido nos espectros de luzes azul e branco, não apresentando diferença estatística significativa (Tabela 4).

Para o teor de clorofilas totais, Plântulas germinadas nos espectros fluorescente ($0,63 \text{ mg.g-1 MF}$), azul ($0,61 \text{ mg.g-1 MF}$) e branco ($0,53 \text{ mg.g-1 MF}$) mostraram as maiores médias e não diferiram estatisticamente entre si. A menor média obtida foi em plântulas germinadas no espectro vermelho ($0,25 \text{ mg.g-1 MF}$) que diferiu estatisticamente das germinadas nos espectros, fluorescente, branco e azul (Tabela 4.) Em relação ao teor de carotenoides, as maiores médias obtidas foram de plântulas submetidas aos espectros azul ($0,88 \text{ mg.g}^{-1}\text{MF}$), fluorescente ($0,84 \text{ mg.g}^{-1}\text{MF}$) e branco ($0,78 \text{ mg.g}^{-1}\text{MF}$) que não diferiram estatisticamente entre si. A menor média obtida com relação ao teor de carotenoides foi em plântulas germinadas no espectro vermelho ($0,38 \text{ mg.g}^{-1} \text{ MF}$), diferindo estatisticamente das plântulas dos tratamentos de espectros fluorescente, branco e azul (Tabela 4).

Poudel et al (2008) utilizando brotos de videira das cultivares “Franco Híbrido”, “Kadainou R-1” e *Vitis ficifolia* var. “ganebu”, obtiveram os maiores teores de clorofila, número de folhas por explante, em plantas cultivadas em LEDs azul, resultados esses que corroboram com o presente estudo visto que o maior teor de clorofila, e número de folhas foram encontrados em brotos germinados no espectro azul e fluorescente. Em estudo realizado por Heo et al (2006), os pesos frescos e secos de brotos de porta-enxertos de uva “Teleki5BB” cultivadas in vitro, foram maiores quando cultivadas nos espectros fluorescente, vermelho, e azul/vermelho, resultado esses, que também foram obtidos no presente estudo.

Estudo relacionado a germinação de sementes de *Stevia reubadiana* sugere que a luz LED azul aumentou a germinação das sementes, mas afetou o desenvolvimento de folhas e raízes, além de influenciar de forma positiva a concentração de carotenoides, entretanto as maiores concentrações de clorofila *a* e clorofila *b*, foram encontradas em mudas germinadas no espectro de luz branca, a luz LED vermelha acabou por aumentar significativamente o

comprimento do caule e das raízes e teve o efeito menos favorável na síntese de pigmentos (SIMLAT et al., 2016). Em nosso estudo, a luz azul promoveu a germinação das sementes de *Vriesea reitzii* e afetou de forma negativa o desenvolvimento de raízes, visto que não houve o desenvolvimento dessas, em relação a concentração de carotenoides, no presente trabalho, as maiores concentrações também foram encontradas em plântulas germinadas em espectro de luz azul, entretanto, as maiores concentrações de clorofila *a* foram encontradas no espectro fluorescente e as de clorofila *b* nos espectros de luz azul e branco. Plântulas submetidas ao espectro de luz vermelho, tiveram os menores teores de pigmentos, corroborando com o estudo realizado com *Stevia reubadiana*.

Plantas de *Doritaenopsis* cultivadas *in vitro* e submetidas a diferentes espectros, sintetizaram maior teor de carotenoides, clorofila totais e tamanho de área foliar quando submetidas no espectro de luz azul/vermelho, entretanto o maior valor obtido em comprimento de folha foi obtido quando o material foi exposto ao espectro de luz vermelho (SHIN et al., 2008), no entanto esses resultados não se repetiram em *Vriesea reitzii* mostrando que os valores obtidos variam de espécie para espécie e também de acordo com o explante utilizado, sementes apesar de serem ótimos explantes para se manter a variabilidade genética das plantas, também trazem características únicas consigo, o que faz com que cada semente se comporte uma forma.

Alguns autores afirmam que a combinação dos espectros de luz azul/vermelho pode induzir um maior número de folhas, maior massa seca e teores de clorofila, do que quando usados separadamente (NAZNIN et al., 2019; CHUNG et al., 2010). A luz azul e vermelha quando combinadas pode aumentar o rendimento das plantas quando comparadas aos tratamentos com luzes monocromáticas (OLLE & VIRSILE., 2013), provavelmente pelo fato de que combinação de luzes vermelha e azul excitam de forma mais eficiente os fotorreceptores das plantas (DOU et al., 2017; SABZALIAN et al., 2014) aumentando a fotossíntese e o crescimento das plantas (SABZALIAN et al., 2014; SPALHOLZ et al., 2020). Entretanto, esse comportamento esperado foi observado em partes nas plântulas de *Vriesea reitzii* germinadas nessa combinação de espectros, visto que teve número mais baixos que as plântulas submetidas a luz fluorescente, branca, mas não diferiu estatisticamente desses, isso pode estar relacionado com o espectro de luz na qual as plântulas foram submetidas, *Vriesea reitzii* pode se comportar de forma melhor e mais significativa quando exposta a outras combinações de espectros de luz, que não foram estudados no presente trabalho.

O espectro de luz tem efeitos importantes no crescimento e desenvolvimento da planta (BOTTERWEG-PAREDES et al., 2010). O espectro de luz vermelho pode afetar o número de

folhas e o conteúdo de clorofila como estudado em *Oryza sativa* e em *Cucumis sativus* (HANDAMI et al., 2019; SU et al., 2014). Em relação a luz azul, ela desempenha um papel importante na síntese da clorofila, fotomorfogênese e pode melhorar a adaptação das plantas à luz (WALTERS et al., 2005; LI & KUBOTA, 2009).

Luzes de espectro azul e vermelho quando fornecidos separadamente são os principais responsáveis por influenciar a fotossíntese e induzir a planta a produzir e acumular teores de clorofilas (SAEBO et al., 1995; MCCREE., 1972). Isso se deve ao fato de que a clorofila *a* absorve energia preferencialmente no espectro de luz vermelho, enquanto a clorofila *b*, absorve de forma mais efetiva no espectro de luz azul. Estudos com plantas de tomateiro cultivadas sob luzes vermelha e azul/vermelha obtiveram os maiores conteúdos de clorofila *a* e *b* e carotenóides quando comparado com outros comprimentos de luzes (YANG et al., 2018). No presente trabalho, os maiores teores de clorofila *a* foi observado no espectro de luz fluorescente enquanto os maiores níveis de clorofila *b* e carotenóides foi observado nas plântulas submetidas a luz do espectro azul, corroborando com trabalhos que relatam que a clorofila *b* absorve melhor a energia vinda desse espectro de luz.

No presente estudo, pode ser observada diferença de coloração nas folhas das plântulas submetidas aos espectros de luz vermelho e azul/vermelho (Figura 4C, D), isso pode estar relacionado com o tempo de exposição e com a intensidade luminosa nas quais as plântulas foram submetidas, além do baixo teor de clorofila e carotenóides encontrado em plântulas submetidas a esses espectros como pode ser observado. Os baixos teores de pigmentos fotossintéticos podem indicar a ocorrência de fotoinibição devido a radiação, no que se refere a captação de luz em ambientes com menor luminosidade e a proteção contra a fotodestruição em ambientes com maior luminosidade (GOMES et al., 2008). Algumas sementes submetidas ao espectro de luz azul/vermelho acabaram por não gerar plântulas de forma convencional, e criou-se ali um aglomerado de células remetendo a culturas nodulares como pode ser observado (Figura 4 G, H).

Estudos relacionados ao crescimento de calos de *Hyoscyamus reticulatus* expostos a luz LED vermelha e azul alterou a forma celular desses calos, esse fato pode estar relacionado ao impacto desses espectros no controle da expressão gênica da forma celular e/ou ativação de enzimas que controlam o enrijecimento da parede celular (HASSANPOUR., 2021).

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVA

Neste trabalho, foi possível avaliar que a recuperação de CNs de *Vriesea reitzii* após a criopreservação é afetada por diferentes espectros luminosos. As maiores taxas de recuperação foram obtidas nos espectros fluorescente e branco.

Estudos sobre tratamentos com luzes pré- e pós-criopreservação ainda são incipientes, mas sabe-se que pode afetar tanto a sobrevivência como a regeneração e pode mudar conforme a variedade/espécie a ser estudada. Logo, estudos sobre o uso de diferentes espectros luminosos antes e depois da criopreservação podem trazer importantes resultados.

Em relação as taxas de germinação, todos os tratamentos obtiveram bons índices de germinação, porém o espectro fluorescente teve destaque na variável altura da plântulas quando comparado aos outros tratamentos, assim como a variável clorofila total e carotenoides onde teve altos índices junto com o espectro de luz azul.

Novas pesquisa são sugeridas a partir dos resultados obtidos, o primeiro deles se remete a acompanhar o padrão de desenvolvimento e regeneração em microbrotos nos diferentes espectros luminosos de culturas nodulares criopreservadas. Como segunda sugestão analisar possíveis alterações na expressão gênica com caráter epigenético, através do uso de miRNA.

REFERÊNCIAS

- ABBADE, Leticia Caravita et al. Growth curve and biochemical analyses of callus of Ipebranco (*Tabebuia roseo alba* (Ridl.) Sand.). **Naturalia**, v. 33, 2010.
- ALINE, Bireahls Estabelecimento *ex situ* de uma coleção de germoplasma de bromélias da floresta ombrófila mista e floresta ombrófila densa. 2015. TCC (Graduação em Agronomia)-Curso de agronomia, Centro de Ciências Rurais, Universidade de ..., Campus de Curitibaanos, Curitibaanos, SC. 2015.
- ALVES FILHO, G. M. et al. Allozymic markers and genetic characterization of a natural population of *Vriesea friburgensis* var. *paludosa*, a bromeliad from the Atlantic Forest. **Plant Genet Resour**, v. 2, p. 23-28, 2004.
- BARFUSS, Michael H.J. et al. Taxonomic revision of Bromeliaceae subfam. Tillandsioideae based on a multi-locus DNA sequence phylogeny and morphology. **Phytotaxa**, v. 279, n. 1, p. 1-97, 2016.
- BENSON, Erica E. **Free radical damage in stored plant germplasm**. Bioersivity International, 1990.
- BENSON, Erica E. Cryopreservation theory. *In*: REED, Barbara M. (ed.). **Plant cryopreservation: a practical guide**. Springer, New York, NY, 2008. p. 15-32.
- BENZING, David H.; BENNETT, B. **Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation**. Cambridge University Press, 2000.
- BERJAK, Patricia et al. The effects of various parameters during processing for cryopreservation on the ultrastructure and viability of recalcitrant zygotic embryos of *Amaryllis belladonna*. **Protoplasma**, v. 249, n. 1, p. 155-169, 2012.
- BI, Wen-Lu et al. Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.)—a review. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 53, n. 5, p. 449-460, 2017.
- BOUZON, Zenilda Laurita. Histoquímica e ultra-estrutura da ontogênese dos tetrasporângios de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). **Brazilian Journal of Botany**, v. 29, n. 2, p. 229-238, 2006.
- BOTTERWEG-PAREDES, Esther et al. Light affects tissue patterning of the hypocotyl in the shade-avoidance response. **PLoS genetics**, v. 16, n. 3, p. e1008678, 2020.
- BULA, R. J[†] et al. Light-emitting diodes as a radiation source for plants. **HortScience**, v. 26, n. 2, p. 203-205, 1991.
- CARPENTIER, Robert. Photosynthesis: Photoinhibition and Energy Dissipation. **Handbook of photosynthesis**, p. 443, 1996.

CARVALHO, J. M. F. C.; ARAÚJO, S. de S.; DA SILVA, M. A. **Preservação e intercâmbio de germoplasma**. Campina Grande, PB. Embrapa Algodão 2008, 24p. (Documentos, 106).

CHUNG, Jen-Ping; HUANG, Chia-Ying; DAI, Ting-En. Spectral effects on embryogenesis and plantlet growth of *Oncidium* 'Gower Ramsey'. **Scientia Horticulturae**, v. 124, n. 4, p. 511-516, 2010.

CORREDOR-PRADO, Jenny P.; SCHMIDT, Eder C.; GUERRA, Miguel P.; BOUZON, Zenilda L.; DAL VESCO, Lírio L.; PESCADOR, Rosete. Histodifferentiation and ultrastructure of nodular cultures from seeds of *Vriesea friburgensis* Mez var. *paludosa* (LB Smith) LB Smith and leaf explants of *Vriesea reitzii* Leme & A. Costa (Bromeliaceae). **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 3, n. 4, p. 200-209, 2015.

CORREDOR-PRADO, Jenny Paola; DE CONTI, Daniela; ROECKER JÚNIOR, Djalma; CANGAHUALA-INOCENTE, Gabriela C.; GUERRA, Miguel P.; DAL VESCO, LÍRIO L.; PESCADOR, Rosete Proteomic identification of differentially altered proteins during regeneration from nodular cluster cultures in *Vriesea reitzii* (Bromeliaceae). **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 38, n. 2, p. 586-599, 2019.

FLORA DIGITAL-RS, SC. In: GIEHL, E.L.H. (coord.). **Flora Digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 2012. Disponível em: http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=7836. Acesso em: 31 mar. 2022.

CNCFlora. *Vriesea reitzii* in **Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2** Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Vriesea reitzii](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Vriesea_reitzii)>. Acesso em: 31 mar. 2022.

CONSELHO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE, RIO GRANDE DO SUL. Decreto estadual CONSEMA n. 42.099 de 31 de dezembro de 2002. Declara as espécies da flora nativa ameaçadas de extinção no estado do Rio Grande do Sul e da outras providências, Palácio Piratini, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 31 dez. 2002, 2002.

DA COSTA, Andrea Ferreira. *Vriesea* (Bromeliaceae, Tillandsioideae): taxonomic history, and morphology of the Brazilian lineage¹. **The Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 141, n. 4, p. 338-352, 2014.

DAL VESCO, L. L. VIEIRA, P.; CORREDOR, J. P.; PESCADOR, R; WELTER, L. J.; GUERRA, M.P.. Induction and development of nodular cluster cultures in *Vriesea reitzii* (Leme and Costa), an endangered bromeliad from the Brazilian Atlantic Forest. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 89, n. 5, p. 542-548, 2014b.

DAL VESCO, Lírio L. STEFENON, Valdir M.; WELTER, Leocir J.; STEINER, Neusa; GUERRA, Miguel P.. Induction and scale-up of *Billbergia zebrina* nodule cluster cultures: implications for mass propagation, improvement and conservation. **Scientia Horticulturae**, v. 128, n. 4, p. 515-522, 2011.

DAL VESCO, Lírio L.; PESCADOR, R; CORREDOR, J. P.; WELTER, L. J.; GUERRA, M.P. *In vitro* propagation of *Vriesea reitzii*, a native epiphyte bromeliad from the Atlantic rainforest. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 36, n. 3, p. 271-278, 2014a.

DÉZERALD, Olivier et al. Tank bromeliads sustain high secondary production in neotropical forests. **Aquatic sciences**, v. 80, n. 2, p. 1-12, 2018.

DIAS, Francis Pereira et al. Integrated proteomics and histochemical analysis of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (Araucariaceae) in embryogenic suspension culture. **Annals of Forest Research**, v. 63, n. 2, p. 27-43, 2020.

DOU, Haijie et al. Effects of light quality on growth and phytonutrient accumulation of herbs under controlled environments. **Horticulturae**, v. 3, n. 2, p. 36, 2017.

DUTTA GUPTA, S.; JATOTHU, B. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in *in vitro* plant growth and morphogenesis. **Plant Biotechnology Reports**, v. 7, n. 3, p. 211-220, 2013.

EDESI, Jaanika et al. Does light spectral quality affect survival and regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) shoot tips after cryopreservation?. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 119, n. 3, p. 599-607, 2014.

EDESI, Jaanika; PIRTTILÄ, Anna Maria; HÄGGMAN, Hely. Modified light spectral conditions prior to cryopreservation alter growth characteristics and cryopreservation success of potato (*Solanum tuberosum* L.) shoot tips *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 128, n. 2, p. 409-421, 2017.

ENGELMANN, Florent; DUSSERT, Stéphane. Cryopreservation. In: **Conservation of tropical plant species**. Springer, New York, NY, 2013. p. 107-119.

ENGELMANN, Florent. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 47, n. 1, p. 5-16, 2011.

FAHY, Gregory M. et al. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v. 21, n. 4, p. 407-426, 1984.

FERRARI, Edilene Aparecida Preti et al. Cryopreservation of seeds of *Encholirium spectabile* Martius ex Schultes f. by the vitrification method. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, p. 172-177, 2016.

FUNNEKOTTER, Bryn; MANCERA, Ricardo L.; BUNN, Eric. Advances in understanding the fundamental aspects required for successful cryopreservation of Australian flora. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 53, n. 4, p. 289-298, 2017.

GEORGE, Edwin F. **Plant propagation by tissue culture**. 1993.

GOMES, Inês Angélica Cordeiro et al. Alterações morfofisiológicas em folhas de Coffea arabica L. cv." Oeiras" sob influência do sombreamento por Acacia mangium Willd. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p. 109-115, 2008.

GONZALEZ-ARNAO, Maria Teresa et al. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 92, n. 1, p. 1-13, 2008.

GONZÁLEZ-ARNAO, María T.; ENGELMANN, Florent. **Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe**. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 2013.

GUERRA, Miguel Pedro; VESCO, Lirio Luiz Dal. Strategies for the micropropagation of bromeliads. In: **Protocols for in vitro propagation of ornamental plants**. Humana Press, 2010. p. 47-66.

HALLIDAY, Karen; WHITELAM, Garry C. **Light and Plant Development**. Oxford: Blackwell, 2007.

HAMDANI, Saber et al. Changes in the photosynthesis properties and photoprotection capacity in rice (*Oryza sativa*) grown under red, blue, or white light. **Photosynthesis research**, v. 139, n. 1, p. 107-121, 2019.

HARDING, Keith; JOHNSTON, Jason W.; BENSON, Erica E. Exploring the physiological basis of cryopreservation success and failure in clonally propagated in vitro crop plant germplasm. **Agricultural and Food Science**, v. 18, n. 2, p. 103-116, 2009.

HASSANPOUR, Halimeh. Potential impact of red-blue LED light on callus growth, cell viability, and secondary metabolism of *Hyoscyamus reticulatus*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, p. 1-10, 2021.

HEO, Jeong Wook et al. Light quality affects in Vitro growth of grape 'Teleki 5BB'. **Journal of Plant Biology**, v. 49, n. 4, p. 276-280, 2006.

HERINGER, Angelo Schuabb et al. Survival and ultrastructural features of peach palm (*Bactris gasipaes*, Kunth) somatic embryos submitted to cryopreservation through vitrification. **Protoplasma**, v. 250, n. 5, p. 1185-1193, 2013.

HMELJEVSKI, Karina V. et al. Conservation assessment of an extremely restricted bromeliad highlights the need for population-based conservation on granitic inselbergs of the Brazilian Atlantic Forest. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 209, n. 5-6, p. 250-259, 2014.

JUNGHANS, Tatiana Góes; SOUZA, AS da. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009.

KÄMPF, Atelene Normann. Produção comercial de plantas ornamentais. **Guaíba: Agropecuária**, 2005.

- KESSOUS, Igor Musauer et al. New records of *Vriesea agostiniana* E. Pereira, and *Vriesea saltensis* Leme & L. Kollmann (Bromeliaceae, Tillandsioideae) from southeastern Brazil. **Check List**, v. 14, n. 1, p. 37, 2018.
- KULUS, Dariusz; ZALEWSKA, Małgorzata. Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species—a review. **Scientia Horticulturae**, v. 168, p. 88-107, 2014.
- LAZZARINI, Luiz Eduardo Santos et al. Uso de diodos emissores de luz (LED) na fisiologia de plantas cultivadas: revisão. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 16, n. 2, p. 137-144, 2017.
- LEME, E. M. C.; COSTA, A. A new species from Southern Brazil: A tribute to Father Raulino Reitz. **Journal of the Bromeliad Society (USA)**, 1991.
- LI, De-Zhu; PRITCHARD, Hugh W. The science and economics of ex situ plant conservation. **Trends in plant science**, v. 14, n. 11, p. 614-621, 2009.
- LI, Jing-Wei et al. Cryopreservation and evaluations of vegetative growth, microtuber production and genetic stability in regenerants of purple-fleshed potato. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 128, n. 3, p. 641-653, 2017.
- LI, Qian; KUBOTA, Chieri. Effects of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, n. 1, p. 59-64, 2009.
- LÜTTGE, Ulrich. **Physiological ecology of tropical plants**. Springer Science & Business Media, 2007.
- MARTINELLI, Gustavo et al. Bromeliaceae da Mata Atlântica brasileira: lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, v. 59, p. 209-258, 2008.
- MARTINELLI, Gustavo. The bromeliads of the Atlantic Forest. **Scientific American**, v. 282, n. 3, p. 86-93, 2000.
- MARTINEZ-MONTERO, Marcos Edel; GONZALEZ-ARNAO, M. T.; ENGELMANN, Florent. Cryopreservation of tropical plant germplasm with vegetative propagation—review of sugarcane (*Saccharum* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill) cases. **Curr Front Cryo**, p. 359-396, 2012.
- MCCREE, Keith J. Test of current definitions of photosynthetically active radiation against leaf photosynthesis data. **Agricultural meteorology**, v. 10, p. 443-453, 1972.
- MERZLYAK, Mark N.; SOLOVCHENKO, Alexei E. Photostability of pigments in ripening apple fruit: a possible photoprotective role of carotenoids during plant senescence. **Plant Science**, v. 163, n. 4, p. 881-888, 2002.
- METZGER, Jean Paul. Conservation issues in the Brazilian Atlantic forest. **Biological Conservation**, 2009.

MONTOYA-SERRANO, Francisco S. et al. Seeds cryopreservation of *Vriesea reitzii* Leme & AF Costa endemic bromeliad from Atlantic Rainforest.

MUNEER, Sowbiya et al. Influence of green, red and blue light emitting diodes on multiprotein complex proteins and photosynthetic activity under different light intensities in lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.). **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 3, p. 4657-4670, 2014.

MURASHIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

MYERS, Norman et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.

NAZNIN, Most Tahera et al. Blue light added with red LEDs enhance growth characteristics, pigments content, and antioxidant capacity in lettuce, spinach, kale, basil, and sweet pepper in a controlled environment. **Plants**, v. 8, n. 4, p. 93, 2019.

NIINO, Takao; ARIZAGA, Miriam Valle. Cryopreservation for preservation of potato genetic resources. **Breeding science**, v. 65, n. 1, p. 41-52, 2015.

O'BRIEN, TrP; FEDER, N.; MCCULLY, Mi E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

OLLE, Margit; VIRŠILE, Akvile. The effects of light-emitting diode lighting on greenhouse plant growth and quality. **Agricultural and food science**, v. 22, n. 2, p. 223-234, 2013.

PANIS, Bart; LAMBARDI, Maurizio. 6. Status of cryopreservation technologies in plants (crops). **The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources**, p. 61, 2006.

PARTON, E. et al. Viability and storage of bromeliad pollen. **Euphytica**, v. 125, n. 2, p. 155-161, 2002.

PEREIRA, A. R. et al. Morphological aspects of seed, germination and storage of *Pitcairnia albiflos* (Bromeliaceae). **Seed Science and Technology**, v. 38, n. 1, p. 79-87, 2010.

PEREIRA, R. C. et al. Influence of different auxins in the induction and callus growth of *Uncaria guianensis* JF GMEL. **Plant Cell, Culture and Micropropagation**, v. 3, p. 69-77, 2007.

POUDEL, Puspa Raj; KATAOKA, Ikuo; MOCHIOKA, Ryosuke. Effect of red-and blue-light-emitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 92, n. 2, p. 147-153, 2008.

PRADELLA, E.M. **Criopreservação de sementes e culturas nodulares de *Vriesea reitzii* Leme & Costa e *Vriesea philippocoburgii* Wawra: Capacidade regenerativa, respostas morfoanatômicas e bioquímicas**, 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

- RAMÍREZ-MOSQUEDA, Marco A.; IGLESIAS-ANDREU, Lourdes G.; BAUTISTA-AGUILAR, José R. The effect of light quality on growth and development of in vitro plantlet of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Sugar Tech**, v. 19, n. 3, p. 331-336, 2017.
- REITZ, R. Bromeliáceas e a malária-bromélia endêmica. Itajaí. **Flora Ilustrada Catarinense**, 1983.
- RIBEIRO, Milton Cezar et al. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141-1153, 2009.
- RODRIGUES, Alba RP; FORZZA, Rafaela C.; ANDRADE, Antonio CS. Physiological characteristics underpinning successful cryopreservation of endemic and endangered species of Bromeliaceae from the Brazilian Atlantic Forest. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 176, n. 4, p. 567-578, 2014.
- RODRIGUES, Filipe A. et al. Curva de crescimento de calos de *Enterolobium contortisiliquum* induzidos *in vitro*. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1, p. e24911124550, 2022.
- ROQUE-BORDA, Cesar Augusto et al. Cryopreservation of Agronomic Plant Germplasm Using Vitrification-Based Methods: An Overview of Selected Case Studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 6157, 2021.
- ROSSATO, Marieli et al. Embryogenic potential of the callus of gabirobeira, *Campomanesia adamantium* (Cambess) O. Berg. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 41, p. e46358-e46358, 2019.
- SABZALIAN, Mohammad R. et al. High performance of vegetables, flowers, and medicinal plants in a red-blue LED incubator for indoor plant production. **Agronomy for sustainable development**, v. 34, n. 4, p. 879-886, 2014.
- SÆBØ, Arne; KREKLING, Trygve; APPELGREN, Maigull. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 41, n. 2, p. 177-185, 1995.
- SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 9, n. 1, p. 30-33, 1990.
- SAKAI, Akira; ENGELMANN, Florent. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. **CryoLetters**, v. 28, n. 3, p. 151-172, 2007.
- SAKAI, Akira; HIRAI, Dai; NIINO, Takao. Development of PVS-based vitrification and encapsulation–vitrification protocols. In: **Plant cryopreservation: a practical guide**. Springer, New York, NY, 2008. p. 33-57.

SCHERER, Ramon Felipe et al. Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). **Scientia Horticulturae**, v. 151, p. 38-45, 2013.

SCHMIDT, Éder C. et al. Alterations in architecture and metabolism induced by ultraviolet radiation-B in the carragenophyte *Chondracanthus teedei* (Rhodophyta, Gigartinales). **Protoplasma**, v. 249, n. 2, p. 353-367, 2012.

SHIN, Kong Sik et al. The effect of light quality on the growth and development of in vitro cultured *Doritaenopsis* plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 3, p. 339-343, 2008.

SILVA, Marina MA et al. Effect of blue/red LED light combination on growth and morphogenesis of *Saccharum officinarum* plantlets in vitro. In: **Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues XII**. International Society for Optics and Photonics, 2014. p. 89471X.

SILVA, Tecla dos Santos et al. Calogênese em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Ciência Florestal**, v. 30, p. 700-717, 2020.

SIMLAT, Magdalena et al. The effect of light quality on seed germination, seedling growth and selected biochemical properties of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Scientia Horticulturae**, v. 211, p. 295-304, 2016.

Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira - Disponível em :
https://collectory.sibbr.gov.br/collectory/?lang=pt_BR.

SOUZA, Fernanda V. D. et al. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 124, n. 2, p. 351-360, 2016.

SOUZA, Fernanda V. D.; SOUZA, Everton H. de; SILVA, Ronilze L. da. Cryopreservation of pollen grains of pineapple and other bromeliads. **Plant cell culture protocols**. Humana Press, New York, NY, 2018. p. 279-288.

SOUZA, Girlene et al. Teores de pigmentos fotossintéticos, taxa de fotossíntese e estrutura de cloroplastos de plantas jovens de *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker (Guaco) cultivadas sob malhas coloridas. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 12, 2011.

SPALHOLZ, Hans; PERKINS-VEAZIE, Penelope; HERNÁNDEZ, Ricardo. Impact of sun-simulated white light and varied blue: red spectrums on the growth, morphology, development, and phytochemical content of green-and red-leaf lettuce at different growth stages. **Scientia Horticulturae**, v. 264, p. 109195, 2020.

STEGANI, Vanessa et al. Criopreservação de sementes de rainha do abismo (*Sinningia leucotricha*). **Ornamental Horticulture**, v. 23, p. 15-21, 2017.

STEHMANN, João R. **Plantas da floresta Atlântica**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2009.

- SU, Nana et al. Effects of light quality on the chloroplastic ultrastructure and photosynthetic characteristics of cucumber seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 73, n. 3, p. 227-235, 2014.
- SUN, Jindong; NISHIO, John N.; VOGELMANN, Thomas C. Green light drives CO₂ fixation deep within leaves. **Plant and Cell Physiology**, v. 39, n. 10, p. 1020-1026, 1998.
- TAIZ, Lincoln et al. **Fundamentos de Fisiologia Vegetal-6**. Artmed Editora, 2021.
- TARRÉ, Erika et al. Germinability after desiccation, storage and cryopreservation of seeds from endemic *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. and *Dyckia* Schult. & Schult. f. species (Bromeliaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, p. 777-783, 2007.
- VEIGA, RENATO F. de A. et al. Levantamento de plantas ornamentais nativas, mantidas sob conservação ex situ no Brasil. **Ornamental Horticulture**, v. 15, n. 1, 2009.
- VILLALOBOS, V. M.; ENGELMANN, F. Ex situ conservation of plant germplasm using biotechnology. **World journal of microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 375-382, 1995.
- VOLK, Gayle M.; CASPERSEN, Ann M. Plasmolysis and recovery of different cell types in cryoprotected shoot tips of *Mentha* × *piperita*. **Protoplasma**, v. 231, n. 3, p. 215-226, 2007.
- VOLK, Gayle M.; WALTERS, Christina. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. **Cryobiology**, v. 52, n. 1, p. 48-61, 2006.
- WALTERS, Robin G. Towards an understanding of photosynthetic acclimation. **Journal of experimental botany**, v. 56, n. 411, p. 435-447, 2005.
- WELLBURN, Alan R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of plant physiology**, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.
- WEN, Bin et al. Cytological and physiological changes in recalcitrant Chinese fan palm (*Livistona chinensis*) embryos during cryopreservation. **Protoplasma**, v. 249, n. 2, p. 323-335, 2012.
- WESLEY-SMITH, James et al. Why is intracellular ice lethal? A microscopical study showing evidence of programmed cell death in cryo-exposed embryonic axes of recalcitrant seeds of *Acer saccharinum*. **Annals of Botany**, v. 115, n. 6, p. 991-1000, 2015.
- WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação in vitro de recursos genéticos de plantas. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, p. 297-329, 1998.
- WYSE, Sarah V.; DICKIE, John B.; WILLIS, Katherine J. Seed banking not an option for many threatened plants. **Nature plants**, v. 4, n. 11, p. 848-850, 2018.

YANG, Xiaolong et al. Response of photosynthetic capacity of tomato leaves to different LED light wavelength. **Environmental and Experimental Botany**, v. 150, p. 161-171, 2018.

ZANELLA, Fábio; SONCELA, Regiani; LIMA, Ana L. da .S. Formação de mudas de maracujazeiro" amarelo" sob níveis de sombreamento em Ji-Paraná/RO. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 5, p. 880-884, 2006.

ZHANG, Dandan et al. The cysteine protease CEP1, a key executor involved in tapetal programmed cell death, regulates pollen development in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 26, n. 7, p. 2939-2961, 2014.