



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

THAYANNA VIEIRA COSTA

**ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS E ANATÔMICOS DE PLÂNTULAS DE
Handroanthus impetiginosus: REGULADORES DE CRESCIMENTO, TROCAS
GASOSAS E ENRIQUECIMENTO DE CO₂ NO CULTIVO *IN VITRO***

SÃO LUÍS - MA

2025

THAYANNA VIEIRA COSTA

**ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS E ANATÔMICOS DE PLÂNTULAS DE
Handroanthus impetiginosus: REGULADORES DE CRESCIMENTO, TROCAS
GASOSAS E ENRIQUECIMENTO DE CO₂ NO CULTIVO *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual do Maranhão como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Agrárias.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Thais Roseli Corrêa

Coorientadora: Dr^ª Anyela Marcela Ríos-Ríos

SÃO LUÍS- MA

2025

Costa, Thayanna Vieira.

Aspectos morfofisiológicos e anatômicos de plântulas de *Handroanthus impetiginosus*: reguladores de crescimento, trocas gasosas e enriquecimento de CO₂ no cultivo in vitro./Thayanna Vieira Costa. – São Luís, MA, 2025.

114f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Estadual do Maranhão, 2025.

Orientadora: Profa. Dra. Thais Roseli Corrêa.

1. Micropropagação. 2. Multiplicação. 3. Enraizamento. 4. CO₂ elevado. 5. Espécie lenhosa.
I. Título

Elaborado por Luciana de Araújo - CRB 13/445

THAYANNA VIEIRA COSTA

**ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS E ANATÔMICOS DE PLÂNTULAS DE
Handroanthus impetiginosus: REGULADORES DE CRESCIMENTO, TROCAS
GASOSAS E ENRIQUECIMENTO DE CO₂ NO CULTIVO *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual do Maranhão como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Agrárias.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Thais Roseli Corrêa

Coorientadora: Dr^a Anyela Marcela Ríos-Ríos

Aprovada em: 30/09/2025

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **THAIS ROSELI CORREA**
Data: 11/12/2025 09:56:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Thais Roseli Corrêa – (Orientadora)
Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

Documento assinado digitalmente
 **FABIO AFONSO MAZZEI MOURA DE ASSIS FIGUI**
Data: 11/12/2025 11:16:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente
 **NATANE AMARAL MIRANDA PADUA**
Data: 11/12/2025 13:58:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Natane Amaral Miranda
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro- UFRRJ

SÃO LUÍS- MA

2025

“Agrada-te do Senhor, e Ele satisfará os
desejos do teu coração.”

Salmos 37:4

AGRADECIMENTOS

Quando nasci, me ofereceram a uma mulher que não conseguia engravidar, mas que tinha um imenso sonho em ser mãe. Eu era apenas um bebê quando cheguei na família que futuramente mudaria todo o curso da minha história. Acredito que desde o início Deus tinha um plano para a minha vida, como diz em Jeremias 1:5 “antes mesmo de te formar no ventre materno, Eu te escolhi; antes que viesses ao mundo, Eu te separei para uma missão!”. Não sei quem eu poderia ser na minha família de origem, mas sei quem eu sou na família que me amou desde o primeiro momento. Eu te agradeço e te louvo, Deus, por todo o cuidado e misericórdia que teve e tem pela minha vida.

Agradeço aos meus pais, que tanto amo e por quem faço tudo o que for preciso; Josidalva Alves Vieira e Antônio José Silva Costa, vocês são o motivo de cada escolha que faço na vida. À minha irmã Thamires Vieira Costa por ser a melhor irmã que eu poderia ter.

Às queridas orientadora e coorientadora Prof^a. Dr^a. Thais Roseli Corrêa e Dr^a Anyela Marcela Ríos-Ríos, vocês são sensacionais como profissionais e como pessoas. Desde o primeiro dia no curso de mestrado, você, Anyela Marcela, não mediu esforços para me ensinar tudo o que eu precisava saber. E desde o primeiro contato, professora Thaís, a senhora me deixou super confiante e entusiasmada com o que eu poderia conquistar na pesquisa. Obrigada por confiarem em meu potencial.

Aos amigos que fiz no mestrado e que certamente levarei comigo, cada um de vocês tem um espaço em meu coração.

A todos que me ajudaram com orientações, ajustes e sugestões para a minha pesquisa. Podem contar comigo no que precisarem.

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

A Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA), em parceria com a Empresa Maranhense de Administração Portuária (EMAP), pela concessão da bolsa de estudo.

E a todos que estiveram comigo nessa caminhada.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO II

Figura 1. Etapas da propagação <i>in vitro</i> de <i>Handroanthus impetiginosus</i>	45
Figura 2. Aspectos morfológicos de plântulas de <i>Handroanthus impetiginosus</i> com 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> , sob diferentes tipos de reguladores (m-TP e BAP) e concentrações (0, 2,5 e 5 µM) de citocininas.....	49
Figura 3. Parâmetros de crescimento em plântulas de <i>Handroanthus impetiginosus</i> com 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> , sob influência de citocininas (m-TP e BAP) e diferentes concentrações (0, 2,5 e 5 µM). (A) comprimento de aérea; (B) diâmetro do caule; (C) número de folhas; (D) número de folíolos; (E) número de nós; (F) número de brotos; (G) massa seca da parte aérea; (H) área foliar; (I) massa seca do calo. Letras maiúsculas comparam os valores das variáveis quanto as citocininas, e as letras minúsculas comparam as diferentes concentrações das citocininas (Teste Tukey; $p \leq 0,05$). (Teste Tukey; $p \leq 0,05$).....	51
Figura 4. Pigmentos fotossintéticos em plântulas de <i>Handroanthus impetiginosus</i> com 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> , sob influência de citocininas (m-TP e BAP) e diferentes concentrações (0, 2,5 e 5 µM). (A) clorofila <i>a</i> ; (B) clorofila <i>b</i> ; (C) clorofila <i>a/b</i> ; (D) carotenoides; (E) clorofila total. Letras maiúsculas comparam os valores das variáveis quanto as citocininas, e as letras minúsculas comparam as diferentes concentrações das citocininas (Teste Tukey; $p \leq 0,05$).	53
Figura 5. Fluorescência da clorofila em plântulas de <i>Handroanthus impetiginosus</i> com 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> , sob influência de citocininas (m-TP e BAP) e diferentes concentrações (0, 2,5 e 5 µM). (A) fluorescência inicial; (B) fluorescência variável; (C) fluorescência máxima; (D) rendimento quântico máximo do fotossistema II; (E) energia absorvida por centro de reação ativo; (F) índice de performance. Letras maiúsculas comparam os valores das variáveis quanto as citocininas, e as letras minúsculas comparam as diferentes concentrações das citocininas (Teste Tukey; $p \leq 0,05$).....	54
Figura 6. Fitorreguladores na rizogênese de plântulas de <i>Handroanthus impetiginosus</i> com 45 dias de cultivo <i>in vitro</i> , sob diferentes tipos de reguladores (ANA e AIB) e concentrações (0, 3 e 6 µM) de auxinas.	55
Figura 7. Parâmetros de crescimento radicular de plântulas de <i>Handroanthus impetiginosus</i> tratadas com tipos de auxinas (ANA e AIB) e diferentes concentrações (0, 3 e 6 µM), durante 40 dias de cultivo <i>in vitro</i> . (A) número de raízes; (B) comprimento da maior raiz; (C) diâmetro da maior raiz; (D) volume de raiz; (E) massa seca da raiz. Letras maiúsculas comparam os valores das variáveis quanto as citocininas, e as letras minúsculas comparam as diferentes concentrações das citocininas (Teste Tukey; $p \leq 0,05$).....	56

Figura 8. Parâmetros de crescimento da parte aérea de plântulas de *Handroanthus impetiginosus* tratadas com tipos de auxinas (ANA e AIB) e diferentes concentrações (0, 3 e 6 μM), durante 40 dias de cultivo *in vitro*. (A) comprimento da parte aérea; (B) diâmetro do caule; (C) número de folhas; (D) número de folíolos; (E) massa seca da parte aérea. Letras maiúsculas comparam os valores das variáveis quanto as citocininas, e as letras minúsculas comparam as diferentes concentrações das citocininas (Teste Tukey; $p \leq 0,05$).....57

CAPÍTULO III

Figura 1. Plântulas de *Handroanthus impetiginosus* sob CO_2 elevado em combinação com dosagens de sacarose.....83

Figura 2. Parâmetros de crescimento em plântulas de *Handroanthus impetiginosus* com 35 dias de cultivo *in vitro*, sob influência de CO_2 (420 e 800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) em combinação com dosagens de sacarose (0, 10 e 20 g L^{-1}). (A) comprimento de aérea; (B) diâmetro do caule; (C) número de folhas; (D) número de nós; (E) número de brotos; (F) área foliar; (G) massa seca da parte aérea. Letras maiúsculas comparam os valores das variáveis quanto ao CO_2 , e as letras minúsculas comparam as diferentes concentrações de sacarose (Teste Tukey; $p \leq 0,05$).....84

Figura 3. Pigmentos fotossintéticos em plântulas de *Handroanthus impetiginosus* com 35 dias de cultivo *in vitro*, sob influência de CO_2 (420 e 800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) em combinação com dosagens de sacarose (0, 10 e 20 g L^{-1}). (A) clorofila *a*; (B) clorofila *b*; (C) clorofila *a/b*; (D) carotenoides; (E) clorofila total; sm = sem material vegetal. Letras maiúsculas comparam os valores das variáveis quanto ao CO_2 , e as letras minúsculas comparam as diferentes concentrações de sacarose (Teste Tukey; $p \leq 0,05$)..... 85

Figura 4. Fluorescência da clorofila *a* em plântulas de *Handroanthus impetiginosus* com 35 dias de cultivo *in vitro*, sob influência de CO_2 (420 e 800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) em combinação com dosagens de sacarose (0, 10 e 20 g L^{-1}). (A) fluorescência inicial; (B) fluorescência variável; (C) fluorescência máxima; (D) rendimento quântico máximo do fotossistema II; (E) energia absorvida por centro de reação ativo; (F) índice de desempenho; sm= sem material vegetal. Letras maiúsculas comparam os valores das variáveis quanto ao CO_2 , e as letras minúsculas comparam as diferentes concentrações de sacarose (Teste Tukey; $p \leq 0,05$).....87

Figura 5. Trocas gasosas em plântulas de *Handroanthus impetiginosus* com 35 dias de cultivo *in vitro*, sob influência de CO_2 (420 e 800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) em combinação com dosagens de sacarose (0, 10 e 20 g L^{-1}). (A) taxa fotossintética líquida; (B) condutância estomática; (C) taxa de transpiração; (D) concentração interna de CO ; (E) razão da concentração de CO_2 intercelular ambiente; (F) eficiência de carboxilação; (G) eficiência intrínseca do uso da água; sm= sem material vegetal. Letras maiúsculas comparam os valores das variáveis quanto ao CO_2 , e as

letras minúsculas comparam as diferentes concentrações de sacarose (Teste Tukey; $p \leq 0,05$).....89

Figura 6. Índice e densidade estomática de *Handroanthus impetiginosus* com 35 dias de cultivo *in vitro*, sob influência de CO_2 (420 e $800 \mu\text{mol mol}^{-1}$) em combinação com dosagens de sacarose (0, 10 e 20 g L^{-1}). (A) índice estomático; (B) densidade estomática; sm= sem material vegetal.....90

Figura 7. Índice estomático e densidade estomática de *Handroanthus impetiginosus* com 35 dias de cultivo *in vitro*, sob influência de CO_2 (420 e $800 \mu\text{mol mol}^{-1}$) em combinação com dosagens de sacarose (10, 20 g L^{-1}). (A) índice estomático; (B) densidade estomática; sm= sem material vegetal. Letras maiúsculas comparam os valores das variáveis quanto ao CO_2 , e as letras minúsculas comparam as diferentes concentrações de sacarose (Teste Tukey; $p \leq 0,05$).....91

Figura 8. Seções transversais das folhas de *Handroanthus impetiginosus* com 35 dias de cultivo *in vitro*, sob influência de CO_2 (420 e $800 \mu\text{mol mol}^{-1}$) em combinação com dosagens de sacarose (10, 20 g L^{-1}). A, C, E, G mostram a nervura central; B, D, F, H mostram o limbo. Eax: epiderme adaxial; Eab: epiderme abaxial; Fl: floema; PE: parênquima esponjoso; PP: parênquima paliçádico; Tr: tricoma; Xi: xilema; ponta da seta: espaçosintercelulares.....93

Figura 9. Parâmetros medidos em cortes transversais das folhas de *Handronthus impetiginosus* com 35 dias de cultivo *in vitro*, sob influência de CO_2 (420 e $800 \mu\text{mol mol}^{-1}$) em combinação com dosagens de sacarose (10, 20 g L^{-1}). (A) epiderme adaxial; (B) epiderme abaxial; (C) parênquima paliçádico; (D) parênquima esponjoso; (E) feixe vascular tv - transversal-; (F) feixe vascular lg- longitudinal. Letras maiúsculas comparam os valores das variáveis quanto ao CO_2 , e as letras minúsculas comparam as diferentes concentrações de sacarose (Teste Tukey; $p \leq 0,05$).....95

Figura 10. Seções transversais do caule de *Handroanthus impetiginosus* com 35 dias de cultivo *in vitro*, sob influência de CO_2 (420 e $800 \mu\text{mol mol}^{-1}$) em combinação com dosagens de sacarose (10, 20 g L^{-1}). Ctx: córtex; Ep: epiderme; Fl: floema; Md: medula; Tt: tricoma tector; Xi: xilema.....96

Figura 11. Parâmetros medidos em cortes transversais de caule de *Handronthus impetiginosus* com 35 dias de cultivo *in vitro*, sob influência de CO_2 (420 e $800 \mu\text{mol mol}^{-1}$) em combinação com dosagens de sacarose (10, 20 g L^{-1}). (A) epiderme; (B) parênquima cortical; (C) parênquima medular; (D) feixe vascular. Letras maiúsculas comparam os valores das variáveis quanto ao CO_2 , e as letras minúsculas comparam as diferentes concentrações de sacarose (Teste Tukey; $p \leq 0,05$).....97

LISTA DE ABREVIATURAS

A = Assimilação fotossintética de CO₂
A/Ci = Eficiência de carboxilação
A/gs = Eficiência intrínseca do uso da água
AIB = Ácido indolbutírico
ANA = Ácido naftalenoacético;
BAP = 6-benzilamonopurina;
Cap = Comprimento da parte aérea;
Ci = Concentração interna de CO₂
Ci/Ca = Razão de concentração intercelular de CO₂ no ambiente
E = Taxa de transpiração
F₀ = Fluorescência inicial
F_m = Fluorescência máxima
F_v = Fluorescência variável
F_v/F_m = Rendimento quântico máximo do fotossistema II
g L⁻¹ = Gramas por litro;
gs = Condutância estomática ao vapor de água
PI = Índice de desempenho
mg L⁻¹ = Miligramas por litro
mL = Mililitro;
mm = Milímetro;
MS = Murashige & Skoog
WPM = Woody Plant Medium
m-TP = *meta*-topolina
NaOCl = Hipoclorito de sódio
nm = Nanômetro
μg cm⁻² = Micrograma por centímetro quadrado
μM = Micromol
μm = Micrômetro
μg = Micrograma
μmol m⁻² s⁻¹ = Micromol por metros quadrado por segundo
PVP = Polivinilpirrolidona
RC/ABS = Energia absorvida por centro de reação ativo
kPa = Quilopascal

SUMÁRIO

RESUMO.....	14
CAPÍTULO I.....	15
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
1.1 Descrição da espécie.....	16
1.2 Importância econômica da espécie.....	17
1.3 Propagação do <i>Handroanthus impetiginosus</i>	18
1.4 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Handroanthus impetiginosus</i>	19
1.5 Cultivo fotomixotrófico e uso de membranas porosas no sistema de vedação <i>in vitro</i>	21
1.6 Cultivo fotoautotrófico	23
1.7 Uso de reguladores de crescimento no cultivo <i>in vitro</i>	24
1.8 Enriquecimento de CO ₂ <i>in vitro</i>	25
1.9 Aspectos anatômicos de lenhosas em condições de CO ₂ elevado	26
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
Capítulo II.....	40
RESUMO.....	41
1 INTRODUÇÃO.....	42
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
2.1 Local de estudo	44
2.2 Estabelecimento do <i>Handroanthus impetiginosus</i>	44
2.2.1 Obtenção do material vegetal.....	44
2.2.2 Desinfestação e germinação das sementes.....	44
2.3 Experimento de multiplicação <i>in vitro</i> de <i>Handroanthus impetiginosus</i>	45
2.4 Experimento de enraizamento <i>in vitro</i> de <i>Handroanthus impetiginosus</i>	46
2.5 Avaliação de parâmetros morfofisiológicos.....	47
2.5.1 Determinação de parâmetros de crescimento	47
2.5.2 Determinação dos pigmentos fotossintéticos	47
2.5.3 Determinação da fluorescência da clorofila	48
2.5.4 Análise estatística	48
3 RESULTADOS.....	49
3.1 As citocininas <i>m</i> -TP e BAP modulamos parâmetros de crescimento de plântulas de <i>Handroanthus impetiginosus</i> cultivadas <i>in vitro</i>	49

3.2	A citocinina <i>m</i> -TP altera o conteúdo de pigmentos fotossintéticos de plântulas <i>in vitro</i> de <i>Handroanthus impetiginosus</i>	52
3.3	Citocininas <i>m</i> -TP e BAP não alteram a fluorescência da clorofila de plantas de <i>Handroanthus impetiginosus</i> em cultivo <i>in vitro</i>	53
3.4	Auxinas AIB e ANA influenciam na rizogênese de <i>Handroanthus impetiginosus</i> cultivado <i>in vitro</i>	54
3.5	As auxinas não influenciam às variáveis de crescimento da parte aérea de plântulas de <i>Handroanthus impetiginosus</i> cultivado <i>in vitro</i>	57
4	DISCUSSÃO.....	58
4.1	A citocinina <i>m</i> -TP modula os parâmetros de crescimento de plântulas de <i>Handroanthus impetiginosus</i> cultivado <i>in vitro</i>	58
4.2	A citocinina <i>m</i> -TP altera os teores de pigmentos fotossintéticos de plântulas de <i>Handroanthus impetiginosus</i> em cultivo <i>in vitro</i>	60
4.3	As Citocininas <i>m</i> -TP e BAP não alteram a fluorescência da clorofila de plântulas de <i>Handroanthus impetiginosus</i> em cultivo <i>in vitro</i>	61
4.4	Auxinas AIB e ANA influenciam na rizogênese de <i>Handroanthus impetiginosus</i> cultivado <i>in vitro</i>	62
4.5	As auxinas não influenciam às variáveis de crescimento da parte aérea de plântulas de <i>Handroanthus impetiginosus</i> cultivado <i>in vitro</i>	64
5	CONCLUSÕES.....	66
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
	CAPÍTULO III.....	73
	RESUMO.....	74
1	INTRODUÇÃO.....	75
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	77
2.1	Plântulas de <i>Handroanthus impetiginosus</i> cultivadas em câmaras enriquecidas com CO ₂	77
2.2	Avaliação de parâmetros morfofisiológicos e anatômicos de plântulas de <i>Handroanthus impetiginosus</i> obtidas sob enriquecimento com CO ₂	77
2.2.1	Parâmetros de crescimento	77
2.2.2	Determinação dos pigmentos fotossintéticos	78
2.2.3	Determinação da fluorescência da clorofila	78
2.2.4	Trocas gasosas	78
2.2.5	Análise de parâmetros anatômicos.....	79
2.2.6	Análise estatística	80
3	RESULTADOS.....	82

3.1	O CO ₂ elevado em combinação com dosagens de sacarose influencia o crescimento das plântulas de <i>Handroanthus impetiginosus</i>	82
3.2	O acúmulo de pigmentos fotossintéticos em plântulas de <i>Handroanthus impetiginosus</i> é pouco influenciado pelo incremento de CO ₂ em sistemas fotomixotróficos.....	85
3.3	Sistemas fotomixotróficos pouco impactam a fluorescência da clorofila de plântulas <i>in vitro</i> de <i>Handroanthus impetiginosus</i> sob atmosfera com CO ₂ elevado	86
3.4	O CO ₂ elevado em condições fotomixotróficas modula as trocas gasosas de plântulas <i>in vitro</i> de <i>Handroanthus impetiginosus</i>	87
3.5	O CO ₂ elevado em combinação com dosagens de sacarose impacta o índice e densidade estomática de <i>Handroanthus impetiginosus</i>	90
3.6	Aspectos anatômicos de folha e caule de <i>Handroanthus impetiginosus</i> são influenciados pelo CO ₂ elevado em combinação com a sacarose.....	91
4	DISCUSSÃO.....	98
4.1	O CO ₂ elevado em combinação com dosagens de sacarose influencia o crescimento das plântulas de <i>Handroanthus impetiginosus</i>	98
4.2	O acúmulo de pigmentos fotossintéticos em plântulas de <i>Handroanthus impetiginosus</i> é pouco influenciado pelo incremento de CO ₂ em sistemas fotomixotróficos.....	99
4.3	Sistemas fotomixotróficos pouco impactam a fluorescência da clorofila de plântulas <i>in vitro</i> de <i>Handroanthus impetiginosus</i> sob atmosfera com CO ₂ elevado	101
4.4	O CO ₂ elevado em condições fotomixotróficas modula as trocas gasosas de plantas <i>in vitro</i> <i>Handroanthus impetiginosus</i>	103
4.5	O CO ₂ elevado em combinação com dosagens de sacarose impacta o índice e densidade estomática de <i>Handroanthus impetiginosus</i>	105
4.6	Aspectos anatômicos de folha e caule de <i>Handroanthus impetiginosus</i> são influenciados pelo CO ₂ elevado em combinação com a sacarose.....	106
5	CONCLUSÕES.....	109
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110

RESUMO

Handroanthus impetiginosus, popularmente conhecido como ipê roxo, é uma espécie lenhosa com elevado potencial farmacológico, madeireiro e ornamental; contudo, apresenta limitações quanto a sua propagação. As técnicas de cultivo *in vitro* como a germinação, multiplicação, enraizamento e o uso de CO₂ podem ser excelentes alternativas para a propagação dessa espécie. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo realizar o estabelecimento, multiplicação e enraizamento *in vitro* da espécie, bem como analisar o impacto da sacarose e do enriquecimento de CO₂ no desenvolvimento e anatomia do ipê roxo. O capítulo I conta com o referencial teórico abordando os principais tópicos da espécie no cultivo *in vitro*. No capítulo II foi realizado a germinação de sementes, multiplicação (a partir de segmentos de caule) e enraizamento (a partir de brotos) *in vitro* do ipê roxo. As sementes foram previamente desinfestadas e inoculadas em meio de cultura ½ MS sem reguladores de crescimento. Para a multiplicação dos segmentos de caule, utilizou-se meio WPM com citocininas *m*-TP e BAP (0, 2,5, 5 µM) e para o enraizamento utilizou-se meio WPM com auxinas ANA e AIB (0, 3 e 6 µM). Após 45 dias de cultivo observou-se que a *m*-TP 5 µM se sobressaiu como citocinina principal para a multiplicação do ipê roxo e o AIB em concentrações moderadas como indutor radicular em protocolos de micropropagação do ipê roxo. No capítulo III, os segmentos de caule provindos da multiplicação, inoculados em meio WPM, suplementados com sacarose (0, 10, 20 g L⁻¹) e *m*-TP 5 µM, foram acondicionados em duas câmaras climáticas com concentração ambiente de CO₂ (420 ± 30 µmol mol⁻¹) e com concentração elevada de CO₂ (800 ± 30 µmol mol⁻¹). Após 35 dias de cultivo observou-se que 10 g L⁻¹ de sacarose + 800 µmol mol⁻¹ de CO₂ maximiza o crescimento e a eficiência fotossintética durante o cultivo *in vitro* de ipê roxo, especialmente em fases de transição para a autotrofia, e 20 g L⁻¹ de sacarose + 800 µmol mol⁻¹ de CO₂ influenciou na anatomia da espécie. Este estudo apresentou resultados interessantes que possibilitam o estabelecimento de protocolo, de multiplicação e enraizamento do ipê roxo, os quais podem servir como subsídios para propagação em escala de plantas. Os resultados encontrados apontam ainda a possibilidade de que *H. impetiginosus* apresente certa plasticidade fisiológica e anatômica diante de ambientes com alta concentração de CO₂, como os previstos em cenários de mudanças climáticas, sugerindo um potencial adaptativo da espécie.

Palavras-chave: micropropagação, multiplicação, enraizamento, CO₂ elevado, espécie lenhosa.

CAPÍTULO I

Estabelecimento *in vitro*, uso de reguladores de crescimento e o impacto do enriquecimento de CO₂ no desenvolvimento e anatomia de *Handroanthus impetiginosus*: revisão

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Descrição da espécie

Espécies do gênero *Handroanthus*, da família Bignoniaceae, têm se destacado pela alta qualidade da sua madeira, com excelentes propriedades físico-químicas (Silva-Junior et al., 2018) e valor ornamental (Grose; Olmstead, 2007); além disso, em sua maioria biossintetizam lapachol, uma naftoquinona com amplo potencial biológico com ação anticâncer, antimicrobiana, antibacteriana e tripanocida (Lira et al., 2022). Dentre as espécies do gênero se destaca o ipê-roxo, *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos, nativa da Mata Atlântica e conhecida popularmente como pau-d'arco-roxo e ipê-roxo-da-mata (Martins et al., 2011; Silva et al., 2015).

O ipê roxo está presente em quase todos os domínios fitogeográficos brasileiros (Freitas et al., 2008; Lohmann, 2020), e nas regiões Nordeste e Sudeste pode ser encontrado em áreas de vegetação nativa (Lohmann, 2014). Em alguns estados brasileiros a espécie ocorre naturalmente, como no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, além do sul e oeste baianos (Marto et al., 2005).

No grupo sucessional o ipê roxo é considerado como uma espécie “intermediária de crescimento lento” (Durigan; Nogueira, 1990), mas em relação a outras espécies arbóreas nativas, pode ser considerada como espécie de crescimento “parcialmente rápido” (Longhi, 1995). A espécie se desenvolve bem a pleno sol, mas suporta sombreamento moderado em seu estágio jovem, classificada como heliófila (Salomão; Camillo, 2016); é tolerante a solos pobres e períodos de seca (Ferreira et al., 2020) e ainda, cresce em capoeiras e capoeirões, e em áreas perturbadas apresenta comportamento pioneiro.

A planta adulta do ipê roxo atinge de 8 a 12 metros de altura (Lorenzi, 1992), mas em florestas pode atingir até 30 metros, com diâmetro do tronco que varia entre 60 e 100 cm (Marto et al., 2005). O caule tem 40 mm de espessura (Carvalho, 2003), é de coloração escura pardo-cinza e a casca apresenta líquens. A sua madeira é resistente ao ataque de alguns insetos xilófagos, como cupins, besouros e vespas (Costa et al., 2024). A espécie é ainda utilizada tanto na construção civil, naval, hidráulica e rural, como em construção de instrumentos musicais e marcenaria (Ipef, 2010).

As folhas do ipê roxo medem de 3 a 10 cm de comprimento e de 2 a 6 cm de largura, são compostas, digitadas e opostas, com 5 folíolos desuniformes, obovados,

serreados, glabros, cuja face superior é de cor verde-escura e a face inferior é verde-clara (Salomão; Camillo, 2016), com presença de tricomas (Lozano; Zapater, 2008). Suas flores, apresentam de 5 a 8 cm de comprimento, são reunidas em tirso curto multifloral, terminal, em grupos de três, com corola róseo-violácea (Carvalho, 2003). Seu fruto é de coloração bege, em forma de cápsula linear, deiscente, variando de 25 a 30 cm de comprimento e de 1,5 cm de largura (Carvalho, 2003). As sementes são pequenas, do tipo aladas nas duas extremidades, de cor marrom-clara transparente e membranáceas (Costa et al., 2024).

A floração dessa espécie ocorre entre os meses de julho e setembro, e chega a perder todas as suas folhas (Lorenzi, 2002), enquanto a maturação de seu fruto se dá em outubro, e cada um pode conter até 192 sementes (Carvalho, 2003). A mudança de coloração dos frutos é um dos indicativos de sua maturidade, pois frutos maduros apresentam coloração verde com pontos arroxeados, e as sementes passam de verde a verde-amarelo-amarronzado (Gemaque et al., 2002). A dispersão das sementes acontece por meio do vento, possui fecundação cruzada e autoincompatibilidade (Bittencourt Junior, 2017). Os principais polinizadores da espécie são as abelhas, entretanto, morcegos, mariposas, beija-flores, papagaios e bugios também são atraídos pela sua flor (Salomão; Camillo, 2016). Ademais, a árvore é paisagística e pode ser utilizada para restauração de áreas degradadas e na silvicultura urbana (Chaves et al., 2018; Maia-Silva et al., 2012).

1.2 Importância econômica da espécie

Handroanthus impetiginosus apresenta enorme potencial de utilização em diversos segmentos, que abrange o reflorestamento de áreas degradadas, fonte alimentar da fauna, uso apícola (Salomão; Camilo, 2016), fins medicinais (Silva et al., 2012; Silva-Junior et al., 2018; Moraes et al., 2020), paisagístico e ornamental (Pacheco; Silva, 2019), produção de móveis e construção civil e naval (Saueressig et al., 2014; Ribeiro; Coelho, 2021).

O uso dessa arbórea em projetos de reflorestamento e paisagístico (Yarte et al., 2022) traz benefícios não apenas ecológicos, mas também econômicos, uma vez que produz madeira nobre e gera novos mercados para a exploração sustentável de recursos florestais na indústria madeireira (Fonseca Filho et al., 2017; Silva-Júnior et al., 2018). O

ipê roxo se destaca significativamente no ramo madeireiro, e chega a ser considerada como boa substituta de espécies como o mogno e o cedro (Almeida et al., 2010).

O Brasil é um grande produtor e exportador de madeira de ipê, e dentre os países que mais importam a madeira estão a união Europeia, os Estados Unidos e a China. Como exemplo, no período de 2008 a 2017, os EUA importaram cerca de 276 mil m³ de ipê serrado e, desse total, o Brasil foi responsável por 93% da sua produção (InfoAmazonia, 2022). Entre os anos de 2017 e 2021 foram exportados da Bolívia, Brasil, Paraguai e Peru mais de 525 milhões de kg de produtos de madeira de ipê, equivalentes a 469.613 m³, deste, 96% do comércio foi do Brasil (Forest Trends, 2022).

Na Amazônia, dentre as espécies madeireiras mais exploradas, o ipê ocupou a décima posição em 2019, com 500 mil m³ explorados, sendo 80% desse volume nos estados de Mato Grosso e Pará, para produção de madeira em tora (Lentini et al., 2021). O ipê movimenta mais de R\$ 70 milhões por ano, e ficou em primeiro lugar no *ranking* da economia de estados como Mato Grosso, Acre e Rondônia (Embrapa, 2022).

No Brasil, o Pará é o principal produtor e exportador de madeira nativa, exportando 212 mil m³ do produto para os EUA e União Europeia em 2021, o que gerou cerca de 200 milhões de dólares para o estado. Desse volume exportado, o ipê representa 4%, sendo que o m³ de sua madeira serrada chega a custar entre 15 e 17 mil reais (Aimex, 2022).

Embora o ipê seja um “carro chefe” da economia madeireira, a sua colheita ilegal leva a diminuição da população da espécie na Amazônia e, além disso, abre caminho para a exploração adicional de espécies de menor valor, o que resulta em degradação florestal e desmatamento (Potapov et al., 2017).

Além do uso madeireiro, o ipê-roxo é utilizado em aplicações farmacológicas (Ahmad et al., 2020; Campos; Albuquerque, 2021; Ryan et al., 2021; Silva et al., 2021) para combater febre, distúrbios circulatórios, infecções e problemas gastrointestinais (PIRES et al., 2015). A sua casca tem poder analgésico, anti-inflamatório (Son et al., 2006; Kung et al., 2008), antioxidante (Santos et al., 2024), antibacteriano (Park et al., 2005), antifúngico e antiviral (Tandon et al., 2004) e anticancerígeno (Valle et al., 2023).

1.3 Propagação do *Handroanthus impetiginosus*

A propagação do *Handroanthus impetiginosus* pode ser sexuada (Martins et al., 2011; Lima et al., 2014), cuja emergência das plântulas se dá por volta de 15 dias após o

semeio, e assexuada através de mini estacas (Oliveira et al., 2016) e enxertia (Simões et al., 2021). As sementes devem ser colhidas assim que inicia a deiscência dos frutos, sendo a sua dispersão pelo vento, de forma espontânea (Gemaque et al., 2002). O processo de coleta pode ser dificultado devido à estrutura alada das sementes (Felix et al., 2018).

A depender da finalidade para a qual o ipê será usado, como por exemplo na cadeia madeireira, a via de propagação por sementes não é a mais adequada, devido a heterozigosidade que resulta na desuniformidade dos plantios. Os indivíduos gerados por propagação sexuada são desuniformes, com grande variabilidade genética, o que reflete na produtividade da espécie (Mori et al., 2011).

Para superar os desafios da variabilidade genética em plantas de propagação sexuada, a propagação assexuada por mini estaquia e enxertia torna-se interessante do ponto de vista comercial, pois garante uma maior uniformidade, pode levar a espécie à resistência de pragas e doenças, a adaptação a diferentes tipos de solos (Simões et al., 2021), ao rejuvenescimento da espécie em fase adulta (Wendling et al., 2001), ao florescimento precoce, e ao enraizamento em curto prazo (Wendling et al., 2005). Apesar disso, o enraizamento das estacas pode ser afetado por fatores internos, a exemplo os reguladores de crescimento presentes na estaca, principalmente auxinas, que podem promover ou inibir a formação de raízes (Hartmann et al., 2002). Os fatores abióticos também podem interferir no enraizamento das estacas dentre eles: umidade, substrato, temperatura, luz e fitohormônios exógenos (Paiva; Gomes, 2005). Ademais, quanto ao crescimento radicular, este depende das condições ambientais, se estas são favoráveis ou não.

Dentre as estratégias de propagação assexuada, técnicas de cultura de tecidos como a micropropagação é uma alternativa que apresenta relevante destaque para espécies florestais nativas ou até mesmo já domesticadas, pois possibilita a multiplicação da planta em qualquer época do ano em períodos de tempo menores (De Oliveira et al., 2013), e pode ainda gerar indivíduos uniformes, com elevado potencial produtivo e características desejáveis.

1.4 Cultivo *in vitro* de *Handroanthus impetiginosus*

A cultura de tecidos consiste na simulação de um ambiente com um microclima adequado para a germinação e desenvolvimento da planta, o qual fornece nutrientes essenciais para o vegetal sob condições assépticas. Na cultura de tecidos, partes da planta

(célula, tecido ou órgão), com capacidade totipotente para regeneração de um novo indivíduo são isoladas como material inicial (Torres et al., 1998).

As pesquisas sobre o estabelecimento de protocolos para o cultivo *in vitro* de espécies arbóreas têm sido realizadas a fim de enriquecer e fortalecer programas de conservação e melhoramento florestal, bem como formação de jardins clonais. Segundo Pereira et al. (2015), o sucesso de um protocolo depende de todas as fases, a começar pelo estabelecimento *in vitro*, seguido da multiplicação, alongamento (em alguns casos), enraizamento e aclimação.

Os protocolos de germinação e propagação *in vitro* de várias espécies da família Bignoniaceae têm sido reportados na literatura, como o trabalho de Dousseau et al. (2008), onde os autores propagaram embriões *in vitro* de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich utilizando meio MS completo) (Murashige; Skoog, 1962), sem reguladores, a fim de comparar as diferenças anatômicas da espécie cultivada *in vitro*, *in vivo* e *ex vitro*. Na micropropagação de ipê rosa (*Tabebuia rosea* Bertol DC) (Suarez et al., 2006), foram utilizadas diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaOCl) e combinações de tempo de exposição, para determinar as melhores condições de multiplicação da espécie e gerar clones superiores. Outros trabalhos buscaram avaliar a anatomia do tecido foliar *in vitro* de *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand. (Caravita-Abbade et al., 2009), e a multiplicação *in vitro* de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*) (Pereira; Navroski; Reininger, 2015) e ipê-roxo (Bassegio et al., 2017) em meios de cultura sob diferentes concentrações de BAP (6-benzilaminopurina).

A germinação *in vitro* de sementes de ipê é uma das técnicas da cultura de tecidos de importante destaque, que conta com uma fase de desinfestação sob condições assépticas em câmaras de fluxo laminar. Nessa técnica, o NaOCl é a principal solução desinfetante, e sua concentração vai depender da espécie trabalhada, e pode variar de 1 a 2,5%. O seu uso pode ser comprovado em sementes de canjarana (*Cabralea canjerana*) (Rocha, 2005), calêndula (*Calendula officinales*) (Bevilacqua et al., 2011) e oliveira (*Olea europaea* L.) cv. “Koroneiki” (Oliveira et al., 2021).

Outra etapa crucial na cultura de tecidos é a determinação do meio basal, que para o ipê a maioria dos trabalhos utilizam ou indicam o meio basal MS, bem como WPM (Woody Plant Medium), sendo esse último é o mais indicado para espécies lenhosas (Lloyd; Mccown, 1981). O meio WPM com a concentração dos sais completa ou reduzida à metade ($\frac{1}{2}$ WPM), ou na quarta parte ($\frac{1}{4}$ WPM), foi eficaz no estabelecimento *in vitro* de *H. chrysotrichu* (Pereira et al. 2018). Bassegio et al. (2017), reportaram que os meios

MS e WPM apresentaram resultados semelhantes para a germinação de sementes de *H. impetiginosus*.

As sementes de *H. impetiginosus* exsudam compostos fenólicos durante o processo de germinação *ex vitro*, para proteger ao embrião zigótico de diferentes tipos de estresse que possam comprometer a formação da planta. Não obstante, esses compostos fenólicos levam à oxidação e posterior senescência do embrião durante a germinação *in vitro*, portanto, faz-se necessário o uso de substâncias antioxidantes no meio (Cançado et al., 2012), como o ácido ascórbico e carvão ativado (Oliveira et al., 2013; Welz et al., 2020). Além disso, a ala membranacea da semente pode conter inibidores que reduzem a taxa de germinação de diversas espécies de *Handroanthus* (Apóstolo et al., 2016); contudo, retirar essa estrutura antes da desinfestação e posterior inoculação *in vitro* incrementa a taxa de germinação destas espécies (Duarte et al., 2014; Apóstolo et al., 2016).

1.5 Cultivo fotomixotrófico e uso de membranas porosas no sistema de vedação *in vitro*

No cultivo *in vitro* convencional os frascos ficam vedados e os explantes crescem em meio nutritivo líquido ou solidificado com agentes gelificantes como ágar, fitagel ou agarose (Jesus et al., 2011; Ribeiro et al., 2022). Os frascos e tampas utilizados nesse sistema restringem as trocas gasosas, mantêm alta umidade relativa e baixa concentração de CO₂ dentro do recipiente, o que faz com que a fixação de carbono atmosférico a partir da fotossíntese seja reduzida, assim, o meio de cultura é suplementado com uma fonte de carbono, geralmente a sacarose.

Ainda, como restrição do cultivo *in vitro* convencional, tem-se a intensidade luminosa que normalmente é baixa, fornecida por lâmpadas fluorescentes ou LEDs (Diodos Emissores de Luz) (Jesus et al., 2011; Ribeiro et al., 2022). Desta forma, a propagação de plantas através do cultivo *in vitro* convencional ocorre em condições fotomixotróficas, em que os tecidos vegetais clorofilados utilizam carboidratos endógenos e exógenos para se desenvolver em presença de luz (Kozai et al., 2005).

As características morfofisiológicas das plantas cultivadas sob condições fotomixotróficas com ventilação reduzida em sua maioria são inferiores, apresentam maior teor de água nos tecidos, brotos pouco desenvolvidos, folhas pequenas e finas, baixa presença de tricomas e com desordens anatômicas e fisiológicas, comprometendo o aparato fotossintético (Kozai et al., 2005; Cha-Um et al., 2011; Xiao et al., 2011).

Segundo Kitaya et al. (2005) e Alvarez et al. (2012), as mudas cultivadas no sistema convencional ficam desidratadas e mais suscetíveis à morte no período de aclimatização. No estudo de Silva et al. (2024), plantas de *Eryngium foetidum*, quando submetidas ao meio com sacarose e baixa troca gasosa, tiveram seu funcionamento fotossintético comprometido.

Para superar as limitações causadas pelo baixo nível de trocas gasosas do cultivo convencional, membranas porosas que permitem a ventilação natural ou forçada dos recipientes, têm sido utilizadas. As membranas permitem a aeração do frasco, portanto, a umidade relativa é reduzida em seu interior, resultando em aumento da transpiração, e dessa maneira o explante absorve ao máximo o conteúdo nutricional e a água do meio de cultura (Xiao et al., 2011; Kozai, 2010). O uso de membranas microporosas na espécie *Dalbergia nigra* reduziu o acúmulo de gases como etileno e alterou o perfil proteico da espécie (Carrari-Santos et al., 2024). Nessa condição, os brotos conseguem crescer mais rápido, uma vez que a ventilação natural combinada ao microambiente do frasco incrementa a concentração de CO₂ para melhor desempenho do aparelho fotossintético dos tecidos (Silva et al., 2024).

Há membranas permeáveis a gases disponíveis comercialmente para o cultivo *in vitro*, como: MilliSeal® (MilliSeal, Nihon Millipore Ltda., Yonezawa, Japan), MilliWrap® (Millipore Corporation, USA), disco transparente de polipropileno (Courtaulds Films, Bridgewater, Somerset, UK), membranas de teflon (Flora Laboratories; Austrália), Suncap® (Sigma, USA) e discos TQPL® (TQPL Supplies, UK) (Zobayed 2008). Apesar de membranas do tipo MilliSeal® terem sido utilizadas positivamente no cultivo *in vitro* de espécies lenhosas como *Eucalyptus tereticornis* (Sha Valli Khan et al., 2002) e *Azadirachta indica* (Rodrigues et al., 2012), Saldanha et al. (2012) apresentam uma membrana artesanal, a qual é composta por uma camada de fita veda rosca de politetrafluoretileno entre duas camadas de fita microporosa, essa membrana é fixada à tampa com mais uma camada de fita microporosa.

A membrana proposta por Saldanha et al. (2012) mostrou-se viável e têm sido utilizada em trabalhos de micropropagação de plantas medicinais (Iarema et al., 2012; Saldanha et al., 2012; Martins et al., 2015; Silva et al., 2024); no entanto, para espécies lenhosas como o ipê, ainda não há relatos na literatura.

1.6 Cultivo fotoautotrófico

No meio de cultura é comum a presença de sacarose como fonte externa de carbono, além de componentes orgânicos como vitaminas e aminoácidos; entretanto, é possível o seu preparo apenas com os nutrientes inorgânicos, porém, fornecendo maior taxa de trocas gasosas através do uso de ventilação natural ou forçada. Portanto, esse cultivo é definido como “fotoautotrófico”, também chamado de “cultivo fotossintético *in vitro*” ou “cultivo inorgânico”; para a micropropagação de tecidos vegetais, fotoautotrófico se refere comumente ao “cultivo isento de açúcar”, mantendo outras substâncias orgânicas no meio (Kozai, 1991; Kozai et al., 2005).

O cultivo fotoautotrófico é uma técnica promissora conhecida desde a década de 1980, quando Kozai et al. (1988) trabalharam com batatas (*Solanum tuberosum* L.), em meio de cultura sem açúcar, visando obter alta taxa de propagação e tubérculos livres de patógenos, e até hoje é objeto de aprimoração. Acredita-se que a presença de açúcar no meio de cultura do sistema fotomixotrófico suprime a capacidade fotossintética (Fortini et al., 2021), visto que a sacarose interfere na assimilação de carbono no processo fotossintético, pois os sítios ativos de carboxilação da enzima ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCo) acabam sendo bloqueados por açúcares fosforilados (Mayak et al., 1998). Esse fator combinado com a baixa oxigenação do frasco pode resultar no acúmulo de subprodutos tóxicos à planta, portanto, a fotoautotrofia mitiga tais limitações.

Frascos com sistema de ventilação natural ou forçada, sem carboidratos exógenos, associado à luz natural, aumenta a troca gasosa e potencializa a fotossíntese das plantas (Watt, 2012). Esta técnica aplicada em *Pfaffia aglomerata* (Spreng) (Corrêa et al., 2015), *Hevea brasiliensis* (Tisarum et al., 2018), *Cannabis sativa* L. (Zarei et al., 2021; Shi et al., 2024) e *Ananas comosus* L. (Alves et al., 2024), proporcionou eficiência fotossintética das plantas.

Como vantagens do sistema fotoautotrófico destacam-se: melhor crescimento das plantas, baixa contaminação do meio de cultura pela ausência de sacarose, melhoria da qualidade morfológica e rendimento fotossintético, elevada taxa de sobrevivência e redução do estresse da planta durante a aclimação e eliminação dos custos com fontes de carbono exógeno (Kodym; Zapata-Arias, 1999; Afreen et al., 2002; Kozai; Nguyen, 2003; Zobayed, 2008).

O cultivo fotoautotrófico também é importante para reduzir as perdas na etapa de aclimação, que é uma das mais desafiadoras para muitas mudas advindas do cultivo *in vitro*, já que a adequação dessas plantas se dá gradativamente às variações de temperatura, umidade e luminosidade do ambiente (Alves et al. 2021). Shin et al. (2013), ao trabalharem com *Doritaenopsis*, afirmaram que as condições fotoautótroficas fornecidas para a espécie, tais como aumento da concentração de CO₂ e da intensidade luminosa e a eliminação total da sacarose no meio de cultura, elevaram a fotossíntese e a produção de biomassa vegetal, resultando em maior sobrevivência na etapa de aclimação. Ademais, plantas de *Eryngium foetidum* em condições fotomixotróficas e fotoautotróficas, com ventilação natural, tiveram excelente adaptação a esta etapa (Silva et al., 2024).

Embora muitos explantes apresentem capacidade de crescer no fotoautotrofismo, ainda é recomendável estudar a capacidade fotoautotrófica para o maior número de espécies possíveis (Kozai, 2010), principalmente em espécies lenhosas, dado que as plantas *in vitro* sob essa condição têm revelado mecanismos adaptativos bastante singulares, por possuírem características morfoanatômicas próprias (Souza et al., 2023). A implementação dessa estratégia pode contribuir significativamente para a sustentabilidade e eficiência dos programas de propagação de plantas lenhosas.

1.7 Uso de reguladores de crescimento no cultivo *in vitro*

Os reguladores de crescimento auxiliam em diversos processos da morfogênese vegetal e são, na verdade, considerados como moduladores capazes de estimular o alongamento e divisão celular, a formação de raízes, a indução de calos e brotos e a biossíntese de metabólitos secundários em tecidos *in vitro* de espécies vegetais, como observado em *Musa acuminata* (Alraza et al., 2023), *Carica papaya* (Zhao et al., 2021), *Paeonia lactiflora* (Wenhui et al., 2023), *Aloe vera* (Yasmin et al., 2022), *Coccinia grandis* (Aneklaphakij et al., 2025). Trabalhos *in vitro* mostram que o efeito de diferentes reguladores sobre o desenvolvimento dos tecidos e a produção de metabólitos secundários varia dependendo da concentração empregada, do tipo de explante cultivado e das condições de cultura (Shoja; Shishavan, 2021; Ahmadpoor et al., 2022; Adil et al., 2018).

As citocininas desempenham papel central na promoção da divisão celular, brotação de gemas axilares, multiplicação de brotos, formação e crescimento de calo e inibição da formação de raízes. Estudos recentes demonstram que as citocininas continuam sendo ferramentas essenciais para micropropagação com alta taxa de

multiplicação e regeneração de plantas, como em *Ipomoea batatas* (Bansal et al., 2023) e *Salvia bulleyana* (Grzegorzczak-Karolak et al., 2021).

Na última década, a metatopolina tem ganhado destaque como citocinina “moderna” que, em muitos casos, supera a BAP e cinetina (Kin), por sua capacidade de promover multiplicação eficiente com menor incidência de problemas típicos da cultura *in vitro*, tais como hiperidricidade, defeitos morfológicos e baixa qualidade de brotos como em *Salix tetrasperma* (Reshi et al., 2025) e *Stevia rebaudian* (Ptak et al., 2023).

Apesar das vantagens das citocininas, o uso de BAP e m-TP em espécies lenhosas ainda apresenta desafios e resultados variáveis, o que exige cautela e otimização de protocolos conforme o genótipo, explante e condições de cultivo (Martins et al., 2024). O estudo sobre o metabolismo da m-TP, em espécies lenhosas *Tectona grandis* e *Tabebuia rósea*, apontou que a inativação via N9-glicosilação é a principal via de desativação, e que há diferenças inter-específicas no metabolismo da citocinina, o que pode afetar a eficácia da m-TP dependendo da espécie (Grira et al., 2024). Portanto, o tipo de citocinina e sua concentração nem sempre funcionarão igualmente bem em qualquer espécie lenhosa, reforçando a necessidade de ajustar protocolos para cada caso.

1.8 Enriquecimento de CO₂ *in vitro*

O carbono é um elemento que está presente em todas as substâncias orgânicas, e na atmosfera, encontra-se ligado ao oxigênio, e forma o gás carbônico (CO₂). Esse gás, embora seja um dos principais responsáveis pelo agravamento do efeito estufa (Ipcc, 2007), também constitui o substrato fundamental para a fotossíntese, considerado a "moeda" de troca essencial para a fixação de carbono pelas plantas (Kluge et al., 2015). Em pesquisas para simular condições ambientais específicas de mudanças climáticas no desenvolvimento vegetal, pelo aumento da concentração de CO₂, podem ser utilizadas câmaras de enriquecimento de CO₂.

O enriquecimento de CO₂ pode ser estabelecido tanto em frascos de cultivo, como em câmaras de crescimento; a aplicação desse sistema é baseada no princípio de que o fornecimento suplementar de CO₂ pode minimizar a limitação da fotossíntese causada pela baixa difusão do gás nos sistemas de cultura fechados, onde a ventilação é restrita (Kozai, 2010). O uso de sensores permite o monitoramento preciso da concentração de CO₂, bem como o controle de variáveis ambientais como luminosidade, umidade relativa e temperatura. Espécies como *Eucalyptus camaldulensis* (Zobayed et al., 2000), *Coffea arabusta*, *Dioscorea alata* (Nguyen et al., 2001, 2002), *Zantedeschia*

aethiopica (Xiao e Kozai, 2004), *Dendrobium* 'Burana White' (Nguyen et al., 2010), *Plectranthus amboinicus* (Nguyen et al., 2011) e *Castanea sativa* Moinho (Vidal et al., 2017), foram objetos de estudos com essa abordagem.

A técnica de enriquecimento de CO₂ é especialmente vantajosa em cultivos *in vitro*, pois, além de acelerar o crescimento e o enraizamento das mudas, também contribui para a produção de tecidos mais fotossinteticamente ativos, o que faz com que reduza distúrbios fisiológicos, como a hiperidricidade, e melhore a aclimação em ambientes *ex vitro* (Nguyen et al., 2020; Ahmad et al., 2016). No entanto, para que os benefícios sejam plenamente alcançados, é necessário que a concentração de CO₂ seja ajustada à taxa de assimilação da planta, considerando o volume do recipiente e a densidade das plântulas. Caso contrário, o excesso de CO₂ ou sua distribuição desigual pode resultar em diferenças significativas no desenvolvimento das mudas (Kozai, 2010).

Embora as vantagens técnicas e biológicas do enriquecimento de CO₂ estejam bem estabelecidas (Nguyen et al., 2020), ainda são escassos os estudos aplicados a espécies nativas do Brasil, especialmente aquelas de valor ecológico e madeireiro como o ipê roxo (*Handroanthus impetiginosus*). Uma busca sistemática na literatura revela uma lacuna de estudos específicos que explorem os efeitos do enriquecimento de CO₂ em condições *in vitro* para essa espécie.

1.9 Aspectos anatômicos de lenhosas em condições de CO₂ elevado

Diante do atual cenário de mudanças climáticas, com a elevada concentração de gás carbônico, estudos buscaram abordar como estresses abióticos provocam efeitos significativos na fisiologia e desenvolvimento de algumas culturas (Xu et al., 2015; Gamage et al., 2018; Ainsworth et al., 2020) e na produtividade e fisiologia de florestais (Pinkard et al., 2010; Lobo et al., 2022). Contudo, pouco se sabe sobre a influência do CO₂ elevado nos aspectos anatômicos de espécies lenhosas.

A concentração de CO₂ isolada ou combinada a outros fatores abióticos pode favorecer ou não as características anatômicas das plantas (Mohamed & Alsadon, 2010); por exemplo, um estudo com *Eucalyptus grandis* (Costa et al., 2023), exposto a condição de CO₂ elevado, resultou em aumento do diâmetro dos vasos do xilema, isso indica maior alocação de biomassa para o caule. Por outro lado, no trabalho conduzido por Wesolowski et al. (2020) para a mesma espécie, o aumento de CO₂ não estimulou o crescimento do caule. Tais respostas evidenciam a plasticidade dos vasos condutores a estresses ambientais, no caso de espécies lenhosas, obter esse conhecimento é essencial para

sugerir quais espécies estarão aptas a maior produtividade de madeira e lenho em uma esfera de condições ambientais extremas.

Do ponto de vista foliar, o CO₂ elevado também pode aumentar a espessura da folha, a densidade de vasos condutores e a área de tecidos fotossintéticos, o que contribui para uma maior eficiência no uso da água e na assimilação de carbono (Habermann et al., 2019; Wang et al., 2020). No entanto, outros trabalhos indicam que essas alterações podem ser tênues ou inexistentes, dependendo do genótipo e das condições ambientais (Kim et al., 2020; Xu et al., 2023).

Apesar do avanço do conhecimento em espécies de interesse econômico, há uma escassez evidente de estudos anatômicos sob enriquecimento de CO₂ em espécies florestais. Essa lacuna é preocupante, considerando o potencial medicinal, ecológico, ornamental e madeireiro do ipê-roxo, amplamente utilizado em reflorestamentos, arborização urbana e programas de restauração de ecossistemas. Além disso, como uma espécie nativa de ambientes tropicais sujeitos a variações extremas de temperatura e precipitação, entender sua plasticidade anatômica frente ao aumento de CO₂ é essencial para prever sua resiliência e performance em cenários climáticos futuros.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIL, M. *et al.* (2018). Effect of explant type and plant growth regulators on callus induction, growth and secondary metabolites production in *Cnidium officinale* Makino. **Mol Biol Rep**, v.45, n.6, p.1919-1927. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4340-3>
- AFRENN, F.; ZOBAYED, S.M.A.; KOZAI, T. (2002). Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: photosynthetic ability and growth of different stage embryos. **Annals of Botany**, v.90, p.11-19. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf150>
- AHMAD, F. *et al.* (2020). Naphthoquinones from *Handroanthus impetiginosus* promote skin wound healing through Sirt3 regulation. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v.23, n.9, p.1130-1139. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2020.43706.10275>
- AHMADPOOR, F. *et al.* (2022). Sterilization protocols and the effect of plant growth regulators on callus induction and secondary metabolites production in *in vitro* cultures *Melia azedarach* L. e calos e na produção de metabólitos secundários em culturas *in vitro* de *Melia azedarach* L. **AMB Express**, v.12, n.3. <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01343-8>
- AINSWORTH, E.A.; LEMONNIER, P.; WEDOW, J.M. (2020). A influência do aumento do dióxido de carbono troposférico e do ozônio na produtividade das plantas. **Plant Biol.**, v.22, p.5–11. <https://doi.org/10.1111/plb.12973>
- ALMEIDA, A.N. *et al.* (2010). Mercado de madeiras tropicais: substituição na demanda de exportação. **Acta Amazonica**, v.40, n.1, p.119-126. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672010000100015>
- ALRAZN, S.M.; ALKHALIFA, A.A.; AL-SEREH, E.A. (2023). Efeito da citocinina TDZ e da auxina IBA na sucessão de plantas da bananeira *Musa acumanata*, cultivar híbrida Grand-Nain, utilizando a tecnologia de cultura de tecidos. **Journal of Wildlife and Biodiversity**, v.7, p.277–290. <https://doi.org/10.5281/zenodo.10213198>
- ALVAREZ, C. *et al.* (2012). Effects of light and ventilation on physiological parameters during *in vitro* acclimatization of *Gevuina avellana* mol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.110, p.93-101. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0133-x>
- ALVES, G.L. *et al.* (2024). Potencial fotoautotrófico e competência fotossintética em *Ananas comosus* [L]. Merr. cultivar Turiaçu em sistemas de cultivo *in vitro*. In *Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, v.60, p.131–146. <https://doi.org/10.1007/s11627-023-10410-z>
- ANEKLAPHAKIJ, C. *et al.* (2025). Thidiazuron-mediated callus culture in Ivy gourd (*Coccinia grandis* (L.) Voigt) as a promising source of antioxidant and anti-aging potential for phytocosmeceutical applications. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.163, n.46. <https://doi.org/10.1007/s11240-025-03240-x>
- APÓSTOLO, N.M. *et al.* (2016). *In vitro* and *ex vitro* germination of three *Handroanthus species* (Bignoniaceae). **Bonplandia**, v.25, n.1, p.5-16.
- ASSOCIAÇÃO DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE MADEIRA DO ESTADO DO PARÁ- AIMEX. (2022). Exportações de madeira crescem 98% em relação a 2021.

Disponível em: <https://www.aimex.com.br/biblioteca-florestal/news/exportacoes-de-madeira-crescem-98-em-relacao-a-2021#gsc.tab=0>. Acesso em: 16 de jun. 2024.

BANSAL, S. *et al.* (2023). Meta-topolin enhanced *in vitro* propagation and genetic integrity assessment in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). **South African Journal of Botany**, v.157, p.27-36. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.03.047>

BASSEGIO, C. *et al.* (2017). Desenvolvimento de ipê-roxo em meios de cultura e concentrações de bap (6-benzilaminopurina) durante a etapa de multiplicação *in vitro*. **Acta Iguazu**, Cascavel, v.6, n.1, p.72-80. <https://doi.org/10.48075/actaiguaz.v6i1.16878>

BATISTA, D.S.; *et al.* (2017). Flask sealing on *in vitro* seed germination and morphogenesis of two types of ornamental pepper explants. **Ciência Rural**, v.47, n.3, e20150245. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150245>

BEVILACQUA, C.B. *et al.* (2011). Desinfestação superficial, germinação e regeneração *in vitro* a partir de sementes de calêndula. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.5, p.761-766. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011000500004>

BITTENCOURT JUNIOR, N.S. (2017). Evidence for post-zygotic self-incompatibility in *Handroanthus impetiginosus* (Bignoniaceae). **Plant reproduction**, v.30, n.2, p.69-79. <https://doi.org/10.1007/s00497-017-0300-7>

CAMPOS, J.L.A.; ALBUQUERQUE, U.P. (2021). Indicators of conservation priorities for medicinal plants from seasonal dry forests of northeastern Brazil. **Ecological Indicators**, v.121, n.1, p.1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106993>

CANÇADO, G.M.A. *et al.* (2012). Cultivo *in vitro* da oliveira e suas aplicações. In: OLIVEIRA, A. F. *et al.* Oliveiras no Brasil -tecnologias de produção. Belo Horizonte: EPAMIG, p.275-310.

CARAVITA-ABBADÉ, L. *et al.* (2009). Anatomia foliar de ipê branco (*Tabebuia roseo Alba* (Ridl.) Sand.) - Bignoniaceae, proveniente do cultivo *ex vitro* e *in vitro*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.31, n.3, p.307-311. <https://doi.org/10.4025/actasciobiolsci.v31i3.1937>

CARRARI-SANTOS, R. *et al.* (2024). Enhancing *in vitro* growth and development of *Dalbergia nigra* shoots using microporous membranes: impacts on gas exchange, protein profile, ethylene, and polyamine levels. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.158, n.34. <https://doi.org/10.1007/s11240-024-02828-z>

CARVALHO, P. E. R. (2003). Espécies arbóreas brasileiras. Colombo: Embrapa- CNPF; Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**. 1039 p.

CHAVES, P.M. *et al.* (2018). Qualidade fisiológica de sementes e crescimento inicial de mudas de *Handroanthus impetiginosus* sob diferentes sombreamentos e substratos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.13, n.1, p.22-26. <http://dx.doi.org/10.18378/rvads.v13i1.5348>

CORRÊA, J.P.O. *et al.* (2015). Potencial fotoautotrófico *in vitro* e competência fotossintética *ex vitro* de acessos de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v.121, p.289–300. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0700-4>

COSTA, A.S. *et al.* (2024). Caracterização dendrológica de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. Ex DC) Mattos – Bignoniaceae. **Revista Semiárido De Visu**, v.12, n.1, p.94-106. <https://doi.org/10.31416/rsdv.v12i1.620>

COSTA, L.D.S.; VURALHAN-ECKERT, J.; FROMM, J. (2023). Effect of elevated CO₂ and drought on biomass, gas exchange and wood structure of *Eucalyptus grandis*. **Plants**, v.12, n.1. p.148. <https://doi.org/10.3390/plants12010148>

DE OLIVEIRA, L.S.; DIAS, P.C; BRONDANI, G.E. (2013). Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa florestal brasileira**, v.33, n.76, p.439-453. <https://doi.org/10.4336/2013.pfb.33.76.481>

DOUSSEAU, S. *et al.* (2008). Anatomia foliar de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) nich. (Bignoniaceae) propagadas *in vitro*, *in vivo* e durante a aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.6, p.1694-1700. <https://doi.org/10.1590/S1413-705420080006000002>

DUARTE, E.R. *et al.* (2014). Efecto de la testa sobre la germinación de semillas de *Handroanthus heptaphyllus* tras distintos tiempos de almacenamiento. **Ciencias Agronómicas**, Revista XXIV, v.14, p.029 – 035.

DURIGAN, G.; NOGUEIRA, J.C.B. (1990). Recomposição de matas ciliares. São Paulo: **Instituto Florestal**, (IF. Série Registros), n.4, p.1-14.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- EMBRAPA. (2022). Estudo comprova ampla ocorrência do ipê nas florestas do Brasil. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/73763224/estudo-comprova-ampla-ocorrencia-do-ipe-nas-florestas-do-brasil>. Acesso em: 17 de jun. de 2024.

FELIX, F.C.; MEDEIROS, J.A.D.; PACHECO, M.V. (2018). Morfologia de sementes e plântulas de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos. **Revista de Ciências Agrárias**, v.41, n.4, p.1028-1035. <https://doi.org/10.19084/RCA18126>

FERREIRA, E.R.A. *et al.* (2020). Caracterização ecológica e distribuição geográfica de espécies de *Handroanthus* spp. No Brasil. *Revista Árvore*, v.44, e4415. <http://doi.org/10.1590/1806-908820200000015>

FONSECA FILHO, I. C. da *et al.* (2017). Pau-d’arco-roxo (*Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos): conhecimento e uso madeireiro em comunidades rurais do nordeste do Brasil. **Gaia Scientia**, v.11, n.2, p.149-159. <https://doi.org/10.22478/ufpb.1981-1268.2017v11n2.34878>

FOREST TRENDS AND THE CENTER FOR INTERNATIONAL AND ENVIRONMENTAL LAW (CIEL). (2022). “LEGAL ACQUISITION FINDINGS: A Handbook by Forest Trends and Center for International Environmental Law (CIEL).” Forest Trends. Disponível em: <https://www.forest-trends.org/publications/legal-acquisition-findings-a-handbook/>. Acesso em: 26 de jun 2024.

FORTINI, E.A. *et al.* (2021). Gas exchange rates and sucrose concentrations affect plant growth and production of flavonoids in *Vernonia condensata* grown *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.144, n.3, p.593-605. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01981-5>

FREITAS, M.L.M. *et al.* (2008). Variação e parâmetros genéticos em dois bancos de germoplasma de *Tabebuia heptaphylla* (Velloso) Toledo. **Revista do Instituto Florestal**, v.20, n.1, p.13-22. <https://doi.org/10.24278/2178-5031.2008201893>

GAMAGE, D. *et al.* (2018). New insights into the cellular mechanisms of plant growth at elevated atmospheric carbon dioxide concentrations. **Plant Cell Environ**, v.41, n.6, p.1233–1246. <https://doi.org/10.1111/pce.13206>

GEMAQUE, R.C.R.; DAVIDE, A.C.; FARIA, J.M.R. (2002). Indicadores de maturidade fisiológica de sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standel). **Cerne**, v.8, n.2, p.84-91.

GRIRA, M.; PRINSEN, E.; WERBROUCK S. (2024). New Understanding of Meta-Topolin Riboside Metabolism in Micropropagated Woody Plants. **Plants**, v.13, n.9, p.1281. <https://doi.org/10.3390/plants13091281>

GROSE, S.O.; OLMSTEAD, R.G. (2007). Taxonomic revisions in the polyphyletic genus *Tabebuia* s.l. (Bignoniaceae). **Systematic Botany**, v.32, n.3, p.660-670. <https://doi.org/10.1600/036364407782250652>

HABERMANN, E. *et al.* (2019). Increasing atmospheric CO₂ and canopy temperature induces anatomical and physiological changes in leaves of the C₄ forage species *Panicum maximum*. **PLoS ONE**, v.14, n.2, e0212506. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212506>

HARTMANN, H.T. *et al.* (2002). Plant propagation: principles and practices. Prentice-Hall/Englewood Cliffs, New Jersey. 7 ed. Upper saddle River: Prentice Hall, 880p.

<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

IAREMA, L. *et al.* (2012). Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfafra glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.110, p.227–238. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0145-6>

INFOAMAZONIA. (2022). Mercados de luxo da Europa e EUA estão levando ipê da Amazonia à extinção. Disponível em: <https://infoamazonia.org/2022/03/23/mercados-de-luxo-da-europa-e-eua-estao-levando-ipe-da-amazonia-a-extincao/>. Acesso em: 16 de jun. de 2024.

INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS- IPEF. (2010). Ipê-roxo. Disponível em: <http://www.ipef.br/identificacao/nativas/detalhes.asp?codigo=27>. Acesso em: 16 de jun 2024.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE- IPCC. (2023). Climate change 2023: Syntesis Report. Contribution of Working Group I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Cimate Change. [Core Writing Team, J.B.R. Matthews (ed.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 184 pp. Disponível em: <https://www.ipcc.ch/report/ar6/syr>. Acesso em: janeiro de 2025.

JESUS, A.M.S. *et al.* (2011). Avaliação do efeito das concentrações de sacarose e dos estádios de desenvolvimento do fruto no cultivo *in vitro* de embriões de frutos de cafeeiro.

Revista Ceres, v.58, n.6, p.679-684. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2011000600001>

KIM, T-L. *et al.* (2022). Elevated CO₂ levels alter the physiological and transcriptomic responses of *Pinus densiflora* to prolonged CO₂ exposure. **Plants**, v.11, n.24, p.3530. <https://doi.org/10.3390/plants11243530>

KITAYA, Y. *et al.* (2005). Manipulation of the culture environment on *in vitro* air movement and its impact on plantlets photosynthesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.83, n.3, p.251-257. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-6839-2>

KLUGE, R.A.; TEZZOTO-ULIANA, J.V.; DA SILVA, P.P.M. (2015). Aspectos Fisiológicos e Ambientais da Fotossíntese. **Revista Virtual de Química**, v.7, p.56-73. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150004>

KODYM, A.; ZAPATA-ARIAS, F.J. (1998). Natural light as an alternative light source for the *in vitro* culture of banana (*Musa acuminata* cv. Grande Naine'). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.55, p.141-145. <https://doi.org/10.1023/A:1006119114107>

KOZAI, T. (1991). Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: Debergh P.C., Zimmerman T.H. (Editores). Micropropagation technology and application. **Springer, Dordrecht**, p.447-469. https://doi.org/10.1007/978-94-009-2075-0_26

KOZAI, T. (2010). Photoautotrophic micropropagation - Environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, v.10, n.4, p.188-204.

KOZAI, T., KOYAMA, Y., WATANABE, I. (1988). Multiplication and rooting of potato plantlets *in vitro* with sugar medium under high photosynthetic photon flux. **Acta Horticulturae**, v.230, p.121-127. [10.17660/ActaHortic.1988.230.12](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1988.230.12)

KOZAI, T., NGUYEN, Q.T. (2003). Photoautotrophic Micropropagation of Woody and Tropical Plants. In: Jain, S.M., Ishii, K. (eds) Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Forestry Sciences, **Springer, Dordrecht**, v.75, p.757-781. https://doi.org/10.1007/978-94-010-0125-0_26

KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOYABED, S. M.A. (Eds). (2005). Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system. **Springer, Dordrecht**, 316p. <https://doi.org/10.1007/1-4020-3126-2>

KUNG, H.N. *et al.* (2008). *In vitro* and in vivo wound healing-promoting activities of beta-lapachone. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v.295, n.4, p.931-943. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00266.2008>

LENTINI, *et al.* (2021). A exploração do ipê (*Handroanthus* spp.) em florestas naturais da amazônia brasileira: desafios e oportunidades para a conservação e o manejo responsável. São Paulo: Boletim Timberflow- **IMAFLOA**, v.4, p.1-16.

LIMA, P.R. *et al.* (2014). Avaliação morfofisiológica em mudas de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos durante a rustificação. **Floresta e Ambiente**, v.21, n.3, p.316-326. <https://doi.org/10.1590/2179-8087.058813>

- LIRA, L. M. *et al.* (2022). Avaliação da atividade biológica do lapachol extraído da *Tabebuia avellanedae*: uma revisão. **Cadernos de graduação Ciências Biológicas e de Saúde Unit**, v.7, n.2, p.83-94.
- LLOYD, G; McCOWN, B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society**, v.30, p.421–427.
- LOBO, A. K. M. *et al.* (2022). Physiological and Molecular Responses of Woody Plants Exposed to Future Atmospheric CO₂ Levels under Abiotic Stresses. **Plants**, v.11, n.14, p.1880. <https://doi.org/10.3390/plants11141880>
- LOHMANN, L.G. (2020). *Handroanthus* in Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB114086>>. Acesso em: 16 jun. 2024.
- LOMANN, L.G. (2014). Bignoniaceae in lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://florado brasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB114086>). Acesso em: 09/10/2025
- LONGHI, R. A. (1995). Livro das árvores: árvores e arvoretas do Sul. 2. ed. Porto Alegre: L&M. 176p.
- LORENZI, H. (1992). Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**, v.1, p.351.
- LORENZI, H. (2002). Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 2 ed. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**, v.2, p.368.
- LOZANO, E.C.; ZAPATER, M.A. (2008). Delimitation and status of *Handroanthus heptaphyllus* and *H. impetiginosus*, (Bignoniaceae, Tecomeae). **Darwiniana**, v. 46, n. 2, p. 304-317.
- MARTINS, J.P.R. *et al.* (2015). Impacts of photoautotrophic and photomixotrophic conditions on in vitro propagated *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.123, p.121–132. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0820-5>
- MARTINS, J.P.R. *et al.* (2024). Differential morphophysiological and epigenetic responses during in vitro multiplication of *Quercus robur* depending on donor age and plant growth regulators, **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.159, p.62. <https://doi.org/10.1007/s11240-024-02914-2>
- A. *et al.* (2023). Meta-Topolin-induced mass shoot multiplication and biosynthesis of valuable secondary metabolites in *Stevia rebaudiana* Bertoni bioreactor culture. *Scientific Reports*, v.13, n.1, 15520. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-42619-8>
- MARTINS, J.P.R. *et al.* (2011). Crescimento e aspectos sintomatológicos na aclimatização de Ipê-roxo. **Cerne**, v.17, n.4, p.435-442. <https://doi.org/10.1590/S0104-77602011000400001>
- MARTO, G.B.T.; BARRICHELO, L.E.G.; MÜLLER, P.H. (2005). *Tabebuia heptaphylla* (ipê roxo). **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**. Disponível em: <http://www.ipef.br/identificacao/tabebuia.heptaphylla.asp>. Acesso em: 16 jun. 2024.

- MAYAK, S. *et al.* (1998). Growth and development of pineapple (*Ananas comosus* L.) plantlets cultured *in vitro* at enriched and ambient CO₂ environments. **Acta Horticulturae**, v.461, p.225-230. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1998.461.23>
- MOHAMED, M.A.H.; ALSADON, A.A. (2010). Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. **Scientia Horticulturae**, v.123, p.295-300. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.09.014>
- MORAIS, M. G. *et al.* (2020). Triagem fitoquímica e avaliação da atividade antibacteriana das flores de *Handroanthus impetiginosus*. **Biodiversidade**, v.19, n.2, p. 187-195.
- MORI, N.T. *et al.* (2012). Genetic diversity between and within populations of 9 *Handroanthus heptaphyllus* (vell.) Mattos using microsatellite markers. **Cerne**, v.18, n.1, p.9-15. <https://doi.org/10.1590/S0104-77602012000100002>
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497.
- NGUYEN, H.N. *et al.* (2011). Study on plant growth, carbohydrate synthesis and essential oil accumulation of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng cultured photoautotrophically under forced ventilation condition. **Journal of Biotechnology**, v.9, n.4A, p.605-610. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/297995540>. Acesso em: 24 agosto de 2024.
- NGUYEN, Q.T. *et al.* (2001). Photoautotrophic growth response of *in vitro* coffee plantlets to ventilation methods and photosynthetic photon fluxes under carbon dioxide enriched condition. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.66, p.217-225. <https://doi.org/10.1023/A:1010662413486>
- NGUYEN, Q.T. *et al.* (2002). Growth enhancement of *in vitro* yam (*Dioscorea alata*) plantlets under photoautotrophic condition using a forced ventilation system. In: Nakatani, M., Komaki, K. (Eds.), Potential of Root Crops for Food and Industrial Resources: Twelfth Symposium of the International Society for Tropical Root Crops (ISTRC), Sep.10-16, 2000. International Society for Tropical Root Crops, Tsukuba, Japan, p.366-368. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/295067686>. Acesso em: 24 de agosto de 2024.
- NGUYEN, Q.T. *et al.* (2010). Photoautotrophic growth of Dendrobium 'Burana White' under different light and ventilation conditions. **Propagation of Ornamental Plants**, v.10, n.4, p.227-236. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/280774999>. Acesso em: 24 agosto de 2024.
- NGUYEN, Q.T.; XIAO, Y.; KOZAI, T. (2020). Photoautotrophic micropropagation. In: Kozai T., Niu G., Takagaki M. (eds) **Plant factory: an indoor vertical farming system for efficient quality food production**, 2nd edn. Academic Press, New York, p.333-346. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816691-8.00023-6>
- OLIVEIRA, L.S.; DIAS, P.C.; BRONDANI, G.E. (2013). Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa florestal brasileira**, v.33, n.76, p.439-453. <https://doi.org/10.4336/2013.pfb.33.76.481>

- OLIVEIRA, N.P.; RIBEIRO, S.A.F.; SOUZA, M.M.de. (2021). Controle de contaminação e oxidação no cultivo *in vitro* de oliveira (*Olea europaea* L.) cv. “Koroneiki”. *Research, Society and Development*, v.10, n.5, e30710514929. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14929>
- OLIVEIRA, T.P.F. *et al.* (2016). Aplicação de AIB e tipo de miniestacas na produção de mudas de *Handroanthus heptaphyllus* Mattos. **Ciência Florestal**, v. 26, n.1, p.313-320. <https://doi.org/10.5902/1980509821128>
- PACHECO, C.S.G.R.; SILVA, A.M. (2019). Arborização urbana em Petrolina (PE): melhoria paisagística e de qualidade ambiental com plantas nativas da Caatinga. **Nature and Conservation**, v.12, n.2, p.77-87. <https://doi.org/10.6008/CBPC2318-2881.2019.002.0008>
- PAIVA, H.N.; GOMES, J.M. (2005). Propagação Vegetativa de Espécies Florestais. Viçosa, MG: UFV, 2005, 46p. (Cadernos didáticos, 83).
- PARK, B.S. *et al.* (2005). Selective growth-inhibiting effects of compounds identified in *Tabebuia impetiginosa* inner bark on human intestinal bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.4, p.1152-1157. <https://doi.org/10.1021/jf0486038>
- PEREIRA, M. de O.; NAVROSKI, M.C.; REININGER, L.R.S. (2015). Multiplicação *in vitro* de ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*). **Nativa**, Sinop, v.3, n.1, p.59-63. <https://doi.org/10.14583/2318-7670.v03n01a10>
- PINKARD, E.A. *et al.* (2010). Determining photosynthetic responses of forest species to elevated [CO₂]: Alternatives to FACE. **Forest Ecology and Management**, v.260, p.1251–1261. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2010.07.018>
- PIRES, T.C.S. *et al.* (2015). Bioactive Properties of *Tabebuia impetiginosa*- Based Phytopreparations and Phytoformulations: A Comparison between Extracts and Dietary Supplements. **Molecules**, v.20, n.22, p.22863-22871. <https://doi.org/10.3390/molecules201219885>
- POTAPOV, P. *et al.* (2017). The last frontiers of wilderness: Tracking loss of intact forest landscapes from 2000 to 2013. **Science Advances**, v.3, n.1, e1600821. <https://doi.org/10.1126/sciadv.160082>
- RADOGLU, K.M.; JARVIS, P.G. (1992). The effects of CO₂ enrichment and nutrient supply on growth morphology and anatomy of *Phaseolus vulgaris* L. seedlings. **Annals of Botany**, v.70, p.245-256. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a088466>
- RESHI, Z.A. *et al.* (2025). Effect of meta-Topolin on morphological, physiochemical, and molecular dynamics during *in vitro* regeneration of *Salix tetrasperma* Roxb. **BMC Plant Biology**, v.25, p.121. <https://doi.org/10.1186/s12870-025-06095-8>
- RIBEIRO, A.E.S.; COELHO, E.S. (2021). Fatores abióticos sobre aspectos ecofisiológicos de *Handroanthus impetiginosus* y *Handroanthus serratifolius*. **Bosque**, v.42, n.1, p.121-129. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-92002021000100121>
- RIBEIRO, I. S. *et al.* (2022). Light condition, flask sealing, and cultivation time on the germination and initial *in vitro* development of *Dendrobium nobile* Lindl. **Ornamental Horticulture**, v.28, n.4, p.407-413. <https://doi.org/10.1590/2447-536X.v28i4.2515>

- ROCHA, S.C. (2005). **Micropropagação da canjarana (*Cabrlea canjerana*)**. 2005. 85p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- RODRIGUES M. *et al.* (2012). Effects of flask sealing and growth regulators on *in vitro* propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.48, p.67–72. <https://doi.org/10.1007/s11627-011-9398-8>
- RYAN, R.Y. *et al.* (2021). The medicinal plant *Tabebuia impetiginosa* potently reduces pro-inflammatory cytokine responses in primary human lymphocytes. **Scientific Reports**, v.11, n.1, p.1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85211-8>
- SALDANHA, C.W. *et al.* (2012). A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.110, p.413–422.
- SALOMÃO, A.N.; CAMILLO, J. (2016). *Handroanthus impetiginosus*. In: Vieira, R. F.; Camillo, J.; Coradin, L. (Eds.). Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro - Região Centro-Oeste. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, v.5, p.801-812.
- SANTOS, L.C.D. *et al.* (2024). Chemical characterization, antioxidant activity, and cytotoxicity of fatty acids methyl esters from *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos (Bignoniaceae) seeds. **Natural Product Research**, v.38, n.4, p.619-623. <https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2179624>.
- SAUERESSIG, D. (2014). Plantas do Brasil: Árvores Nativas. vol.1, 432 p.: il. ed. Plantas do Brasil.
- SHA VALLI KHAN, P. S. (2002). Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.71, p.141–146. <https://doi.org/10.1023/A:1019935208418>
- SHI, X.N.; COLLADO, C.E.; HERNÁNDEZ, R. (2024). Improve *Cannabis sativa* micropropagation through increasing air change rate in photoautotrophic and traditional tissue culture. **Scientia Horticulturae**, v.333, 113238.
- SHIN, K.S.; PARK, S.Y.; PAEK, K.Y. (2013). Metabolismo de açúcar, fotossíntese e crescimento de plântulas in vitro de *Doritaenopsis* sob condições microambientais controladas. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v.49, p.445–454. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2024.113238>
- SHOJA, H.M.; SHISHAVANI, H.K. (2021). Effects of different hormonal treatments on growth parameters and secondary metabolite production in organ culture of *Hyssopus officinalis* L. **BioTechnologia**, v.102, n.1, p.33–41. <https://doi.org/10.5114/bta.2021.103760>
- SILVA, D.R. *et al.* (2024). Unlocking the potential of *in vitro* photoautotrophy for *Eryngium foetidum*: biomass, morphophysiology, and acclimatization. **Horticulturae**, v.10, n.1, 107. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10010107>
- SILVA, G. H.; SANTOS, R.V.; LUCENA, R.J. (2015). Seedlings production of *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos in substrate containing vermiculite

co-product. **Scientific Electronic Archives**, v.8, n.2, p.22-28. <https://doi.org/10.36560/822015167>

SILVA, R.S. *et al.* (2021). Chemical profiles and antimicrobial activities of plants utilized in Brazilian traditional medicine. **Eclética Química Journal**, v.46, v.1, p.35-40. <https://doi.org/10.26850/1678-4618eqj.v46.1.2021.p35-40>

SILVA; A.M.P. *et al.* (2012). Atividade biológica de Naftoquinonas de espécies de Bignoniaceae. **Revista Fitos**, v.7, n.4, p.207-215. <https://doi.org/10.32712/2446-4775.2012.154>

SILVA-JUNIOR, O.B. *et al.* (2018). Genome assembly of the pink ipê (*Handroanthus impetiginosus*, Bignoniaceae), a highly valued, ecologically keystone neotropical timber forest tree. **Gigascience**, v.7, n.1, p.1-16. <https://doi.org/10.1093/gigascience/gix125>.

SIMÕES, I.M. *et al.* (2021). Grafting among species of the genus *Handroanthus* (Bignoniaceae). **Scientia Forestalis**, v.49, n.130, e3513. <https://doi.org/10.18671/scifor.v49n130.12>

SON, D.J. *et al.* (2006). Effects of *Tabebuia impetiginosa* inner bark extract on platelet aggregation and vascular smooth muscle cell proliferation through suppressions of arachidonic acid liberation and ERK1/2 MAPK activation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.108, n.1, p.148-151. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.016>.

SONG, W. *et al.* (2023). Improvement of culture conditions and plant growth regulators for *in vitro* callus induction and plant regeneration in *Paeonia lactiflora* Pall. **Plants**, v.12, n.23, p.3968. <https://doi.org/10.3390/plants12233968>

SUAREZ, I.E.; JARMA-OROZCO, A.; AVILA, M. (2006). Desarrollo de un protocolo para propagación *in vitro* de roble (*Tabebuia rósea* Bertol DC). **Temas Agrarios**, v.11, n.2, p.52-62. <https://doi.org/10.21897/rta.v11i2.645>

TANDON, V.K.; SINGH, R.V.; YADAV, D.B. (2004). Synthesis and evaluation of novel 1,4-naphthoquinone derivatives as antiviral, antifungal and anticancer agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v.14, n.11, p.2901-2904. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.03.047>

TISARUM, R. *et al.* (2018). *In vitro* photoautotrophic acclimatization, direct transplantation and ex vitro adaptation of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.133, p.215-223. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1374-5>

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (1998). Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa – SPI/ Embrapa- CNPH, v.1, p.133- 145.

VALLE, A.C.V. *et al.* (2023). Evaluation of cell viability and nitric oxide release after treatment of human hepatocellular carcinoma cells with a homeopathic compound of Graviola (*Annona muricata*) and Purple Ipe (*Handroanthus impetiginosus*). **Medical Research Archives**, v.11, n.7, p.1-6. <https://doi.org/10.18103/mra.v11i7.2.4091>

VIDAL, N. *et al.* (2017). Proliferation and rooting of chestnut under photoautotrophic conditions. In: Bonga, J.M., Park, Y.-S., Trontin, J.-F. (Eds.), Development and Application of Vegetative Propagation Technologies in Plantation Forestry to Cope with

a Changing Climate and Environment: Fourth International Conference of the IUFRO Unit 2.09.02: Somatic Embryogenesis and Other Vegetative Propagation Technologies, September 19th–23, 2016. La Plata, Argentina, p.119-127.

WANG, N. et al. (2020) Coordinated responses of leaf and absorptive root traits under elevated CO₂ concentration in temperate woody and herbaceous species. *Environmental and Experimental Botany*, v.179, p.1–9. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104199>

WATT, M.P. (2012). O status da tecnologia do sistema de imersão temporária (TIS) para micropropagação de plantas. *African Journal of Biotechnology*, v.11, p.14036–14043. <https://doi.org/10.5897/AJB12.1693>

WELZ, V. F. F. *et al.* (2020). Growth, enzymatic activity, and antioxidant activity of sweet basil grown *in vitro*. *Revista Caatinga*, v.33, n.3, p.660-670. <https://doi.org/10.1590/1983-21252020v33n309rc>

WENDLING, I.; FERRARI, M. P.; DUTRA, L. F. (2005). Produção de mudas de corticeira-do-mato (*Erythrina falcata Benth*) por miniestaquia a partir de propágulos juvenis. *Comunicado Técnico Embrapa Florestas*, Colombo, n.130.

WENDLING, I.; XAVIER, A. (2001). Gradiente de maturação e rejuvenescimento aplicado em espécies florestais. *Floresta e Ambiente*, v.8, n.1, p.187-194.

WESOLOWSKI, A. *et al.* (2020). Elevated CO₂ did not stimulate stem growth in 11 provenances of a globally important hardwood plantation species. *Frontiers*, v.3, n.66, p.1-18. <https://doi.org/10.3389/ffgc.2020.00066>

XIAO, Y.; KOZAI, T. (2004). Commercial application of a photoautotrophic micropropagation system using large vessels with forced ventilation: plantlet growth and production cost. *Hortscience*, v.39, p.1387-1391. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.39.6.1387>

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. (2011). Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.105, n.1, p.149–158. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9863-9>

XU, N.; *et al.* (2023). Effects of Elevated CO₂ Concentration and Temperature on the Growth and Photosynthetic Characteristics of *Populus simonii* × *P. nigra* ‘1307’ Leaves. *Forests*, v.14, p.2156. <https://doi.org/10.3390/f14112156>

XU, Z.; JIANG, Y.; ZHOU, G. (2015). Response and adaptation of photosynthesis, respiration, and antioxidant systems to elevated CO₂ with environmental stress in plants. *Frontiers Plant Science*, v.6, p.1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00701>

YASMIN, S. *et al.* (2022). Auxin and cytokinin synergism in micropropagation for mass production of *Aloe vera*. *BioTechnologia*, v.103, n.3, p.301–310. <https://doi.org/10.5114/bta.2022.118672>

ZAREI, A. *et al.* (2021). *Cannabis sativa* L. photoautotrophic micropropagation: a powerful tool for industrial scale in vitro propagation. *In Vitro Cellular and*

Developmental Biology - Plant, v.57, p.932–941. <https://doi.org/10.1007/s11627-021-10167-3>

ZHAO, X. *et al.* (2021). Auxin and cytokinin mediated regulation involved *in vitro* organogenesis of papaya. **Journal of Plant Physiology**, v.260, 153405, ISSN 0176-1617. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153405>.

ZOBAYED, S.M.A. (2008). Aeration in Plant Tissue Culture. In: Plan Tissue Culture Engineering. **Springer, Dordrecht**, v.6, p.313–327. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3694-1_16

ZOBAYED, S.M.A. *et al.* (2000). Mass propagation of *Eucalyptus camaldulensis* in a scaled-up vessel under *in vitro* photoautotrophic condition. **Annals of Botany**, v.85, p.587-592. <https://doi.org/10.1006/anbo.1999.1106>

Capítulo II
Estabelecimento, multiplicação e enraizamento *in vitro* de *Handroanthus*
impetiginosus

RESUMO

Handroanthus impetiginosus (Mart. ex DC.) é uma espécie lenhosa nativa do Brasil, entretanto, apresenta problemas em sua propagação seminal devido a recalcitrância das sementes. Portanto, técnicas de propagação *in vitro* podem driblar as barreiras enfrentadas pela propagação natural da espécie e garantir mudas com elevada taxa de sobrevivência em campo. Desta forma, este trabalho teve como objetivo o estabelecimento, multiplicação e enraizamento *in vitro* de *H. impetiginosus* a partir de segmentos nodais. As sementes de *H. impetiginosus* foram desinfestadas e inoculadas nos tratamentos *meta*-topolina (*m*-TP) e Benzilaminopurina (BAP) (0, 2,5 e 5 μ M), para multiplicação. Após 45 dias de cultivo, os brotos foram inoculados nos tratamentos ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indol-3-butírico (AIB) (0, 3 e 6 μ M) para enraizamento dos brotos. No experimento de multiplicação, os tratamentos com *m*-TP 2,5 e 5 μ M proporcionaram plantas com diâmetro do colo (DC) e número de folhas (NF) superiores, consecutivamente. Em contrapartida, o tratamento com *m*-TP 2,5 reduziu os teores de clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides e clorofila total. No experimento de enraizamento, os tratamentos com ANA 3 e 6 μ M promoveram resultados superiores para os parâmetros número de raiz (NR), volume de raiz (VR) e massa seca da raiz (MSR). crescimento da raiz. Assim, neste trabalho foi possível estabelecer um protocolo eficiente para a multiplicação e enraizamento *in vitro* de *H. impetiginosus*.

Palavras-chave: citocininas, auxinas, multiplicação, enraizamento, espécie lenhosa.

1 INTRODUÇÃO

Handroanthus impetiginosus conhecido popularmente como ipê roxo, é uma arbórea nativa do Brasil, com ocorrência em diversos biomas, como a Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pantanal e Amazônia (Proflora, 2023). O principal meio de propagação do ipê roxo é via seminal, entretanto, apresenta problemas com a baixa produção de sementes durante o ano, a recalcitrância das sementes e infestação por microrganismos que inibem e comprometem a germinação, a qualidade fisiológica e, posteriormente, o desenvolvimento da plântula (Lopes et al., 1991; Sales, 1992; Castellani et al., 1996; Botelho et al., 2008; Parisi et al., 2019).

Existem ferramentas biotecnológicas que possibilitam driblar as barreiras enfrentadas pela propagação natural do ipê roxo, como a cultura *in vitro* de tecidos vegetais, por ser uma alternativa viável que garante a propagação de mudas em diferentes períodos do ano e uniformidade em espécies de crescimento lento (Resende et al., 2021). a conservação de plantas em bancos de germoplasma (Guariniello et al., 2018) e a produção de compostos bioativos (Felipe et al., 2019; Ríos-Ríos et al., 2019; Fortini et al., 2021).

O sucesso do cultivo *in vitro* depende de fatores como a escolha do explante, o meio de cultura e, especialmente, o uso adequado de reguladores de crescimento. Dentre os reguladores, as citocininas desempenham papel importante na multiplicação de brotos por estimularem a divisão celular e o desenvolvimento de gemas laterais. Os fitorreguladores como 6-benzilaminopurina (BAP), *meta*-topolina (m-TP) e cinetina são empregados em protocolos de propagação de espécies lenhosas e herbáceas, a fim de aumentar a taxa de brotação e a formação de múltiplos segmentos nodais (De Oliveira et al., 2008; Puscan et al., 2024;). A escolha da citocinina e sua concentração adequada determinam o sucesso do protocolo, e influenciam diretamente na qualidade e quantidade das brotações obtidas (Hoell et al., 2003; Liu et al., 2020).

Além das citocininas, as auxinas, como o ácido indol-3-butírico (AIB) e o ácido naftalenoacético (ANA), são reguladores comumente usados para indução de enraizamento *in vitro* em plantas lenhosas. Trabalhos como o de Oliveira et al. (2016) e Máximo et al. (2020) abordaram que concentrações elevadas (8.000 mg L^{-1}) e intermediárias ($1,0\text{--}9,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) de AIB potencializam a formação de raízes adventícias em *Handroanthus heptaphyllus* e incrementam o número e comprimento de raiz em *Handroanthus impetiginosus*. O ANA, por sua vez, não demonstrou efeito aparente na

porcentagem de enraizamento de *Pinus caribaea* e *Melissa officinalis* L. (Henrique et al. 2006; Sevik; Guney, 2013).

Apesar das vantagens que o cultivo *in vitro* proporciona para espécies lenhosas como *H. impetiginosus*, a falta de protocolos robustos, eficientes e específicos, sobretudo nos estágios de multiplicação e enraizamento, impede a produção consistente de mudas de alta qualidade fitossanitária e genética, o que compromete os programas de reflorestamento, exploração sustentável e conservação da espécie.

Diante da importância ecológica, econômica e medicinal desta espécie, aliada às limitações impostas pela propagação convencional, torna-se essencial desenvolver protocolos eficientes de multiplicação *in vitro*. Assim, o objetivo deste trabalho foi o estabelecimento de *H. impetiginosus* com protocolo de desinfestação, a multiplicação de brotos a partir de segmentos nodais e o enraizamento *in vitro* da espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de estudo

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT/UEMA) e no Laboratório de Ciências Ambientais e Biodiversidade (LCAB/UEMA) da Universidade Estadual do Maranhão (São Luís, MA / Brasil).

2.2 Estabelecimento do *Handroanthus impetiginosus*

2.2.1 Obtenção do material vegetal

As sementes de *H. impetiginosus* foram adquiridas da empresa “Sementes Caiçara®” (São Paulo, Brasil), e armazenadas em sacos plásticos em geladeira na temperatura entre 5-8 °C no LCT/UEMA.

2.2.2 Desinfestação e germinação das sementes

O protocolo de desinfestação foi estabelecido com base em metodologias propostas por Ríos-Ríos et al. (2019), Aragão et al. (2015) e Duarte et al. (2014), modificadas.

Em condições de laboratório, as sementes foram desinfestadas, com imersão em: (i) água e detergente neutro por 30 minutos; (ii) hipoclorito de sódio (NaOCl) (2,5% de cloro ativo) (água sanitária Ipê®, Química Amparo Ltda®, Brasil) acrescido com Tween 20® (Isofar Ltda®, Duque de Caxias – RJ, Brasil) (4 gotas para cada 100 mL) por 7 minutos; (iii) etanol comercial (EtOH) a 70% por 2 minutos; (iv) NaOCl (2,5% de cloro ativo) com Tween 20® [4 gotas (100 mL)⁻¹] por 15 minutos; (v) solução de polivinilpirrolidona - PVP (500 mg L⁻¹) (Dinâmica®, Química Contemporânea Ltda, São Paulo, Brasil) estéril por 24 horas, no escuro a 25 ± 3 °C. Posteriormente, a ala membranacea (tegumento) foi seccionada até a exposição da semente, em condições estéreis (vi) e estas foram imersas em: (vii) EtOH 70% por 2 minutos; (viii) NaOCl (2,5% de cloro ativo) com Tween 20® [4 gotas (100 mL)⁻¹] por 7 minutos (Figura 1). A partir da etapa ii a desinfestação foi realizada em câmara de fluxo laminar, com agitação ocasional e garantindo que todas as sementes entraram em contato com as soluções desinfetantes. Entre cada etapa foram feitas seis lavagens com água destilada estéril.

Em seguida, as sementes foram colocadas sobre papel toalha estéril para retirar o excesso de água e imediatamente inoculadas em tubos de vidro de 24 x 150 mm contendo 10 mL de meio MS (Murashige & Skoog) (Murashige; Skoog 1962) (M519, Phytotechnology Laboratories®, Kansas, United States) ½ força (metade da concentração de macro e micronutrientes - ½ MS), suplementado com vitaminas MS, sacarose (20 g L⁻¹), mio-inositol (100 mg L⁻¹), carvão ativado (2 g L⁻¹) e phytigel (2,1 g L⁻¹). O pH do meio foi ajustado para 5,80 ± 0,03 antes da autoclavagem a 121 °C e 108 kPa durante 15 min. Os tubos foram vedados com tampa de polipropileno e filme de pvc transparente e mantidos em sala de crescimento a 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h luz e irradiância de 40 µmol m⁻² s⁻¹, proveniente de duas lâmpadas LEDs (Diodos Emissores de Luz) de cor branco (Tubular T8 Led, 10w, Brasília, Brasil) (Figura 1).

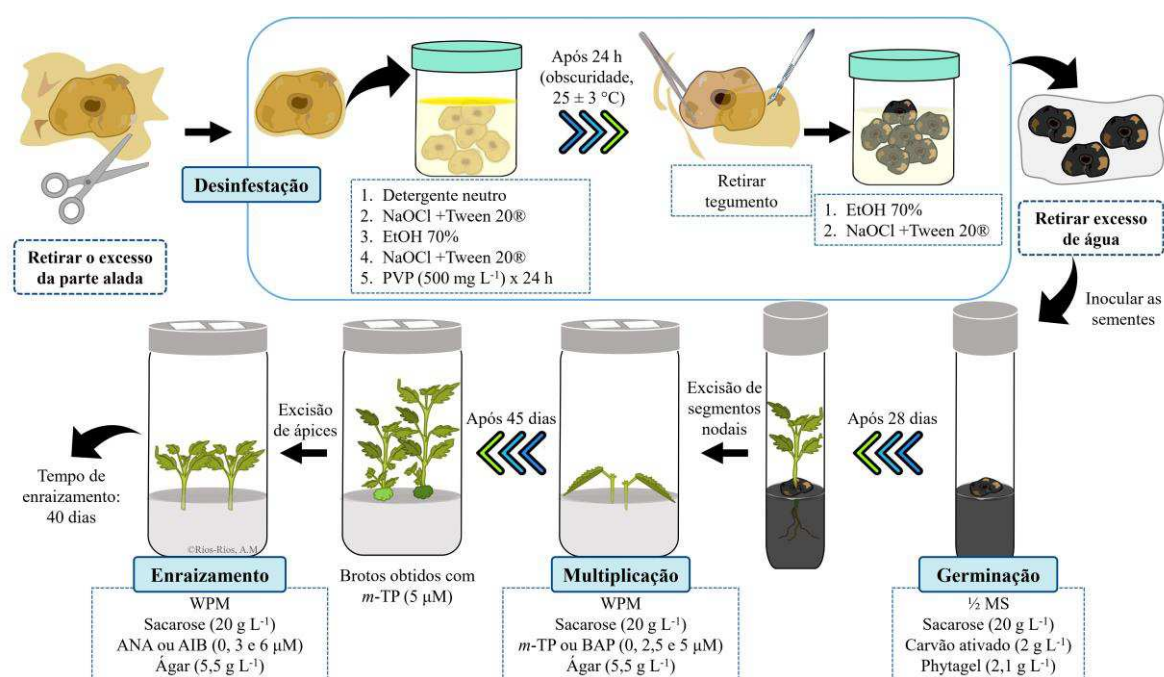


Figura 1. Etapas da propagação *in vitro* de *Handroanthus impetiginosus*. **NaOCl**: hipoclorito de sódio; **EtOH**: Etanol; **PVP**: polivinilpirrolidona; ½ **MS**: meio Murashige & Skoog meia força (metade da concentração de macro e micronutrientes); **WPM**: meio McCown's Woody Plant; **m-TP**: *meta*-topolina; **BAP**: 6-Benzilaminopurina; **ANA**: ácido naftalenoacético; **AIB**: ácido indol-3-butírico.

2.3 Experimento de multiplicação *in vitro* de *Handroanthus impetiginosus*

Plântulas germinadas de *H. impetiginosus* com 28 dias de cultivo, tamanho e desenvolvimento homogêneo, foram utilizadas como fonte dos explantes para induzir a multiplicação de brotos. Segmentos de caule (1,5 cm de comprimento) com um meristema axilar e uma folha inteira pré-existent foram inoculados em frascos de vidro de 350 mL

de capacidade contendo 40 mL de meio WPM (McCown's Woody Plant; Lloyd;McCown, 1981) com vitaminas e mio-inositol (100 mg L^{-1}) (L449, Phytotechnology Laboratories®, Kansas, United States) suplementado com sacarose (20 g L^{-1}), ágar bacteriológico ($5,5 \text{ g L}^{-1}$) (Dinâmica, Brasil) e os reguladores de crescimento *meta*-topolina (*m*-TP) e benzilaminopurina (BAP) (0, 2,5 e $5 \text{ } \mu\text{M}$), usados por separado. O pH do meio foi ajustado a $5,80 \pm 0,03$ antes da autoclavagem a $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e 108 kPa durante 15 min.

Os frascos foram vedados com tampas de polipropileno com dois orifícios de 10 mm de diâmetro cobertos com membranas elaboradas segundo a metodologia de Saldanha et al. (2012). O material vegetal foi mantido em sala de crescimento a $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 h luz e irradiância de $40 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ proveniente de duas lâmpadas LEDs (Diodos Emissores de Luz) de cor branco (Tubular T8 Led, 10w, Brasília, Brasil) (Figura 1).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2×3 , constituído de dois reguladores de crescimento (*m*-TP e BAP) e três concentrações (0, 2,5 e $5 \text{ } \mu\text{M}$), com seis repetições. Cada repetição consistiu de um frasco contendo 40 mL de meio de cultura e dois segmentos de caule.

2.4 Experimento de enraizamento *in vitro* de *Handroanthus impetiginosus*

Os brotos foram induzidos a partir de segmentos de caule (com um nó e uma folha pré-existente) inoculados em frascos de vidro de 350 mL de capacidade, contendo 40 mL de meio WPM acrescido com *m*-TP ($5 \text{ } \mu\text{M}$), sacarose (20 g L^{-1}) e ágar bacteriológico ($5,5 \text{ g L}^{-1}$), como mencionado na etapa de multiplicação (item 2.3).

Após 45 dias de cultivo os brotos (3 cm de comprimento) com dois pares de folhas completamente expandidas (incluindo o ápice) foram separados do explante inicial, eliminando o calo formado na base. Em seguida, os brotos foram inoculados em meio WPM com adição de sacarose (20 g L^{-1}), ágar bacteriológico ($5,5 \text{ g L}^{-1}$) e as auxinas ácido naftalenoacético (ANA) e ácido indol-3-butírico (AIB) (0, 3 e $6 \text{ } \mu\text{M}$). O pH do meio foi ajustado a $5,80 \pm 0,03$ antes da autoclavagem a $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e 108 kPa durante 15 min. Os frascos foram vedados com tampas de polipropileno com dois orifícios de 10 mm cobertos com membranas porosas (Saldanha et al., 2012). O material vegetal foi mantido durante 40 dias em sala de crescimento a $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 h luz e irradiância de $40 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ proveniente de duas lâmpadas LEDs brancas (Figura 1).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2x3, constituído de dois auxinas (ANA e AIB) e três concentrações (0, 3 e 6 μ M), com 6 repetições. Cada repetição consistiu de um frasco contendo 40 mL de meio de cultura e dois brotos.

2.5 Avaliação de parâmetros morfofisiológicos

2.5.1 Determinação de parâmetros de crescimento

Na etapa de multiplicação foram avaliados o comprimento da parte aérea (CAP), o diâmetro do caule (DC), número de folhas (NF), folíolos totais por broto (NFL), número de nós (NN) do maior broto formado por explante, número de brotos (NB) e presença ou ausência de calo. A massa seca da parte aérea (MSPA) e do calo (MSC) e a área foliar (AF) foram determinados com base na biomassa total produzida por explante.

Na etapa de enraizamento foram determinados o número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR), diâmetro da maior raiz (DR), volume de raiz (VR) e a massa seca da raiz (MSR). Também foram avaliados: comprimento da parte aérea (CAP), diâmetro do caule (DC), número de folhas (NF), folíolos totais por broto (NFL) e a massa seca da parte aérea (MSPA).

A área foliar foi determinada a partir de fotografias, capturadas com câmera digital, das folhas individuais fixadas sobre papel milimetrado branco, as imagens foram analisadas com o software ImageJ 1.49v (Schneider et al., 2012). A massa seca foi obtida após secagem do material vegetal (acondicionado em sacos de papel) em estufa de circulação de ar forçado (Ambikontrol®, Novus, n1030) a 45 °C durante 72 h, até obtenção de massa constante.

2.5.2 Determinação dos pigmentos fotossintéticos

Para quantificação da clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides, clorofila *a/b* e clorofila total das plantas obtidas na etapa de multiplicação, foram extraídos três discos foliares de 3 mm de diâmetro da terceira folha totalmente expandida, contada a partir do ápice e, evitando as nervuras; para as folhas com mais de um folíolo foi selecionado o folíolo central. As amostras foram imersas em 3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO, Isofar® Ltd.a, Duque de Caxias, RJ, Brasil) e mantidas no escuro por 48 h (Santos et al., 2008). A absorbância dos extratos foi determinada a 665 nm, 649 nm e 480 nm, com o auxílio

de um espectrofotômetro UV-visível (mono-feixe) (UV-M51; BEL Engineering Company, Monza, Itália) em cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico. O conteúdo dos pigmentos fotossintéticos foi determinado com base nas equações descritas por Wellburn (1994).

2.5.3 Determinação da fluorescência da clorofila

Para determinação da fluorescência da clorofila das plantas obtidas na etapa de multiplicação utilizou-se um fluorímetro de luz não-modulado modelo Pocket PEA Chlorophyll Fluorimeter (Hansatech Instruments – King's Lynn, Norfolk), em que foi considerada a terceira folha totalmente expandida contada a partir do ápice (para as folhas com mais de um folíolo foi selecionado o folíolo central). Com o auxílio de uma pinça foi realizada uma adaptação do tecido foliar ao escuro por 30 minutos, para que todos os centros de reação adquirissem a condição de abertos (Q_a oxidada) (Bòlhar-Nordenkampf et al, 1989). Através do fluorímetro não modulado foram obtidas as medidas de fluorescência inicial (F_0), fluorescência máxima (F_m), fluorescência variável (F_v) e o índice de performance (PI). A partir dos valores de F_v e F_m foi determinada a relação F_v/F_m (rendimento quântico máximo do fotossistema II) (Bòlhar-Nordenkampf et al., 1989). A indução da fluorescência foi feita por meio de um pulso de luz vermelha (650 nm) com duração de dois segundos com intensidade de 600 W m^{-2} (100% de intensidade), obtido por meio de seis LEDS (Light Emitting Diodes), localizados na sonda do aparelho.

2.5.4 Análise estatística

Para todas as variáveis foram utilizadas 6 repetições, cada repetição consistiu em um broto, planta ou biomassa total gerada a partir de um explante inicial extraídos de um frasco.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F, e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância, utilizando o software Genes, versão 1990.2018.39. (CRUZ, 2016).

3 RESULTADOS

3.1 As citocininas *m*-TP e BAP modulamos parâmetros de crescimento de plântulas de *Handroanthus impetiginosus* cultivadas *in vitro*

As citocininas *m*-TP e BAP proporcionaram resultados satisfatórios quanto ao número de brotos de *H. impetiginosus*, em que o aumento da concentração de ambas resultaram também no maior número de brotações. Além disso, foi possível observar a presença de calos nas brotações obtidas nos tratamentos com *m*-TP e BAP a partir de 2,5 μ M (Figura 2).

As plântulas cultivadas sem reguladores de crescimento não apenas tiveram poucas brotações, como também apresentaram desenvolvimento inferior tanto para número de folhas quanto para formação de gemas axilares. As folhas das plântulas obtidas do tratamento controle (*m*-TP e BAP 0 μ M) apresentaram maior largura, porém, desidratadas quando comparadas aos demais tratamentos (Figura 2).

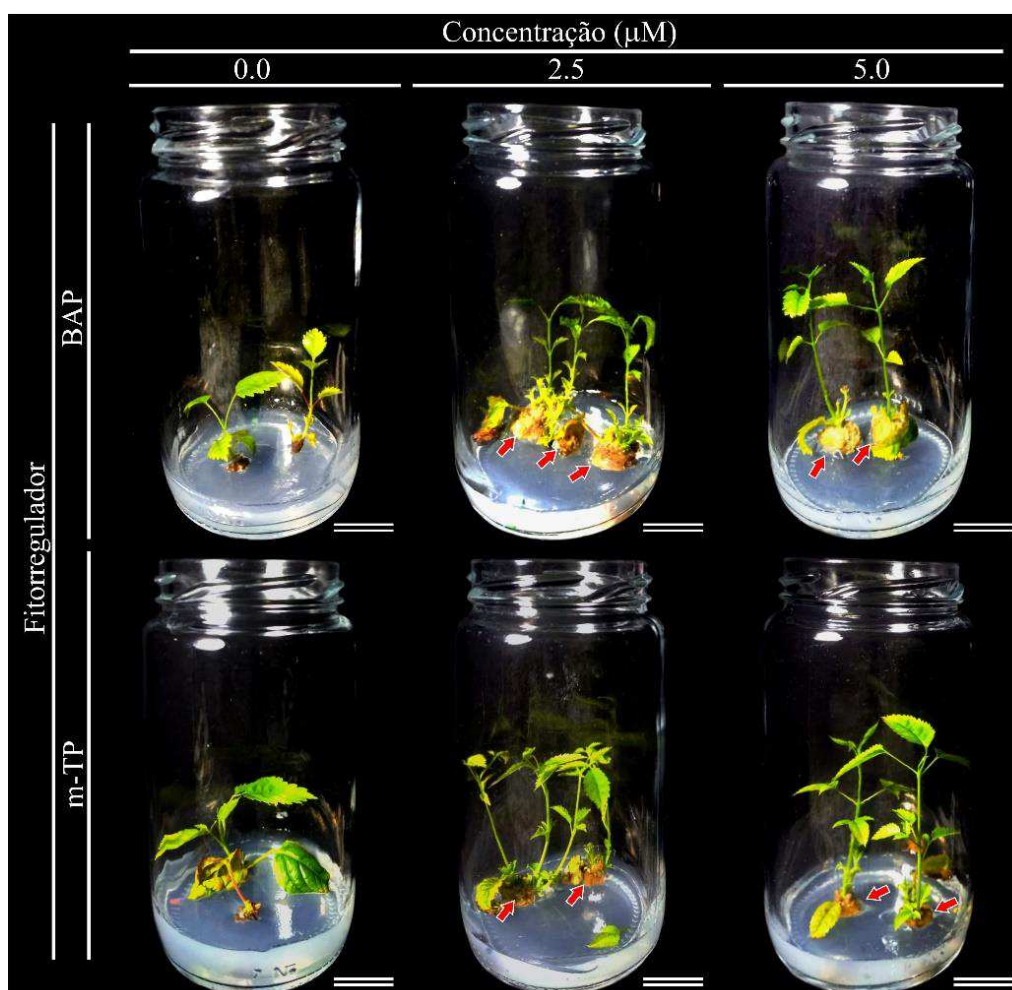


Figura 2. Aspectos morfológicos de plântulas de *Handroanthus impetiginosus* com 45 dias de cultivo *in vitro*, sob diferentes citocininas (*m*-TP e BAP) e concentrações (0, 2,5 e 5 μ M). Setas vermelhas: indicam presença de calos. Barras de escala: 2 cm.

O comprimento da parte aérea (CAP), o número de nós (NN), folíolos (NFL) e a massa seca da parte aérea (MSPA) das plântulas de ipê roxo não foram influenciados pelo tipo de citocinina, nem pelas concentrações usadas (Figuras 3A, 3D, 3E e 3G). O diâmetro do caule (DC) diferiu significativamente quanto a concentração de *m*-TP adicionada ao meio de cultura, com o aumento dessa citocnina, esse parâmetro apresentou redução, enquanto para a citonina BAP não houve diferença entre as concentrações testadas. Ao comparar a *m*-TP com BAP a 2,5 µM, a *m*-TP induziu o maior DC (Figura 3B).

O número de folhas (NF) diferiu entre as citocininas *m*-TP e BAP apenas quando testadas na concentração de 5 µM, e a *m*-TP proporcionou plantas com maior formação das folhas. Ao comparar as diferentes concentrações de *m*-TP e BAP, foi observado maior número de folhas com 2,5 e 5 µM de *m*-TP e com 2,5 µM de BAP; meios isentos desses reguladores proporcionaram plantas com a menor quantidade de folhas (Figura 3C).

A formação de brotos (NB), a área foliar (AF) e a massa seca do calo (MSC) foram semelhantes nas plantas independente da citocinina testada; porém, estas variáveis foram alteradas dependendo da concentração de cada citocinina. O NB foi maior nas plantas dos tratamentos com *m*-TP 2,5 e 5 µM e com BAP 2,5 µM (Figura 3F), entretanto, a AF e a MSC apresentaram os valores mais baixos nos meios isentos de citocininas (Figuras 3H e 3I).

Embora os tratamentos controles tenham apresentado estatisticamente os menores valores para MSC (Figura 3I), os tratamentos com *m*-TP 5 µM apresentaram também médias inferiores para este parâmetro, o que pode ser evidenciado nos calos formados de menor tamanho, em comparação com os observados nas plantas dos tratamentos com 2,5 µM de *m*-TP e 2,5 e 5 µM de BAP (Figura 2). O objetivo da etapa de multiplicação é a obtenção de brotos, esse aglomerado de células indiferenciadas, possíveis calos, não é desejável. Portanto, o tratamento com 5 µM de *m*-TP se torna interessante pelo elevado NB e menor tamanho de calos formados.

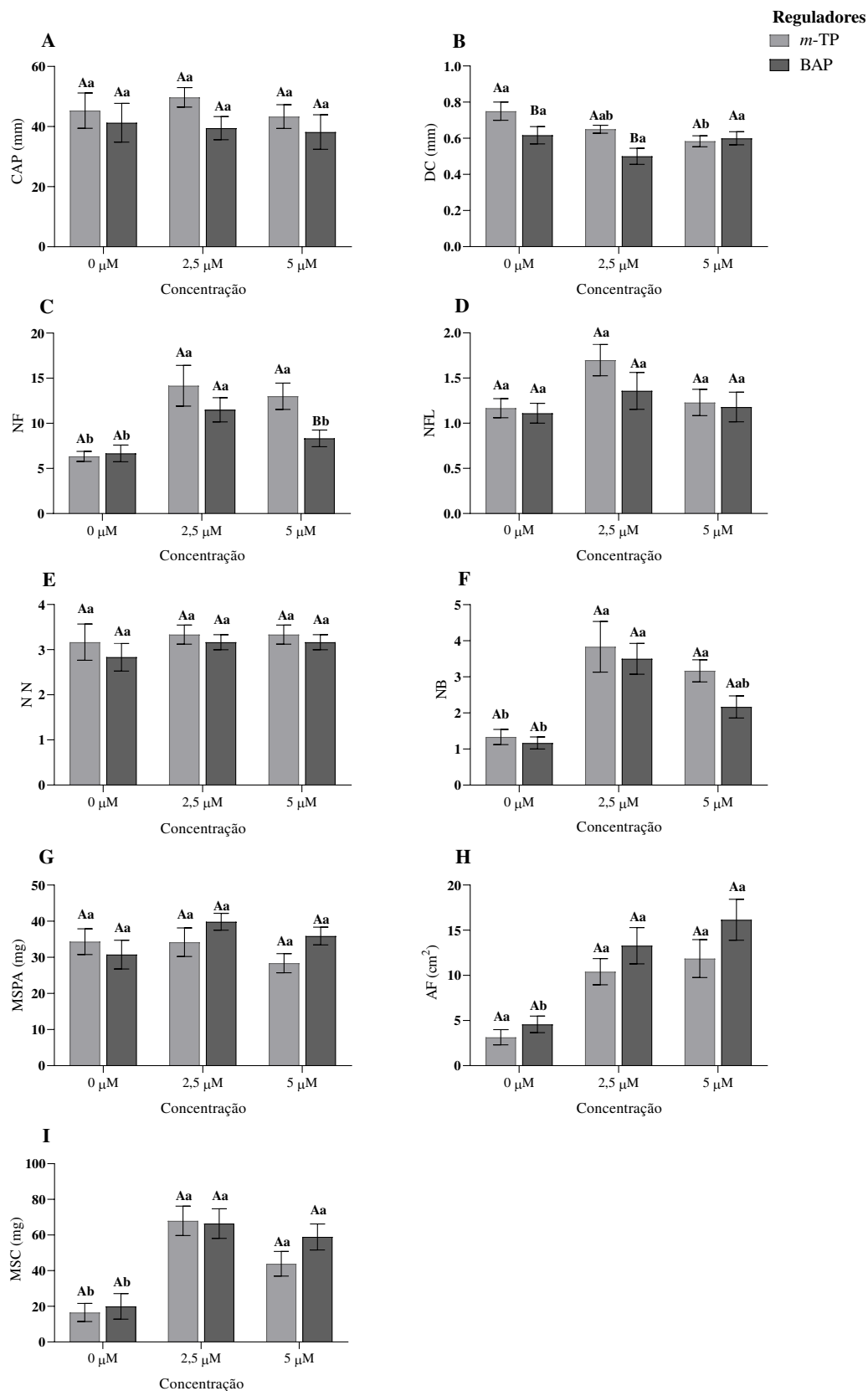


Figura 3. Parâmetros de crescimento em plântulas de *Handroanthus impetiginosus* com 45 dias de cultivo *in vitro* sob influência de citocininas (*m*-TP e BAP) e concentrações (0, 2,5 e 5 µM). (A) comprimento de parte aérea; (B) diâmetro do caule; (C) números de folhas; (D) número de folíolos; (E) número de nós; (F)

número de brotos; (**G**) massa seca da parte aérea; (**H**) área foliar; (**I**) massa seca do calo. Letras maiúsculas comparam os valores das variáveis quanto as citocininas, e as letras minúsculas comparam as concentrações das citocininas (Teste Tukey; $p \leq 0,05$). As barras representam o erro padrão ($n = 6$).

3.2 A citocinina *m*-TP altera o conteúdo de pigmentos fotossintéticos de plântulas *in vitro* de *Handroanthus impetiginosus*

Ao comparar o conteúdo de pigmentos fotossintéticos entre as plantas com relação à *m*-TP e BAP não foram encontradas diferenças significativas, o que indica que as duas citocininas atuam de forma semelhante sobre a biossíntese destes compostos. No entanto, ao analisar as citocininas de forma isolada, observou-se redução nos teores de clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides e clorofila total ao adicionar *m*-TP ao meio de cultura, obtendo as menores quantidades com 2,5 μM (Figuras 4A, 4B, 4D e 4E). O BAP não alterou a biossíntese de pigmentos fotossintéticos e, apenas a razão entre clorofila *a* e *b* não variou entre os tratamentos (Figura 4C).

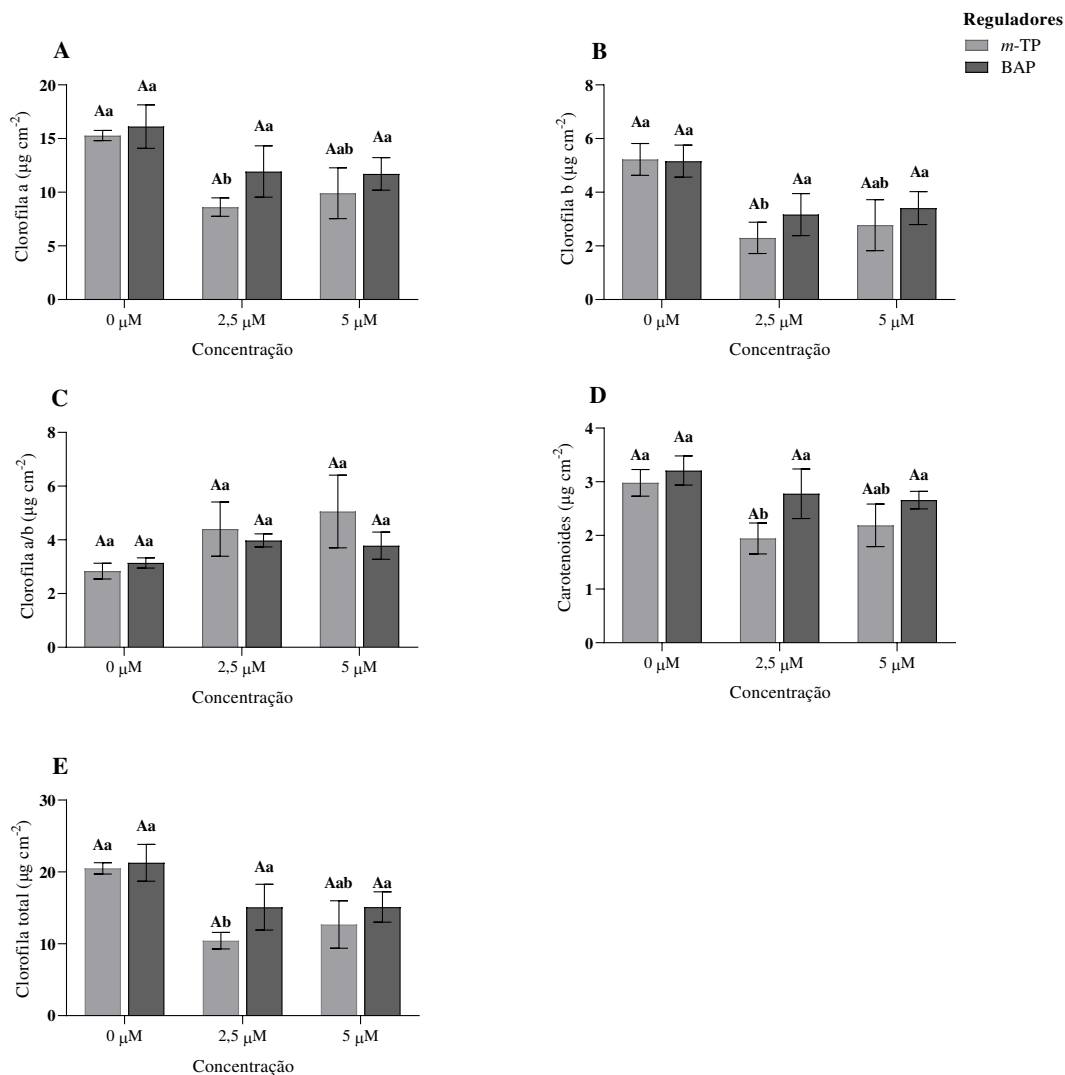


Figura 4. Pigmentos fotossintéticos em plântulas de *Handroanthus impetiginosus* com 45 dias de cultivo *in vitro* sob influência de citocininas (*m*-TP e BAP) em diferentes concentrações (0, 2,5 e 5 µM). (A) clorofila *a*; (B) clorofila *b*; (C) clorofila *a/b*; (D) carotenoides; (E) clorofila total. Letras maiúsculas comparam os valores das variáveis quanto as citocininas, e as letras minúsculas comparam as concentrações das citocininas (Teste Tukey; $p \leq 0,05$). As barras representam o erro padrão ($n=6$).

3.3 Citocininas *m*-TP e BAP não alteram a fluorescência da clorofila de plantas de *Handroanthus impetiginosus* em cultivo *in vitro*

As plântulas de *H. impetiginosus* submetidas aos tratamentos com as citocininas *m*-TP e BAP sob diferentes concentrações não diferiram quanto a fluorescência inicial (F_0), fluorescência variável (F_v), fluorescência máxima (F_m), rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) e índice de performance (PI) (Figuras 5A- 5D, 5F). Entretanto, a energia absorvida por centro de reação ativo (RC/ABS) apresentou diferença significativa em plantas submetidas à *m*-TP, incrementando conforme a concentração

desta citocinina no meio de cultura foi maior, atingindo valores superiores com 5 μM de *m*-TP (Figura 4E).

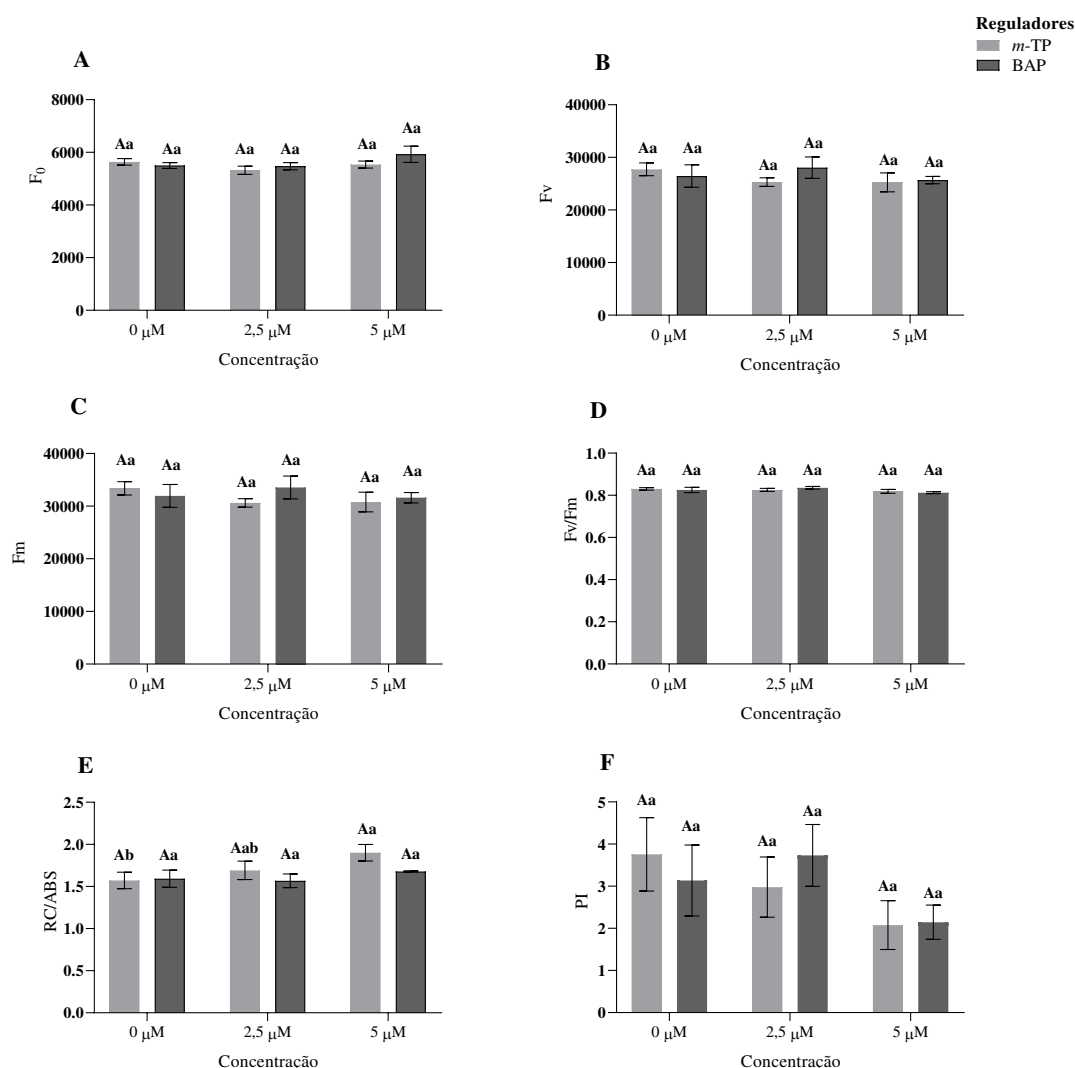


Figura 5. Fluorescência da clorofila em plântulas de *Handroanthus impetiginosus* com 45 dias de cultivo *in vitro* sob influência de citocininas (*m*-TP e BAP) e concentrações (0, 2,5 e 5 μM). (A) fluorescência inicial; (B) fluorescência variável; (C) fluorescência máxima; (D) rendimento quântico máximo do fotossistema II; (E) energia absorvida por centro de reação ativo; (F) índice de performance. Letras maiúsculas comparam os valores das variáveis quanto as citocininas, e as letras minúsculas comparam as concentrações das citocininas (Teste Tukey; $p \leq 0,05$). As barras representam o erro padrão ($n=6$).

3.4 Auxinas AIB e ANA influenciam na rizogênese de *Handroanthus impetiginosus* cultivado *in vitro*

As auxinas AIB e ANA em diferentes concentrações proporcionaram plantas com maior número de raízes e com variação no comprimento da maior raiz e no padrão morfológico das raízes. Na concentração de 3 μM de ANA, a resposta radicular foi heterogênea, com plantas que apresentaram raízes de comprimento intermediário e

espessura variável (Figura 6). As plantas deste mesmo tratamento apresentaram escurecimento tecidual e morte de brotações, possivelmente devido a uma fitotoxicidade.

Todavia, as plantas submetidas ao tratamento com 6 μM de ANA apresentaram a formação de estruturas radiculares espessas e curtas; as raízes apresentaram coloração amarelada, além de hiperproliferação de raízes adventícias, o que indica possível efeito inibitório de raízes normais causado pela dose elevada da auxina ANA (Figura 6).

Já as plantas nos tratamentos com a auxina AIB nas concentrações de 3 e 6 μM apresentaram desempenho superior, com a formação de raízes mais longas e bem definidas, além de aparência saudável das brotações. As plantas submetidas a tratamentos com AIB apresentaram um equilíbrio entre crescimento radicular e vigor da parte aérea (Figura 6).

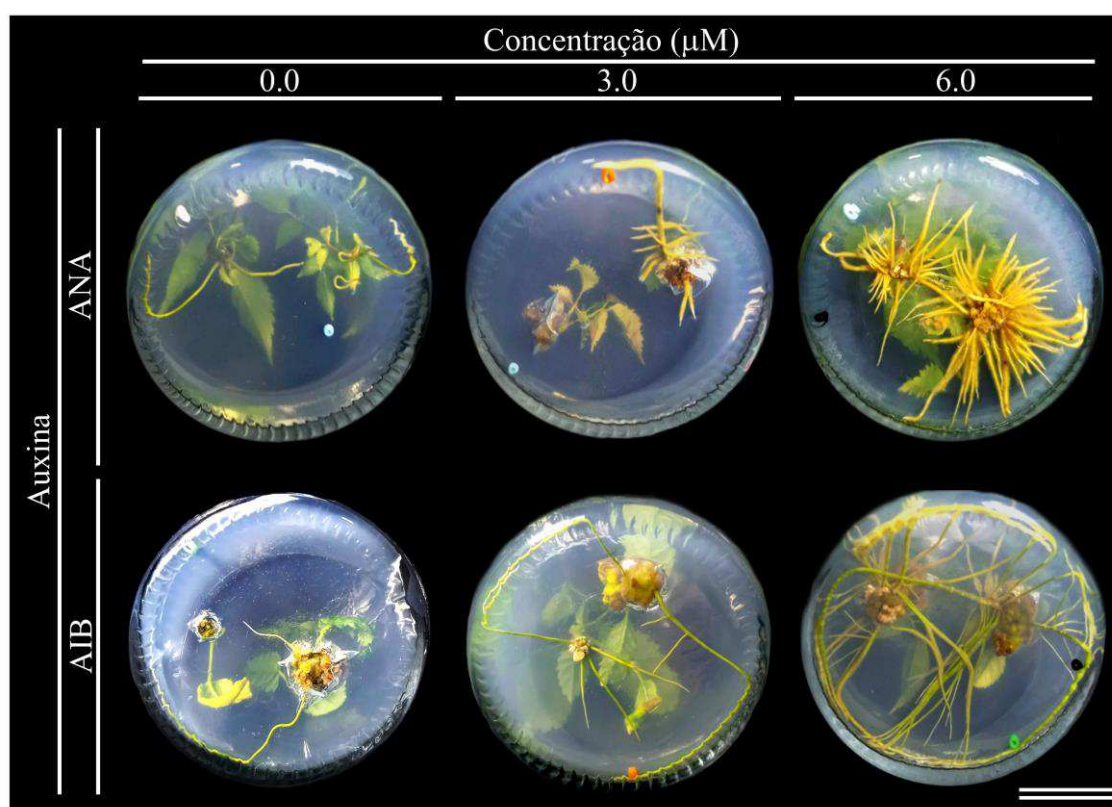


Figura 6. Rizogênese de plântulas de *Handroanthus impetiginosus* com 40 dias de cultivo *in vitro*, sob tipos de auxinas (ANA e AIB) e concentrações (0, 3 e 6 μM). Barra de escala: 2 cm.

Para as variáveis número de raízes (NR) e massa seca de raízes (MSR) houve interação entre o tipo e concentração do regulador, nas quais a auxina ANA com 3 e 6 μM foi superior ao AIB. O NR aumentou com maiores doses de ANA na concentração de 6 μM , com aproximadamente 4 vezes mais raízes em comparação com as plantas submetidas à mesma concentração de AIB (Figura 7A). Resultados semelhantes foram obtidos para a massa seca das raízes, com maior acúmulo de biomassa radicular em 3 e 6

μM de ANA (Figura 7E). Por outro lado, o comprimento da maior raiz (CR) foi superior nas plantas do tratamento com 6 μM de AIB, em comparação às plantas na mesma concentração com ANA (Figura 7B). O DR não apresentou diferença significativamente para nenhum dos tratamentos (Figura 7C).

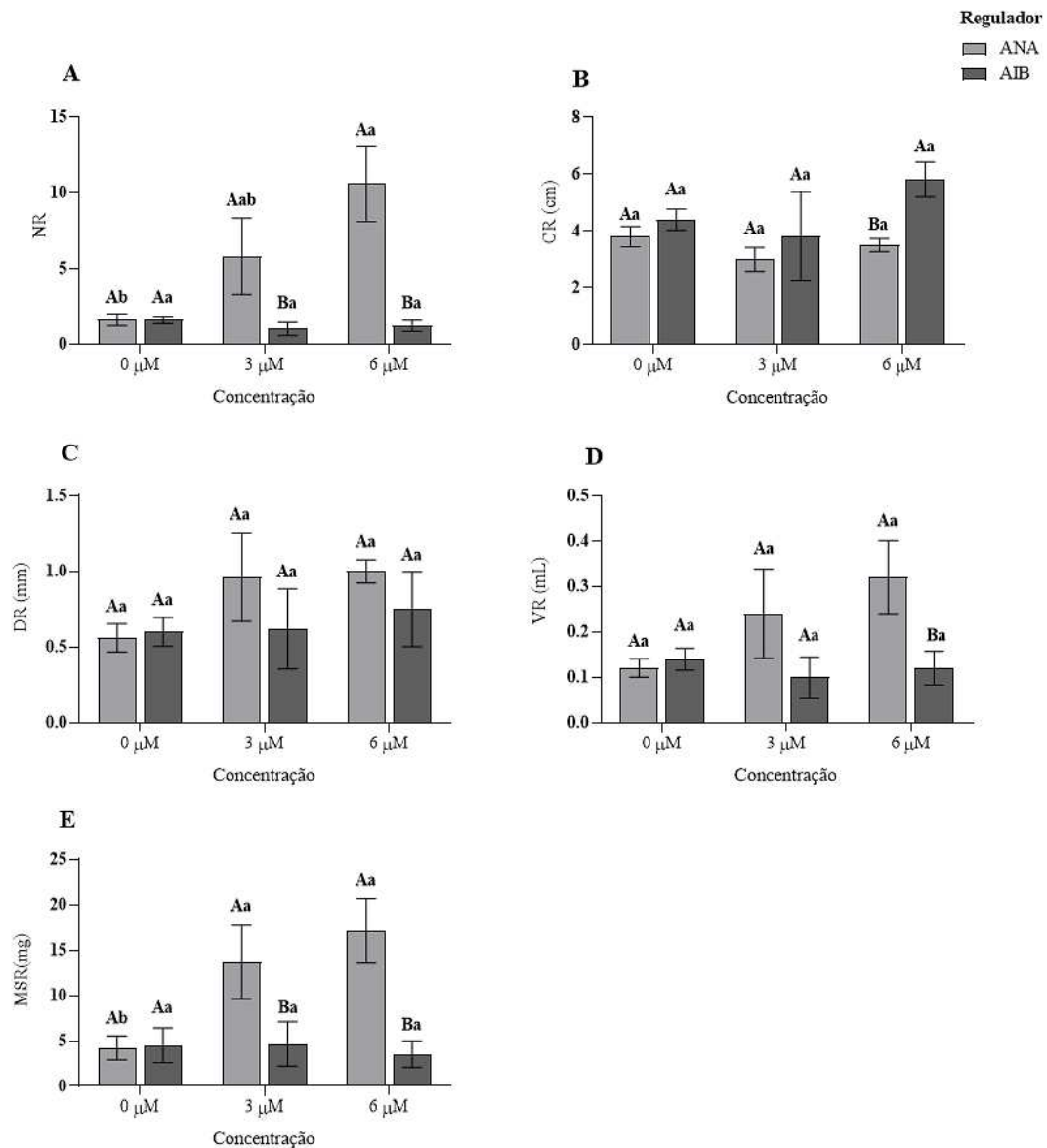


Figura 7. Parâmetros de crescimento radicular em plântulas de *Handroanthus impetiginosus*, com 40 dias de cultivo *in vitro*, sob influência de tipos de auxinas (ANA e AIB) e concentrações (0, 3 e 6 μM). (A) número de ráizes; (B) comprimento da maior raiz; (C) diâmetro da maior raiz; (D) volume de raiz; (E) massa seca da raiz. Letras maiúsculas comparam os valores das variáveis quanto as citocininas, e as letras

minúsculas comparam as concentrações das citocininas (Teste Tukey; $p \leq 0,05$). As barras representam o erro padrão ($n=6$).

3.5 As auxinas não influenciam às variáveis de crescimento da parte aérea de plântulas de *Handroanthus impetiginosus* cultivado *in vitro*

O comprimento da parte aérea (CAP), o diâmetro do caule (DC), o número de folhas (NF), o número de folíolos (NFL) e a massa seca da parte aérea (MSPA) mantiveram-se estáveis independentemente da auxina e da concentração utilizada. Esses resultados demonstram que plantas de ipê roxo apresentam baixa sensibilidade quanto às auxinas testadas durante a fase do desenvolvimento *in vitro* (Figuras 8A-8E).

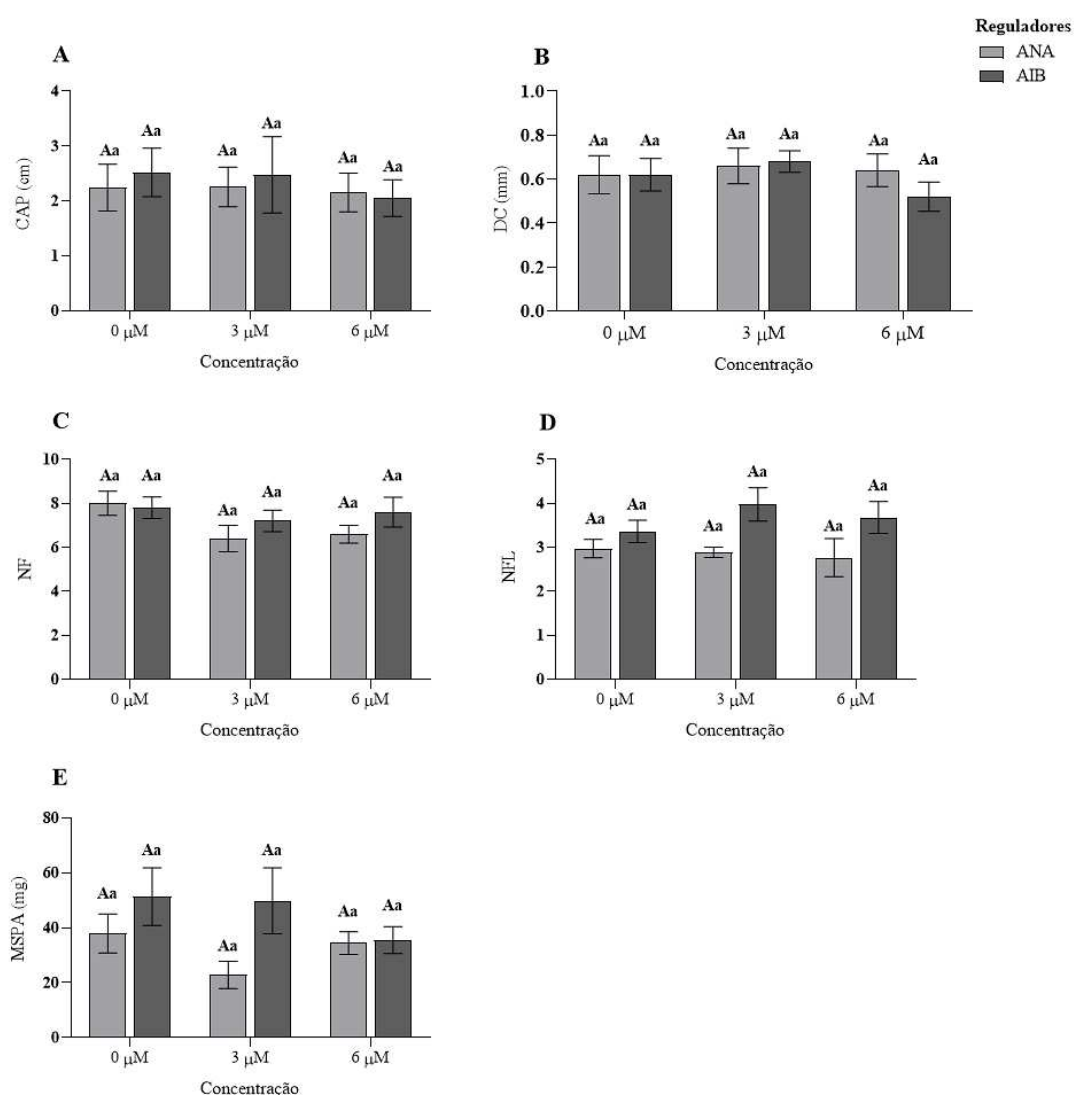


Figura 8. Parâmetros de crescimento da parte aérea em plântulas de *Handroanthus impetiginosus*, com 40 dias de cultivo *in vitro*, sob influência de tipos de auxinas (ANA e AIB) e concentrações (0, 3 e 6 µM). (A) comprimento da parte aérea; (B) diâmetro do caule; (C) número de folhas; (D) número de folíolos; (E) massa seca da parte aérea. Letras maiúsculas comparam os valores das variáveis quanto as citocininas, e as

letras minúsculas comparam as concentrações das citocininas (Teste Tukey; $p \leq 0,05$). As barras representam o erro padrão ($n=6$).

4 DISCUSSÃO

4.1 A citocinina *m*-TP modula os parâmetros de crescimento de plântulas *Handroanthus impetiginosus* cultivado *in vitro*

A morfogênese bem como a formação de multibrotações de plântulas de *H. impetiginosus* cultivadas *in vitro* são influenciadas pelo tipo e concentração de citocininas utilizadas. Após 45 dias de cultivo, observou-se que as plântulas de ipê responderam distintamente aos tratamentos com BAP e *m*-TP.

Nos meios com BAP, houve maior frequência de brotações múltiplas, acompanhadas de alongamento moderado dos caules, o que confirma sua ação promotora de divisão celular e indução de gemas adventícias (Subramanian et al., 2025). No entanto, concentrações elevadas de BAP resultaram em formação de estruturas calosas e hipertrofias, o que comprometeu a diferenciação foliar e caulinar. Esse comportamento já foi relatado por outros autores, em que é mencionado que a citocinina BAP em doses elevadas induz a calogênese em detrimento da organogênese (Lalthafamkimi et al., 2021; Manokari et al., 2023; Bansal et al., 2023).

Já os explantes tratados com *m*-TP apresentaram brotações mais longas, folhas com melhor desenvolvimento e menor incidência de calos, o que indica uma regulação mais equilibrada entre multiplicação e diferenciação. A *m*-TP tem sido reconhecida como alternativa mais eficiente e menos tóxica que o BAP em diversos protocolos de micropropagação (Bansal et al., 2023; Tahseen et al., 2023; Chouhan et al., 2025). A *m*-TP favorece o desenvolvimento de estruturas morfológicamente completas e viáveis para aclimação (Naaz et al., 2019).

Estudos comparativos indicam que há superioridade na resposta das plantas multiplicadas com *m*-TP se comparada com BAP. Em *Ipomoea batatas*, por exemplo, alcançou-se 100% de indução de brotos com *m*-TP entre 3,11 e 16,58 mM, obtendo 7,26 brotos/explante; enquanto que com BAP houve 77,78% de brotações, o que equivale em média a 5,33 brotos/explante (Bansal et al., 2023). Resultados semelhantes foram obtidos em *Curcuma zedoaria*, onde *m*-TP promoveu maior número e velocidade de brotação que BAP (Subramanian et al., 2025), e em *Pogostemon cablin*, com 45 brotos/explante com $1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($4.16 \text{ } \mu\text{M}$) de *m*-TP (Lalthafamkimi et al., 2021).

A combinação entre citocininas também apresenta efeitos positivos, como relatado em *Chlorophytum borivillianum*, em que a associação de 8.28 μM de *m*-TP com 4.44 μM de BAP induziu a formação de 19,2 brotos por explante e 96,3% de regeneração (Karwasra et al., 2024). Em *Celastrus paniculatus*, a combinação ótima foi 5,0 μM BAP + 2,5 μM *m*-TP (Tahseen et al., 2023). Combinações de *m*-TP e auxinas, como o AIA em *Momordica balsamina*, gerou 44,2 brotos/explante, superando os 30,45 obtidos com BAP + AIA (Chouhan et al., 2025); em *Ceropegia juncea*, *m*-TP + ANA produziu 33 brotos após o 3º subcultivo, comparados a 25 brotos com BAP + ANA (Manokari et al., 2023). Embora no presente estudo não foram avaliadas combinações de citocininas com auxinas e também de citocininas, a *m*-TP teve maior influência sobre parâmetros de crescimento dos brotos de *H. impetiginosus*; assim, pesquisas posteriores podem ser realizadas para avaliar o efeito destes reguladores combinados.

Do ponto de vista fisiológico, a *m*-TP apresenta vantagens estruturais e metabólicas: sua rápida metabolização e translocação evitam acúmulo de resíduos tóxicos, ao contrário da BAP, cujos metabólitos frequentemente são inativos ou fitotóxicos (Bansal et al., 2023; Subramanian et al., 2025). Além disso, o grupo hidroxila da *m*-TP favorece a formação de conjugados reversíveis, conferindo maior controle endógeno da atividade hormonal (Karwasra et al., 2024).

Assim como observado neste estudo, plântulas tratadas com *m*-TP tendem a ser mais robustas, com menor incidência de hiperidricidade, necrose apical e senescência precoce (Tahseen et al., 2023; Karwasra et al., 2024). Portanto, embora a BAP seja eficiente na indução rápida de múltiplas gemas, sua eficácia é limitada por efeitos colaterais em altas doses. A *m*-TP, por sua vez, favorece a formação de plântulas morfolologicamente integradas e fisiologicamente estáveis.

Dessa forma, a escolha entre BAP e *m*-TP deve considerar os objetivos do protocolo: o BAP pode ser útil para indução inicial de brotações, desde que sua concentração seja cuidadosamente ajustada. Já a *m*-TP se destaca como regulador preferencial para obtenção de plântulas com maior qualidade morfológica e potencial de aclimação; com base nos resultados obtidos no presente estudo, a *m*-TP é uma citocinina promissora à ser utilizada em protocolos de micropropagação de ipê roxo, reduzindo a formação de tecidos hiperhídricos e de calo.

4.2 A citocinina *m*-TP altera os teores de pigmentos fotossintéticos de plântulas de ipê roxo em cultivo *in vitro*

As citocininas, como a BAP e a *m*-TP, regulam diversos processos fisiológicos, incluindo a maturação dos cloroplastos (Bassegio et al., 2017). Neste estudo, a análise dos pigmentos fotossintéticos demonstrou que o tipo e a concentração de citocinina influenciaram significativamente os teores de clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides e clorofila total em plântulas de *H. impetiginosus* após 45 dias de cultivo *in vitro*.

A adição de *m*-TP ao meio de cultura reduziu o acúmulo de pigmentos fotossintéticos em ipê roxo, sendo que o tratamento com 2,5 µM resultou em diminuição expressiva nos níveis desses pigmentos (Fig. 4A, 4B, 4D, 4E); possivelmente a *m*-TP induz desregulação hormonal que afeta a diferenciação dos cloroplastos ou compromete a integridade das estruturas foliares, reduzindo a biossíntese ou a estabilidade dos mesmos (Martins et al., 2023). A maior produção de pigmentos fotossintéticos nas plântulas submetidas a 5 µM de *m*-TP, em comparação com as de 2,5 µM, indica uma resposta não linear, provavelmente associada ao limiar de sensibilidade hormonal da espécie. Todavia, as plantas submetidas ao tratamento com BAP (2,5 ou 5 µM) apresentaram teores de pigmentos semelhantes ao controle, o que indica maior estabilidade fisiológica com esta citocinina. O BAP pode favorecer a diferenciação e expansão foliar, mantendo a funcionalidade dos cloroplastos e, consequentemente, a atividade fotossintética.

O efeito de citocininas como BAP e *m*-TP sobre a produção de pigmentos fotossintéticos depende da espécie vegetal, da concentração aplicada e da interação com outros componentes do meio de cultivo. Neste trabalho não houve diferença no conteúdo de clorofila *a* e *b* e clorofila e carotenoides totais ao comparar brotos de *H. impetiginosus* cultivados com *m*-TP e BAP.

Em contraste, o BAP reduziu em 18% o teor de clorofila *a* em brotos de *Quercus robur*, além de diminuir compostos fenólicos e a razão clorofila *a/b* em 6% (Martins et al., 2023). No presente estudo, entretanto, a razão clorofila *a/b* permaneceu estável entre os tratamentos (Fig. 4C), indicando que a síntese das duas formas de clorofila foi afetada de forma coordenada em *H. impetiginosus*.

A redução nos pigmentos observada nas plantas submetidas à *m*-TP a 2,5 µM pode comprometer o potencial fotossintético das plântulas, e consequentemente afetar de forma negativa tanto o cultivo *in vitro* quanto a aclimação. Em contrapartida, o desempenho consistente do BAP reforça sua viabilidade como regulador primário em

protocolos de multiplicação, ao favorecer não apenas a brotação, mas também a qualidade fisiológica das plântulas.

4.3 As Citocininas *m*-TP e BAP não alteram a fluorescência da clorofila de plântulas de *Handroanthus impetiginosus* em cultivo *in vitro*

A fluorescência da clorofila, reemissão de luz por moléculas excitadas de clorofila, é amplamente utilizada como ferramenta não destrutiva para avaliar a eficiência fotoquímica do fotossistema II (PSII) e detectar sinais precoces de estresse fisiológico em plantas (Roháček et al., 2008). Alterações nos parâmetros de fluorescência refletem o balanço entre os processos de captura de luz, conversão de energia e dissipação térmica, portanto, variáveis especialmente úteis para caracterizar respostas adaptativas em condições de cultivo *in vitro*.

No presente estudo, plântulas de *H. impetiginosus* mantidas em meio suplementado com diferentes concentrações de BAP ou *m*-TP não apresentaram diferenças significativas nos principais parâmetros de fluorescência da clorofila, como F_0 , F_v , F_m , F_v/F_m e PI, cujos valores permaneceram dentro da faixa fisiológica considerada ideal para PSII funcional ($F_v/F_m \approx 0,83$). No entanto, foi observada uma redução significativa em RC/ABS nas plântulas submetidas ao tratamento com 5 μM de *m*-TP, o que indica menor número de centros de reação ativos em relação à energia absorvida. Essa redução sugere um desacoplamento parcial entre a absorção de luz e o uso eficiente dessa energia no PSII, o que pode refletir um ajuste fino, ou uma resposta de contenção ao excesso de energia luminosa captada. Todavia, esse efeito não foi observado nos tratamentos com BAP, cujos valores de RC/ABS permaneceram estáveis.

Embora a redução de RC/ABS sob *m*-TP não tenha impactado diretamente a eficiência quântica máxima (F_v/F_m) ou o índice de performance (PI), pode ter ocorrido um estresse fisiológico leve e momentâneo, ainda que todas as condições de cultura estavam controladas, ou ainda, pode ter ocorrido uma reorganização do aparato fotossintético em resposta ao tipo de citocinina. Esse comportamento pode refletir a capacidade das plantas de ajustar a fotoproteção e o uso da energia luminosa de maneira específica ao regulador presente no meio.

Concentrações elevadas de BAP ($\geq 10 \mu\text{M}$) podem causar efeitos residuais negativos sobre o PSII, incluindo redução em F_m , F_v , F_v/F_m e PI(ABS), além de aumento em ABS/RC e DIO/RC, o que caracteriza desequilíbrio entre absorção e utilização de energia, aumento da dissipação térmica e possível inativação de centros de reação (Souza

et al., 2019; Martins et al., 2018). Embora esses efeitos não tenham sido detectados nas plântulas de *H. impetiginosus* neste estudo, devido às concentrações moderadas de BAP utilizadas, os dados ressaltam a importância de selecionar cuidadosamente o tipo e a dose da citocinina para preservar a funcionalidade fotossintética.

A *m*-TP, por sua vez, têm sido considerada uma alternativa promissora à BAP, com efeitos positivos sobre a multiplicação e menor ocorrência de anomalias como hiperidricidade e distúrbios no enraizamento (Kőszeghi et al., 2014; Souza et al., 2019). Contudo, estudos anteriores focaram em parâmetros morfofisiológicos e bioquímicos e não abordaram diretamente os efeitos da *m*-TP sobre a fluorescência da clorofila. A presente observação de alteração em RC/ABS associada à *m*-TP sugere que esta citocinina também pode modular sutilmente a estrutura funcional do PSII.

Em suma, os resultados indicam que, embora tanto BAP quanto *m*-TP não tenham comprometido a eficiência fotoquímica global das plântulas *in vitro* de *H. impetiginosus*, a *m*-TP em 5 µM reduziu a densidade de centros de reação ativos por unidade de energia absorvida. Isso reforça a necessidade de estudos adicionais sobre os efeitos fotofisiológicos da *m*-TP, ainda pouco relatados, sobretudo, considerando esta citocinina como uma alternativa ao BAP em protocolos de micropropagação.

4.4 Auxinas AIB e ANA influenciam na rizogênese de *Handroanthus impetiginosus* cultivado *in vitro*

As auxinas ANA e AIB são reguladores essenciais na indução de raízes adventícias em culturas *in vitro*, com efeitos variáveis conforme a espécie, concentração e fase de desenvolvimento. Neste estudo, ambas influenciaram significativamente a rizogênese em plântulas de *H. impetiginosus*, porém com respostas morfológicas distintas.

O tratamento com 6 µM de ANA promoveu o maior número de raízes nas plântulas de *H. impetiginosus* (Fig. 7A), mas com morfologia espessada e curta (Fig. 6). Estes resultados indicam uma intensa atividade mitótica, porém desorganizada, provavelmente induzida por excesso de auxina exógena. Resultados semelhantes foram observados por Zhang et al. (2025) no cultivo *in vitro* de segmentos caulinares de *Lycium barbarum*, onde o uso de ANA induziu calos espessos e raízes curtas. Essa resposta está associada à capacidade do ANA de estimular divisões celulares indiferenciadas, especialmente em altas concentrações, o que compromete a qualidade morfofuncional das raízes.

A massa seca e o volume radicular (Figs. 7D e 7E) também foram superiores nas plântulas dos tratamentos com ANA, que refletiu em intensa proliferação celular, no entanto, não houve necessariamente uma funcionalidade radicular adequada. Em experimentos com embriões de *Paeonia lactiflora*, Xin et al. (2025) também observaram que a adição de ANA induziu formação de raízes associadas a calogênese, principalmente quando aplicada em concentrações moderadas a altas, o que reforça o papel do ANA como indutor da fase inicial da rizogênese, mas limitante ao alongamento.

Por outro lado, o AIB na concentração de 6 μ M proporcionou plântulas com menor número de raízes, todavia estas foram significativamente mais longas (Fig. 7B), e morfologia mais organizada, o que indica uma diferenciação mais especializada e potencial funcional superior. A eficácia do AIB é atribuída à sua estabilidade e baixa taxa de degradação em meios de cultura, o que assegura sua ação prolongada. A importância da dose adequada foi destacada por Adiba et al. (2022), que demonstraram que a concentração de AIB é determinante para o tipo e qualidade da resposta radicular, portanto, doses elevadas inibidoras e doses intermediárias são promotoras da formação de raízes bem desenvolvidas.

O efeito do AIB na formação de raízes pode estar ligado ainda a modulação dos fitormônios endógenos. Yuan et al. (2025) evidenciaram essa dinâmica ao mostrar que a aplicação de AIB eleva os níveis internos de AIA durante a indução e reduz esses níveis nas fases de diferenciação, e evita a calogênese excessiva. A ausência de calos e a presença de raízes longas e finas observadas neste estudo corroboram esse comportamento.

No geral, os resultados indicam que o AIB promove um sistema radicular mais funcional, portanto adequado para o posterior crescimento das plantas na fase *ex vitro*, enquanto o ANA, embora potente na indução, gera estruturas espessadas e curtas, que são características desfavoráveis para a aclimação.

O balanço entre auxinas e citocininas também deve ser considerado, visto que a formação de calo e o tipo de organogênese dependem diretamente dessa relação. Concentrações elevadas de auxinas, como ANA, tendem a favorecer calogênese, especialmente quando não há regulação exógena de citocininas (Zhang et al., 2025; Yuan et al., 2025). Assim, o AIB se destaca como a auxina mais adequada para protocolos de enraizamento de plântulas de ipê roxo, com menor risco de formação de estruturas desorganizadas.

Em síntese, os resultados demonstram que o ANA, em alta concentração, estimula fortemente a proliferação de estruturas radiculares, mas com perda de organização, enquanto o AIB favorece a formação de raízes mais longas, delgadas e potencialmente mais funcionais. Ambas as auxinas apresentam potencial para a propagação *in vitro* de *H. impetiginosus*, mas o AIB se mostra mais promissor para a produção de mudas com sistemas radiculares morfológicamente saudáveis para aclimação das plantas.

4.5 As auxinas não influenciam às variáveis de crescimento da parte aérea de plântulas de *Handroanthus impetiginosus* cultivado *in vitro*

De modo geral, auxinas como AIB e ANA são amplamente estudadas por seu papel na indução de raízes e formação de calos em cultivo *in vitro* (El-Banna et al., 2023; Kumar et al., 2024; Xin et al., 2025; Zhang et al., 2025). No entanto, estudos também relatam efeitos sobre o crescimento da parte aérea.

A ação do AIB nos brotos pode ser uma resposta genótipo-dependente. Em romãzeiras, concentrações elevadas de AIB (~15 mM) aumentaram o comprimento dos brotos em alguns cultivares, mas tiveram efeito inibitório em outros (Adiba et al., 2022). Além disso, compostos com atividade auxínica ou sinérgica, como óleos essenciais de alecrim e tomilho, também demonstraram estimular a emissão de brotos axilares. Em morangueiro, o uso de óleo essencial de alecrim (REO), que é análogo a ação de hormônios como AIB e citocinina, induziu de 3 a 5 brotos axilares por explante (Chaouch et al., 2025).

Em *Paeonia lactiflora*, o AIB é comumente utilizado para indução radicular, mas sua combinação (9,8 µM de AIB) com carvão ativado promoveu plântulas mais vigorosas e com folhas alongadas; enquanto concentrações menores (2,5 e 4,9 µM) resultaram em crescimento débil, folhas amareladas e enroladas (Xin et al., 2025). Hossain et al. (2016) também observaram efeitos sinérgicos na indução de folhas a partir de explantes foliares, utilizando AIB (4,9 - 17,2 µM), contudo, em combinação com BAP (4,4 - 8,9 µM). Estes estudos sugerem que, ao favorecer o desenvolvimento radicular, uma concentração adequada de AIB pode repercutir positivamente no crescimento da parte aérea.

Já o ANA, embora comumente associado à formação de calos (Xin et al., 2025; Zhang et al., 2025), tem sido utilizado em protocolos de regeneração de brotos adventícios (Chen et al., 2024; Zhang et al., 2025) e no desenvolvimento de plântulas. Em *Lycium barbarum*, a combinação de BAP (0,44 µM) e ANA (0,27 µM) aumentou

significativamente a emissão de brotos (Zhang et al., 2025). Em *Paeonia lactiflora*, a associação de BAP, ANA e GA₃ elevou as taxas de germinação e formação de plântulas (Xin et al., 2025). Concentrações mais baixas de auxinas favorecem a diferenciação radicular, enquanto níveis mais altos de citocininas promovem a formação de brotos. O ANA, por sua vez, desempenha papel chave tanto na formação de calos, quanto no desenvolvimento radicular (Zhang et al., 2025).

No presente estudo foi observado que as auxinas ANA e AIB nas concentrações de 0, 3 e 6 µM não alteraram significativamente os parâmetros de crescimento: comprimento da parte aérea (Figura 8A), diâmetro do caule (Figura 8B), número de folhas (Figura 8C), número de folíolos (Figura. 8D) e massa seca da parte aérea (Figura 8E) de plântulas de *H. impetiginosus* após 40 dias de cultivo *in vitro*. O padrão de crescimento apresentado pelas plantas nas condições testadas sugere uma baixa sensibilidade às auxinas exógenas nessa fase inicial; possivelmente devido à predominância da regulação endógena ou à priorização do crescimento radicular, que respondeu de maneira mais evidente aos reguladores aplicados. Estes resultados também indicam que as auxinas utilizadas não comprometem o crescimento da parte aérea.

Do ponto de vista morfofisiológico, esses resultados demonstram que a aplicação exógena de auxinas não constitui um fator limitante para o desenvolvimento da parte aérea de *H. impetiginosus* nesta etapa da micropropagação, o que reduz a necessidade de ajustes hormonais complexos nesse estágio.

5 CONCLUSÕES

A *m*-TP é uma citocinina que proporcionou plântulas para protocolos de micropropagação de *H. impetiginosus* com folhas bem formadas, menor incidência de calos e maior estabilidade fisiológica. A citocinina BAP favoreceu múltiplas brotações, induziu calogênese em maior quantidade e plântulas hiperidricas e clorosas quando em concentrações elevadas, que comprometeu o desenvolvimento integral da parte aérea.

O AIB é a auxina mais indicada para a fase de formação de sistema radicular funcional em protocolo de micropropagação de *H. impetiginosus*. A rizogênese das plântulas de *H. impetiginosus* foi modulada pelas auxinas testadas, o AIB promoveu a formação de raízes longas e bem estruturadas. A auxina ANA, embora tenha induzido maior número de raízes e massa radicular, resultou em estruturas espessas e curtas, frequentemente associadas à calogênese, o que pode comprometer a funcionalidade e a sobrevivência das plantas em condições *ex vitro*.

Em protocolos de micropropagação do *H. impetiginosus* recomenda-se o uso de *m*-TP como citocinina principal nas etapas de indução e multiplicação de brotações, e o AIB quando em concentrações moderadas, como uma auxina promissora para formação de raízes, tal combinação favorece a obtenção de plântulas morfológicamente completas, fisiologicamente estáveis e provavelmente com maior potencial de sobrevivência na fase de aclimação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADIBA, A. et al. (2022). Evaluation of cuttings ability of eighteen pomegranate cultivars from an *ex-situ* collection under influence of stem age and IBA treatment. **Scientia Horticulturae**, v.304, 111281. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111281>
- BANSAL, S. et al. (2023). Meta-topolin enhanced *in vitro* propagation and genetic integrity assessment in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). **South African Journal of Botany**, v.157, p.27-36. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.03.047>
- BASSEGIO, C. et al. (2017). Desenvolvimento de ipê-roxo em meios de cultura e concentrações de BAP (6-benzilaminopurina) durante a etapa de multiplicação *in vitro*. *Acta Iguazu*, v.6, n.1, p.72-80. <https://doi.org/10.48075/actaiguazu.v6i1.16878>
- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R. et al. (1989). Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology*, v.3, n.4, p.497–514.
- BOTELHO, L.S.; MORAES, M.H.D.; MENTEN, J.O.M. 2008. Fungos associados às sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*): incidência, efeito na germinação e transmissão para as plântulas. *Summa Phytopathologica, Botucatu*, v.34, n.4, p.343-348. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052008000400008>
- CASTELLANI, E.D. et al. (1996). Influência do tratamento químico na população de fungos e na germinação de sementes de *Bauhinia variegata* L. var *variegata*. *Revista Brasileira de Sementes, Brasília*, v.18, n.1, p.41-44.
- CHAOUCH, R. et al. (2025). Auxin-like potential of essential oils in strawberry micropropagation: A sustainable approach to root induction and photosynthetic performance. *South African Journal of Botany*, v.177, p.352-362. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.12.025>
- CHEN, X. et al. (2025). An integrate methods to improve the high efficiency of embryo rescue breeding in seedless grapes. *Journal of Integrative Agriculture*. ISSN 2095-3119. <https://doi.org/10.1016/j.jia.2025.02.042>
- CHOUHAN, R. et al. (2025). *Meta*-topolin mediated enhanced micropropagation, foliar-micromorphological evaluation and genetic homogeneity validation in African pumpkin (*Momordica balsamina* L.). *South African Journal of Botany*, v.180, p.286-296. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2025.03.005>
- COSSA, M. C. V. et al. (2024). Impact of ventilation system with sucrose doses and wavelength on biomass production and arbutin content in *Origanum majorana* L. plantlets. **Scientia Horticulturae**, v.337, 113498.. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2024.113498>

CRUZ, C.D. (2016). Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v.38, n.4, p.547-552. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v38i4.32629>

CUTTER, E. G. (1986). Anatomia Vegetal. Parte 1. Células e Tecidos. São Paulo, Tradução Roca, 2ªed., 304p.

DE OLIVEIRA, L. M. et al. (2008). Efeitos de citocininas sobre a anatomia foliar e o crescimento de *Annona glabra* L. durante. *Ciência Rural*, v.38, n.5, p.1447-1451.

DE SOUZA, L.M. et al. (2019). Use of *meta*-Topolin, an unconventional cytokinin in the *in vitro* multiplication of *Opuntia stricta* Haw. *Biotecnología Vegetal*, v.19, n.2, p.85-96. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2074-86472019000200085&lng=en&nrm=iso&tlng=en

DUARTE, E. R. et al. (2014). Efecto de la testa sobre la germinación de semillas de *Handroanthus heptaphyllus* tras distintos tiempos de almacenamiento. *Ciencias Agronómicas* - Revista XXIV, v.14, p.029-035.

EL-BANNA, M. F. et al. (2023). Exogenous IBA stimulated adventitious root formation of *Zanthoxylum beecheyanum* K. Koch stem cutting: Histo-physiological and phytohormonal investigation. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.197, 10763. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107639>

EL-BANNA, M. F. et al. (2024). Bee honey improved the performance of indole-3-butyric acid on promoting adventitious roots formation of *Cupressus macrocarpa* L. var. Goldcrest: Morpho-biochemical and histoanatomical investigation. *Industrial Crops and Products*, v.209, 117971. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117971>

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- EMBRAPA. (2019). Cientistas desenvolvem análise de DNA capaz de ajudar na conservação do ipê-roxo. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/41718843/cientistas-desenvolvem-analise-de-dna-capaz-de-ajudar-na-conservacao-do-ipe-roxo?link=agencia>. Acesso em: 17 de jun. de 2024.

FELIPE, S.H.S. et al. (2019). Accessions of Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata*) with contrasting anthocyanin content behave differently in growth, antioxidative defense, and 20-hydroxyecdysone levels under UV-B radiation. *Protoplasma*, v.256, n.6, p.1557-1571. Doi: 10.1007/s00709-019-01400-3

FORTINI, E.A. et al. (2021). Gas exchange rates and sucrose concentrations affect plant growth and production of flavonoids in *Vernonia condensata* grown *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.144, n.3, p.593-605. DOI:10.1007/s11240-020-01981-5

- HENRIQUE, A. et al. (2006). Effect of plant growth regulators in the rooting of *Pinus cuttings*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, n.2, p.189-196. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132006000300002>
- HOELL, S. H.; LALL, S.; CHE, P. (2003). Cytokinins and shoot development. **Trends in plant science**, v.8, n.9, p.453-459. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00191-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00191-2)
- HOSSAIN, A. S. et al. (2015). Callus cell proliferation from broccoli leaf slice using IBA and BAP *in vitro* culture: Its biochemical and antioxidant properties. **Data in brief**, v.6, p.214-215. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2015.11.061>
- JOHANSEN, D.A. (1940). Plant Microtechnique. New York: McGraw-Hill Book Company, Inc.
- KARWASRA, R.K.; NAZIR, R. & PANDEY, D.K. (2024). *Meta*-topolin mediated improved micropropagation, phytochemical profiling, and assessment of genetic fidelity in *Chlorophytum borivilianum* Sant. et Fernand., an endangered medicinal herb. **Industrial Crops and Products**, v.214, 118463. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.118463>
- KÖSZEGHI, S. et al. (2014). Comparing the effects of benzyladenine and *meta*-topolin on sweet basil (*Ocimum basilicum*) micropropagation. **Notulae Scientia Biologicae**, v.6, n.4, p.422-427. <https://doi.org/10.1583/nsb649464>
- KUMAR, A., NAGAR, P.K., & PALNI, L.M.S. (2024). The role of indole-3-butyric acid and polyamines on *in vitro* rooting of microshoots of *Rosa damascena* Mill. and *Gladiolus hybridus* Hort. **South African Journal of Botany**, v.172, p.1-7. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.07.018>
- LALTHAFAMKIMI, L. et al. (2021). Direct organogenesis mediated improvised mass propagation of *Pogostemon cablin*: A natural reserve of pharmaceutical biomolecules. **South African Journal of Botany**, v.140, p.375-384. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.08.018>
- LOPES, J.C. et al. (1991). Associação entre germinação, vigor e sanidade em sementes de milho precoce e normal, produzidos na área experimental do Centro Agropecuário da UFES. In: Congresso Brasileiro De Sementes, 7, Campo Grande. Informativo ABRATES, Brasília, v.1, n.4, p.55. (Resumos).
- LIU, Y. et al. (2020). Research Progress on the Roles of Cytokinin in Plant Response to Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, 6574. [Doi:10.3390/ijms21186574](https://doi.org/10.3390/ijms21186574)
- MANOKARI, M. et al. (2023). *In vitro* micro-morphometric growth modulations induced by N6 cytokinins (*meta*-topolin and 6-benzylaminopurine) in *Ceropegia juncea* Roxb.—a rare medicinal climber. **South African Journal of Botany**, v.157, p.656-666. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.04.045>

- MARTINS, J.P.R. et al. (2018). Effects of 6-benzylaminopurine on photosystem II functionality and leaf anatomy of *in vitro* cultivated *Aechmea blanchetiana*. **Biologia Plantarum**, v.62, p.793-800. <https://doi.org/10.1007/s10535-018-0822-3>
- MARTINS, J.P.R. et al. (2023). Calcium silicate mitigates the physiological stress induced by 6-benzylaminopurine during the *in vitro* multiplication of *Quercus robur*. **Industrial Crops and Products**, v.194, 116377. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116377>
- MÁXIMO, W.P.F. et al. (2020). Multiplication and *in vitro* rooting of *Handroanthus impetiginosus* (Mart. Ex DC.) Mattos. *Ciência Florestal*, v.30, n.3, p.658-668. DOI: <https://doi.org/10.5902/1980509827012>
- NAAZ, A. et al. (2019). Meta-topolin improved micropropagation in *Syzygium cumini* and acclimatization to ex vitro conditions. **Biologia Plantarum**, v. 63, p.174–182. DOI 10.32615/bp.2019.020
- OLIVEIRA, T.P.DE.F. (2016.) Aplicação de AIB e tipo de miniestacas na produção de mudas de *Handroanthus heptaphyllus* mattos. **Ciência Florestal**, v.26, n.1, p.313-320.
- PARISI, J.J.D. et al. (2019). Patologia de sementes florestais: danos, detecção e controle, uma revisão. **Summa Phytopathol**, v. 45, n. 2, p. 129-133. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/188545>
- PROFLORA. (2023). *Handroanthus impetiginosus* (Mart. Ex DC.) Mattos- Detalhes da espécie. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Acesso em: 06 de julho de 2024. Disponível em: <https://proflora.jbrj.gov.br>.
- PUSCAN, R.; CASTRO, E. R. V.; CHANAMÉ, C. E. M. (2024). Combined effect of cytokinins on the *in vitro* propagation of three strawberry cultivars. **Revista Caatinga**, v.37, e12180. <https://doi.org/10.1590/1983-21252024v3712180rc>
- RÍOS-RÍOS, A.M. (2019). Micropropagation of *Piper crassinervium*: an improved protocol for faster growth and augmented production of phenolic compounds. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.137, n.3, p.495-509. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01585-8>
- ROHÁČEK, K.; SOUKUPOVÁ, J.; & BARTÁK, M. (2008). Chlorophyll fluorescence: a wonderful tool to study plant physiology and plant stress. *Plant Cell Compartments-Selected Topics*. **Research Signpost**, Kerala, India, p.41-104. https://www.researchgate.net/publication/285891590_Chlorophyll_fluorescence_A_wonderful_tool_to_study_plant_physiology_and_plant_stress
- SALDANHA, C.W. et al. (2012). A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.110, p.413–422. DOI:10.1007/s11240-012-0162-5

SALES, N.L. (1992). Efeito da população fúngica e do tratamento químico no desempenho de sementes de ipê-amarelo, ipê-roxo e barbatimão. 1992. 89p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal de Lavras, Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.

SANTOS, R.P. et al. (2008). Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. **Revista Ceres**, v.55, p.356–364.

SEGATTO, F.B. et al. (2004). Técnica para o estudo da anatomia da epiderme foliar de batata. **Revista Ciência Rural**, v.34, n.5, p1597-1601. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782004000500042>

SEVIK, H.; GUNEY, K. (2013). Effects of IAA, IBA, NAA, and GA₃ on rooting and morphological features of *Melissa officinalis* L. stem cuttings. **Scientific World Journal**, v.2013, 09507. Doi: 10.1155/2013/909507

SOUZA, L.M. et al. (2019). *Meta*-topolin: an alternative for the prevention of oxidative stress in sugarcane micropropagation. **Hoehnea**, v.46, e1072018. <http://dx.doi.org/10.1590/2236-8906-107/2018>

SUBRAMANIAN, M. et al. (2025). Micropropagation of white turmeric (*Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe) and establishment of adventitious root culture for the production of phytochemicals. *Industrial Crops and Products*, v.223, 120101. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.120101>

SCHNEIDER, C.A.; RASBAND, W.S.; ELICEIRI, K.W. (2012). NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat Methods**, v.9, p.671–675. DOI: 10.1038/nmeth.2089

TAHSEEN, S.; SHAHZAD, A. & WASI, A. (2023). Direct organogenesis, physiochemical evaluation, chemical characterization and genetic uniformity analysis through SCoT marker in *Celastrus paniculatus* (Willd.): A medicinally important plant. **Industrial Crops and Products**, v.206, 117664. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117664>

XIN, R. et al. (2025). Optimization strategy for establishing an efficient mature embryo reproduction system of *Paeonia lactiflora* Pall. **Scientia Horticulturae**, v.340, 113952. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2025.113952>

YUAN, J. et al. (2025). Effects of plant growth regulators and endogenous phytohormone profiles on the rooting of tissue culture raised shoots of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). **Scientia Horticulturae**, v.339, 113917. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2024.113917>

WELLBURN, A.R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v.144, n.3, p.307–313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)

ZHANG, X. et al. (2025). Establishment of an efficient regeneration system for *Lycium barbarum*. **Industrial Crops and Products**, 226, 120698.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2025.120698>

CAPÍTULO III

Modulação de respostas de crescimento, fisiológicas e anatômicas pelo elevado CO₂ e suplementação de sacarose no cultivo *in vitro* de *Handroanthus impetiginosus*

RESUMO

No cultivo *in vitro* de plantas, fontes de carbono como a sacarose, assim como a ventilação associada a níveis elevados de CO₂, podem influenciar a taxa fotossintética, o padrão estomático e as características de crescimento. Todavia, esses efeitos ainda são pouco conhecidos em espécies lenhosas, como em *Handroanthus impetiginosus*. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar características morfológicas, fisiológicas e anatômicas em plântulas de *H. impetiginosus* sob influência de CO₂ elevado e dosagens de sacarose. Segmentos de caule provindos de um banco de plantas multiplicadas foram inoculados em meio WPMsuplementados com sacarose (0, 10, 20 g L⁻¹) e *m*-TP 5 µM, posteriormente, foram acondicionados em duas câmaras climáticas com concentração ambiente de CO₂ (420 ± 30 µmol mol⁻¹) e com concentração elevada de CO₂ (800 ± 30 µmol mol⁻¹). O tratamento com 10 g L⁻¹ de sacarose + 800 µmol mol⁻¹ de CO₂ maximizou o crescimento das plântulas e foi superior para a taxa fotossintética líquida, a eficiência de carboxilação e a eficiência intrínseca do uso da água, no entanto, reduziu a razão da clorofila *a/b*, durante o cultivo *in vitro* de *H. impetiginosus*. Para as variáveis de anatomia, o tratamento com 20 g L⁻¹ de sacarose + 800 µmol mol⁻¹ reduziu os parênquimas do caule e o parênquima esponjoso do tecido foliar, mas aumentou o índice e densidade estomática, bem como a epiderme abaxial de *H. impetiginosus*. Portanto, nossos resultados mostram que a interação entre fonte de carbono como a sacarose e CO₂ atmosférico são fatores-chave na micropropagação dessa espécie; que demonstrou plasticidade anatômica diante de ambientes com elevada concentração de CO₂.

Palavras-chave: Fontes de carbono, cultura de tecidos, espécie lenhosa, fotoautotrófico, fotomixotrófico.

1 INTRODUÇÃO

O dióxido de carbono (CO₂) desempenha um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento das plantas, especialmente em espécies lenhosas, onde atua como substrato primário para a fotossíntese (Fu et al., 2024). A exposição de plantas lenhosas a níveis elevados de CO₂ tem promovido reduções na condutância estomática e na taxa de transpiração, ao mesmo tempo em que aumenta a taxa fotossintética e a eficiência do uso da água (Bhargava; Mishra, 2022). O CO₂ elevado no cultivo *in vitro* melhora a fotossíntese, o acúmulo de biomassa seca, a composição da parede celular, bem como respostas a nível molecular e produção de metabólitos secundários (Louback et al., 2021; Fu et al., 2024; Lobo et al., 2022; Roy; Mathur 2024).

Embora diversos estudos tenham demonstrado os efeitos positivos do enriquecimento de CO₂ em condições *ex vitro* (Watanabe et al., 2008; Eberhardt et al., 2015; Quick et al., 2025), há escassez de pesquisas que avaliem seu impacto em combinação com diferentes fontes de carbono exógenas no cultivo *in vitro* de espécies arbóreas. Outro fator que precisa ser elucidado, sobretudo na propagação *in vitro* de espécies arbóreas, é a substituição ou redução substancialmente da sacarose, especialmente aliada à ventilação e níveis elevados de CO₂; pois isso pode favorecer o aumento da taxa fotossintética, melhorar o padrão estomático e diminuir os custos e o risco de contaminação do meio basal (Wu et al., 2018; Ashrafzadeh; Leung 2021), contudo, tais respostas podem variar de acordo com a espécie trabalhada. Uma arbórea de relevante importância econômica e ameaçada de extinção (Iucn, 2022) é o o ipê-roxo (*H. impetiginosus*), no entanto, não há pesquisas que abordem tanto a propagação *in vitro* em condições de elevado CO₂, quanto a alteração da concentração da sacarose nas condições de cultivo.

O ipê roxo é uma planta que apresenta germinação de sementes cerca de 7-14 dias (Ferreira et al., 2020), o que facilita o estabelecimento de explantes uniformes para estudos *in vitro*. Essa característica, combinada à sua robustez como lenhosa pan-neotropical, torna-o um modelo valioso para investigar a redução de sacarose e o enriquecimento de CO₂ em protocolos de micropropagação avançados. Além disso, o ipê roxo pode ser uma espécie promissora para o estudo de plasticidade fenotípica de árvores diante de mudanças climáticas. Assim, o ipê-roxo pode oferecer um sistema funcionalmente representativo para otimizar metodologias fotoautotróficas em espécies arbóreas.

Dessa forma, observa-se uma lacuna científica relevante quanto à compreensão dos efeitos do CO₂ elevado, isoladamente ou em combinação com a sacarose, no desenvolvimento *in vitro* de espécies arbóreas. Investigar essa interação no cultivo de ipê roxo pode contribuir para a otimização dos protocolos de micropropagação e para o avanço de sistemas inteligentes na produção de mudas florestais. Este trabalho teve como objetivo avaliar características morfológicas, fisiológicas e anatômicas em plântulas de ipê roxo (*H. impetiginosus*) sob influência de CO₂ elevado e dosagens de sacarose.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Plântulas de *Handroanthus impetiginosus* cultivadas em câmaras enriquecidas com CO₂

Segmentos de caule (1,5 cm de comprimento), com uma folha inteira e um meristema axilar pré-existente foram retirados de plântulas de *Handroanthus impetiginosus* mantidas sob condições fotomixotróficas e inoculados em meio de cultura constituído por WPM com vitaminas e mio-inositol (100 mg L⁻¹) (McCown's Woody Plant; Lloyd; McCown 1981) (L449, Phytotechnology Laboratories®, Kansas, United States) suplementado com sacarose (0, 10 e 20 g L⁻¹), ágar bacteriológico (5,5 g L⁻¹) (Dinâmica, Brasil) e *m*-TP 5 µM. O pH do meio foi ajustado a 5.80 ± 0.03 antes da autoclavagem a 121 °C e 108 kPa durante 15 min. Os frascos foram vedados com tampas de polipropileno com dois orifícios de 10 mm de diâmetro cobertos com membranas elaboradas segundo a metodologia de Saldanha et al. (2012).

O material vegetal foi acondicionado em duas câmaras climáticas (Tecnal®, TE-4002/3) com concentração ambiente de CO₂ ($420 \pm 30 \mu\text{mol mol}^{-1}$) e com concentração elevada de CO₂ ($800 \pm 30 \mu\text{mol mol}^{-1}$), por 35 dias de cultivo. Ambas as câmaras apresentavam renovação forçada de ar, mantidas em $25 \pm 2^\circ \text{C}$ sob irradiância de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 60% de umidade e fotoperíodo de 16 h.

2.2 Avaliação de parâmetros morfofisiológicos e anatômicos de plântulas de *Handroanthus impetiginosus* obtidas sob enriquecimento com CO₂

2.2.1 Parâmetros de crescimento

Foram avaliadas as variáveis morfológicas: comprimento da parte aérea (CAP), diâmetro do caule (DC), número de folhas (NF), número de folíolos total por planta (NFL), número de nós (NN), número de brotos (NB), massa seca da parte aérea (MSPA) e área foliar (AF). Para a área foliar foram feitas fotografias, capturadas com câmera digital, das folhas individuais fixadas sobre papel milimetrado branco, as imagens foram analisadas com o software ImageJ 1.49v (Schneider et al., 2012).

A massa da matéria seca foi obtida após secagem do material vegetal (acondicionado em sacos de papel Kraft) em estufa de circulação de ar forçado (Ambikontrol®, Novus, n1030) a 45 °C durante 72 h, até obtenção de massa constante.

2.2.2 Determinação dos pigmentos fotossintéticos

Para quantificação da clorofila *a* ($\mu\text{g cm}^{-2}$), clorofila *b* ($\mu\text{g cm}^{-2}$), carotenoides ($\mu\text{g cm}^{-2}$), clorofila *a/b* e clorofila total ($\mu\text{g cm}^{-2}$) foram extraídos três discos foliares de 3 mm de diâmetro da terceira folha totalmente expandida, contada a partir do ápice e, evitando as nervuras, para as folhas com mais de um folíolo foi selecionado o folíolo central. As amostras foram imersas em 3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO, Isofar® Ltd.a, Duque de Caxias, RJ, Brasil) e mantidas no escuro por 48 h (Santos et al., 2008). A absorbância dos extratos foi determinada a 665 nm, 649 nm e 480 nm, com o auxílio de um espectrofotômetro UV-visível (mono-feixe) (UV-M51; BEL Engineering Company, Monza, Itália) em cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico. A quantidade de pigmentos fotossintéticos foi calculada como indicado por Wellburn (1994).

2.2.3 Determinação da fluorescência da clorofila

A fluorescência da clorofila foi determinada a partir da terceira folha totalmente expandida contada a partir do ápice (para as folhas com mais de um folíolo foi selecionado o folíolo central), utilizando um fluorímetro de luz não-modulado modelo Pocket PEA Chlorophyll Fluorimeter (Hansatech Instruments – King's Lynn, Norfolk); com o auxílio de pinça foi realizada a adaptação do tecido foliar ao escuro por 30 minutos, para que todos os centros de reação adquirissem a condição de abertos (Q_a oxidada) (Bòlhar-Nordenkamp et al, 1989).

Através do fluorímetro não modulado, foram obtidas as medidas de fluorescência inicial (F_0), fluorescência máxima (F_m), fluorescência variável (F_v) e o índice de performance (PI). A partir dos valores de F_v e F_m foi determinada a relação F_v/F_m (rendimento quântico máximo do fotossistema II) (Bòlhar-Nordenkamp et al., 1989). A indução da fluorescência foi feita por meio de um pulso de luz vermelha (650 nm) com duração de dois segundos com intensidade de 600 W m^{-2} (100% de intensidade), obtido por meio de seis LEDS (Light Emitting Diodes), localizados na sonda do aparelho.

2.2.4 Trocas gasosas

A quantificação das taxas de assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (g_s), concentração interna de CO_2 (C_i), taxa de transpiração (E), razão da concentração intercelular de CO_2 no ambiente (C_i/C_a), eficiência de carboxilação (A/C_i) e eficiência intrínseca de uso da água (A/g_s) foram realizadas utilizando-se um aparelho

analisador de gás infravermelho (IRGA; Li-Cor 6400), acoplado a uma câmara, com área de análises adaptada para 0,5 cm², que permite o controle de luz, temperatura e concentração de CO₂, na qual considerou-se primeira folha totalmente expandida de cada planta, a partir do ápice.

As avaliações foram feitas a partir de medidas pontuais sob intensidade luminosa de 450 μmol m⁻² s⁻¹ e temperatura de 28 ± 2°C, umidade relativa de 60 ± 5%, entre 9 e 12 horas (Cuzzuol 2003). A concentração de CO₂ dentro da câmara foi de 360 μmol mol⁻¹ ou de 720 μmol mol⁻¹, de acordo com o tratamento da planta em análise. As equações para calcular a taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*), a taxa de transpiração (*E*) e a condutância estomática seguem Caemmerer;Farquhar (1981). A eficiência do uso da água (EUA) foi calculada como a relação entre a taxa de assimilação líquida dividida pela taxa de transpiração (EUA = *A/gs*).

2.2.5 Análise de parâmetros anatômicos

Para estimar a densidade e o índice estomático, por meio da técnica de impressão da epiderme (Segatto et al., 2004), foi amostrada a epiderme da face abaxial do terceiro par de folhas totalmente expandidas contadas a partir do ápice. As impressões da epiderme foram realizadas com o auxílio de cola instantânea de alta resistência (SuperBonder®) e lâminas para microscopia. Os parâmetros foram calculados a partir da análise das imagens da impressão capturadas em microscópio de luz (B20T, Bioptika, Colombo, PR, Brasil) em objetiva 10X, com sistema U-photo, acoplado a uma câmera fotográfica digital (CMOS-5.0, Bioptika, Colombo, PR, Brasil) e computador com software Capture versão 2.1., medido com o ImageJ®. Em cada lâmina foram contados três campos de cada região da folha, na qual cada campo de visão tinha 0,45 mm². O índice estomático foi calculado conforme a fórmula de Cutter (1986), onde NE e CE representam, respectivamente, número de estômatos e número de células epidérmicas:

$$IE (\%) = \frac{NE \times 100}{CE + NE}$$

Para a densidade estomática foi usada a seguinte fórmula, em que, *N_{es}* e *A* representam, respectivamente, número de estômatos e área do campo visual (geralmente em mm² ou cm²):

$$DE = \frac{N_{est}}{A}$$

Para as avaliações micromorfométricas foram coletadas amostras da região mediana do terceiro par de folhas expandidas (contadas a partir do ápice) e do caule entre o segundo e terceiro entrenó para fixação em solução de FAA (Formalina: Ácido acético: Álcool etílico 50%, 1:1:18) (JOHANSEN, 1940). Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série etílica gradual 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% e 100% (v/v), por 1 hora em cada uma das soluções, e colocadas em resina acrílica (Historesin; Leica Instruments, Jena, Germany).

Os cortes anatômicos transversais de 6 µm de espessura foram obtidos a partir de um micrótomo rotativo semiautomático (MRP2015, Lupetec Tecnologia Aplicada, São Carlos, SP, Brasil). Posteriormente, os cortes foram corados com azul de toluidina (pH 3,2) (O'Brien; McCully, 1981). As imagens foram capturadas com o auxílio de um microscópio de luz (B20T, Bioptika, Colombo, PR, Brasil) com sistema U-photo, acoplado a uma câmera fotográfica digital (CMOS-5.0, Bioptika, Colombo, PR, Brasil), em objetiva de 10X e computador com software Capture versão 2.1.

As medições na folha (espessura da epiderme das faces adaxial e abaxial, espessura do parênquima paliçádico, espessura do parênquima esponjoso e espessura do feixe vascular da nervura central tv- transversal e lg- longitudinal) e no caule (espessura da epiderme, parênquima cortical, parênquima medular e feixe vascular) foram realizadas em três lâminas, cada uma com quatro cortes, em cada corte foram amostrados três campos para obter a média dos valores.

2.2.6 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial, constituído de duas concentrações de CO₂ [(A[CO₂]) 420 ± 30 µmol mol⁻¹ e (E[CO₂]) 800 ± 30 µmol mol⁻¹] e três dosagens de sacarose (0, 10 e 20 g L⁻¹). Para as variáveis de crescimento, pigmentos fotossintéticos e fluorescência da clorofila foram utilizadas 6 repetições com dois segmentos de caule por frasco, como unidade experimental. Para as trocas gasosas, índice e densidade estomática foram utilizadas 5 repetições, e para a micromorfometria foram 4 repetições.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando-se o teste F e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Para as variáveis de crescimento, pigmentos fotossintéticos, fluorescência da clorofila, trocas gasosas, índice e densidade estomática foi utilizado

programa Genes, versão 1990.2018.39 (CRUZ, 2016). Para a análise de micromorfometria da folha e do caule foi utilizado o programa R, versão 4.1.2 (R Development Core Team, 2021).

3 RESULTADOS

3.1 O CO₂ elevado em combinação com dosagens de sacarose influencia o crescimento das plântulas de *Handroanthus impetiginosus*

As plântulas com 0 g L⁻¹ de sacarose, tanto na concentração de 420, quanto 800 µmol mol⁻¹ de CO₂ tiveram crescimento reduzido. Contudo, à medida que a concentração de sacarose no meio de cultura foi elevada para 10 e 20 g L⁻¹, independente das concentrações de CO₂, houve melhora progressiva no crescimento das plantas, que se apresentaram alongadas e com maior número de folhas (Figura 1).

Em condições elevadas de CO₂ (800 µmol mol⁻¹) foi possível observar o efeito positivo da sacarose sobre as variáveis de crescimento (Figura 1). As plantas cultivadas com 10 e 20 g L⁻¹ de sacarose, em 800 µmol mol⁻¹ de CO₂ apresentaram crescimento vigoroso, com maior biomassa aparente, coloração verde mais intensa e estruturas foliares mais desenvolvidas, em comparação aos demais tratamentos. Cabe destacar que, tanto a concentração de CO₂, quanto a disponibilidade de sacarose, afetaram positivamente o crescimento *in vitro* de ipê roxo, especialmente quando combinados em doses elevadas (800 µmol mol⁻¹ de CO₂ e 10 g L⁻¹ de sacarose), proporcionando o melhor desempenho das plântulas; portanto, sugere-se um efeito sinérgico entre a suplementação carbônica e o fornecimento de sacarose (Figura 1).

As variáveis de crescimento das plântulas de ipê roxo foram influenciadas pela concentração de sacarose, dependendo do nível de CO₂ usado. Plantas cultivadas sob 420 µmol mol⁻¹ exibiram maiores valores para o comprimento da parte aérea (CAP), diâmetro do caule (DC) e número de nós (NN) na presença de sacarose (10 e 20 g L⁻¹) (Figura 2A, 2B e 2D); porém, ao adicionar 20 g L⁻¹ deste carboidrato no meio de cultura diminuiu o número de brotos (NB), com relação a 0 e 10 g L⁻¹ de sacarose (Figura 2E). Os parâmetros: número de folhas (NF), área foliar (AF) e massa seca da parte aérea (MSPA) não diferiram estatisticamente entre as três dosagens de sacarose quando combinadas com 420 µmol mol⁻¹ de CO₂; no entanto, condições fotoautotróficas (sem sacarose) se mostraram menos favoráveis (Figura 2C, 2F e 2G).

Ao analisar o efeito da quantidade de sacarose em combinação com 800 µmol mol⁻¹ de CO₂ observou-se que a presença de sacarose no meio de cultura incrementa o CAP, a AF e a MSPA (Figura 2A, 2F e 2G). O diâmetro do caule (DC) aumentou conforme se elevou a dose de sacarose (Figura 2B). 10 g L⁻¹ de sacarose foi o que mais

estimulou o desenvolvimento foliar, com um NF superior (Figura 2C). O NN e NB não diferiram para a concentração de sacarose (Figura 2D e 2E).

Ao comparar o efeito dos níveis de CO₂, entre cada concentração de sacarose empregada, observou-se que o CO₂ elevado (800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) induziu maior DC e NB ao utilizar 20 g L⁻¹ de sacarose (Figura 2B e 2E) e, apresentou significância para o acúmulo de MSPA em plântulas cultivadas com 10 g L⁻¹ de sacarose (Figura 2G).



Figura 1. Plântulas de *Handroanthus impetiginosus* propagadas *in vitro*, sob CO₂ elevado (420 e 800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) em combinação com dosagens de sacarose (0, 10 e 20 g L⁻¹). Barras de escala: 2 cm.

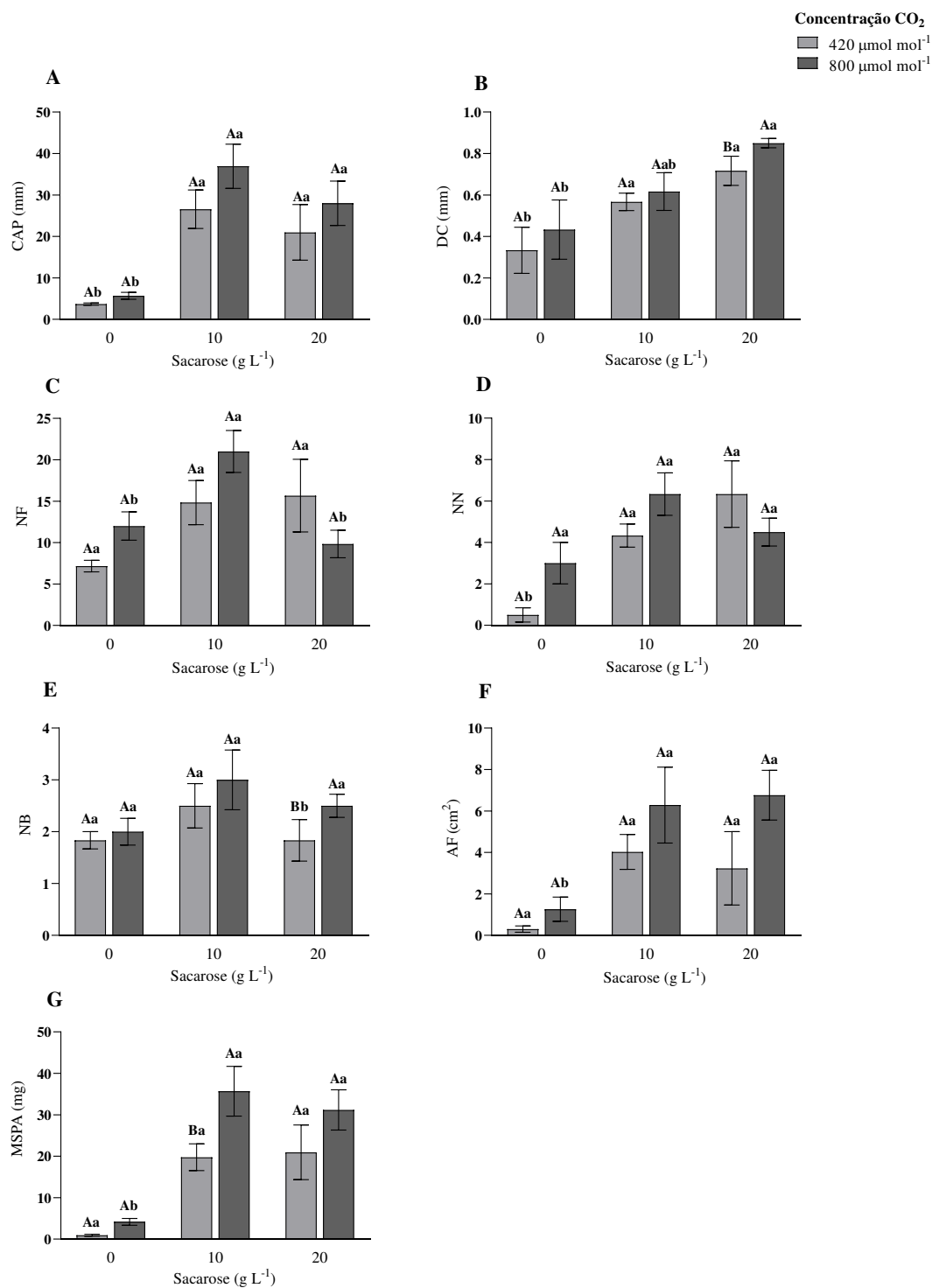


Figura 2. Parâmetros de crescimento em plântulas *in vitro* de *Handroanthus impetiginosus* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob CO₂ (420 e 800 μmol mol⁻¹) em combinação com dosagens de sacarose (0, 10 e 20 g L⁻¹). (A) comprimento de aérea; (B) diâmetro do caule; (C) números folhas; (D) número de nós; (E) número de brotos; (F) área foliar; (G) massa seca da parte aérea. Letras maiúsculas comparam os valores das variáveis quanto ao CO₂, e as letras minúsculas comparam as diferentes concentrações de sacarose (Teste Tukey; $p \leq 0,05$). As barras representam o erro padrão (n= 6).

3.2 O acúmulo de pigmentos fotossintéticos em plântulas de *Handroanthus impetiginosus* é pouco influenciado pelo incremento de CO₂ em sistemas fotomixotróficos

Os teores de pigmentos fotossintéticos como a clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides e clorofila total não foram influenciados pelas concentrações de CO₂ e sacarose (10 e 20 g L⁻¹) (Figura 3A, B, D e E). Diferenças significativas foram observadas apenas na razão clorofila *a/b*, superior em plântulas sob 420 μmol mol⁻¹, em comparação com 800 μmol mol⁻¹ de CO₂, quando cultivadas com 10 g·L⁻¹ de sacarose. Além disso, este parâmetro variou com relação à concentração de sacarose, o qual apresentou significância com 10 g L⁻¹ de sacarose para o ambiente com 420 μmol mol⁻¹ (Figura 3C).

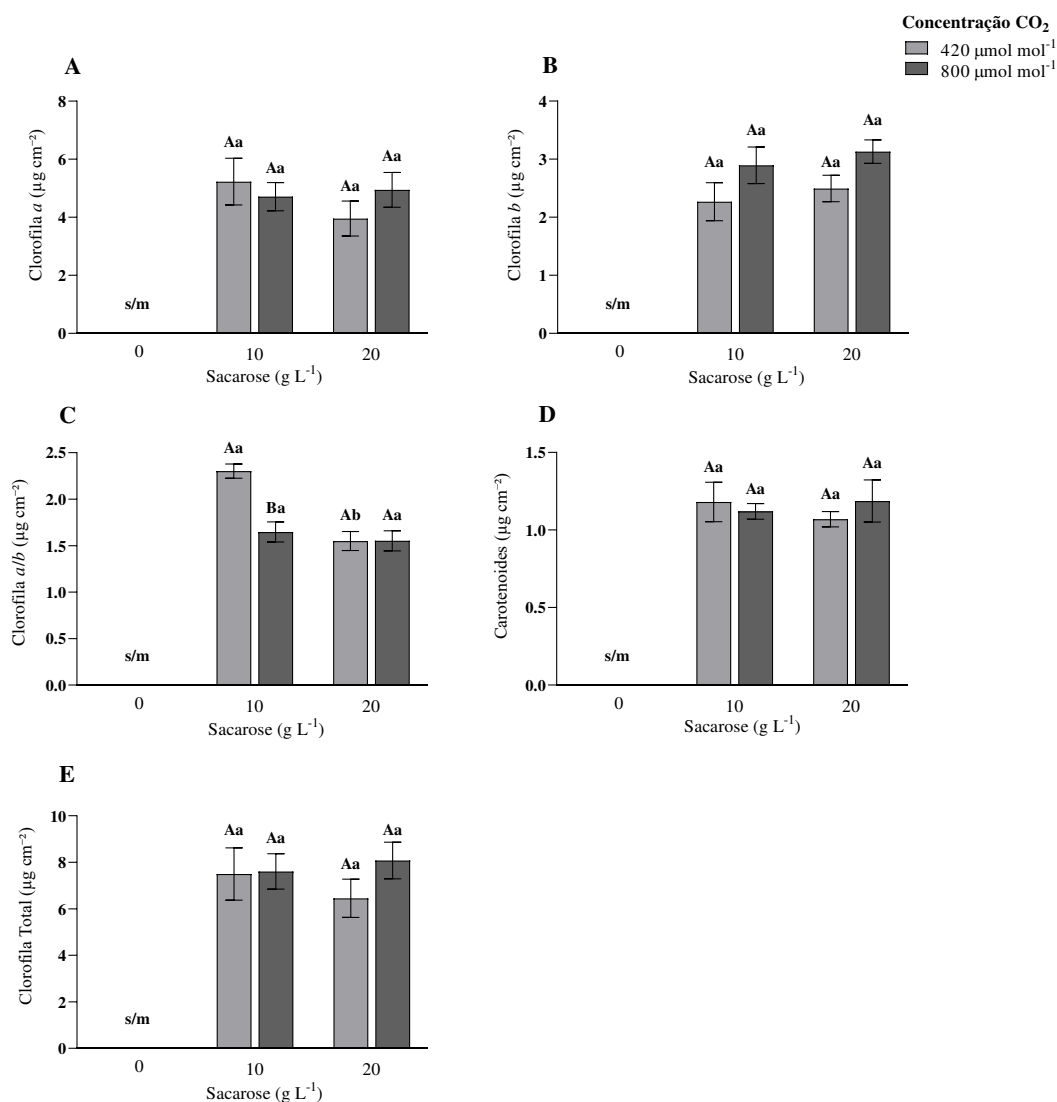


Figura 3. Pigmentos fotossintéticos em plântulas de *Handroanthus impetiginosus* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob CO₂ (420 e 800 μmol mol⁻¹) em combinação com dosagens de sacarose (10 e 20 g L⁻¹). (A)

clorofila *a*; (**B**) clorofila *b*; (**C**) clorofila *a/b*; (**D**) carotenoides; (**E**) clorofila total; **sm**: sem material vegetal. Letras maiúsculas comparam os valores das variáveis quanto ao CO₂, e as letras minúsculas comparam as diferentes concentrações da sacarose (Teste Tukey; $p \leq 0,05$). As barras representam o erro padrão (n= 6).

3.3 Sistemas fotomixotróficos pouco impactam a fluorescência da clorofila de plântulas *in vitro* de *Handroanthus impetiginosus* sob atmosfera com CO₂ elevado

A fluorescência inicial (F_0) (Figura 4A), fluorescência variável (F_v) (Figura 4B), fluorescência máxima (F_m) (Figura 4C), rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) (Figura 4D) e o índice de desempenho (PI) (Figura 4F) não diferiram significativamente entre os tratamentos avaliados. Apenas a energia absorvida por centro de reação ativo (RC/ABS) (Figura 4E) apresentou diferença estatística quanto as concentrações de 10 e 20 g L⁻¹ de sacarose em ambiente com CO₂ elevado (800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$), sendo superior em plantas cultivadas com a maior concentração de sacarose (Figura 4E).

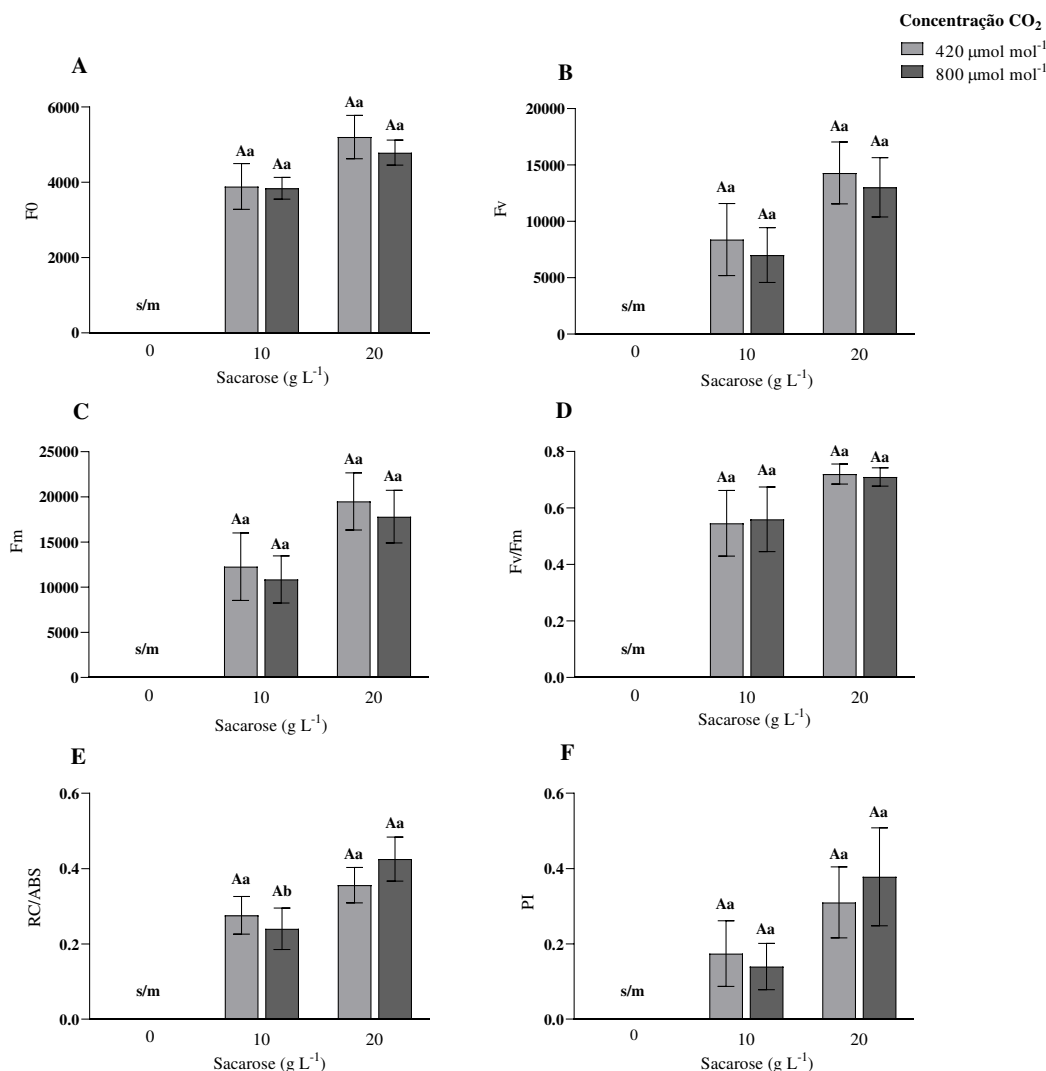


Figura 4. Fluorescência da clorofila em plântulas de *Handroanthus impetiginosus* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob CO₂ (420 e 800 μmol mol⁻¹) em combinação com dosagens de sacarose (10 e 20 g L⁻¹). (A) fluorescência inicial (F₀); (B) fluorescência variável (F_v); (C) fluorescência máxima (F_m); (D) rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m); (E) energia absorvida por centro de reação ativo (RC/ABS); (F) índice de desempenho (PI); sm: sem material vegetal. Letras maiúsculas comparam os valores das variáveis quanto ao CO₂, e as letras minúsculas comparam as diferentes concentrações da sacarose (Teste Tukey; p ≤ 0,05). As barras representam o erro padrão (n= 6).

3.4 O CO₂ elevado em condições fotomixotróficas modula as trocas gasosas de plântulas *in vitro* de *Handroanthus impetiginosus*

Plântulas condicionadas à 800 μmol mol⁻¹ de CO₂ com adição de 10 g L⁻¹ de sacarose, em comparação com 400 μmol mol⁻¹ de CO₂, apresentaram valores superiores para a taxa fotossintética líquida (Figura 5A), a eficiência de carboxilação (Figura 5F) e a eficiência intrínseca do uso da água (Figura 5G). Em contraste, estas plantas exibiram

menor concentração interna de CO₂ (Figura 5C) e inferior razão da concentração de CO₂ intercelular ambiente (Figura 5E); portanto, houve uma taxa de assimilação fotossintética elevada, e a planta conseguiu utilizar de maneira eficiente o CO₂, disponível.

Ao comparar a concentração de sacarose adicionada ao meio de cultura, evidenciaram-se diferenças estatísticas significativas a penas para a condutância estomática (Figura 5B) e a taxa de transpiração (Figura 5D) das plantas cultivadas sob 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂, nas quais, 10 g L⁻¹ de sacarose incrementou estes parâmetros.

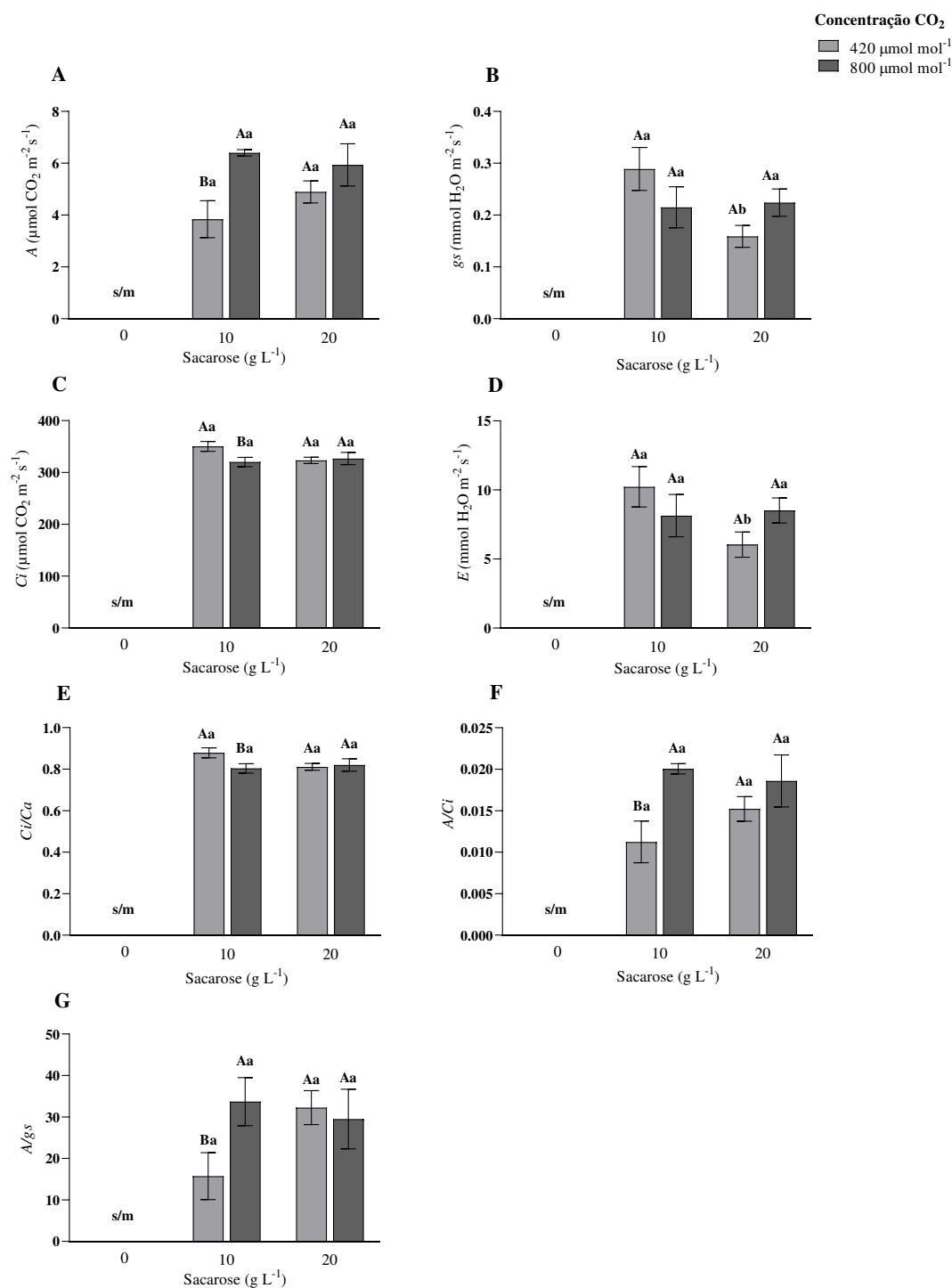


Figura 5. Trocas gasosas em plântulas de *Handroanthus impetiginosus* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob CO₂ (420 e 800 μmol mol⁻¹) em combinação com dosagens de sacarose (10 e 20 g L⁻¹). (A) taxa fotossintética líquida; (B) condutância estomática; (C) taxa de transpiração; (D) concentração interna de CO₂; (E) razão da concentração de CO₂ intercelular ambiente; (F) eficiência de carboxilação; (G) eficiência intrínseca do uso da água; **sm**: sem material vegetal. Letras maiúsculas comparam os valores das variáveis quanto ao CO₂, e as letras minúsculas comparam as diferentes concentrações da sacarose (Teste Tukey; $p \leq 0,05$). As barras representam o erro padrão ($n=5$).

3.5 O CO₂ elevado em combinação com dosagens de sacarose impacta o índice e densidade estomática de *Handroanthus impetiginosus*

As folhas de *Handroanthus impetiginosus* apresentam epiderme com células justapostas e presença de tricomas nas duas faces; portanto, é considerada hipoestomática, com estômatos anisocíticos no mesmo nível das demais células epidérmicas (Figura 6).

A combinação de sacarose com CO₂ em níveis elevados (20 g L⁻¹ + 800 μmol mol⁻¹ de CO₂) estimulou a diferenciação estomática, evidenciada pelo aumento do número de estômatos e da densidade estomática (Figura 6D).

Tanto o índice estomático quanto a densidade estomática variaram com relação ao fornecimento de sacarose, apenas na condição de 800 μmol mol⁻¹ de CO₂, os quais apresentaram os maiores valores na dosagem de 20 g L⁻¹ (Figura 7A). Ao comparar os dois ambientes de CO₂, entre as quantidades de carboidrato adicionadas ao meio de cultura, houve diferença estatística nas plantas cultivadas com 20 g L⁻¹, em que a atmosfera com 420 μmol mol⁻¹ de CO₂ induziu os menores resultados, em comparação com CO₂ elevado (800 μmol mol⁻¹) (Figura 7).

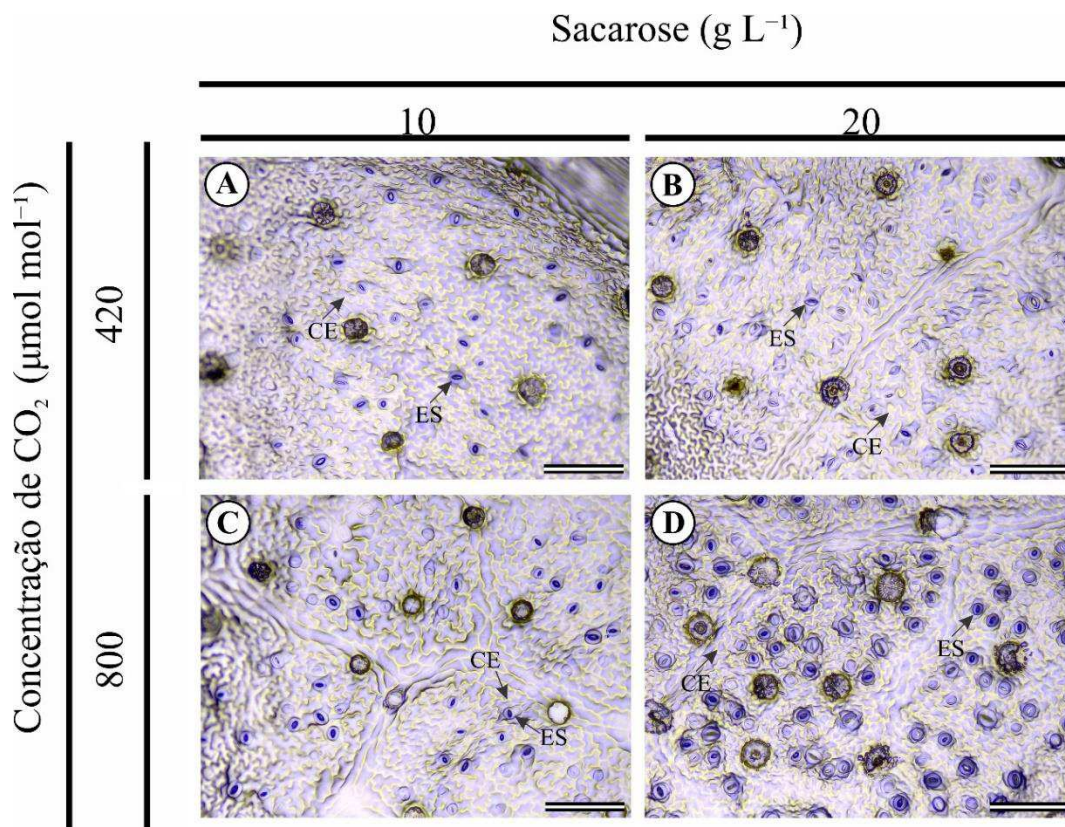


Figura 6. Índice estomático e densidade estomática de *Handroanthus impetiginosus* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob CO₂ (420 e 800 μmol mol⁻¹) em combinação com dosagens de sacarose (10 e 20 g L⁻¹). CE: célula epidérmica; ES: estômato. Barras de escala: 200 μm.

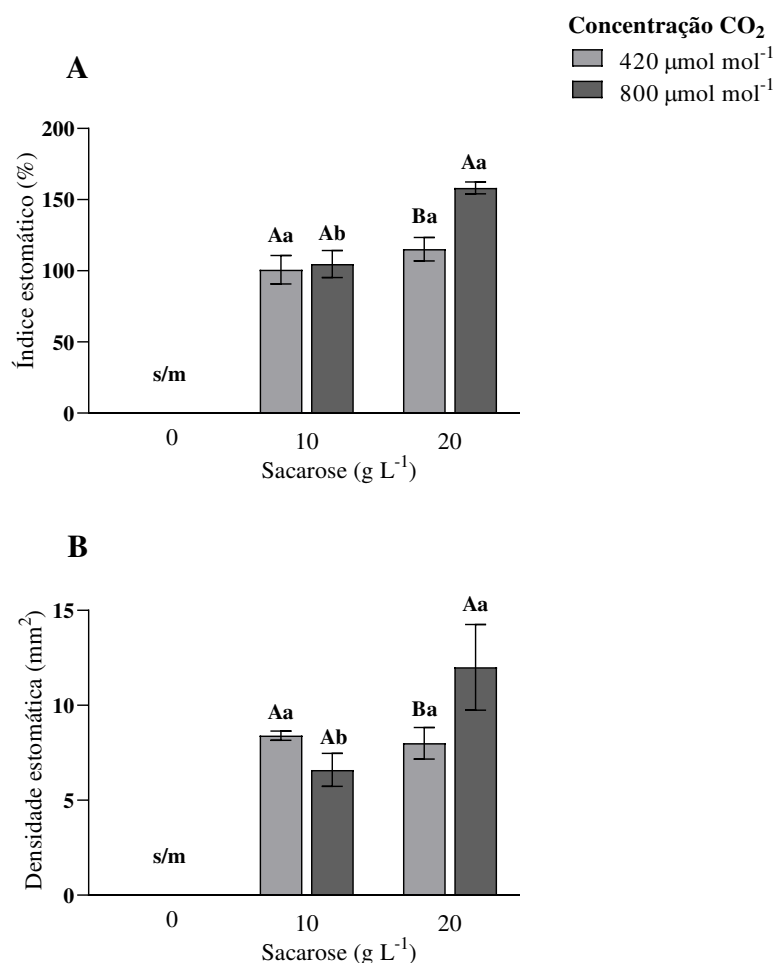


Figura 7. Índice estomático e densidade estomática de plantas de *Handroanthus impetiginosus* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob CO₂ (420 e 800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) em combinação com dosagens de sacarose (10, 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). (A) índice estomático; (B) densidade estomática; **sm**: sem material vegetal. Letras maiúsculas comparam os valores das variáveis quanto ao CO₂, e as letras minúsculas comparam as diferentes concentrações de sacarose (Teste Tukey; $p \leq 0,05$). As barras representam o erro padrão ($n= 5$).

3.6 Aspectos anatômicos de folha e caule de *Handroanthus impetiginosus* são influenciados pelo CO₂ elevado em combinação com a sacarose

As seções transversais das folhas de *Handroanthus impetiginosus* mostram uma epiderme uniestratificada, tanto na face adaxial quanto na face abaxial, ambas epidermes são dorsiventrais. O mesofilo é composto por apenas uma camada de parênquima paliádico e uma camada de parênquima esponjoso. A folha exhibe tricomas peltados em

ambas faces, característica típica da família Bignoniaceae. Na nervura central, o feixe vascular é colateral, com o xilema e floema opostos um ao outro.

As folhas das plântulas cultivadas na concentração de CO₂ elevado (800 μmol mol⁻¹) apresentaram epiderme abaxial mais espessa, bem como feixes vasculares mais expandidos e maiores espaços intercelulares no parênquima esponjoso. Em contrapartida, aquelas cultivadas em 420 μmol mol⁻¹ de CO₂ revelaram maior expansão do parênquima esponjoso. A epiderme adaxial e o parênquima paliçádico mantiveram-se uniformes em ambos ambientes de CO₂ (Figura 8).

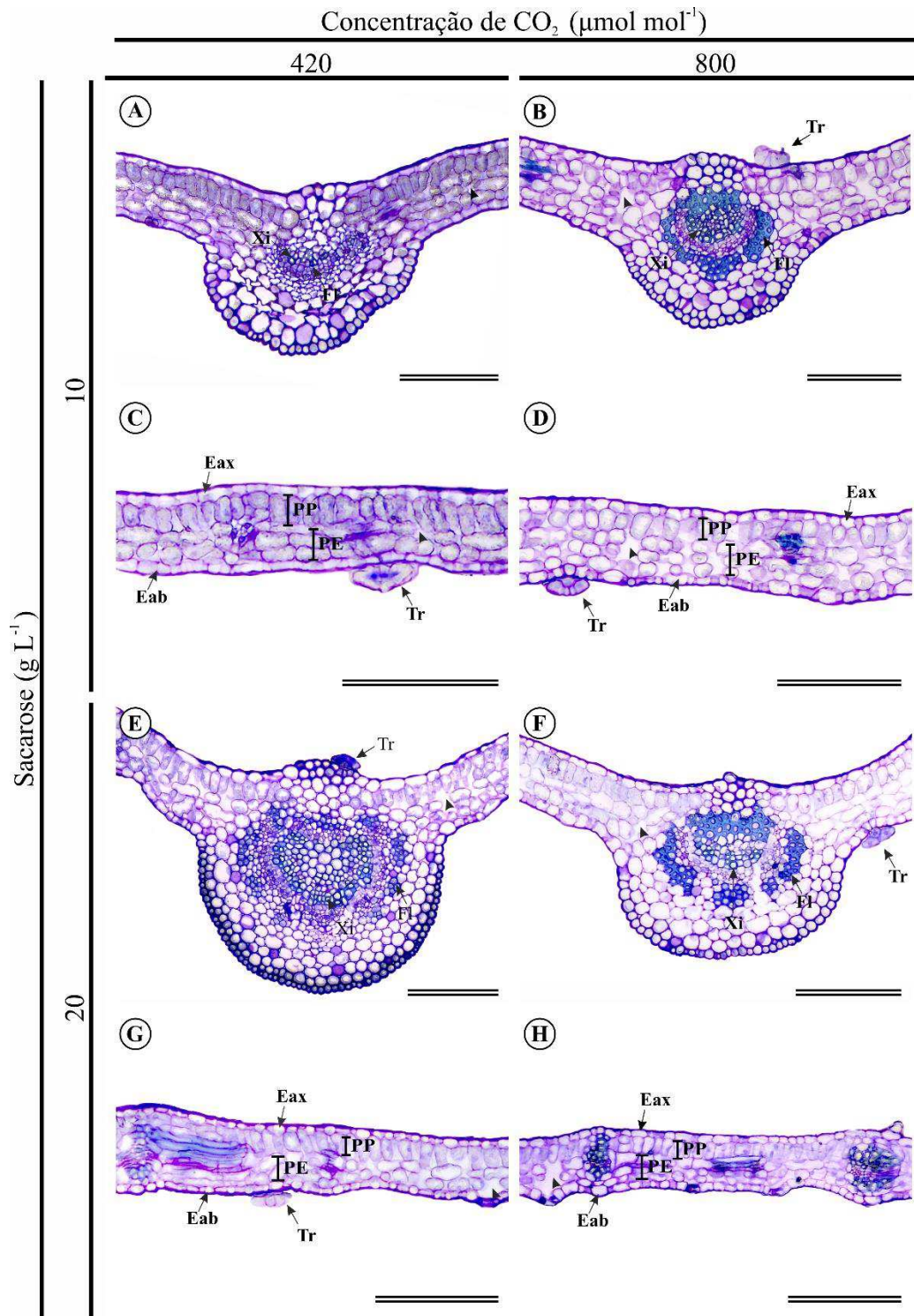


Figura 8. Seções transversais de folhas de plantas de *Handroanthus impetiginosus* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob CO₂ (420 e 800 μmol mol⁻¹) em combinação com dosagens de sacarose (10, 20 g L⁻¹). **A, C, E, G:** nervura central; **B, D, F, H:** limbo ou mesófilo. **Eax:** epiderme adaxial; **Eab:** epiderme abaxial; **Fl:** floema; **PE:** parênquima esponjoso; **PP:** parênquima paliçádico; **Tr:** tricoma; **Xi:** xilema; ponta de seta resalta espaços intercelulares. Barras = 100 μm.

A espessura da epiderme adaxial e do parênquima paliçádico não foram alterados pelos níveis de CO₂, nem pela dose de sacarose adicionada ao meio de cultura (Figuras

9A e 9C). O aumento da concentração de CO₂ promoveu espessamento significativo da epiderme abaxial nas doses de 10 e 20 g L⁻¹ de sacarose (Figura 9B).

As plântulas cultivadas sob 20 g L⁻¹ de sacarose apresentaram diferença estatística significativa na espessura do parênquima esponjoso, ao comparar as duas atmosferas de CO₂ testadas, as plântulas expostas à concentração ambiente de CO₂ (420 μmol mol⁻¹) apresentaram maiores valores (Figura 9D).

Em relação aos tecidos vasculares, houve interação significativa para os fatores. A concentração de sacarose no meio de cultivo influenciou no tamanho dos feixes vasculares, a penas nas plântulas sob 420 μmol mol⁻¹ de CO₂, nas quais 20 g L⁻¹ de sacarose aumentou significativamente a espessura dos feixes vasculares em ambas as direções analisadas (transversal e longitudinal) (Figuras 9E e 9F). Em condições de CO₂ elevado não houve diferença significativa entre 10 e 20 g L⁻¹ de sacarose. Ao comparar os dois níveis de CO₂ usados, entre cada dose de carboidrato, evidenciou-se diferença estatística entre eles para as plantas cultivadas com 10 g L⁻¹ de sacarose; nas quais, o tamanho do feixe vascular no sentido transversal e longitudinal foi superior sob 800 μmol mol⁻¹ de CO₂ (Figura 9E e 9F).

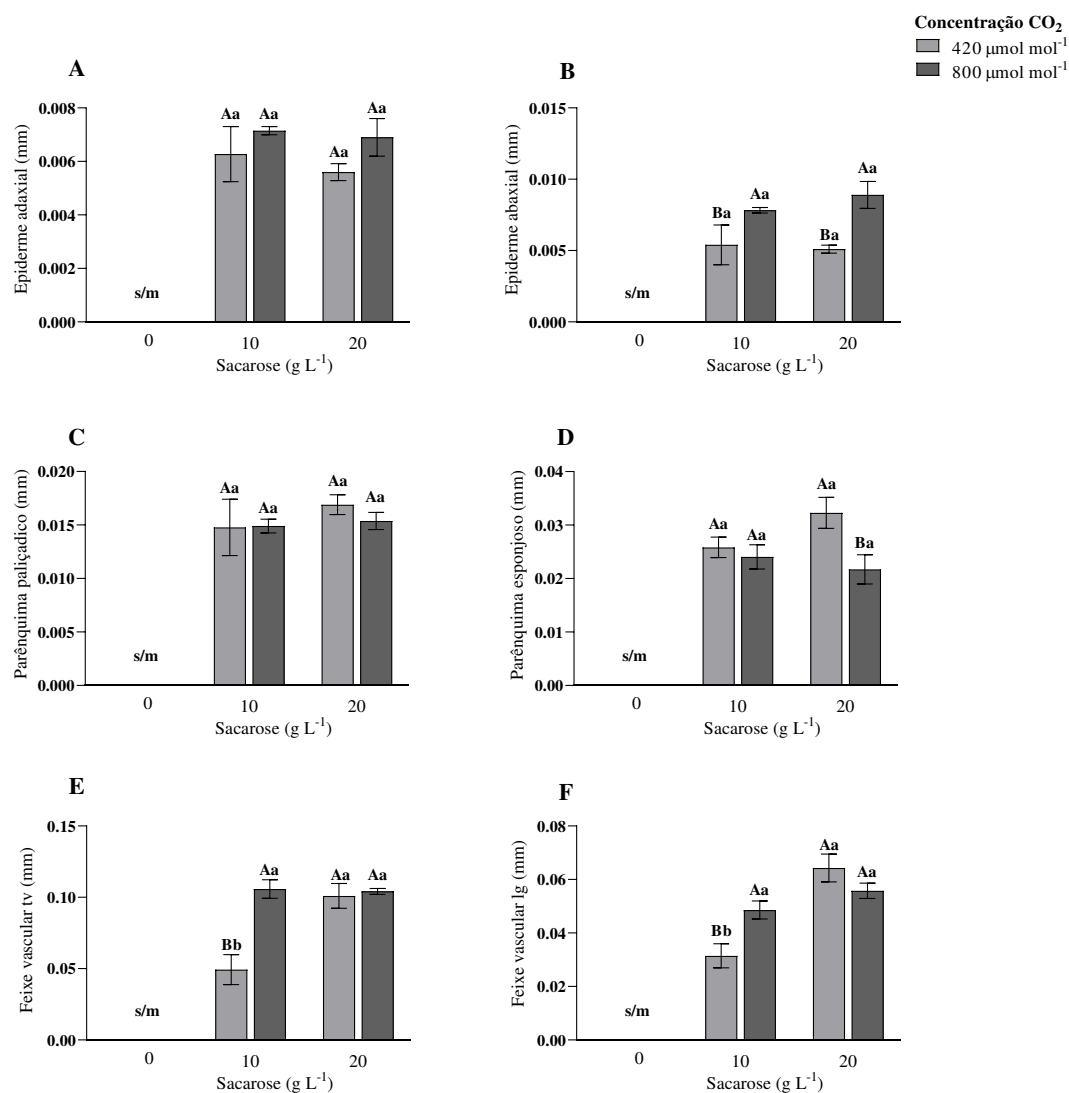


Figura 9. Parâmetros medidos em cortes transversais das folhas de plântulas de *Handronthus impetiginosus* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob CO₂ (420 e 800 μmol mol⁻¹) em combinação com dosagens de sacarose (10, 20 g·L⁻¹). (A) epiderme adaxial; (B) epiderme abaxial; (C) parênquima paliçádico; (D) parênquima esponjoso; (E) feixe vascular tv - transversal-; (F) feixe vascular lg- longitudinal. Letras maiúsculas comparam os valores das variáveis quanto ao CO₂, e as letras minúsculas comparam as diferentes concentrações de sacarose (Teste Tukey; p ≤ 0,05). As barras representam o erro padrão (n = 4).

Os cortes transversais do caule de ipê roxo revelaram células bem definidas e justapostas e a presença de vários tricomas tectores; a parede dos feixes vasculares foi mais densa nas plântulas cultivadas com 10 e 20 g·L⁻¹ sob 800 μmol mol⁻¹ de CO₂ (Figura 10)

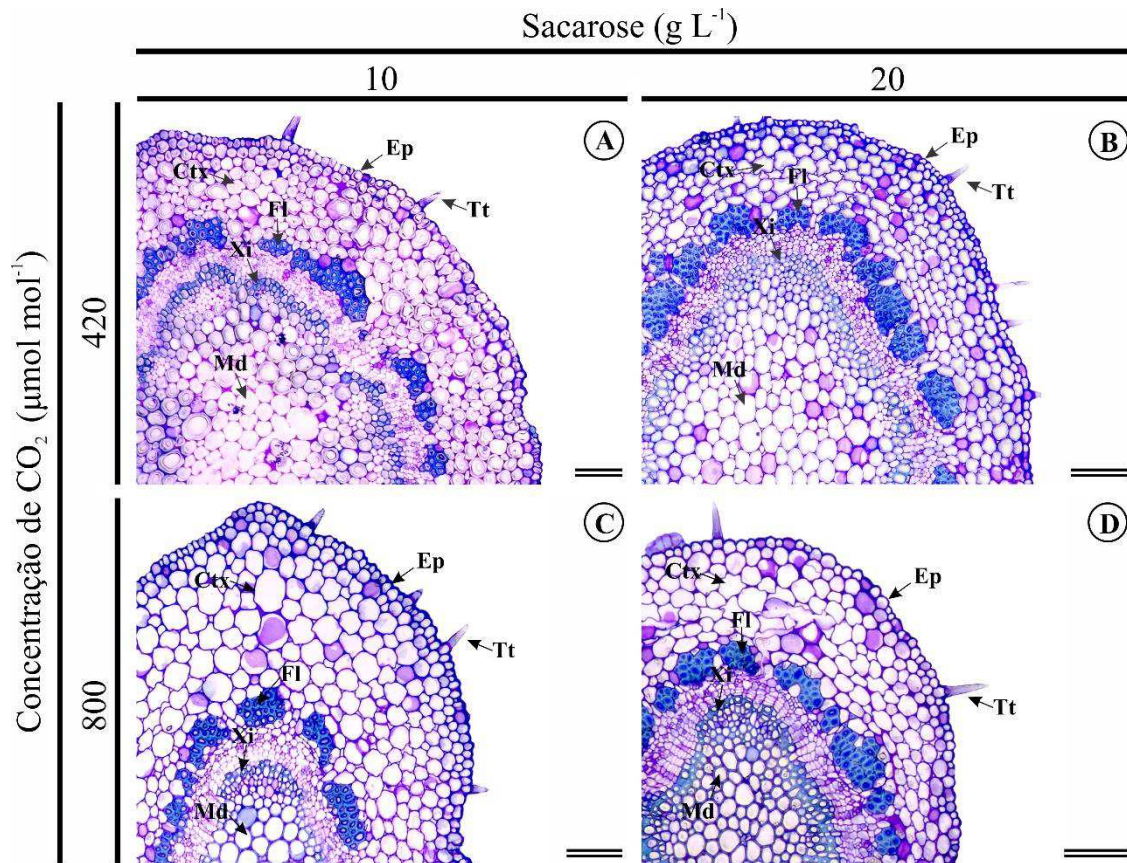


Figura 10. Seções transversais do caule de plantas de *Handroanthus impetiginosus* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob CO₂ (420 e 800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) em combinação com dosagens de sacarose (10, 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Ctx: córtex; Ep: epiderme; Fl: floema; Md: medula; Tt: tricoma tector; Xi: xilema. Barras = 50 μm .

A espessura da epiderme e o do feixe vascular do caule não foram alterados pelos tratamentos testados (Figura 11A e 11D). A concentração de sacarose não influenciou nos parâmetros anatômicos do caule analisados, independentemente do nível de CO₂. Ao comparar as duas atmosferas de CO₂ investigadas, o aumento da concentração de CO₂ (800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) reduziu significativamente a espessura do parênquima cortical na dosagem de 20 g L^{-1} de sacarose; enquanto o parênquima medular apresentou menor espessamento para ambas as dosagens (10 e 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose) no mesmo nível de CO₂ (Figura 11B e 11C).

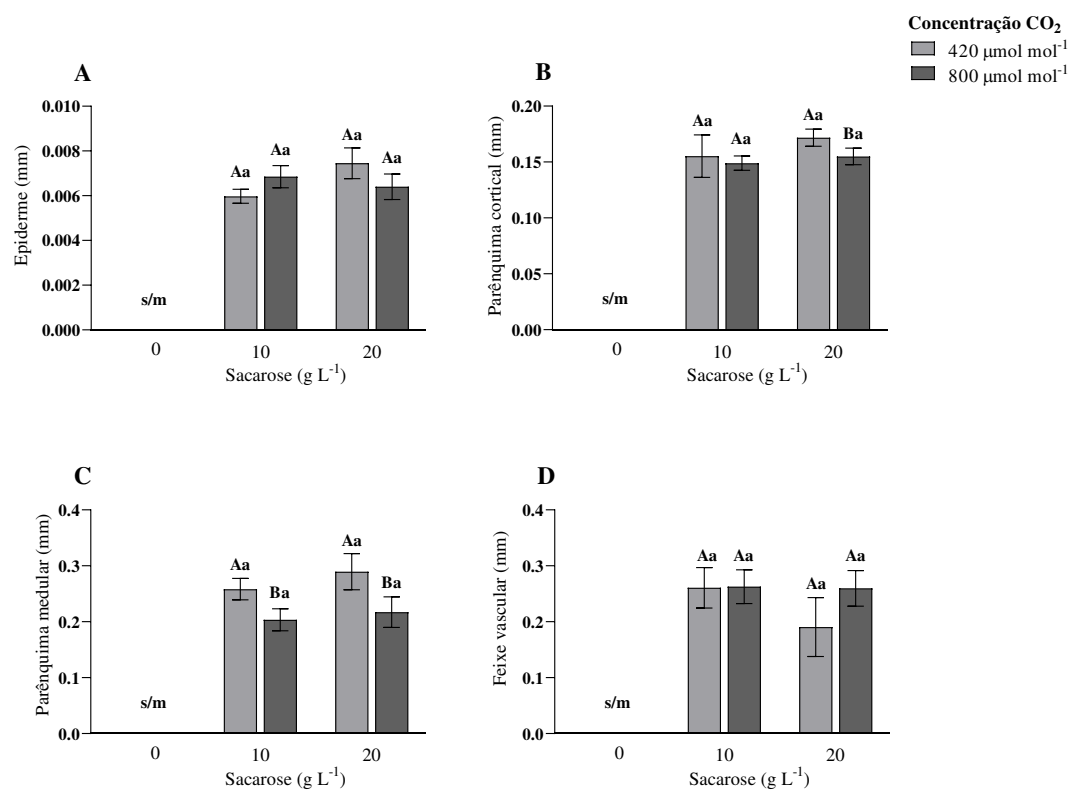


Figura 11. Parâmetros medidos em cortes transversais de caule de plantas de *Handronthus impetiginosus* após 35 dias de cultivo *in vitro* sob CO₂ (420 e 800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) em combinação com dosagens de sacarose (10, 20 g L⁻¹). (A) epiderme; (B) parênquima cortical; (C) parênquima medular; (D) feixe vascular. Letras maiúsculas comparam os valores das variáveis quanto ao CO₂, e as letras minúsculas comparam as diferentes concentrações de sacarose (Teste Tukey; $p \leq 0,05$). As barras representam o erro padrão ($n = 4$).

4 DISCUSSÃO

4.1 O CO₂ elevado em combinação com dosagens de sacarose influencia o crescimento das plântulas de *Handroanthus impetiginosus*

As plântulas de *Handroanthus impetiginosus* responderam de forma positiva às variações nas concentrações de CO₂ e sacarose; foi evidente a interação sinérgica entre a combinação de 800 µmol mol⁻¹ de CO₂ com 10 g L⁻¹ de sacarose. Todavia, o crescimento das plântulas foi limitado na ausência de sacarose (0 g L⁻¹) (condição fotoautotrófica), independentemente do nível de CO₂ isso evidencia a dependência de uma fonte exógena de carbono no cultivo *in vitro* de ipê roxo, o que caracteriza um comportamento predominantemente fotomixotrófico (Figura et al., 2019).

A presença de sacarose (10 e 20 g L⁻¹) favoreceu o comprimento da parte aérea (CAP), diâmetro do caule (DC) e número de nós (NN) nas plântulas de ipê roxo cultivadas sob 420 µmol mol⁻¹. Enquanto que na atmosfera com 800 µmol mol⁻¹ de CO₂ incrementou o CAP, a área foliar (AF), o DC e a massa seca da parte aérea (MSPA); no entanto, o número de folhas (NF) foi superior com 10 g L⁻¹ de sacarose. Esses resultados sugerem que a sacarose favoreceu tanto o alongamento, quanto a ramificação dos caules, devido que este carboidrato não atua apenas como substrato energético, mas também como um sinalizador metabólico capaz de modular a expressão gênica relacionada ao crescimento vegetal (Ashraf et al., 2025). Por outro lado, o ambiente enriquecido com CO₂ potencializa a assimilação de carbono, mesmo em condições controladas, principalmente quando há luminosidade disponível. O acúmulo de biomassa em ipê roxo foi favorecido pela presença de sacarose, evidenciando sua importância como fonte complementar de carbono. Esse efeito possivelmente se deve à limitação da fotossíntese endógena em condições *in vitro*, nas quais o aporte externo de carbono torna-se essencial para o crescimento vegetal (Cossa et al., 2024).

O DC, por sua vez, mostrou maior sensibilidade à concentração mais elevada de sacarose (20 g L⁻¹), especialmente sob 800 µmol·mol⁻¹ de CO₂. Esse aumento pode refletir uma maior deposição de lignina e espessamento dos tecidos de sustentação, fenômeno associado à disponibilidade energética elevada e à intensificação do metabolismo estrutural.

Nossos resultados demonstram efeito sinérgico entre o enriquecimento carbônico e a suplementação energética via adição exógena de sacarose ao meio de cultura, que favoreceu tanto o crescimento vegetativo quanto a expansão foliar das

plântulas de ipê roxo. A resposta negativa quanto ao crescimento das plantas em condições de 0 g L⁻¹ de sacarose, mesmo com alta concentração de CO₂, reforça a insuficiência da capacidade fotossintética no estágio inicial do seu desenvolvimento, indicando que *H. impetiginosus* requer suplementação exógena de carbono para manter o crescimento em condições *in vitro*.

Estudos com outras espécies confirmam a relevância da sacarose no cultivo *in vitro*. Em *Origanum majorana*, 15 g L⁻¹ de sacarose promoveu maior alongamento e acúmulo de biomassa, enquanto 7,5 g L⁻¹ estimulou a brotação (Cossa et al., 2024). Em *Bambusa vulgaris*, 30 g L⁻¹ foi essencial para a sobrevivência e o vigor das plântulas (Gonçalves et al., 2023). Em pesquisas realizadas com inhame (*Dioscorea rotundata*), concentrações elevadas de sacarose (60 - 90 g L⁻¹) estimularam a formação de microtubérculos e o acúmulo de massa, especialmente em associação com ácido abscísico (Suárez & Otero, 2016). Já em *Samanea saman*, a redução da concentração de sacarose em ambiente enriquecido com CO₂ resultou em maior crescimento e desenvolvimento radicular (Mosaleeyanon et al., 2004). Todos esses achados sugerem que a dose ideal de sacarose varia em função da capacidade fotossintética da espécie e das condições ambientais.

A resposta observada no ipê roxo justifica-se pela natureza fotomixotrófica das plântulas cultivadas *in vitro*, que dependem da adição de uma fonte externa de carbono ao meio de cultura para suprir suas exigências metabólicas durante os estágios iniciais de desenvolvimento. A combinação de CO₂ elevado com concentrações moderadas de sacarose proporcionou um ambiente favorável, tanto para o fornecimento energético, quanto para a sinalização metabólica que regula o crescimento e a diferenciação celular. Essa interação sinérgica, que se refletiu em ganhos morfofisiológicos consistentes, reforça a importância de ajustar os níveis de carbono orgânico e inorgânico no microambiente *in vitro* conforme a fisiologia específica da espécie. Estes resultados ressaltam a importância da otimização de protocolos de micropropagação para a espécie.

4.2 O acúmulo de pigmentos fotossintéticos em plântulas de ipê roxo é pouco influenciado pelo incremento de CO₂ em sistemas fotomixotróficos

Os teores estáveis de clorofilas e carotenoides observados nas plântulas de *H. impetiginosus* sugerem que, sob as condições fotomixotróficas avaliadas, tanto o aumento da concentração atmosférica de CO₂ (de 420 para 800 µmol mol⁻¹), quanto o incremento

de sacarose exógena (10 e 20 g L⁻¹) pouco influenciam a produção de pigmentos fotossintéticos. Tais resultados podem ser explicados pela própria natureza do cultivo *in vitro*, que é caracterizado por ambiente altamente controlado, baixa luminosidade, ausência de flutuações de fotoperíodo, e disponibilidade constante de carboidratos, que reduzem a dependência da fotossíntese como via primária de obtenção de energia e carbono.

Em *Samanea saman* foi verificado sensibilidade acentuada, com redução na clorofila total em meios ricos em sacarose (Mosaleeyanon et al., 2004); enquanto que em *Persea americana*, Jian & Ishii (2012) não houve diferença significativa nos pigmentos sob diferentes níveis de sacarose. Em *Phalaenopsis*, espécie com metabolismo CAM, o CO₂ elevado combinado à sacarose promoveu aumento na razão clorofila/carotenoides (Yoon et al., 2009), indicando que a resposta pode variar também conforme a via fotossintética predominante. Portanto, é possível afirmar que os efeitos da sacarose sobre os pigmentos são altamente espécie-específicos. Contudo, o efeito da ausência de sacarose sobre a biossíntese de pigmentos fotossintéticos não foi verificado neste trabalho, uma vez que a biomassa e desenvolvimento foliar das plântulas de ipê roxo foram insuficientes para a extração destes metabólitos.

Por outro lado, diversos estudos indicam que o enriquecimento de CO₂ em sistemas com ventilação eficiente ou membranas permeáveis à gases pode elevar a concentração de pigmentos fotossintéticos (Cossa et al., 2024; Yoon et al., 2009). No presente estudo o incremento de CO₂ não alterou o conteúdo de clorofila *a* e *b*, clorofila total e carotenoides em plântulas de ipê roxo, possivelmente o sistema de ventilação utilizado (tampas com dois orifícios de 10 mm de diâmetro coberto por membranas porosas) ainda limita a taxa de troca gasosa dentro dos frascos de cultivo. Em *Origanum majorana*, por exemplo, o uso de quatro membranas porosas permitiu acúmulo significativamente maior de clorofilas e carotenoides, em comparação com sistemas sem membranas (Cossa et al., 2024); em variedades crioulas de batata, o uso de recipientes plásticos equipados com filtro HEPA aumentou o teor de clorofila nas folhas (Vollmer et al., 2024), reforçando a importância da ventilação para se alcançar os efeitos benéficos do CO₂.

A variação observada na relação clorofila *a/b*, ao comparar as duas atmosferas de CO₂ (420 e 800 µmol mol⁻¹), particularmente no tratamento com 10 g L⁻¹ de sacarose, pode indicar uma modulação fina da composição dos complexos antena dos fotossistemas, com possível reorganização do fotossistema II em resposta à

disponibilidade relativa de carbono externo e CO₂ atmosférico. Um aumento nessa relação está frequentemente associado à redução proporcional de clorofila *b*, o que reflete um ajuste na captação de luz, especialmente em condições em que a fotossíntese não é completamente inibida, mas também não é exigida como via principal, um comportamento típico de plantas crescidas sob condições fotomixotróficas.

Do ponto de vista fisiológico, a presença de sacarose no meio atua não apenas como substrato energético e osmótico, mas também como sinal metabólico. Para alguns autores, a suplementação com sacarose pode reprimir genes associados à assimilação fotossintética e aos pigmentos relacionados, especialmente sob enriquecimento com CO₂ (Mosaleeyanon et al., 2004; Jian & Ishii, 2012). A ausência de incrementos significativos em pigmentos fotossintéticos nas condições testadas, portanto, é coerente com esse padrão de repressão metabólica, típico de culturas em meio com sacarose, onde o CO₂ elevado não necessariamente se traduz em maior fotossíntese líquida, devido à baixa demanda por produção autótrofa de açúcares.

É relevante destacar que a estabilidade nos níveis de carotenoides, pigmentos associados à dissipação de energia e proteção contra estresse oxidativo, indica que as plantas não estavam submetidas a estresses luminotrópicos ou oxidativos relevantes. A homogeneidade do ambiente *in vitro* limita significativamente a variabilidade fotofísica, o que pode atenuar os efeitos esperados do CO₂ elevado sobre a maquinaria fotossintética (Jian & Ishii, 2012; Verma et al., 2025).

Os resultados obtidos com o ipê roxo reforçam a ideia de que a interação entre CO₂ e sacarose em condições *in vitro* é modulada pela fisiologia da espécie, pela ventilação do sistema, e pelas condições ambientais impostas. A estabilidade dos pigmentos sugere que a suplementação com CO₂ só terá efeito significativo na presença de maior demanda fotossintética, ou seja, sob condições que promovam maior autotrofia funcional, como redução da sacarose ou uso de sistemas com melhor troca gasosa.

4.3 Sistemas fotomixotróficos pouco impactam a fluorescência da clorofila de plântulas *in vitro* de ipê roxo sob atmosfera com CO₂ elevado

A ausência de efeitos significativos do CO₂ elevado e das diferentes concentrações de sacarose (10 e 20 g L⁻¹) sobre os parâmetros da fluorescência F₀, F_v, F_m, F_v/F_m e PI (Figura 4A–F) indica que o aparato fotoquímico do fotossistema II (PSII) das plântulas de *H. impetiginosus* manteve-se funcional e estruturalmente estável nas

condições fotomixotróficas avaliadas. Esse padrão sugere que a integridade dos complexos antena e dos centros de reação do PSII não foi comprometida nem pelo enriquecimento com CO₂ nem pelo incremento de carbono exógeno via sacarose.

Os valores de F_v/F_m utilizados como indicadores da eficiência máxima do PSII sob condições ideais são em torno de 0,80 - 0,83 (Maxwell; Jhonson, 2000; Taiz et al., 2017), neste trabalho oscilaram entre 0,60 e 0,70 sugerindo um leve estresse para esse tratamento, porém sem comprometer o desenvolvimento das plântulas de *H. impetiginosus* durante os 35 dias de cultivo *in vitro*. De modo consistente, os valores de F_0 , F_v e F_m , relacionados à absorção e emissão de energia pela clorofila a não apresentaram variações significativas, indicando que o ambiente controlado do cultivo *in vitro* do ipê roxo, aliado ao fornecimento contínuo de sacarose, tamponou respostas sensíveis às variações na disponibilidade de CO₂.

Entretanto, o parâmetro RC/ABS, que representa a densidade de centros de reação ativos em relação à energia absorvida, exibiu variações significativas sob 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de CO₂, em ambas as concentrações de 10 e 20 g L⁻¹ de sacarose (Figura 4E). Essa resposta pontual pode refletir uma reorganização funcional do aparato fotossintético, possivelmente associada à modulação redox intracelular ou à sinalização mediada por açúcares. A queda de RC/ABS nas plântulas cultivadas com 10 g L⁻¹, em comparação com o aumento com 20 g L⁻¹, sugere que concentrações intermediárias de sacarose em presença de CO₂ elevado podem induzir um *feedback* negativo na fotossíntese, reduzindo temporariamente a necessidade de centros de reação ativos. Por outro lado, o aumento observado RC/ABS nas plantas cultivadas com 20 g L⁻¹ pode estar relacionado à ativação de vias anabólicas ou de armazenamento que exigem maior produção de ATP e NADPH, reativando centros anteriormente inativos. Essa hipótese é respaldada por evidências de que a sacarose, além de atuar como fonte energética, exerce papel sinalizador na regulação da expressão gênica relacionada à fotossíntese e ao metabolismo secundário (Cossa et al., 2024).

A estabilidade do índice de performance (PI), que integra diferentes aspectos da atividade fotossintética, reforça a robustez do aparato fotossintético frente às condições testadas. Apesar de alterações pontuais, o desempenho global manteve-se estável, indicando um equilíbrio funcional entre o suprimento de carbono exógeno e a regulação endógena da atividade fotossintética (Verma et al., 2025).

No caso de plântulas de *Phalaenopsis*, observou-se um aumento de 14% na relação F_v/F_m sob enriquecimento com CO₂ durante o cultivo *in vitro*. Contudo, ao final

do período experimental, não foram detectadas diferenças significativas entre as combinações de tratamento envolvendo CO₂ e sacarose (Yoon et al., 2009). A literatura sugere que os efeitos dessas variáveis estão mais associados ao metabolismo de reservas e a adaptação pós-transferência para o ambiente *ex vitro*, do que a alterações imediatas na eficiência do PSII (Verma et al., 2025; Cossa et al., 2024; Yoon et al., 2009). Em suma, os dados obtidos com *H. impetiginosus* indicam que o aparato fotossintético mantém sua estabilidade funcional sob diferentes regimes de CO₂ e sacarose, com respostas discretas apenas em parâmetros específicos como RC/ABS. Essa resiliência pode refletir a capacidade adaptativa da espécie ao ambiente *in vitro*, contrastando com respostas mais sensíveis observadas em outras espécies, como *Phalaenopsis*, e destacando a importância de abordagens espécie-específicas..

4.4 O CO₂ elevado em condições fotomixotróficas modula as trocas gasosas de plantas *in vitro* ipê roxo

Os resultados observados quanto as trocas gasosas das plântulas de *Handroanthus impetiginosus* demonstraram que a aplicação exógena de sacarose, e o enriquecimento com CO₂ influenciou na fotossíntese. A adição de 10 g L⁻¹ de sacarose promoveu um aumento significativo na taxa fotossintética líquida (*A*), tanto sob 420 quanto 800 μmol mol⁻¹ de CO₂. A sacarose, além de fornecer energia metabólica, atua como molécula sinalizadora que regula genes associados à assimilação de carbono (El-Banna et al., 2024; Guan et al., 2024). No entanto, a ausência de um aumento adicional com 20 g L⁻¹ sugere que há um limiar fisiológico, acima do qual o excesso de sacarose desencadeia mecanismos de inibição por retroalimentação, conforme descrito por Mosaleeyanon et al. (2004) e Jian & Ishii (2012).

A condutância estomática (*g_s*) e a taxa de transpiração (*E*) apresentaram reduções significativas apenas no tratamento com 20 g L⁻¹ sob 420 μmol mol⁻¹ de CO₂, o que reflete possíveis efeitos osmóticos que levam ao fechamento estomático. Esse fechamento pode ser resultado do acúmulo de açúcares nas células-guarda ou de alterações no balanço redox, que limita o fluxo de CO₂ para o mesófilo e prejudica a assimilação de carbono (Liang et al., 2025). Por outro lado, estes resultados indicam que uma dosagem menor de sacarose no meio de cultivo pode aumentar a condutância estomática e a taxa de transpiração em ipê roxo.

A concentração interna de CO₂ (*C_i*) foi significativamente menor nas plantas expostas a 800 μmol mol⁻¹ de CO₂ com 10 g L⁻¹ de sacarose, o que indica maior taxa de

fixação de carbono e eficiência fotossintética; isto sugere que há uma taxa de assimilação fotossintética elevada, e que a planta consegue utilizar de maneira eficiente esse CO₂. Esse padrão é confirmado pela redução da relação Ci/Ca e pelo aumento da eficiência de carboxilação (A/Ci), que refletem na maior atividade da Rubisco e maior funcionalidade do ciclo de Calvin (Jair & Ishii, 2012). Além disso, a eficiência intrínseca do uso da água (A/g_s) aumentou em tais condições, o que sinaliza um metabolismo mais eficiente e adaptativo em condições de estresse hídrico potencial.

Embora a sacarose seja essencial nesses sistemas fotomixotróficos, concentrações elevadas podem inibir a fotossíntese ao reduzir a atividade da Rubisco, estimular o acúmulo de amido nos cloroplastos e desencadear respostas de feedback negativo (Mosaleeyanon et al., 2004; Jian & Ishii, 2012). Estes resultados também foram observados em diversos estudos com diferentes espécies, como *Samanea saman*, *Phalaenopsis*, Abacate e *Acacia mangium*, nos quais a adição de sacarose reduziu a taxa fotossintética ou não promoveu aumento de biomassa, mesmo em presença de CO₂ elevado.

Por outro lado, o enriquecimento atmosférico com CO₂ (por meio de ventilação ou membranas permeáveis a gases) demonstrou aumentar significativamente a taxa fotossintética, eficiência do PSII (Fv/Fm) e captação líquida de CO₂ em diferentes espécies (Yoon et al., 2009; Cossa et al., 2024). Em alguns casos, o cultivo em condições fotoautotróficas (sem sacarose) com alto CO₂ promoveu o melhor desempenho fisiológico, indicando que o fornecimento externo de carbono via sacarose pode ser mais prejudicial do que benéfico quando o CO₂ está disponível em níveis adequados.

Dessa forma, os resultados deste estudo evidenciam que a adição moderada de sacarose (10 g L⁻¹) sob enriquecimento com CO₂ (800 µmol mol⁻¹) atua como um bioestimulante, o que promove maior assimilação de carbono, eficiência hídrica e funcionamento fotossintético em plântulas de ipê roxo. Por outro lado, concentrações elevadas de sacarose limitam esses ganhos, mesmo em condições de CO₂ elevado, o que confirma a necessidade de um balanço preciso entre fonte exógena de carbono e condições atmosféricas.

Do ponto de vista aplicado, a combinação de baixa sacarose e alto CO₂ pode ser explorada para promover o crescimento inicial de espécies arbóreas em sistemas de propagação *in vitro* voltados à restauração ecológica. A transição para protocolos fotoautotróficos, com ventilação eficiente e suplementação controlada de CO₂, pode

representar uma abordagem mais sustentável e fisiologicamente eficiente para a micropropagação de espécies nativas como ipê roxo.

4.5 O CO₂ elevado em combinação com dosagens de sacarose impacta o índice e densidade estomática de ipê roxo

Houve interação significativa entre a concentração de CO₂ atmosférico e o suprimento exógeno de sacarose sobre o desenvolvimento estomático de ipê roxo, que refletiu tanto no índice estomático quanto na densidade estomática. O aumento do índice estomático com a aplicação de 20 g L⁻¹ de sacarose sob CO₂ elevado (800 µmol mol⁻¹), indicou uma resposta sinérgica entre essas duas fontes de carbono, mediada por mecanismos de sinalização e ajustes morfofisiológicos para otimizar a captação de CO₂ mesmo que em um ambiente com maior disponibilidade energética.

A sacarose pode atuar diretamente nas células-guarda, e promover alterações osmóticas ou modular vias de sinalização como a da hexoquinase e do ABA, o que afeta a dinâmica de abertura e fechamento dos estômatos (Lima et al., 2018). A maior formação de estômatos sob as condições com mais sacarose pode indicar um ajuste adaptativo que visa maximizar o fluxo de CO₂ para a fotossíntese, e aproveitar o suprimento abundante de carbono tanto atmosférico quanto exógeno.

Curiosamente, o mesmo incremento na sacarose (20 g L⁻¹) não proporcionou efeito significativo nas plântulas sob 420 µmol mol⁻¹ de CO₂, o que sugere que a concentração de CO₂ menor representa um fator limitante, que inibe a atuação plena da sacarose como promotora do desenvolvimento estomático. Essa ausência de resposta pode refletir na necessidade de uma concentração limiar de CO₂ para ativar vias metabólicas ou genéticas envolvidas na diferenciação estomática, corroborando com outros autores que indicam a dependência da resposta ao CO₂ em relação à espécie e ao contexto ambiental (Xu et al., 2016; Poole et al., 2000; Matkowski; Daszkowska, 2023).

A densidade estomática apresentou padrão semelhante de resposta, com aumento significativo apenas sob 20 g L⁻¹ de sacarose e CO₂ elevado. Estudos prévios indicam que, de forma geral, o CO₂ elevado tende a reduzir a densidade estomática (Xu et al., 2016; Lima et al., 2018), possivelmente como estratégia de conservação de água. No entanto, resultados contrários foram observados, como aumento do índice estomático sem alteração da densidade (Poole et al., 2000), e os autores indicam que a resposta morfológica dos estômatos ao CO₂ é multifatorial e modulada por interações com outras variáveis, como a presença de sacarose no meio.

A redução da densidade estomática sob $800 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 com 10 g L^{-1} de sacarose foi relevante. Outros trabalhos apontam que elevadas concentrações de sacarose podem comprometer o funcionamento estomático, favorecer o acúmulo de açúcares nos tecidos e alterar o balanço hormonal, incluindo a ativação da via do ABA, que inibe o desenvolvimento de estômatos (Pinheiro et al., 2021; Lima et al., 2018). Além disso, altas concentrações de sacarose podem induzir alterações anatômicas como estômatos anormais e redução na expressão de genes fotossintéticos, o que reforça a importância de um balanço preciso na disponibilidade de carbono (Miranda et al., 2018; Matkowski; Daszkowska, 2023).

Portanto, os resultados demonstram que a formação estomática em ipê roxo responde de maneira não-linear à interação entre CO_2 e sacarose, assim, essa planta expressa uma plasticidade anatômica, que pode ser vantajosa em contextos de mudança climática. A capacidade da espécie de modular densidade e índice estomático sob enriquecimento de CO_2 , especialmente quando combinada com fonte energética exógena, sugere um potencial adaptativo promissor para ambientes com atmosferas enriquecidas e recursos limitados, como sistemas de micropropagação ou regiões sob impacto ambiental.

4.6 Aspectos anatômicos de folha e caule de *Handroanthus impetiginosus* são influenciados pelo CO_2 elevado em combinação com a sacarose

A anatomia da folha de ipê roxo revelou variações estruturais entre os tratamentos com diferentes concentrações de CO_2 e sacarose. Sob CO_2 elevado, espera-se que as plantas aumentem a assimilação de carbono através da fotossíntese, o que leva ao acúmulo de açúcares no interior dos tecidos foliares (Da Silva Fortirer et al., 2023). O excesso de carbono dispara duas respostas principais nos tecidos epidérmicos: a expansão celular e a redução na densidade e modulação da condutância estomática. No caso do ipê roxo foi observada a expansão da epiderme abaxial, com o incremento da concentração de CO_2 , nas doses de 10 e 20 g L^{-1} de sacarose, o que sugere uma maneira das plantas otimizarem a função foliar em condições de alta disponibilidade de carbono. Esse resultado, quanto ao efeito do CO_2 , é compatível com relatos de Masle (2000) e Liu et al. (2022). Outros trabalhos revelaram alteração epidérmica na face adaxial (Habermann et al., 2019) e em ambas as faces (Driscoll et al., 2006; Soares et al., 2007). A epiderme mais espessa confere maior robustez celular, o que faz com que a planta reduza a perda de água e suporte as variações ambientais.

Em relação aos tecidos mesofílicos, não foi observada mudança estrutural no parênquima paliçádico, mas a espessura do parênquima esponjoso foi menor com enriquecimento de CO₂ (800 µmol mol⁻¹), sob 20 g L⁻¹ de sacarose. Os dados indicam que a formação do parênquima esponjoso responde de forma mais eficiente ao CO₂ ambiente, desde que haja um suprimento adequado de sacarose no meio, como observado com a dosagem de 20 g L⁻¹ de sacarose. Resultados contrários foram reportados em plantas de soja, em que tanto o parênquima paliçádico como o esponjoso aumentaram significativamente quando os níveis de CO₂ elevaram de 400 para 1000 µmol mol⁻¹ (Zengh et al., 2019). Todavia, mesófilos menos espessos ou proporcionais ao crescimento vascular podem ocorrer, sugerindo alocação preferencial como a reorganização anatômica em favor de transporte e suporte vascular na planta (Upreti et al., 2001).

A suplementação de 800 µmol mol⁻¹ de CO₂ com dosagem de 10 g L⁻¹ de sacarose, em comparação com atmosfera com 420 µmol mol⁻¹ de CO₂, favoreceu maior largura e altura do feixe vascular; o que indica que o enriquecimento com CO₂, em combinação com concentrações intermediárias de sacarose, intensifica a diferenciação e o espessamento vascular. Especificamente no xilema, o CO₂ elevado aumenta a assimilação de carbono, reduz a condutância estomática e, conseqüentemente, a taxa de transpiração (Teng et al., 2006; Liu et al., 2020). Isso resulta em maior pressão hídrica nos vasos e favorece o crescimento secundário e espessamento dos elementos vasculares, associados ao aumento de diâmetro de vasos e parênquima adjacente, o que não ocorreu com as plântulas de ipê roxo.

Já no floema, o aumento da intensidade fotossintética sob altas concentrações de CO₂ intensifica a produção de sacarose, favorecendo o carregamento e os gradientes de pressão-turgor nas células crivadas (Ainsworth et al., 2018). Esse estímulo tem potencial para promover a expansão do floema, com maior área de feixe e aumento da atividade metabólica, como evidenciado em videiras, nas quais elevações de temperatura associadas ao acúmulo de sacarose desencadearam o crescimento do floema em galhos e pecíolos (Wolberg et al., 2024).

No caule, tanto o parênquima cortical quanto o medular sofreram redução quando as plântulas foram condicionadas ao CO₂ elevado. Para Innocente et al. (2020), este comportamento não é comum, uma vez que se espera que com o enriquecimento de CO₂ haja proliferação de células no meristema vascular, expandindo o diâmetro do caule e estimulando a divisão do parênquima cortical e medular. No entanto, pode ocorrer que o parênquima cortical e medular apresentem espessuras menores, o que sugere que com

a maior disponibilidade de CO₂, parte do carbono possa ser remobilizado do parênquima para expansão vascular, conferindo estabilidade estrutural e hidráulica (Liu et al., 2020; Arsic et al., 2021).

Nossos resultados apontam que a interação entre fonte de carbono e CO₂ atmosférico, é um fator-chave no planejamento de protocolos de micropropagação de ipê roxo. A compreensão dos mecanismos envolvidos na adaptação ao cultivo *in vitro* e na transição para a autotrofia permite não apenas otimizar as taxas de crescimento, mas também contribui com estratégias para a conservação e propagação do ipê-roxo, espécie de relevância ecológica e paisagística.

Futuros estudos devem ser realizados afim de aprofundar o conhecimento sobre parâmetros fisiológicos e bioquímicos associados à resposta das plântulas em condições de elevado CO₂ e dosagens de sacarose, bem como verificar se plantas em tais condições apresentam maior rusticidade na aclimatação, e ainda, estudar a aplicação desses ajustes em escalas maiores e em sistemas de cultivo alternativos, como biorreatores de imersão temporária, sistemas hidropônicos ou cultivo *ex vitro* sob ambiente controlado.

5 CONCLUSÕES

A fonte de carbono e às condições atmosféricas, exercem influência significativa sobre o crescimento, fisiologia e anatomia de plântulas de *H. impetiginosus* em condições de cultivo *in vitro*. Dessa forma, recomenda-se 10 g L⁻¹ de sacarose + 800 µmol mol⁻¹ de CO₂ para maximizar o crescimento e a eficiência fotossintética durante o cultivo *in vitro*, especialmente em fases de transição para a autotrofia. Quanto aos aspectos anatômicos, as plantas sob condições de 20 g L⁻¹ de sacarose + 800 µmol mol⁻¹ de CO₂ apresentaram maior índice e densidade estomática e maior espessura do feixe vascular.

Nossos resultados apontam a possibilidade de que *H. impetiginosus* apresente certa plasticidade fisiológica e anatômica diante de ambientes com alta concentração de CO₂, como os previstos em cenários de mudanças climáticas, sugerindo um potencial adaptativo que merece ser investigado em estudos de maior escala e em condições *ex vitro*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINSWORTH, E.A.; LEMONNIER P. (2018). Phloem function: a key to understanding and manipulating plant responses to rising atmospheric [CO₂]?. **Current Opinion in Plant**, v.43, p.50-56 <https://doi.org/10.1111/plb.12973>
- ARSIĆ, J. et al. (2021). Increased wood biomass growth is associated with lower wood density in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. saplings growing under elevated CO₂. **PLoS One**, v.16, n.10, e0259054. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259054>
- ASHRAF, Z. et al. (2025). Growth Dilatory Effects of PEG and Sucrose on *Geranium wallichianum*: An *In vitro* Approach for Conservation. **Phyton-International Journal of Experimental Botany**, v.94, n.3, p.987-1006. 2025. <https://doi.org/10.32604/phyton.2025.062351>
- BERTOLO, A.J. et al. (2022). Combustíveis fósseis: panorama de produção e consumo no Brasil. **Gestão e Desenvolvimento em Revista**, v.9, n.1, p.102-123.
- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R. et al. (1989). Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. **Functional Ecology**, v.3, n.4, p.497–514. <https://doi.org/10.2307/2389624>
- CASTRO-CAMBA, R. (2023). Reducing costs, improving profits: A low-cost culture media for woody plants micropropagation. **Journal of Forest Science**, v.69, n.9, p.377-388. <https://doi.org/10.17221/56/2023-JFS>
- COSSA, M.C.V. et al. (2024). Impact of ventilation system with sucrose doses and wavelength on biomass production and arbutin content in *Origanum majorana* L. plantlets. **Scientia Horticulturae**, v.337, 113498.
- CRUZ, C.D. (2016). Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.38, n.4, p.547-552. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v38i4.32629>
- DANTAS, L.A. et al. (2021). The impact of carbon source on cell growth and production of bioactive compounds in cell suspensions of *Hancornia speciosa* Gomes. **Scientific reports**, v.11, 24315. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03845-0>
- DA SILVA FORTIRER. et al. (2023). Meta-análise das respostas de árvores e ervas ao alto nível de CO₂ no Brasil. **Scientific Reports**, v.13, 15832. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40783-5>
- DIGIANTONIO, G. et al. (2019). National Oceanic and Atmospheric Administration Science Report. Retrieved from. Disponível em: <https://sciencecouncil.noaa.gov/council-products/noaa-science-report/>. Acesso em: 15 de abr. 2025.
- DRISCOLL, S. P. (2006). Specification of adaxial and abaxial stomata, epidermal structure and photosynthesis for CO₂ enrichment in maize leaves. **Journal of Experimental Botany**, v.57, n.2, p.381-390. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj030>
- EBERHARDT, T.L. et al. (2015). Efeitos do tratamento prolongado com CO₂ elevado na química da casca interna e externa de árvores de *Liquidâmbar styraciflua* L. **Árvores**, v.29, p.1735–1747. <https://doi.org/10.1007/s00468-015-1254-8>

EL-BANNA, M. F., et al. (2024). Bee honey improved the performance of indole-3-butyric acid on promoting adventitious roots formation of *Cupressus macrocarpa* L. var. Goldcrest: Morpho-biochemical and histoanatomical investigation. **Industrial Crops and Products**, v.209, 117971. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117971>

FERREIRA, D.R.G. et al. (2020). Temperature and light under the physiological potential of seeds of *Handroanthus impetiginosus*. **Bioscience Journal**, v.36, n.1, p.68–77. <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v36n1a2020-42454>

FIGURA, T. et al. (2019). *In vitro* axenic germination and cultivation of mixotrophic Pyroloideae (Ericaceae) and their post-germination ontogenetic development. **Annals of Botany**, v.123, n.4, p.625–639. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcy195>

FU, PEI-LI. et al. (2024). The impact of elevated CO₂ concentration on photosynthesis, growth and hydraulics of evergreen and deciduous tree seedlings from a subtropical forest in Southwest China. **Environmental and Experimental Botany**. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2024.01.036

GONÇALVES, D. S. (2023). *In vitro* cloning of *Bambusa vulgaris* Schrad. ex JC Wendl.: Effect of culture systems, sucrose and activated charcoal supplementation. **Advances in Bamboo Science**, 3, 100024. <https://doi.org/10.1016/j.bamboo.2023.100024>

GUAN, C., et al. (2025). Difference in sucrose concentration between scion and rootstock influences the incompatibility of cucumber/pumpkin grafted plants. **Horticulture Plant Journal**, v.11, n.3, p.1166-1180. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2024.02.014>

HABERMANN, E. et al. (2019). Increasing atmospheric CO₂ and canopy temperature induces anatomical and physiological changes in leaves of the C₄ forage species *Panicum maximum*. **PLoS One**, v.14, n.2, e0212506. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212506>

INNOCENT, P.S.; TEIXEIRA, S.P.; BALBUENA, T.S. (2020). Elevated atmospheric CO₂ increases *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake stem diameter by stimulating cell proliferation and reducing lignin deposition. **Acta botnica Brasilica**, v.34, n.3, p.589-591. <https://doi.org/10.1590/0102-33062020abb0107>

IUCN – International Union for Conservation of Nature. (2023). *Handroanthus impetiginosus*. The IUCN Red List of Threatened Species, Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/species/144297143/173394208>. Acesso em: 7 janeiro de 2025.

JAIN, S. M.; ISHII, K. (Eds.). (2012). Micropropagation of woody trees and fruits. v.75. **Springer Science & Business Media**, p.840.

JOHANSEN, D.A. (1940). Plant Microtechnique. New York: McGraw-Hill Book Company, Inc.

LENTINI, et al. (2021). A exploração do ipê (*handroanthus spp.*) em florestas naturais da amazônia brasileira: desafios e oportunidades para a conservação e o manejo responsável. São Paulo: Boletim Timberflow- IMAFLORA, v.4, p.1-16.

- LIANG, K., CHEN, Y., HOU, J., & LIU, F. (2025). Elevated CO₂-conferred sodium homeostasis is linked to abscisic acid-mediated stomatal closure and signalling pathway in tomato. **Horticultural Plant Journal**, v.11, n.3, p.1218-1230. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2024.01.005>
- LIMA, V. F. (2018). Toward multifaceted roles of sucrose in the regulation of stomatal movement. **Plant Signaling & Behavior**, v.13, n.8, e1494468. <https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1494468>
- LIU, J. et al. (2020). Increasing [CO₂] alleviates the impacts of water deficit on xylem anatomy and hydraulic properties of corn stalks. **Plant, Cell and Environment**, v.43, ed.3, p.563-578. <https://doi.org/10.1111/pce.13677>
- LIU, L. et al. (2022). The CO₂ fertilization effect on leaf photosynthesis of maize (*Zea mays* L.) depends on growth temperatures with changes in leaf anatomy and soluble sugars. **Frontiers in Plant Science**, v.13, e890928. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.890928>
- LOBO, A. K. M. et al. (2022). Physiological and molecular responses of woody plants exposed to future atmospheric CO₂ levels under abiotic stresses. **Plants**, v.11 n.14, p.1880. <https://doi.org/10.3390/plants11141880>
- LOUBACK, E. et al. (2021). CO₂ enrichment leads to altered cell wall composition in *Pfafa glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae) plants. **Plant Cell Tiss Organ Culture**, v.145, p.603–613. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02031-4>
- LLOYD, G. & MCCOWN, B.H. (1981). Woody Plant Medium (WPM)—A Mineral Nutrient Formulation for Microculture of Woody Plant Species. **HortScience**, v.16, n.3, p.453.
- MATKOWSKI, H.; DASZKOWSKA-GOLEC, A. (2023). Update on stomata development and action under abiotic stress. **Frontiers in Plant Science**, v.14, p.1270180. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1270180>
- MASLE, J. (2000). The effects of elevated CO₂ concentrations on cell division rates, growth patterns and blade anatomy in young wheat plants are modulated by factors related to leaf position, vernalization and genotype. **Plant Physiology**, v.122, n.2, p. 1399–1416. <https://doi.org/10.1104/pp.122.4.1399>
- MIRANDA, N. A. et al. (2018). Antioxidants, sucrose and agar in the *in vitro* multiplication of *Eremanthus incanus*. **Floresta**, v.48, n.3, p.311-320. <https://doi.org/10.5380/rf.v48i3.51365>
- MOSALEEYANON, K.; CHA-UM, S.; KIRDMANEE, C. (2004). Enhanced growth and photosynthesis of rain tree (*Samanea saman* Merr.) plantlets *in vitro* under a CO₂-enriched condition with decreased sucrose concentrations in the medium. **Scientia Horticulturae**, v.103, n.1, p.51-63. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.02.010>
- PINHEIRO, M. V. M. et al. (2021). CO₂ enrichment alters morphophysiology and improves growth and acclimatization in *Etlingera Elatior* (Jack) RM Smith micropropagated plants. **Brazilian Journal of Botany**, v.44, p.799-809. <https://doi.org/10.1007/s40415-021-00741-9>

POOLE, I. et al. (2000). Effect of elevated CO₂ on the stomatal distribution and leaf physiology of *Alnus glutinosa*. **The New Phytologist**, v. 145, n.3, p.511-521. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00589.x>.

QUICK, S.E. et al. (2025). Water usage of old-growth oak at elevated CO₂ in the FACE (Free-Air CO₂ Enrichment) of climate change **Biogeosciences**, v.22, p.1557–1581. <https://doi.org/10.5194/bg-22-1557-2025>

SALDANHA, C.W. et al. (2012). A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.**, v.110, p.413–422.

SEGATTO, F.B. et al. (2004). Técnica para o estudo da anatomia da epiderme foliar de batata. **Revista Ciência Rural**, v.34, n.5, p1597-1601. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782004000500042>

SOARES, A.S. et al. (2007). Adaxial/abaxial specification in the regulation of photosynthesis and stomatal aperture in relation to light orientation and growth with CO₂ enrichment in the C₄ species *Paspalum dilatatum*. **New Phytologist Foundation**, v.177, n.1, p.186-198. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02218.x>

SCHNEIDER, CA.; RASBAND, W.S.; ELICEIRI, K.W. (2012). NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, v.9, p.671–675.

SUÁREZ PADRÓN, I. E., & OTERO, R. (2016). Absciscic acid and sucrose affect *in vitro* tuber formation in yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) plants. *Temas Agrarios*, v.21, n.1, p.9-17. <https://doi.org/10.21897/rta.v21i1.866>

TAHSEEN, S., SHAHZAD, A., & WASI, A. (2023). Direct organogenesis, physiochemical evaluation, chemical characterization and genetic uniformity analysis through SCoT marker in *Celastrus paniculatus* (Willd.): A medicinally important plant. *Industrial Crops and Products*, v.206, 117664. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117664>

TENG, N. et al. (2006). Elevated CO₂ induces physiological, biochemical and structural changes in *Arabidopsis thaliana* leaves. **New Phytologist Foundation**, v.216, n.1, p.720-727. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01818.x>

UPRETY, D. et al. (2001). Effect of high CO₂ concentration on the leaf structure of *Brassica Juncea* under water stress. **Plantarum Biology**, v.44, p.149–152. <https://doi.org/10.1023/A:1017959429783>

VERMA, P. et al. (2025). Modeling the Impact of Direct Air Capture on Forest Biomass and Population Dynamics. **Earth Systems and Environment**. Acesso em: 28 de junho de 2025. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s41748-025-00599-x#citeas>.

Vollmer, R. *et al.* (2024). Effect of as exchange rate, vessel type, planting density, and genotype on growth, photosynthetic activity, and ion uptake of *in vitro* Potato Plants. **Plants (Basel)**, v.13, n.19, p.2830. <https://doi:10.3390/plants13192830>

WATANABE, Y. et al. (2008). Effects of elevated CO₂ and nitrogen levels on wood structure related to water transport in seedlings of two deciduous broadleaf tree species. **Trees**, v.22, p.403–411. <https://doi.org/10.1007/s00468-007-0201-8>

WELLBURN, A.R. (1994). The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v.144, n.3, p.307–313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)

WOLBERG, S. et al. (2024). High temperatures induce phloem investment and increase sucrose accumulation in grapevines. **Trees**, v.38, p.1151–1159. <https://doi.org/10.1007/s00468-024-02542-5>

YOON, Y. J., MOBIN, M., HAHN, E. J., & PAEK, K. Y. (2009). Impact of *in vitro* CO₂ enrichment and sugar deprivation on acclimatory responses of Botan Botany, Phalaenopsis plantlets to *ex vitro* conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v.65, n.2-3, p.183-188. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.08.001>

XU, Z. et al. (2016). Elevated-CO₂ response of stomata and its dependence on environmental factors. **Frontiers in plant science**, v.7, p.657. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00657>

ZHENG, Y. et al. (2019). High CO₂ concentrations induce negative regulation of photosynthesis with changes in leaf structure, non-structural carbohydrates and nitrogen content of soybeans. **BMC Plant Biology**, v.19, 255. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1788-9>



Emitido em 30/09/2025

DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS Nº 7430/2025 - DPARQ (11.14.68.07.05)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 30/03/2026 14:18)

RONALD SILVA DIAS

CHEFE DIVISAO

839738

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sis.sig.uema.br/documentos/> informando seu número:
7430, ano: **2025**, tipo: **DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS**, data de emissão: **30/03/2026** e o código de
verificação: **68b1171fbf**

