



Uema
UNIVERSIDADE ESTADUAL
DO MARANHÃO



PPGCIAG
Programa de Pós-Graduação
em Ciências Agrárias - UEMA

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

NAHOR DANIEL RIBEIRO DINIZ

ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE *Cedrela fissilis* Vellozo GERMINADA *in vitro* SOB CONDIÇÕES DE VENTILAÇÃO NATURAL

São Luís - MA
2025

NAHOR DANIEL RIBEIRO DINIZ

ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE *Cedrela fissilis* Vellozo GERMINADA *in vitro* SOB CONDIÇÕES DE VENTILAÇÃO NATURAL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – PPGIAG/CESBA/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias.
Orientador (a): Prof. Dr. Weverton Pereira Rodrigues
Coorientadora: Dra. Anyela Rios

São Luís - MA
2025

Diniz, Nahor Daniel Ribeiro

Aspectos fisiológicos de *Cedreia fissilis* Vellozo germinada in vitro sob condições de ventilação natural / Nahor Daniel Ribeiro Diniz. – São Luis, MA, 2025.

73f

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

Orientador: Prof. Dr. Weverton Pereira Rodrigues

Coorientador: Prof. Dra. Anyela Rios

1.Fotomixotrófico. 2.Fotoautotrófico. 3.Sacarose. 4.Cedro rosa. I.Título.

CDU: 631.53.02

NAHOR DANIEL RIBEIRO DINIZ

ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE *Cedrela fissilis* Vellozo GERMINADA *in vitro* SOB CONDIÇÕES DE VENTILAÇÃO NATURAL

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

Orientador (a): Prof. Dr. Weverton Pereira Rodrigues

Coorientador: Dra. Anyela Rios

Aprovada em 10/10/2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Weverton Pereira Rodrigues (Orientador)

Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão (UEMASUL)

Prof^a. Dr^a Thais Roseli Corrêa

Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

Prof^a. Dr^a Ellen de Moura Vale

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF)

Dedico este trabalho à memória de minha querida avó, Nizeth Oliveira Ribeiro (*in memoriam*), que, com seu amor, valores e exemplo de vida, permanece sendo uma fonte inesgotável de força e inspiração. Sua dedicação, generosidade e fé me ensinaram a perseverar e acreditar nos meus sonhos.

Cada conquista alcançada é também fruto do caminho que a senhora ajudou a construir em minha vida. Esta vitória é, acima de tudo, sua.

*"O verdadeiro saber está em ser humilde e repartir
aquilo que se aprende"*
Mestre Irineu

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pela oportunidade de viver esta experiência de aprendizado e pelo amparo constante ao longo de todo este processo.

Registro meus mais profundos agradecimentos aos meus orientadores, Dr. Werveton Pereira Rodrigues e Dra. Anyela Rios, pela dedicação em acompanhar cada etapa deste trabalho. Sua paciência, orientação segura, disponibilidade e palavras de incentivo foram fundamentais para que esta pesquisa se concretizasse.

À minha família, pelo amor, apoio incondicional e exemplo de força: minha mãe, Rejane Oliveira Ribeiro; meu pai, Márcio Augusto Ayres Diniz; meus irmãos, Bruno Nathaniel Ribeiro Diniz e Thiago Cristian Ribeiro de Anchieta; minha irmã, Rebecca Ribeiro Diniz; meu tio Francisco Dantas Ribeiro e aos meus primos André Luiz Carvalho Ribeiro e Rafael Carvalho Dantas Ribeiro. E, de maneira muito especial, à minha querida avó, Nizeth Oliveira Ribeiro (*in memoriam*), que, com sua honra e suporte em cada fase da minha vida, continua sendo inspiração e alicerce para minhas conquistas.

Aos meus amigos, pela presença, incentivo e pelas valiosas trocas de ideias que tornaram esta caminhada mais leve e enriquecedora, representados por Matheus Henrique Felipe Lima, Tamires de Moura Lima, Adriely Sá, Fernanda Oliveira, Thayanna Vieira Costa e Cinthya Veras de Aguiar da Silva.

À Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), ao Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT), ao Laboratório de Ciências Ambientais e Biodiversidade (LCAB) e à Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA), pelo apoio institucional, pelos recursos disponibilizados e pelas condições que possibilitaram a execução deste trabalho.

Por fim, estendo minha gratidão a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa, seja com palavras de incentivo, gestos de apoio ou colaboração técnica e científica.

RESUMO

O desmatamento e o aumento do CO₂ atmosférico ameaçam espécies arbóreas valiosas como *Cedrela fissilis*, dessa forma, o cultivo *in vitro*, associado com ventilação natural em sistemas fotoautotróficos e fotomixotróficos, é uma alternativa para a sua conservação. Nesse contexto, torna-se relevante investigar como diferentes estratégias de cultivo *in vitro* podem impactar o desempenho dessa espécie sob condições controladas. Assim, este trabalho teve como objetivo estudar o efeito de sistemas fotoautotróficos e fotomixotróficos com ventilação natural sobre o desenvolvimento e características fisiológicas e anatômicas de plantas de *Cedrela fissilis* germinadas *in vitro*. Para isso, sementes de *C. fissilis* foram desinfestadas e inoculadas *in vitro* sob diferentes condições de crescimento, e foram realizados dois experimentos: E-I) realizado em esquema fatorial 2x2x2, em que foram avaliadas as concentrações de sacarose (0 ou 20 g L⁻¹), ágar (0 ou 5,5 g L⁻¹) e membranas porosas (Sem e Com), foram realizadas análises de germinação (% de germinação, % de plântulas formadas, tempo médio de germinação (TMG) e tempo médio da formação de plântula (TMFP), análises de crescimento (comprimento do hipocótilo, da parte aérea e da raiz primária, o número de folhas, nós e raízes), teores de pigmentos fotossintéticos e análises anatômicas (micromorfometria); E-II) em esquema fatorial 2 x 2, com membranas porosas (2 ou 4), concentração de CO₂ – [CO₂] (420 ou 800 ppm), foram realizados as mesmas análises de crescimento e fisiológicas feitas no E-I, além dessas, foram adicionadas análises fisiológicas (conteúdo relativo de água). No E-I evidenciou-se que a presença da membrana porosa estimulou o desenvolvimento das plântulas em ambos os meios de cultura, com destaque para o meio semissólido, que proporcionou plantas com crescimento superior e coloração verde intensa das folhas, mesmo sem adição de sacarose. A suplementação com sacarose (20 g L⁻¹) proporcionou o melhor desenvolvimento das plantas, especialmente quando combinada com as membranas, que resultou em plantas com maior massa fresca e seca da parte aérea e raízes, aumento no comprimento do hipocótilo e parte aérea, maior número de nós e raízes, e incremento da área foliar. Adicionalmente, a membrana aumentou significativamente as concentrações de clorofila b e carotenoides em plantas de *Cedrela fissilis*. No E-II, o aumento da [CO₂] para 800 ppm e a maior permeabilidade das membranas (4 membranas) promoveram plantas com crescimento superior da parte aérea, com maior biomassa seca e área foliar, além de aumento no número de raízes laterais. O comprimento da maior raiz e o diâmetro do caule das plantas não foram afetados, enquanto o diâmetro radicular variou conforme a interação entre CO₂ e permeabilidade. Os parâmetros fotoquímicos permaneceram estáveis (Fv/Fm, Fv/F0, RC/ABS e PI), o que indica manutenção da funcionalidade do fotossistema II. O teor de clorofila a e total foi superior com aumento da [CO₂] e permeabilidade, enquanto a clorofila b não foi alterada. Os carotenoides apresentaram resposta variável, com redução em alta permeabilidade e CO₂ elevado. A combinação do uso de membranas porosas com o meio semissólido, sacarose e o aumento da [CO₂] para 800 ppm, junto com maior permeabilidade das membranas, promoveu crescimento superior, maior biomassa e melhor desenvolvimento fisiológico em *C. fissilis* no cultivo *in vitro*, sem afetar a função fotoquímica. Essas estratégias otimizam o ambiente de cultivo, e favorece a micropropagação e aclimatação da espécie.

Palavras- chave: fotomixotrófico; fotoautotrófico; sacarose; Cedro rosa.

ABSTRACT

Deforestation and rising atmospheric CO₂ levels threaten valuable tree species such as *Cedrela fissilis*. In this context, in vitro culture associated with natural ventilation in photoautotrophic and photomixotrophic systems represents a promising alternative for its conservation. Therefore, it is relevant to investigate how different in vitro cultivation strategies may affect the performance of this species under controlled conditions. This study aimed to evaluate the effects of photoautotrophic and photomixotrophic systems with natural ventilation on the development and physiological and anatomical characteristics of *C. fissilis* plants germinated in vitro. Seeds were disinfected and inoculated under different growing conditions, and two experiments were conducted: (E-I) a 2 × 2 × 2 factorial design evaluating sucrose concentrations (0 or 20 g L⁻¹), agar (0 or 5.5 g L⁻¹), and porous membranes (absence or presence). Germination parameters (% germination, % seedling formation, mean germination time—MGT, and mean seedling formation time—MSFT), growth traits (hypocotyl, shoot and primary root length; number of leaves, nodes, and roots), photosynthetic pigment contents, and anatomical traits (micromorphometry) were assessed. (E-II) a 2 × 2 factorial design evaluating the number of porous membranes (2 or 4) and CO₂ concentration ([CO₂], 420 or 800 ppm). The same growth and physiological analyses as in E-I were performed, with the addition of relative water content (RWC). In E-I, the presence of porous membranes enhanced seedling development in both culture media, particularly in the semisolid medium, which produced plants with superior growth and intense leaf greening even without sucrose supplementation. Sucrose supplementation (20 g L⁻¹) promoted improved plant development, especially when combined with membranes, resulting in greater fresh and dry biomass of shoots and roots, increased hypocotyl and shoot length, higher numbers of nodes and roots, and greater leaf area. Additionally, the membrane significantly increased chlorophyll b and carotenoid concentrations in *C. fissilis* plants. In E-II, increasing [CO₂] to 800 ppm and higher membrane permeability (four membranes) promoted greater shoot growth, higher dry biomass, larger leaf area, and increased numbers of lateral roots. Maximum root length and stem diameter were not affected, whereas root diameter varied depending on the interaction between CO₂ and permeability. Photochemical parameters (Fv/Fm, Fv/F₀, RC/ABS, and PI) remained stable, indicating preserved photosystem II functionality. Chlorophyll a and total chlorophyll contents increased with higher [CO₂] and permeability, whereas chlorophyll b remained unchanged. Carotenoids showed variable responses, with reductions under high permeability and elevated CO₂. Overall, combining porous membranes with semisolid medium, sucrose supplementation, elevated [CO₂] (800 ppm), and higher membrane permeability enhanced growth, biomass accumulation, and physiological performance of *C. fissilis* in vitro without impairing photochemical function. These strategies optimize the cultivation environment and support the micropropagation and acclimatization of the species.

Key words: photomixotrophic; photoautotrophic; sucrose; pink cedar.

LISTA DE SIGLAS

μm - Micrometro

C. fissilis – *Cedrela fissilis*

Ci- Concentração interna de CO₂

CO₂- Dióxido de carbono

CPA- Comprimento da parte aérea

DRA - Diâmetro da raiz

E- Transpiração

F_v/F₀- Eficiência de transferência de elétrons no fotossistema II

F_v/F_m- Rendimento quântico máximo do fotossistema II

Gs- Condutância estomática

MSPA - Massa seca da parte aérea

MSRA- Massa seca da raiz (msra)

NLRA- Número de raízes laterais

PI- Índice de desempenho

Ppm- Parte por milhão

RC/ABS -Energia absorvida por centro de reação ativo

UR- Umidade relativa

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Parâmetros de germinação das sementes de *Cedrela fissilis* germinadas *in vitro* sob fatores distintos de sacarose (0 e 20 g L⁻¹), consistência do meio (líquido e semissólido) e vedação (0 e 1 membrana)..... 33
- Figura 2:** Plantas de *Cedrela fissilis* germinadas *in vitro* sob fatores distintos de sacarose (0 e 20 g L⁻¹), consistência do meio (líquido e semissólido) e vedação (0 e 1 membrana).. 36
- Figura 3:** Parâmetros de crescimento avaliados em plantas de *Cedrela fissilis* germinadas *in vitro* sob fatores distintos de sacarose (0 e 20 g L⁻¹), consistência do meio (líquido e semissólido) e vedação (0 e 1 membrana)..... 38
- Figura 4:** Biomassa fresca e seca de plantas de *Cedrela fissilis* germinadas *in vitro* sob fatores distintos de sacarose (0 e 20 g L⁻¹), consistência do meio (líquido e semissólido) e vedação (0 e 1 membrana). 39
- Figura 5:** Conteúdo de pigmentos fotossintéticos em plantas de *Cedrela fissilis* germinadas *in vitro* sob fatores distintos de sacarose (0 e 20 g L⁻¹), consistência do meio (líquido e semissólido) e vedação (0 e 1 membrana)..... 40
- Figura 6:** Interior da câmara climática para crescimento de plantas, com plântulas germinadas sob condições controladas de temperatura, umidade e fotoperíodo. Esquerda câmara mantida sem a presença de luz e a direita câmara mantida com luzes artificiais LEDs..... 56
- Figura 7:** Plantas de *C. fissilis* germinadas *in vitro* e mantidas em câmara climática de CO₂ sob diferentes níveis de trocas gasosas (2 e 4 membranas) e concentrações de CO₂ (800 e 450 ppm) por 45 dias. Tratamentos: 2 +800 (2 membranas +800 ppm de CO₂); 4+800 (4 membranas +800 ppm de CO₂); 2+450 (2 membranas +450 ppm de CO₂); 4+450 (4 membranas +450 ppm de CO₂)..... 60
- Figura 8:** Efeito da concentração de CO₂ (420 ppm e 800 ppm) e do número de membranas permeáveis a gases (duas e quatro) sobre características morfológicas e fisiológicas de plantas de *C. fissilis* cultivadas *in vitro*..... 62
- Figura 9:** Parâmetros fotossintéticos de plantas de *C. fissilis* cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de CO₂ (420 ppm e 800 ppm) e número de membranas permeáveis a gases (2 e 4 membranas).. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 10:** Teores de pigmentos fotossintéticos em plantas de *C. fissilis* cultivadas *in vitro* submetidas a diferentes concentrações de CO₂ (420 e 800 ppm) e números de membranas permeáveis a gases (2 e 4 membranas)..... 63

Figura 11: Diferença visual das plantas aclimatadas após retiradas da câmara climática de CO₂ e mantidas em estufa por 30 dias..... **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Descrição dos tratamentos aplicados no experimento I – germinação *in vitro* de *Cedrela fissilis* em condições fotomixotróficas e fotoautotróficas com ventilação natural.28
- Tabela 2:** Valores do teste F Valores do teste F para os efeitos principais (tipo de meio, concentração de sacarose e presença de membrana) e suas interações sobre variáveis relacionadas à germinação, desenvolvimento morfológico e biomassa de plântulas de *Cedrela fissilis* em cultivo *in vitro*. Valores com “**” indicam significância estatística ($p < 0,05$) e “ns” indica ausência de significância.35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	16
REFERÊNCIAS	19
Capítulo I.....	23
1. INTRODUÇÃO	24
2. OBJETIVOS	26
2.1 Geral	26
2.2. Específicos.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Desinfestação das sementes de <i>Cedrela fissilis</i>	26
3.2 Germinação <i>in vitro</i> de <i>Cedrela fissilis</i> em condições fotomixotróficas e fotoautotróficas, com ventilação natural.....	27
3.3. Análises de germinação	28
3.4. Análises de crescimento	28
3.5. Determinação de pigmentos fotossintéticos	28
3.6. Anatomia vegetal e análise micromorfométrica.....	29
3.7. Análises estatísticas	30
4. RESULTADOS.....	30
4.1. EFEITO DO MEIO, DA SACAROSE E MEMBRANA NA GERMINAÇÃO	30
4.2. EFEITO DO MEIO, DA SACAROSE E MEMBRANA NO CRESCIMENTO.....	33
4.3. EFEITO DO MEIO, DA SACAROSE E MEMBRANA NA ANATOMIA	40
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS	47
Capítulo II.....	52
1. INTRODUÇÃO	53
2. OBJETIVOS	54
2.2GERAL.....	54
2.3ESPECÍFICOS	54
3 MATERIAIS E MÉTODOS	55
3.1. DESINFESTAÇÃO DAS SEMENTES.....	55
3.2. GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>CEDRELA FISSILIS</i>	55
3.3. CULTIVO DE <i>CEDRELLA FISSILIS</i> EM CÂMARA CLIMÁTICA DE CRESCIMENTO DE PLANTAS	55

3.4. ANÁLISES DE CRESCIMENTO	56
3.5. DETERMINAÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS	56
3.6. CONTEÚDO RELATIVO DE ÁGUA (%).....	56
3.7. ANATOMIA VEGETAL	57
3.8. Índice estomático	57
3.9. ACLIMATAÇÃO DE <i>CEDRELA FISSILIS</i>	58
3.10. ANÁLISES DE FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA <i>A</i> EM PLANTAS ACLIMATADAS	58
3.11. TEOR DE CLOROFILA EM PLANTAS ACLIMATADAS	58
3.12. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	58
4 RESULTADOS.....	59
4.1. EFEITO DO NÚMERO DE MEMBRANAS E DA CONCENTRAÇÃO DE CO ₂ NO CRESCIMENTO... ..	59
4.2. PRODUÇÃO DE PIMENTOS FOTOSSINTÉTICOS SOB DIFERENTES SISTEMAS DE VEDAÇÃO ASSOCIADOS À CONCENTRAÇÃO DE CO ₂	63
4.3 O NÍVEL DE CO ₂ FORNECIDO E O SISTEMA DE VEDAÇÃO ALTERARAM A DENSIDADE ESTOMÁTICA NAS PLANTAS <i>IN VITRO</i>	64
4.4. EFEITO DO NÚMERO DE MEMBRANAS E DA CONCENTRAÇÃO DE CO ₂ NA FISIOLOGIA DE PLANTAS ACLIMATADAS.....	64
5 DISCUSSÃO	65
6 CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS	70

1. INTRODUÇÃO GERAL

O desmatamento e o aumento dos níveis de CO₂ na atmosfera impactam populações de plantas arbóreas de relevância comercial tanto no Brasil, quanto ao nível mundial (Faillace *et al.*, 2021; Brandão, 2023). Tais fenômenos contribuem para a redução das áreas florestais, o que promove alterações nos ecossistemas e diminui a disponibilidade de habitats adequados para o desenvolvimento dessas espécies (Laurance *et al.*, 2014). O aumento da concentração de [CO₂] pode afetar o crescimento e o desempenho das árvores, o que altera os padrões de produtividade e leva a desequilíbrios ecológicos que influenciam na biodiversidade e na economia florestal (Norby; Zak, 2011; Scheffers *et al.*, 2016; Börner *et al.*, 2014, Laffitte *et al.*, 2022). Em conjunto, estes processos põem em risco a sustentabilidade do principal bioma brasileiro.

As medidas de mitigação sugeridas para a agricultura configuram-se como ações de adaptação às mudanças climáticas. Tal fato ocorre porque o aumento do sequestro de carbono depende, primordialmente, da redução das perdas de nutrientes nos ecossistemas agrícolas, bem como do incremento no armazenamento de carbono no solo e nos tecidos de reserva das árvores (Smith; Olense, 2010). Manter alta produtividade e utilizar os recursos naturais, como terra e água, de maneira mais eficiente são objetivos essenciais, assim como promover o sequestro de carbono (Madari *et al.*, 2018).

Uma alternativa viável para mitigar o aumento dos gases do efeito estufa é a fixação do carbono atmosférico por meio do reflorestamento em grande escala, uma vez que as florestas são grandes sequestradoras de carbono (Cerri *et al.* 2004; Domke *et al.*, 2020; Wallwork *et al.*, 2022). Por outro lado, o desmatamento contribui para o aumento do efeito estufa, pois, com a redução da população arbórea, há maior [CO₂] na atmosfera, o que intensifica o aquecimento global.

A maior parte do sequestro de carbono atmosférico ocorre por meio de organismos fotossintetizantes, como plantas, plânctons, algas marinhas e bactérias, os quais utilizam a energia solar e o CO₂ para sintetizar carboidratos para a sua sobrevivência (Assad *et al.*, 2019). Contudo, a propagação de plantas arbóreas de interesse comercial em ambientes naturais pode ser comprometida, devido à fragmentação e perda dos habitats e às mudanças climáticas, o que resulta em populações isoladas e menos e com menos capacidade de multiplicação vegetativa. Consequentemente, a redução de áreas florestais contínuas dificulta a dispersão de sementes e o estabelecimento de mudas (Fahrig 2003; Haddad *et al.*, 2015).

Esse cenário de isolamento e redução da diversidade genética não afeta apenas a regeneração natural das florestas, mas também intensifica a vulnerabilidade de determinadas

espécies. Muitas delas, já pressionadas pela exploração madeireira e pela perda de habitat, encontram-se em categorias de ameaça, o que demanda atenção especial para sua conservação (Ramírez-Delgado et al., 2022). Entre as espécies ameaçadas está o cedro-rosa (*Cedrela fissilis*), também conhecido como Cedro-do-Brasil (Laurance et al., 2014), incluído nessa categoria principalmente devido à exploração intensiva de sua madeira e à perda de habitat causada pelo desmatamento. *C. fissilis* é uma espécie de grande importância econômica, utilizada na indústria madeireira, em projetos paisagísticos, na recuperação de áreas degradadas e na construção naval e aeronáutica (Gandara et al., 2014). Por isso, estratégias para a sua conservação devem ser adotadas.

O principal meio de propagação desta espécie é por meio de sementes, que são aladas, estreitas lateralmente, e podem atingir comprimento de 35 mm e largura de 15 mm (Carvalho; Amâncio, 2002). O conhecimento das características das sementes de cedro-rosa é fundamental para definir a melhor forma de utilizá-las. O manejo de sementes de espécies florestais apresenta diversas dificuldades, o que torna imprescindível o desenvolvimento de técnicas adequadas para a produção, manipulação e análise da viabilidade das sementes, com o objetivo de obter plantas de alta qualidade em tempo reduzido (Martins; Lago, 2008). A produção de sementes de cedro-rosa ocorre de forma irregular e, em condições naturais, apresenta baixa longevidade. Dessa maneira, o desenvolvimento de técnicas que acelerem e aprimorem o processo de germinação é essencial para a propagação eficiente da espécie (Kissmann *et al.*, 2011).

Apesar das vantagens de comercialização de mudas clonais, a produção de mudas de *C. fissilis* é majoritariamente realizada por sementes dentro de viveiros comerciais, entretanto existem viveiros que utilizam propagação de plantas por estacas, mini estacas e micropropagação (Junior et al., 2021; Rosa et al., 2021). Entre as estratégias de propagação de espécies vegetais pode-se citar o cultivo *in vitro*, o qual é um conjunto de técnicas que possibilita a superação de desafios associados à propagação natural e à conservação de plantas ameaçadas de extinção, constituindo-se numa ferramenta biotecnológica valiosa para propagar e preservar espécies arbóreas, como *C. fissilis*, em condições controladas (Bonfá, 2019). Além disso, a germinação e propagação *in vitro* de diversas espécies têm sido aprimoradas por meio do uso de ventilação natural, com a aplicação de membranas porosas, que favorecem a troca gasosa entre o ambiente interno do recipiente e o externo (Silveira *et al* 2022).

O cultivo *in vitro* de *C. fissilis* pode ser aprimorado por meio da utilização de sistemas fotoautotróficos ou fotomixotróficos com ventilação natural, o que depende das condições específicas de crescimento e dos objetivos do cultivo. A ventilação natural emprega recursos

naturais como correntes de ar e ventilação passiva, e contribui para a redução dos custos operacionais associados ao cultivo *in vitro*. Trata-se de um método simples, que pode ser implementado em instalações com acesso adequado à ventilação natural, como estufas ou salas de cultivo bem ventiladas. Esse tipo de ventilação oferece um ambiente mais próximo das condições naturais, o que pode favorecer o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Bellintani *et al.*, 2007; Lazzarini *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2014).

No cultivo fotomixotrófico o carbono que a planta precisa é disponibilizado a partir do CO₂ atmosférico, e pela adição de carboidratos como a sacarose ao meio de cultura. Por outro lado, o cultivo fotoautotrófico é caracterizado pelo crescimento das plantas *in vitro* sem a adição de açúcares ao meio de cultura (Kozai; Kubota, 2005; Souza *et al.*, 2023). O sistema fotoautotrófico, associado a sistemas de ventilação que promovam a taxa adequada de trocas gasosas entre o ambiente externo e o microambiente *in vitro*, favorece o desenvolvimento de estruturas foliares mais funcionais, como estômatos ativos e cutículas mais espessas, além de um sistema fotossintético mais eficiente. Isso resulta em plantas com maior qualidade fisiológica e sobrevivência durante a aclimação *ex vitro*, que podem chegar a taxas próximas de 100% (Miranda, 2018; Souza *et al.*, 2023).

Para otimizar o cultivo fotoautotrófico, além de eliminar a sacarose do meio, são adotadas estratégias como o aumento da concentração de CO₂ e da intensidade luminosa, ventilação dos frascos para melhorar as trocas gasosas e uso de suportes porosos no lugar do ágar (Miranda, 2018). Esse sistema depende das condições específicas de cultivo e dos objetivos do programa de propagação e conservação da espécie.

Estudos recentes com *Cedrela fissilis in vitro* abrangem análises fisiológicas, bioquímicas e proteômicas que detalham fatores que modulam o desenvolvimento das plantas, como o estudo de Ribeiro *et al.* (2024), que investigaram o efeito do ácido 2,3,5-triidobenzoico, que demonstrou alterar níveis endógenos de poliaminas e de AIA, além de modificar o perfil proteômico durante a propagação *in vitro*, evidenciando sua influência sobre sinais hormonais e rotas metabólicas essenciais ao crescimento. Aragão *et al.* (2023), estudaram a inibição da síntese de putrescina e os resultados apontaram para uma má formação de brotos diante da redução dessa poliamina, que elucida a importância do metabolismo de poliaminas na regeneração *in vitro*.

Pesquisas voltadas ao estabelecimento de protocolos práticos de micropropagação também foram conduzidas, com ênfase em condições de cultivo, composição do meio, multiplicação de brotos e enraizamento, oferecendo bases aplicáveis para produção de mudas e conservação da espécie (BONFÁ, 2021).

Diante do panorama apresentado, torna-se evidente que a conservação de *C. fissilis* depende do desenvolvimento de técnicas de propagação eficientes que assegurem a produção de mudas viáveis e de alta qualidade. O gargalo central explorado neste estudo está na otimização do cultivo *in vitro* de *C. fissilis*, especialmente por meio da adoção de sistemas fotoautotróficos associados à ventilação natural, os quais podem reduzir custos, melhorar o desempenho fisiológico das plantas e aumentar as taxas de sobrevivência durante a aclimação. Dessa forma, a pesquisa buscou avançar na superação das limitações da propagação natural da espécie, e oferecer alternativas biotecnológicas que conciliem conservação e produção sustentável.

REFERÊNCIAS

- Aragão, V. P. M; Sousa, K. R. de; Oliveira, T. dos R. de; De Oliveira, L. F; Floh, E. I. S; Silveira, V; Santa-Catarina, C. (2023). The inhibition of putrescine synthesis affects the *in vitro* shoot development of *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) by altering endogenous polyamine metabolism and the proteomic profile. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 152(2): 377-392. https://ui.adsabs.harvard.edu/link_gateway/2023PCTOC.152..377A/doi:10.1007/s11240-022-02414-1
- Assad, E. D; Martins, S. C; Cordeiro, L. A. M; Evangelista, B. A. (2019). **Sequestro de carbono e mitigação de emissões de gases de efeito estufa pela adoção de sistemas integrados**. Embrapa, Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1113072/sequestro-de-carbono-e-mitigacao-de-emissoes-de-gases-de-efeito-estufa-pela-adocao-de-sistemas-integrados>. Acesso em: 10 jun., 2024.
- Bellintani, M. C; Lima, C. C; Brito, A. L; Santana, J. R. F. de; Dornelles, A. L. C. (2007). Efeito da ventilação *in vitro* na aclimatização de plantas micropropagadas de *Orthophyllum mucugense* Wand e Conceição. **Revista Brasileira de Biociências**, 5(2): 1098-1100.
- Bonfá, Y. S. **Propagação *in vitro* de *Cedrela fissilis* vell. uma espécie arbórea brasileira ameaçada de extinção**. (2019). Dissertação (Mestrado) – Curso de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Espírito Santo, Vitória, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufes.br/items/740040fd-7c60-43e2-ac18-0a71b17cfffdf>. Acesso em: 04 jan. 2025.
- Bonfá, Y. S; Nascimento, V. de L; Werner, E. T. (2021). In vitro multiplication of *Cedrela fissilis* Vell.: a threatened Brazilian hardwood forest tree. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, 17: e165. <https://doi.org/10.46526/pccm.2021.v17.165>
- Börner, J; Wunder, S; Wertz-Kanounnikoff, S; Hyman, G; Nascimento, N. (2014). Forest law enforcement in the Brazilian Amazon: Costs and income effects. **Global Environmental Change**, 29: 294-305. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2014.04.021>

Brandão, D. O. (2023). **Desmatamento na Amazônia e influência nos produtos florestais não-madeireiros de uso econômico local**. Tese (Doutorado) – Curso de Ciências Terrestres, Instituto de Pesquisas Espaciais (INPE), São João dos Campos, São Paulo, 2023. Disponível em: <http://mtc-m21d.sid.inpe.br/col/sid.inpe.br/mtc-m21d/2023/04.26.16.45/doc/publicacao.pdf>. Acesso em: 23. Ago. 2025.

Carvalho, L. C; Amâncio, S. (2002). Antioxidant defence system in plantlets transferred from *in vitro* to *ex vitro*: effects of increasing light intensity and CO₂ concentration. **Plant Science**, 162: 33-40.

Cerri, C. C; Cerri, C. E; Davidson, E. A; Bernoux, M. (2004). A ciência do solo e o sequestro de carbono. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 29(3): 29-34.

Domke, G. M; Oswalt, S. N; Walters, B. F; Morin, R. S. (2020). Tree planting has the potential to increase carbon sequestration capacity of forests in the United States. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 117(40):24649-24651. <https://doi.org/10.1073/pnas.2010840117>

Fahrig, L. (2003). Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, 34, 487-515. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132419>

Faillace, C. A; Sentis, A; Montoya, J. M. (2021). Eco-evolutionary consequences of habitat warming and fragmentation in communities. **Biological Reviews**, 96(5):1933-1950. <https://doi.org/10.1111/brv.12732>

Gandara, F. B; Tambarussi, E. V; Sebbenn, A. M; Ferraz, E. M; Moreno, M. A; Ciampi, A.Y; Vianello, R. P; Grattapaglia, D; Kageyama, P.Y. (2014) Development and characterization of microsatellite loci for *Cedrela fissilis* Vell (Meliaceae), an endangered tropical tree species. **Silvae Genetica**, 63(5): 240-243. <https://doi.org/10.1515/sg-2014-0031>

Haddad, N. M; Brudvig, L. A; Clobert, J; Davies, K. F; Gonzalez, A; Holt, R. D; Lovejoy, T. E; Sexton, J. O; Austin, M. P; Collins, C. D; Cook, W. M; Damschen, E. I; Ewers, R. M; Foster, B. L; Jenkins, C. N; King, A. J; Laurance, W. F; Levey, D. J; Margules, C. R; Melbourne, B. A; Nicholls, A. O; Orrock, J. L; Song, D. X; Townshend, J. R. (2015). Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. **Science Advances**, 1(2): e1500052. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500052>

Junior, C. F. dos S; Rech, T. D; Navroski, M. C; Boff, P; Boff, M. I. C. (2021). Vegetative rescue of *Cedrela fissilis* Vell. By rooting of cutting from epicormic and canopy sprouts. **Ciência Rural**, 51(8): e20200775. <http://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200775>

Kissmann, C; Scalon, S. P. Q; Scalon Filho, H; Vieira, M. C. (2011). Biorregulador e pré-condicionamento osmótico na germinação de sementes e no crescimento inicial de mudas de carobinha (*Jacaranda decurrens* subsp. *symmetrifoliolata* Farias & Proença) – Bignoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 13(1): 58-67. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000100009>

Laffitte, B; Seyler, B.C; Wang, W; Li, P; Du, J; Tang, Y. (2022). Declining tree growth rates despite increasing water-use efficiency under elevated CO₂ reveals a possible global

overestimation of CO₂ fertilization effect. **Heliyon**, 8(10): e11219. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11219>

Laurance, W. F; Sayer, J; Cassman, K. G. (2014). Agricultural expansion and its impact on tropical nature. **Trends in Ecology & Evolution**, 29(2): 107-116. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.12.001>

Lazzarini, L. E. S; Bertolucci, S. K. V; de Carvalho, A. A; Santiago, A. C; Pacheco, F. V; Yucesan, B; Pinto, J. E. B. P. (2019). Explant type and natural ventilation systems influence growth and content of carvacrol and thymol of *Lippia gracilis* Schauer. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, 137: 33 – 43. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-01548-5>

Madari, B. E; Cuadra, S. V; Oliveira, P. P. A; Higa, R. C. V; Ramos, N. P; Andrade, C. A. de; Kemenes, A; Gondim, R. S. (2018) O papel da agricultura na mitigação das emissões de gases de efeito estufa. **Ação contra a mudança global do clima**, Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio do Goiás, p 59-68, cap 5, 2018

Martins, L; Lago, A. A (2008). Conservação de sementes de *Cedrela fissilis*: Teor de água da semente e temperatura do ambiente. **Revista Brasileira de Sementes**, 30(1): 161-167. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222008000100020>

Miranda, N. A. (2018). **Jardim clonal in vitro na progagação vegetativa de *Eucalyptus* spp.** 2018, 100f. Tese (Doutorado em Ciências Vegetal), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG.

Norby, R. J; Zak, D. R. (2011). Ecological lessons from free-air CO₂ enrichment (FACE) experiments. **Annual Review of Ecology Evolution and Systematics**, 42: 181-203. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102209-144647>

Ramírez-Delgado, J.P.; Di Marco, M.; Watson, J.E.M.; Johnson, C.J.; Rondinini, C.; Llano, X.C.; Arias, M., Venter, O. (2022). Matrix condition mediates the effects of habitat fragmentation on species extinction risk. **Nature Communications** 13: 595. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28270-3>

Ribeiro, Y. R. de S; Aragão, V. P. M; Santos, K. R. de; Macedo, A. F; Floh, E. I. S; Silveira, V; Santa-Catarina, C. (2024). 2,3,5-triiodobenzoic acid affects the in vitro propagation of *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) through alterations in endogenous polyamine and indol-3-acetic acid levels and the proteomic profile. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 156(25). <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02639-8>

Rosa, S. D. dos S; Schwartz, E; Cassana, F. F; Galli, L. (2021). Production of cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) seedlings using agro-industrial waste. **Research, Society and Development**, 10(1): e1410111267. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i1.11267>

Scheffers, B.R; Meester, L. de; Brigde, T.C.L; Hoffmann, A.A; Pandolfi, J.M; Corlett, R.T; Butchart, S.H.M; Pearce-Kelly, P; Kovacs, K.M; Dudgeon, D; Pacifici, M; Rondinni, C; Foden, W.B; Martin, T.G; Mora, C; Bickford, D; Watson, J. E. M. (2016). The broad footprint of climate change from genes to biomes to people. **Science**, 354: aaf7671. <https://doi.org/10.1126/science.aaf7671>

Silveira, A. A. da C; Silva, L. C. da; Sibov, S. T. (2022). Germinação *in vitro* de *Dipteryx alata* Vogel (Fabaceae) e proliferação de brotos sob sistema de ventilação convencional e natural. **Ciência Florestal**, 32(2): 996–1010. <https://doi.org/10.5902/1980509841400>

Silva, A. B. da; Correa, V. R. S; Togoro, A. H; Silva, J. A. dos S. (2014). Efeito de luz e do Sistema de ventilação natural em abacaxizeiro (Bromeliaceae) micropropagado. **Bioscience Journal**, 30(2): 380 – 386.

Smith, P; Olesen, J. E. (2010). Synergies between the mitigation of, and adaptation to, climate change in agriculture. **The Journal of Agricultural Science**, 148(5):543-552. <https://doi.org/10.1017/S0021859610000341>

Souza, L. M. de; Barbosa, M. R; Nascimento, K. R. P; Fonseca, P. T; Houllou, L. M. (2023). Cultivo fotoautotrófico e fotomixotrófico de plantas *in vitro*: uma revisão sistemática sobre o uso da técnica e suas implicações na produção de mudas de espécies arbóreas. **Multidisciplinary Sciences Reports**, 3(3), 1–20. <https://doi.org/10.54038/ms.v3i3.42>

Wallwork, A; Banin, L. F; Dent, D. H; Skiba, U; Sayer E. (2022). Soil carbon storage is related to tree functional composition in naturally regenerating tropical forests. **Functional Ecology**, 36(12):3175-3187. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.14221>

Capítulo I

Aspectos fisiológicos de *Cedrela fissilis* Vellozo propagada *in vitro* sob condições fotomixotróficas e fotoautotróficas e com ventilação natural

1. INTRODUÇÃO

Cedrela fissilis Vell., popularmente conhecida como cedro-rosa, é uma espécie arbórea pertencente à família Meliaceae, amplamente distribuída em formações florestais da América do Sul, o que inclui as Florestas Ombrófilas Densa e Submontana. Trata-se de uma planta heliófita facultativa, adaptável a solos férteis e bem drenados, com valor ecológico e econômico significativo, especialmente por sua madeira nobre, utilizada na fabricação de móveis, instrumentos musicais e artesanato (Carvalho, 2003; Otalakovski *et al.*, 2021; Cusatis, 2014). No entanto, o crescimento moderado da espécie e sua exploração predatória têm resultado em ameaças crescentes à sua conservação, o que torna urgente a adoção de estratégias eficazes para sua propagação e preservação (Krainovic *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2009; Paredes-Villanueva *et al.*, 2016).

Nesse contexto, o cultivo *in vitro* surge como uma alternativa promissora para a propagação e conservação de espécies ameaçadas, como a *C. fissilis*, isso porque a produção de mudas em viveiros possui entres como baixa produção de sementes, falta de mão de obra qualificada, e infraestrutura (Freire *et al.*, 2022; Guimarães *et al.*, 2024). A técnica de micropropagação permite a multiplicação de indivíduos geneticamente idênticos, sob condições assépticas e controladas, e reduzir a pressão sobre populações naturais (Trazzi *et al.*, 2019).

Entre os sistemas utilizados para a cultura de tecidos vegetais, destacam-se os fotomixotróficos e fotoautotróficos, cada um com características próprias de condução do cultivo. O sistema fotomixotrófico é o mais utilizado convencionalmente e se caracteriza pela presença de sacarose no meio de cultura como fonte de carbono exógena, além do CO₂ atmosférico e luz artificial (Kozai; Kubota, 2005). A sacarose, nesse caso, é fundamental para o fornecimento de energia metabólica, principalmente em espécies com limitada capacidade fotossintética *in vitro* (Costa Nunes *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2022). Entretanto, o cultivo fotomixotrófico apresenta desafios consideráveis, especialmente relacionados à limitação das trocas gasosas nos recipientes, o que compromete o desenvolvimento pleno da planta. O excesso de umidade, a baixa concentração de CO₂ e a ventilação restrita nesse sistema resultam em tecidos com baixa funcionalidade fotossintética, turgidez excessiva e anatomia foliar alterada (Cha-um *et al.*, 2011; Pospíšilová *et al.*, 1999). Isso afeta negativamente a germinação e multiplicação *in vitro* e, sobretudo, a sobrevivência das plantas durante a aclimação, etapa crítica em que as plântulas são transferidas do ambiente estéril para o ambiente natural (Souza *et al.*, 2023).

Diante dessas limitações, o cultivo fotoautotrófico tem se destacado como uma alternativa viável. Esse sistema se caracteriza por eliminar a sacarose do meio de cultura e

promover o uso de luz e CO₂ como fontes de energia e carbono, o que exige o uso de maiores níveis de irradiância e técnicas que favoreçam a ventilação dos recipientes, como membranas porosas e sistemas de ventilação forçada (Kozai; Kubota, 2005; Saldanha et al., 2012). De fato, estudos demonstraram que plantas cultivadas sob condições fotoautotróficas apresentaram maior robustez morfológica (maior número de folhas formadas, maior tamanho do hipocótilo) e aumento da biomassa e da taxa de sobrevivência na aclimatização (Barbosa, 2016; Batista et al., 2017). Contudo, a eficácia desse sistema depende da capacidade autotrófica da espécie, entretanto nem todas as espécies respondem de forma satisfatória à ausência de sacarose (Souza et al., 2020; Gago et al., 2021).

Um estudo com abacaxizeiro cv. Pérola demonstrou que a redução da concentração de sacarose de 30 g L⁻¹ para 10 g L⁻¹, associada ao uso de membranas permeáveis a gases nos frascos, promoveu maior crescimento da parte aérea, área foliar, massa fresca e índices fotossintéticos superiores, mesmo sem aumento significativo na assimilação fotossintética de carbono, entretanto a eliminação total da sacarose, mesmo com ventilação adequada, não foi suficiente para a produção de biomassa nessa espécie, o que indica que o cultivo fotomixotrófico é mais indicado para o abacaxizeiro *in vitro* (Alves, 2021). Portanto, a adição de um pequeno percentual de sacarose ao meio de cultura, que transforme o sistema de fotoautotrófico para fotomixotrófico, promove um aumento significativo nos teores de pigmentos fotossintéticos e confere maior resistência das mudas a fatores abióticos durante a aclimatização (Souza et al., 2023). Outros estudos apontam que a redução da sacarose, ventilação dos frascos e aumento da qualidade e intensidade da luz estimulam a capacidade fotossintética das plantas cultivadas *in vitro*, o que resulta em mudas mais rústicas e com melhor adaptação à aclimatização *ex vitro* (Couto et al., 2014). Portanto, compreender a dinâmica metabólica de cada espécie e a maneira que elas fazem o uso do carbono externo, seja ele proveniente da sacarose ou do CO₂ do ambiente é essencial para se obter sucesso nos protocolos de propagação (Silva et al., 2019; Silva et al., 2021).

Assim, o estabelecimento de protocolos eficientes para a germinação e micropropagação *in vitro* de *C. fissilis*, que avaliem os efeitos dos sistemas fotomixotrófico e fotoautotrófico, é essencial para otimizar seu cultivo e facilitar a posterior aclimatação. A superação das dificuldades técnicas relacionadas à baixa fotossíntese e à fragilidade estrutural das plantas cultivadas *in vitro* representa um passo importante na conservação e uso sustentável dessa espécie de alto valor ecológico e econômico.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar o efeito de sistemas fotoautotróficos e fotomixotróficos com ventilação natural sobre o desenvolvimento e características fisiológicas e anatômicas de plantas de *Cedrela fissilis* germinadas *in vitro*.

2.2. Específicos

- Determinar o efeito de sistemas fotoautotróficos e fotomixotróficos com ventilação natural sobre a germinação *in vitro* de sementes de *C. fissilis*;
- Verificar a influência da consistência do meio de cultura sobre a germinação de sementes e desenvolvimento das plantas de *C. fissilis*;
- Identificar possíveis adaptações morfológicas, anatômicas e fisiológicas de plantas *in vitro* de *C. fissilis* às condições de cultivo fotoautotrófica e fotomixotrófica, através da caracterização anatômica das folhas, raízes e caules.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT), em colaboração com o Laboratório de Ciências Ambientais e Biodiversidade (LCAB), ambos pertencentes à Universidade Estadual do Maranhão (UEMA).

3.1 Desinfestação das sementes de *Cedrela fissilis*

As sementes de *C. fissilis* (Cedro Rosa) foram adquiridas do distribuidor “Sementes Caiçara” (Brejo Alegre, São Paulo – Brasil) e armazenadas em geladeira a 4 °C no LCT. A desinfestação e inoculação das sementes seguiram a metodologia de Ríos-Ríos et al. (2019) e Aragão et al. (2015), com modificações. No LCT, o excesso da asa da semente foi eliminado com ajuda de tesoura e, em seguida, as sementes foram colocadas em contato com uma solução de detergente neutro por 30 minutos. Após esse período, a desinfestação foi realizada em câmara de fluxo laminar, que iniciou com a lavagem das sementes com água destilada estéril 6 vezes. Em seguida, foram realizadas as seguintes etapas, com lavagem com água destilada estéril de 3 a 6 vezes entre cada uma: i) hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5% de cloro ativo, foram adicionadas 4 gotas de Tween 20® (Isifar Ltda®, Duque de Caxias – RJ, Brasil) para cada 100 mL da solução, durante 7 minutos; ii) imersão em etanol (C₂H₆O) 70% por 2 minutos;

iii) repetição da etapa (i), com exposição das sementes por 20 minutos; iv) imersão em solução estéril de polivinilpirrolidona (PVP 500 mg L⁻¹) por 24 horas, no escuro a 25 °C.

No dia seguinte, em câmara de fluxo laminar, foram realizadas três lavagens com água destilada estéril. Em seguida, foram repetidas as etapas (ii) e (i), com tempo de exposição de 2 e 15 minutos, respectivamente. Após a desinfestação, as sementes foram mantidas em solução estéril de PVP 500 mg L⁻¹ enquanto foram inoculadas no meio de cultura, o excesso de solução foi retirado e foram colocadas as sementes sobre papel toalha estéril antes da inoculação.

3.2 Germinação *in vitro* de *Cedrela fissilis* em condições fotomixotróficas e fotoautotróficas, com ventilação natural

As sementes foram inoculadas, logo após a desinfestação, em tubos de vidro de 24 x 150 mm com 10 mL de meio Murashige e Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) com a metade da concentração de macro e micronutrientes (½ MS), suplementado com mio-inositol (100 mg L⁻¹) e vitaminas MS, neste meio de cultivo foram testadas duas concentrações de sacarose (0 e 20 g L⁻¹) (Isifar, Duque de Caxias, Brasil) e duas consistências do meio, líquido e semissólido gelificado com Agargel (5,5 g L⁻¹). O pH dos meios foi ajustado para 5,8 ± 0,03 antes de serem autoclavados a 121 °C e 108 kPa durante 15 minutos. Uma semente foi inoculada por tubo. Adicionalmente, duas condições de vedação foram testadas, foram utilizadas tampas de polipropileno sem membrana [taxa de troca de CO₂ (TTCO₂) de 1,33 µL L⁻¹ s⁻¹] e com uma membrana porosa elaborada conforme Saldanha et al. (2012), que cobrisse um orifício de 10 mm de diâmetro (TTCO₂ de 1,84 µL L⁻¹ s⁻¹) (Pinheiro et al., 2013). Finalmente, os tubos foram vedados com filme de PVC. O experimento foi realizado em esquema fatorial 2x2x2, com duas concentrações de sacarose (0 e 20 g L⁻¹), duas consistências de meio (semissólido e líquido) e duas condições de vedação (tampas sem e com membrana), que totalizou 8 tratamentos (Tabela 1). O material vegetal foi mantido em sala de crescimento a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas de luz e irradiância de 40 µmol m⁻² s⁻¹ proveniente de duas lâmpadas LEDs (Diodos Emissores de Luz) de cor branca (Tubular T8 Led, 10w, Brasília, Brasil) e umidade controlada, durante 60 dias.

Tabela 1: Descrição dos tratamentos aplicados na germinação *in vitro* de *Cedrela fissilis* em condições fotomixotróficas e fotoautotróficas com ventilação natural.

Tratamento	Concentração de Sacarose (g L ⁻¹)	Nº de Membranas	Consistência do meio
T1	0	0	Semissólido
T2	0	1	Semissólido
T3	0	0	Líquido
T4	0	1	Líquido
T5	20	0	Semissólido
T6	20	1	Semissólido
T7	20	0	Líquido
T8	20	1	Líquido

3.3. Análises de germinação

As análises decorreram de inspeção visual diária durante 60 dias e foram determinados porcentagem de germinação e de plantas completamente formadas, tempo médio de germinação (TMG) e tempo médio da emissão da primeira folha verdadeira (TMPF).

3.4. Análises de crescimento

Após 60 dias de cultivo foram determinados o comprimento do hipocótilo, da parte aérea e da raiz primária, o número de folhas, nós e raízes. A área foliar foi medida com auxílio do software ImageJ (National Institute of Health, EUA) 1.49v, por meio das imagens das folhas individuais capturadas com celular Samsung Galaxy A51 (Schneider et al., 2012). As massas fresca e seca foram determinadas a partir do material vegetal, disposto dentro de sacos de papel, em estufa de circulação de ar forçado (Ambikontrol: modelo Novus n1030) a 45 °C durante 72 h.

3.5. Determinação de pigmentos fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos foram extraídos com base na metodologia de Santos et al. (2008), com algumas modificações. Para isso, foram utilizadas seis repetições por tratamento (6 plantas), das quais foram retirados três discos foliares de 3 mm de diâmetro, obtidos da

terceira folha completamente desenvolvida contada a partir do ápice, e imersos em 3 mL de dimetilsulfoxido (DMSO) (Isifar® Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brasil) por 48 horas, no escuro.

A absorvância das amostras foi determinada a 480, 649 e 665 nm com o uso de um espectrofotômetro UV-visível (modelo UV-M51; BEL Engineering Company, Monza, Itália), com cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico. A determinação dos níveis de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides foi realizada segundo Wellburn (1994), pelas seguintes fórmulas:

$$\text{Clorofila } a = 12.19A_{665} - 3.45A_{649}$$

$$\text{Clorofila } b = 21.99 A_{649} - 5.32A_{665}$$

$$\text{Carotenoides} = (1000A_{480} - 2.14C_a - 70.16C_b) / 220$$

3.6. Anatomia vegetal e análise micromorfométrica

Segmentos da região mediana da folha (do segundo par de folhas expandidas, contadas a partir do ápice), que compreendeu a nervura central e parte do limbo, foram seccionados a partir das plantas frescas entre as 14:00 – 16:00 h e, acondicionadas em eppendorf com FAA₅₀ (Ácido acético glacial e Formaldeído) por 48 horas. Por cada repetição biológica (de uma planta / tubo) foi coletado um explante, o que totalizou quatro repetições biológicas por tratamento. Após esse período, as amostras foram retiradas do FAA₅₀ e passaram por uma série elítica em concentrações crescentes de etanol (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 100%), para a desidratação gradual do tecido. Em seguida, foram realizados os processos de pré-infiltração (Etanol 100% + Histoiresina líquida), infiltração (Histoiresina líquida + pó ativador) e polimerização (Histoiresin; Leica Instruments, Jena, Germany).

Os cortes anatômicos transversais foram obtidos em micrótomo rotativo semiautomático (MRP2015, Lupetec Tecnologia Aplicada, São Carlos, SP, Brasil), ajustado para espessura entre 5-7 µm. Os cortes foram cuidadosamente coletados e transferidos para água aquecida, para extensão completa das secções. Posteriormente, as secções expandidas foram transferidas para lâminas de microscopia e os cortes foram corados com azul de toluidina (pH 3,2) (O'BRIEN & MCCULLY, 1981). As imagens dos cortes foram analisadas e visualizadas em microscópio de luz (B20T, Bioptika, Colombo, PR, Brasil) com sistema U-photo, acoplado a câmera fotográfica digital (CMOS-5.0, Bioptika, Colombo, PR, Brasil) e software capture V2.1.

As análises micromorfométricas foram realizadas a partir de imagens digitais do limbo foliar e nervura central da folha, obtidas com o uso da objetiva de 10X. As dimensões celulares da epiderme abaxial e adaxial, parênquima paliádico, mesofilo e espaços intercelulares, foram

feitas na vertical, na largura e altura, e o espaço intercelular foi medido através da área. As medidas foram determinadas com o auxílio do software ImageJ®. As análises foram realizadas em três pontos diferentes de cada fotografia analisada para cada material vegetal (folha), foram utilizadas 3 fotos de cortes realizados em profundidades diferentes e, por tratamento foram analisadas quatro repetições biológicas, o que totalizou 96 medições (8x4x3) para cada parâmetro.

3.7. Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados em esquema fatorial 2x2x2, onde os fatores foram: tipo de meio (semissólido ou líquido), número de membranas porosas (0 ou 1) e concentração de sacarose (0 ou 20 g L⁻¹). Para as análises de crescimento e determinação de pigmentos fotossintéticos foram utilizadas 6 repetições, enquanto para as análises micromorfométrica foram usadas 4 repetições por planta. Os dados foram submetidos a análise de variância bidirecional (ANOVA), com as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância, através do programa Genes, versão 1990.2018.39 (Cruz, 2016).

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do meio de cultivo, sacarose e uso de membrana porosa na Germinação de *Cedrela fissilis* em cultivo *in vitro*

A porcentagem de germinação não foi significativamente afetada por nenhum dos fatores isolados ou suas interações, portanto, as condições avaliadas não influenciaram a capacidade inicial de germinação das sementes de *Cedrela fissilis* em cultivo *in vitro*. Por outro lado, o tempo médio de germinação foi significativamente influenciado pelo tipo de meio de cultivo e pela concentração de sacarose, além de apresentar interação significativa entre tipo de meio e membrana, sugere-se portanto que a velocidade de germinação depende da combinação desses fatores. Quanto à porcentagem de plântulas formadas, não foram observados efeitos significativos (Tabela 2).

Em relação ao tempo médio para formação de plântulas, tanto o tipo de meio quanto a concentração de sacarose apresentaram efeitos significativos, assim como a interação entre sacarose e membrana, o que demonstrou que o desenvolvimento das plântulas é sensível à presença de carboidrato e à permeabilidade gasosa proporcionada pela membrana (Tabela 2).

Tabela 2: Valores do teste F para os efeitos principais (tipo de meio, concentração de sacarose e presença de membrana) e suas interações sobre variáveis relacionadas à germinação, tempo média de germinação, plântulas formadas, tempo médio de plântulas formadas de *Cedrela fissilis* em cultivo *in vitro*.

Variáveis	Tipo de meio (TM)	Concentração de sacarose (CS)	Membrana (M)	TM x CS	TM x M	CS x M	TM x CS x M
Germinação (%)	0.0156 ns	0.2179 ns	1.2274 ns	0.1661 ns	0.0545 ns	0.2088 ns	1.5765 ns
TMG	15.6382 **	5.1530 *	0.0043 ns	2.1472 ns	0.0001 **	0.1708 ns	1.1804 ns
Plântulas formadas (%)	0.4085 ns	0.9145 ns	0.3370 ns	0.0280 ns	0.2949 ns	0.1668 ns	2.1228 ns
TMPF	28.7678 **	10.2717 **	0.0094 ns	0.4866 ns	10.9010 **	3.9721 ns	2.7861 ns

Valores com “***” indicam significância estatística ($p < 0,05$) e “ns” indica ausência de significância.

A utilização de membrana favoreceu a germinação das sementes de *C. fissilis in vitro*, a porcentagem de germinação foi superior a 60% em todas as condições testadas, apesar disso, não houve diferenças estatísticas, porém, houve uma tendência (não significativo) para maior valor em meio líquido com 0 de sacarose, especialmente na presença de membrana, tanto no meio líquido quanto no semissólido, onde os valores ultrapassaram 80% (Figura 1A).

O meio líquido proporcionou menores valores de tempo médio de germinação (TMG) das sementes de *C. fissilis* em comparação ao meio semissólido, independentemente da presença de membrana. Ainda, a presença de membrana não resultou em diferenças significativas dentro de cada tipo de meio (Figura 1B). Quanto à porcentagem de plântulas formadas, não houve diferença significativas, porém verifica-se um padrão semelhante ao observado na germinação das sementes, em que os tratamentos sem sacarose, especialmente com membrana, apresentaram maior eficiência na formação de plântulas, com valores próximos a 80%. Isso reforça o papel positivo da membrana na promoção do desenvolvimento inicial das plântulas (Figura 1C).

O meio líquido sem membrana proporcionou os menores valores de tempo médio para a formação de plântulas (TMPF), enquanto o meio semissólido, com ou sem membrana, apresentou tempos significativamente maiores. O meio líquido, sem restrição à troca gasosa, favoreceu o desenvolvimento mais rápido das plântulas de *C. fissilis*, uma vez que a presença de membrana aumentou o TMPF nesta consistência do meio, mas reduziu levemente no meio semissólido (Figura 1D).

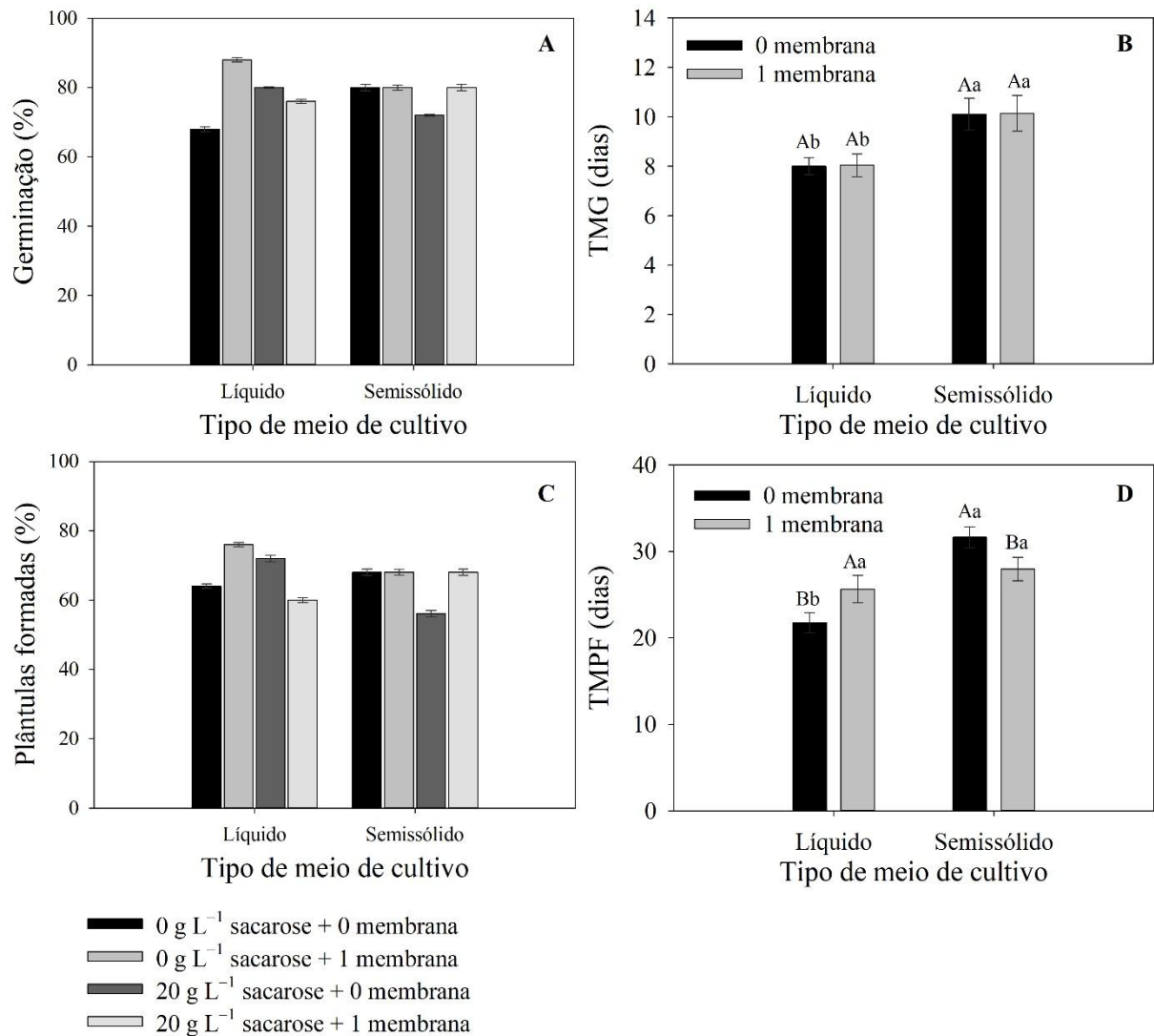


Figura 1: Germinação das sementes de *Cedrela fissilis* germinadas *in vitro* sob fatores distintos de sacarose (0 e 20 g L⁻¹), consistência do meio (líquido e semissólido) e vedação (0 e 1 membrana). **A)** Germinação (%); **B)** Tempo médio de germinação (TMG); **C)** Plântulas formadas; **D)** Tempo médio para a formação de plântulas (TMPF). Nas figuras B e D: letras maiúsculas comparam os distintos tipos de vedação dentro de uma mesma consistência do meio de cultura; letras minúsculas comparam as diferentes consistências do meio de cultura no mesmo tipo de vedação. Médias seguidas por letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Cada valor representa a média \pm E.P. (n=06)

4.2. Efeito do meio de cultivo sacarose e uso de membrana porosa no crescimento de *Cedrela fissilis* em cultivo *in vitro*

As características morfológicas de *Cedrela fissilis* também foram influenciadas principalmente pela presença da membrana no cultivo *in vitro*, observou-se um aumento significativo no comprimento do hipocótilo, da parte aérea e da raiz primária. A disponibilidade

de carbono exógeno e as condições de troca gasosa foram determinantes para o crescimento radicular, uma vez que a concentração de sacarose também afetou o comprimento da raiz primária (Tabela 3, Figura 2).

As variáveis relacionadas ao número de folhas, raízes e nós não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, o que sugere que essas variáveis morfológicas morfológicas são menos sensíveis às variações do meio e das condições de cultivo avaliadas (Tabela 3). Por fim, a biomassa das plântulas foi significativamente influenciada pela presença da membrana, que aumentou tanto a massa fresca quanto a massa seca da parte aérea e das raízes. A concentração de sacarose também teve efeito significativo sobre a massa seca da parte aérea, enquanto a interação entre tipo de meio e sacarose influenciou a massa fresca das raízes (Tabela 3).

Tabela 3: Valores do teste F para os efeitos principais (tipo de meio, concentração de sacarose e presença de membrana) e suas interações sobre variáveis relacionadas ao desenvolvimento morfológico e biomassa de plântulas de *Cedrela fissilis* em cultivo *in vitro*.

Variáveis	Tipo de meio (TM)	Concentração de sacarose (CS)	Membrana (M)	TM x CS	TM x M	CS x M	TM x CS x M
CH (cm)	0.6341 ns	7.7672 **	4.5684 *	1.1421 ns	0.7746 ns	0.5379 ns	0.2323 ns
CPA(cm)	0.8603 ns	0.1348 ns	11.5668 **	0.7562 ns	0.7901 ns	0.7562 ns	0.7562 ns
CRP(cm)	3.7882 ns	9.7636 **	13.8747 **	2.4782 ns	0.0670 ns	3.0768 ns	0.4236 ns
NF	0.5292 ns	0.0108 ns	0.0108 ns	1.3067 ns	0.0108 ns	0.8747 ns	0.5292 ns
NR	3.5397 ns	1.9670 ns	12.9008 **	1.9670 ns	1.6019 ns	1.4334 ns	0.3382 ns
NN	0.4513 ns	2.1841 ns	9.5487 **	0.1625 ns	0.4513 ns	3.0505 ns	0.0181 ns
MFPA (g)	0.0823 ns	0.0464 ns	102.8800 **	0.0584 ns	0.0499 ns	3.9819 ns	0.1135 ns
MFR (g)	0.9180 ns	1.4492 ns	38.3954 **	0.0406 ns	0.0784 ns	1.4040 ns	0.7039 ns
MSPA (g)	0.3291 ns	6.8143 *	44.2020 **	1.1718 ns	0.0414 ns	0.2619 ns	0.3855 ns
MSR (g)	0.2047 ns	1.5101 ns	102.9902 **	1.7125 ns	0.4197 ns	0.1007 ns	0.5952 ns

Valores com “***” indicam significância estatística ($p < 0,05$) e “ns” indica ausência de significância; CH: Comprimento do hipocótilo; CPA: Comprimento da parte aérea; CRP: Comprimento da raiz principal; NF: Número de folhas; NR: Número de raízes; NN: Número de nós; MFPA: Massa fresca da parte aérea; MFR: Massa fresca da raiz; MSPA: Massa seca da parte aérea; MSR: Massa seca da raiz.

Dentre as três variáveis testadas na germinação *in vitro* de *C. fissilis*, o uso de membranas porosas (0M e 1M) e a concentração de sacarose foram os fatores mais relevantes no desenvolvimento das plantas, tanto em meios líquidos, quanto semissólidos. Entre os tratamentos sem adição de sacarose, o uso de membranas no meio semissólido induziu melhor crescimento da parte aérea das plantas, com folhas mais expandidas e coloração verde intensa. A presença de sacarose no meio de cultura (20 g L^{-1}), a ausência de agente gelificante (meio líquido) e, o uso de uma membrana porosa (1M), estimularam também o desenvolvimento da raiz. De forma geral, o meio líquido favoreceu a expansão da parte radicular das plantas germinadas, contudo, se associado à ausência de sacarose e de membranas proporcionou plantas de menor qualidade, com folhas cloróticas e deformadas, além de maior hiperidricidade. Quanto a formação de raízes, o uso de membranas de uma membrana foi favorável, em que é possível observar que sem as membranas praticamente não houve o desenvolvimento do sistema radicular (Figura 2).

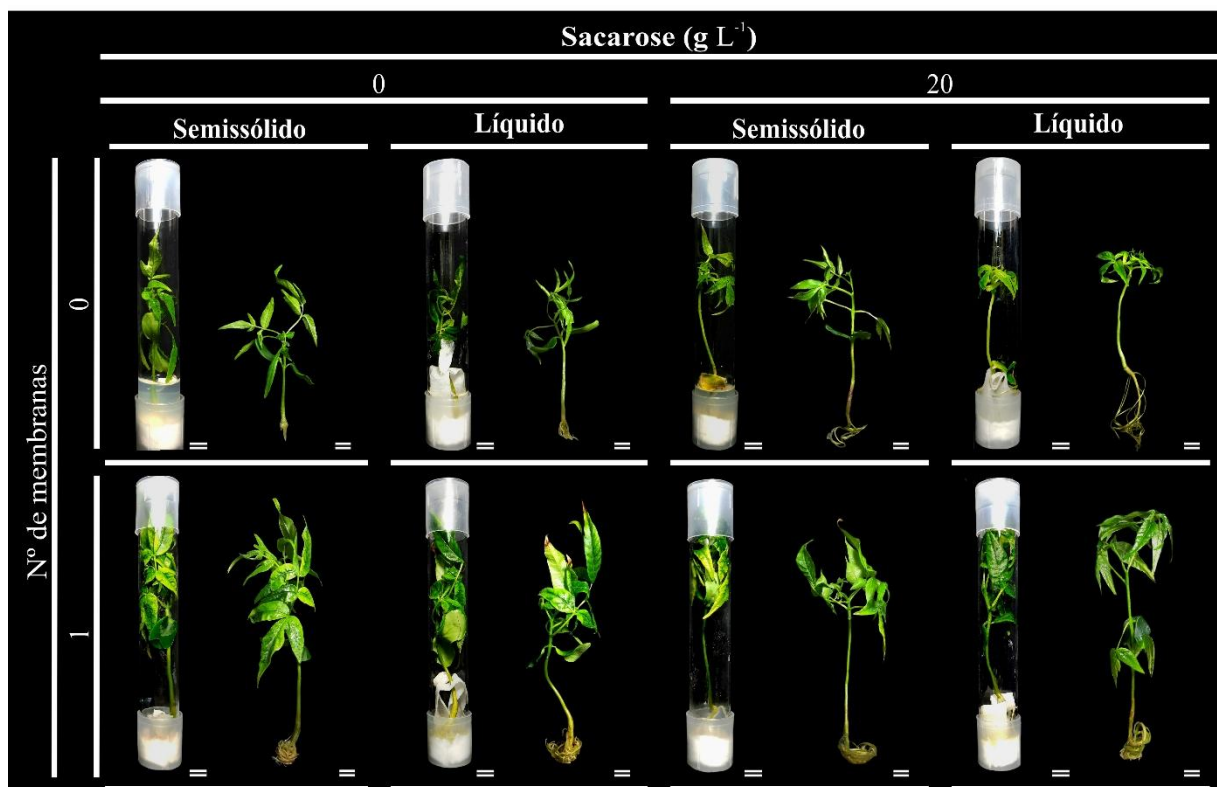


Figura 2. Plantas de *Cedrela fissilis* germinadas *in vitro* sob fatores distintos de sacarose (0 e 20 g L^{-1}), consistência do meio (líquido e semissólido) e vedação (0 e 1 membrana). Barras = 1 cm.

A sacarose e a membrana foram os fatores que mais alteraram o comprimento do hipocótilo (CH) e o comprimento da raiz primária (CRP) das plantas germinadas de *C. fissilis*. Embora não houve interação entre estes fatores, a adição de sacarose (20 g L^{-1}) e a presença da

membrana (1M) aumentaram significativamente o CH (Figura 3A) e o CRP (Figura 3D). O comprimento da parte aérea (CPA), número de nós por plântula (NN) e número de raízes (NR) diferiram significativamente apenas para o fator membrana, com valores superiores na utilização de 1M em comparação com 0M (Figuras 3B, 3C e 2E).

Para a área foliar houve interação entre os fatores sacarose e membrana, onde observou-se que plantas de *C. fissilis* germinadas com 1M em meio isento de sacarose (0 g L^{-1}) apresentaram maior expansão foliar ($32 \pm 3,4 \text{ cm}^2$). De forma geral, a ausência de membrana (0M), com ou sem sacarose no meio (20 e 0 g L^{-1}) alterou negativamente o desenvolvimento das folhas, e foi possível a obtenção de área foliar 2 - 3 vezes menor em comparação com plantas cultivadas com 1M (Figura 3F). Não houve diferença significativa no número de folhas entre os diferentes tratamentos, independentemente da concentração de sacarose, vedação ou consistência do meio de cultivo (líquido ou semissólido) (Figura 3G).

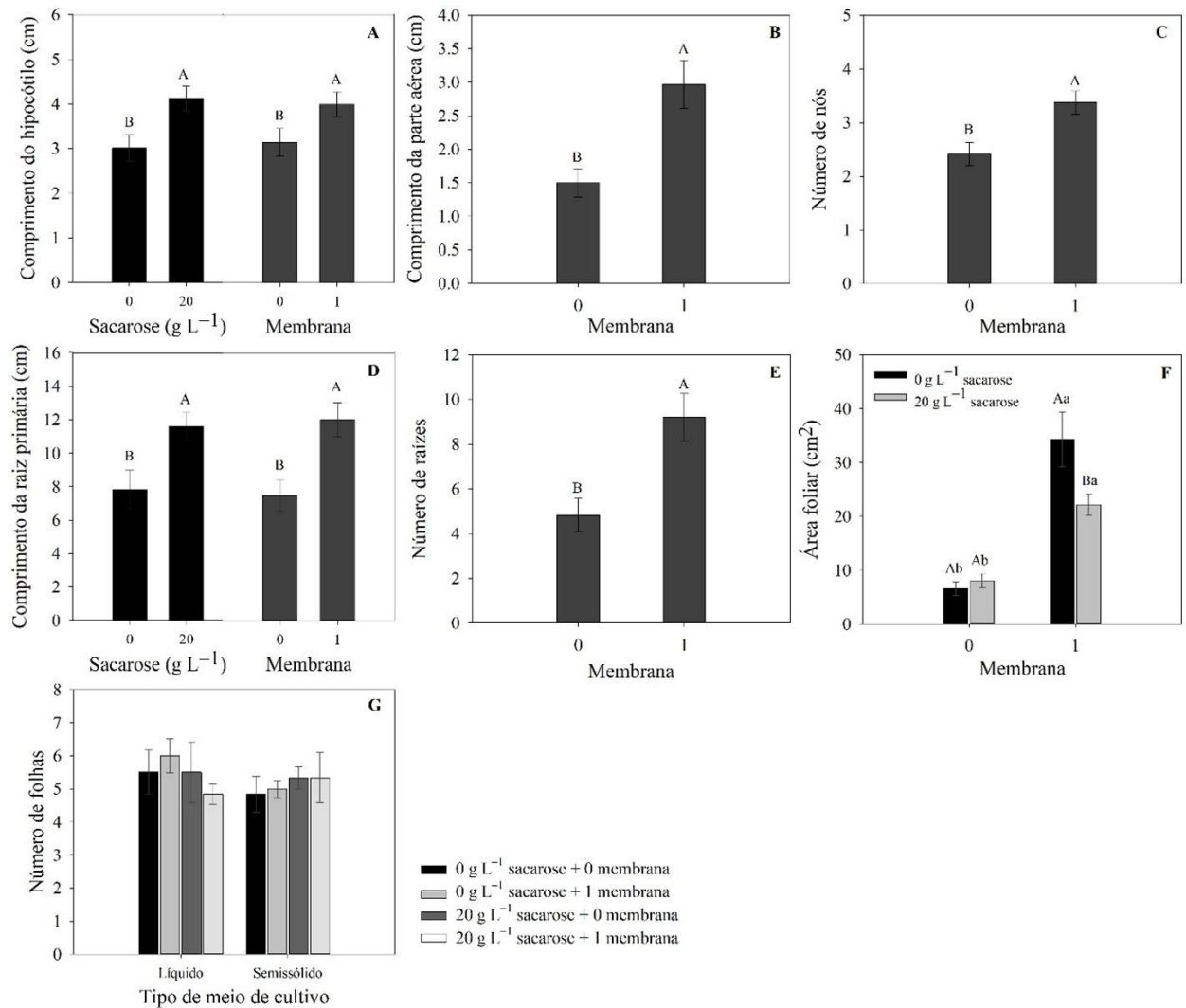


Figura 3: Parâmetros avaliados durante a germinação de sementes de *Cedrela fissilis* germinadas *in vitro* sob fatores distintos de sacarose (0 e 20 g L⁻¹), consistência do meio (líquido e semissólido) e vedação (0 e 1 membrana). **A)** Germinação; **B)** Tempo médio de germinação; **C)** Plântulas formadas; **D)** Tempo médio para a formação de plântulas. Nas figuras B e D: letras maiúsculas comparam os distintos tipos de vedação dentro de uma mesma consistência do meio de cultura; letras minúsculas comparam as diferentes consistências do meio de cultura no mesmo tipo de vedação. Médias seguidas por letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

O uso de membranas porosas foi o fator que mais influenciou na massa fresca da parte aérea (MFPA) (Figura 4A) e radicular (MFR) (Figura 4B) de *Cedrela fissilis*, que atingiu aproximadamente $0,42 \text{ g} \pm 0,01$ de MFPA e $0,6 \text{ g} \pm 0,2$ de MFR com 1M, correspondentes a valores 2,8 e 2 vezes superiores aos obtidos nas plantas cultivadas sem membranas porosas. Para a massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca das raízes (MSR) não houve interação entre os três fatores testados. Porém, a concentração de sacarose e o uso de membranas analisados individualmente, influenciaram nos resultados de MSPA, onde 20 g L⁻¹ de sacarose e 1M induziram maior acúmulo de biomassa, com valores de $0,04 \pm 0,08$ e $0,05 \pm 0,01$,

respetivamente (Figura 4C). Todavia, o uso de membranas foi o único fator que alterou a produção de MSR, no qual foi significativamente superior no tratamento 1M, com valores de $0,07 \pm 0,01$ g, 2,3 vezes mais em comparação com 0M ($0,03 \pm 0,01$ g) (Figura 43D).

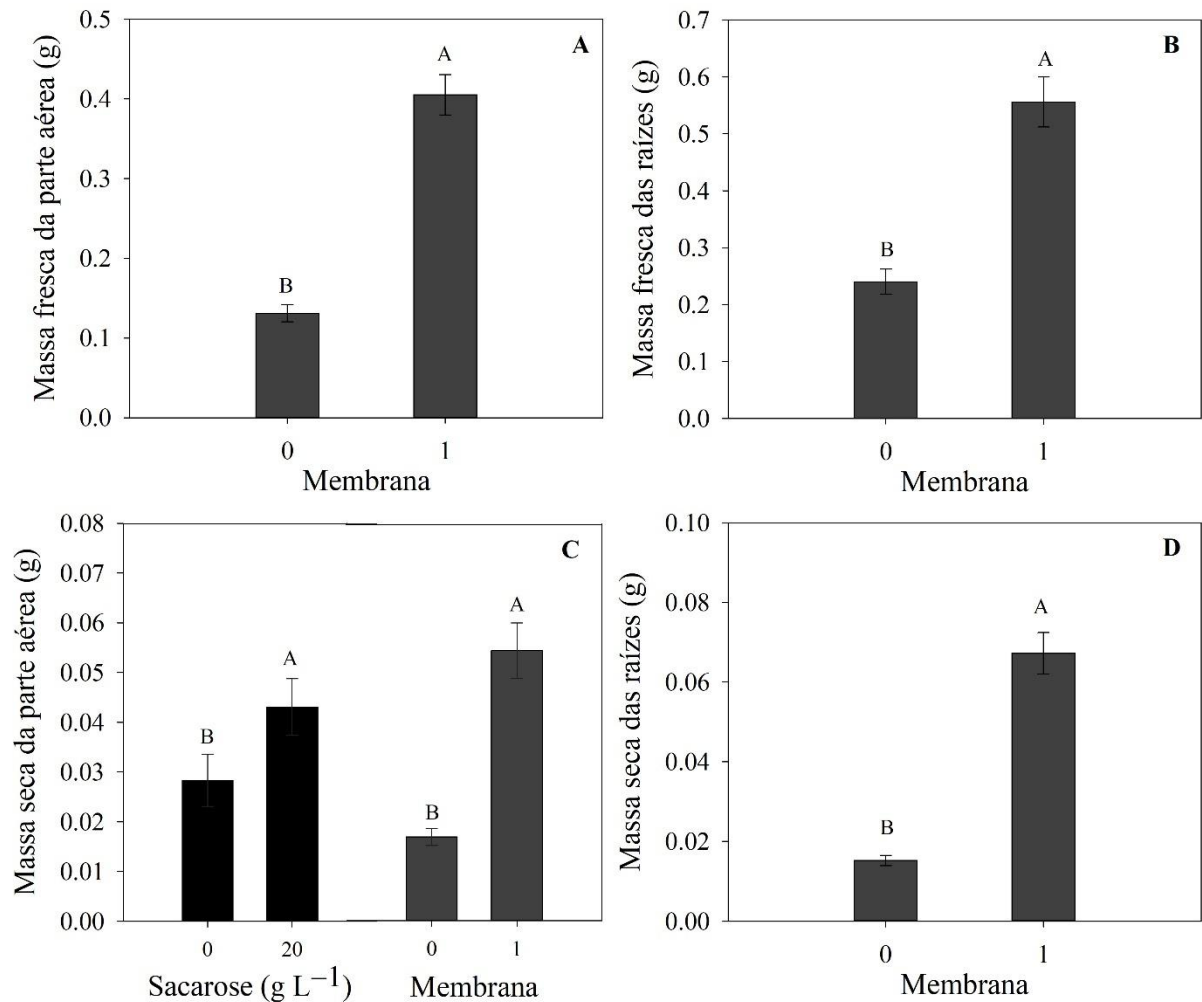


Figura 4: Biomassa fresca e seca de plantas de *Cedrela fissilis* germinadas *in vitro* sob fatores distintos de sacarose (0 e 20 g L⁻¹), consistência do meio (líquido e semissólido) e vedação (0 e 1 membrana). **A)** Massa fresca da parte aérea em função da vedação; **B)** massa fresca das raízes em função da vedação; **C)** Massa seca da parte aérea em resposta à sacarose e vedação; **D)** Massa seca das raízes em função da vedação. Médias seguidas por letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas segundo o teste Tukey ($p < 0,05$) ($n=06$)

A interação entre os fatores consistência do meio de cultivo (líquido e semissólido) e a concentração de sacarose (0 e 20 g L⁻¹) influenciou significativamente no conteúdo de clorofila *a* (Figura 5A) e clorofila total (Figura 5C) das plantas de *C. fissilis* germinadas *in vitro*. Ao usar o meio líquido, a adição de sacarose incrementou a clorofila *a* e a clorofila total, enquanto no meio semissólido não houve diferença significativa entre as duas concentrações de sacarose utilizadas (Figuras 5A e 5C).

Quanto ao sistema de vedação, a presença da membrana (1M) promoveu um aumento significativo na concentração de clorofila *b*, com valores superiores a $12 \mu\text{g cm}^{-2}$; enquanto na ausência da membrana proporcionou plantas com os valores menores que $10 \mu\text{g cm}^{-2}$ (Figura 5B). Da mesma forma, a presença da membrana influenciou positivamente no teor de carotenoides, em que foi obtido valores superiores a $5 \mu\text{g cm}^{-2}$ (Figura 5D). Para a proporção entre clorofila *a* e *b* não houve efeito dos fatores testados analisados de forma isolada e a interação de fatores (Figura 5E).

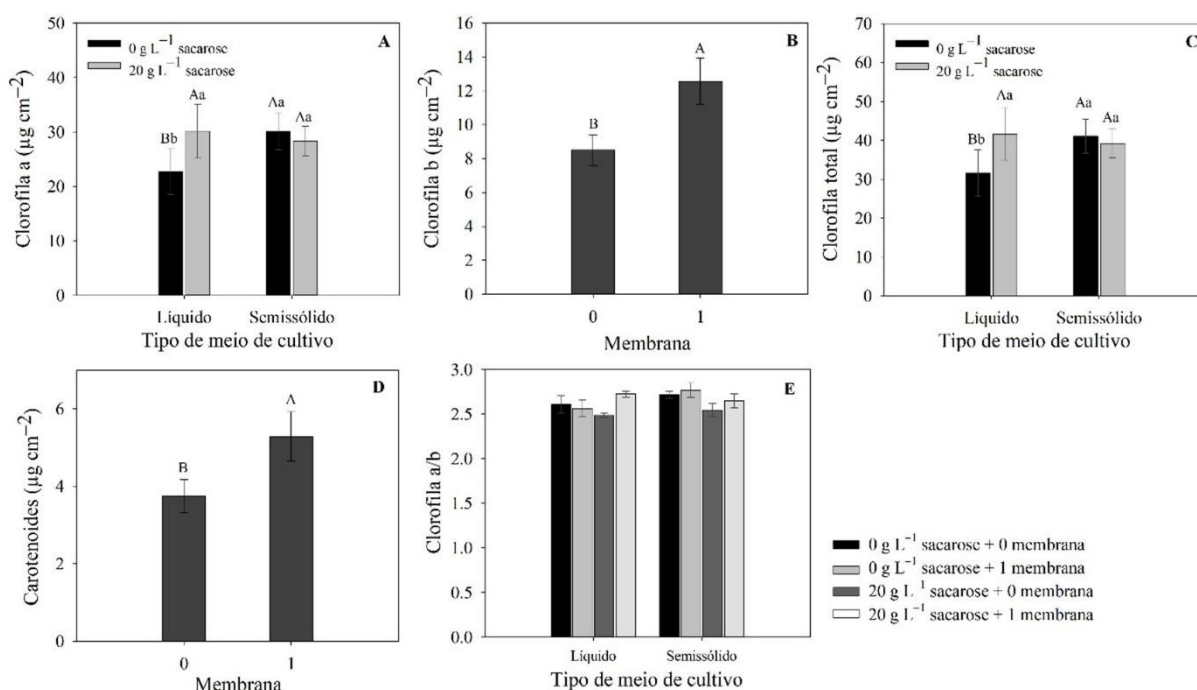


Figura 5: Conteúdo de pigmentos fotossintéticos em plantas de *Cedrela fissilis* germinadas *in vitro* sob fatores distintos de sacarose (0 e 20 g L⁻¹), consistência do meio (líquido e semissólido) e vedação (0 e 1 membrana). **A)** Clorofila *a* em função da consistência do meio e da sacarose; **B)** Clorofila *b* dependente do sistema de vedação; **C)** Clorofila total de acordo com a consistência do meio e a sacarose. **D)** Carotenoides sob influência da vedação; **E)** Relação entre clorofila *a* e *b* nos diferentes tratamentos. Nas figuras A e C, letras maiúsculas comparam as concentrações de sacarose dentro do mesmo tipo meio; letras minúsculas comparam a mesma concentração de sacarose em diferentes tipos de meio. Médias seguidas por letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas segundo o teste Tukey ($p < 0,05$) ($n=06$).

4.3. Efeito do meio de cultivo, sacarose e uso de membrana porosa na anatomia foliar de *Cedrela fissilis* em cultivo *in vitro*

Os cortes anatômicos das folhas de plantas de *Cedrela fissilis* cultivadas em meio semissólido exibiram melhor preservação estrutura com tecidos organizados, tanto na nervura quanto no limbo foliar. A nervura mostrou parede celular espessa e epiderme bem definida,

enquanto o limbo apresentou camadas compactas e células alongadas com organização regular. Por outro lado, os cortes anatômicos das folhas de plantas de *Cedrela fissilis* cultivadas em meio líquido revelaram maior desorganização tecidual, evidenciada por aumento de espaços intercelulares, colapso de células e redução da espessura do limbo, sobretudo na ausência de membrana permeável. A presença de sacarose no meio, especialmente em meios semissólidos, promoveu aumento na densidade celular e espessura dos tecidos, o que sugere que maior estímulo à diferenciação celular e manutenção da integridade anatômica. No meio líquido, mesmo com sacarose, observou-se melhora relativa na manutenção da estrutura em comparação à ausência desse carboidrato, embora a desorganização permanecesse evidente, particularmente sem membrana (Figura 6).

A utilização de membranas permeáveis demonstrou efeito protetor sobre a estrutura anatômica das folhas de *Cedrela fissilis*, com baixos níveis de danos provocados pelo meio líquido. Com o uso de membrana porosa, os tecidos da nervura e do limbo apresentaram organização mais preservada, com menor ocorrência de células colapsadas e espaçamento intercelular aumentado, enquanto, na ausência da membrana, a desestruturação foi mais acentuada (Figura 6).

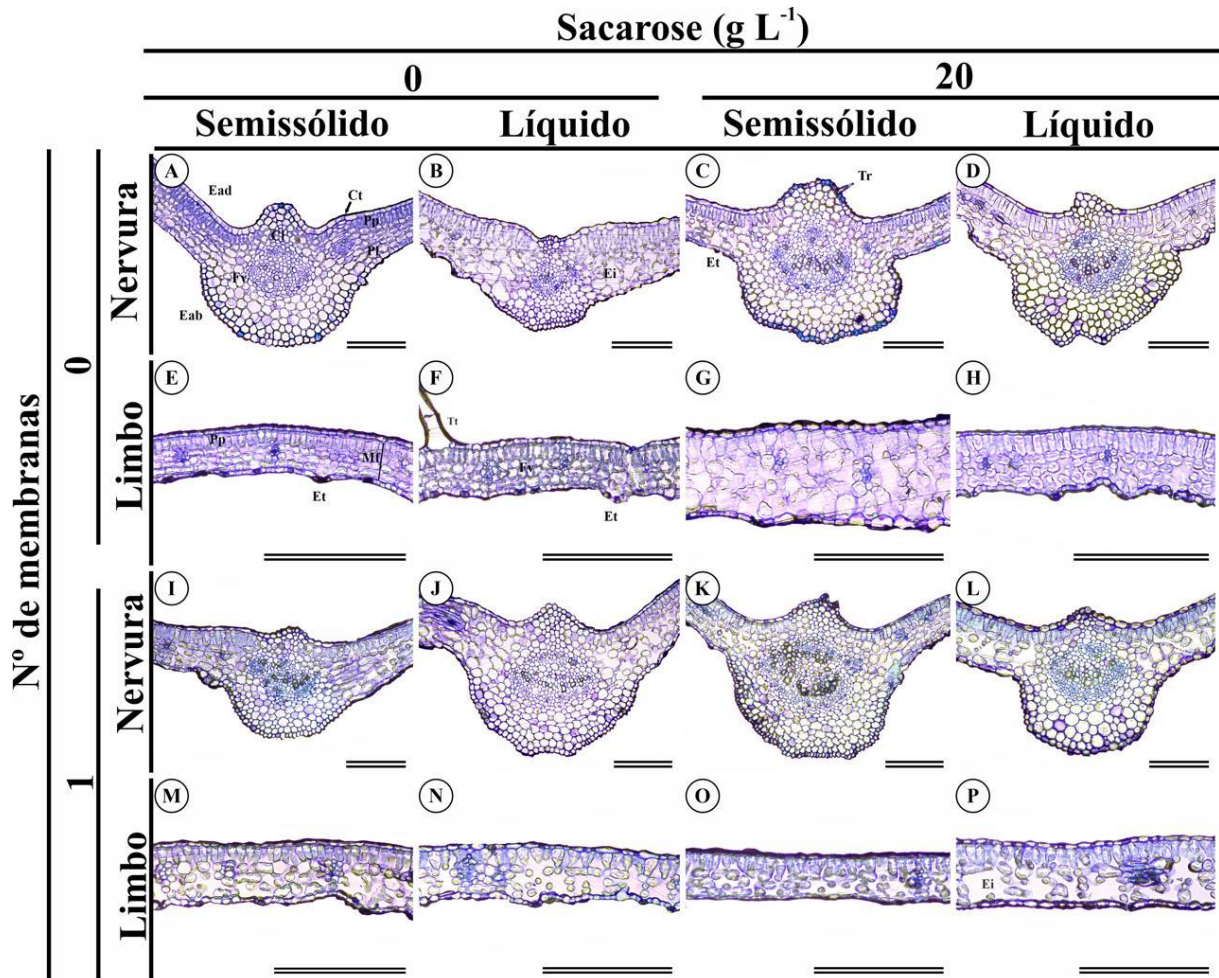


Figura 6. Cortes anatômicos transversais de folhas de *Cedrela fissilis* cultivadas *in vitro* sob diferentes condições de meio de cultivo e presença de membranas permeáveis a gases. Folhas cultivadas em meio semissólido e líquido, suplementados com 0 ou 20 g L⁻¹ de sacarose, na ausência (A–H) e presença (I–P) de uma membrana permeável à troca gasosa. Nervura central (A–D, I–L) e limbo foliar (E–H, M–P). Observa-se a organização dos tecidos epidérmicos (Ead, epiderme adaxial; Eab, epiderme abaxial; Et, epiderme total), cutícula (Ct), parênquima paliçádico (Pd), mesófilo lacunoso (Mi), espaços intercelulares (Ei), tricomas tectores (Tt), tricomas (Tr) e tecidos vasculares (Ft, floema). Barra de escala = 100 µm

A micromorfometria foliar de *Cedrela fissilis* foi significativamente influenciada concentrações sacarose, tipo de meio de cultivo e presença de membrana. Evidenciou-se maior deposição de epiderme abaxial sob condições de maior disponibilidade hídrica, uma vez que a epiderme adaxial apresentou maior espessura em meio líquido sem adição de sacarose e membrana (Figura 7 A-B). Em contraste, em meio semissólido, a presença de sacarose como fonte de carbono foi importante para o desenvolvimento estrutural foliar, já que a ausência de sacarose reduziu significativamente a espessura da epiderme adaxial e abaxial (Figura 7 A-B).

A espessura do parênquima paliçádico foi reduzida pela presença de sacarose (Figura 7 C), o que indica que as concentrações elevadas podem comprometer a expansão celular do tecido assimilador. Por outro lado, a espessura do mesófilo apresentou maior estabilidade frente

às condições de cultivo ao não exibir variações significativas entre os tratamentos, o que (Figura 7 D). Por outro lado, os espaços intercelulares foram ampliados pela adição de 20 g L⁻¹ de sacarose (Figura 7 E).

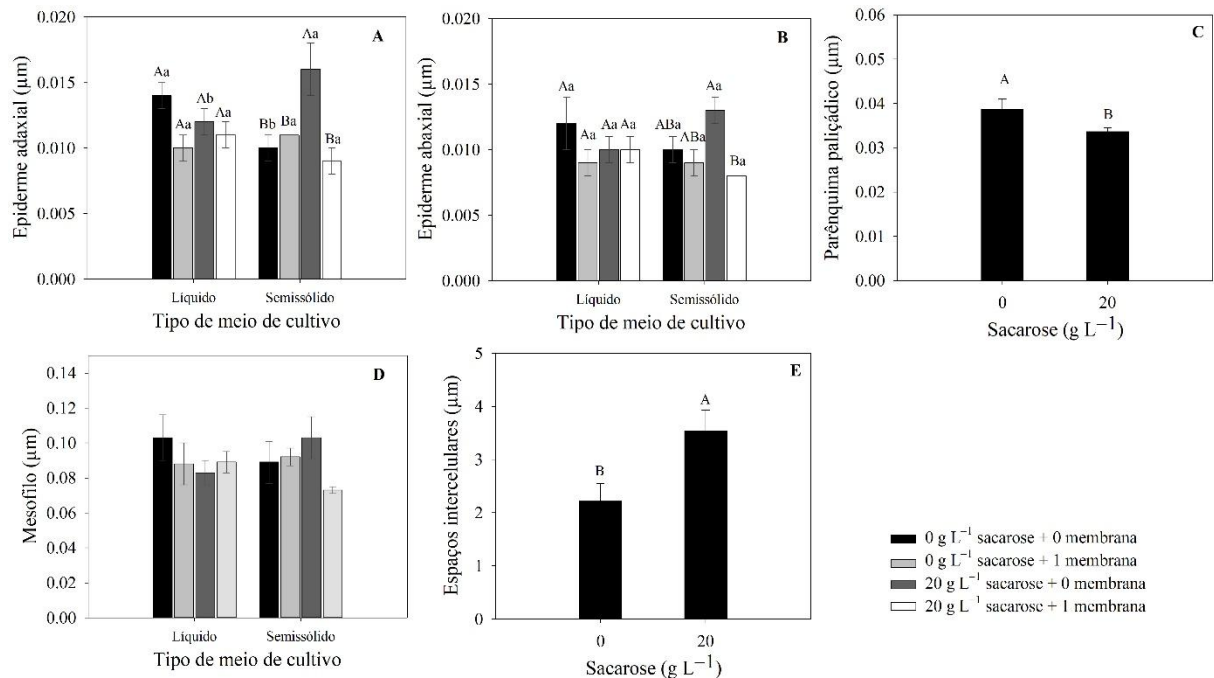


Figura 7. Micromorfometria foliar de *Cedrela fissilis* cultivada *in vitro* em diferentes tipos de meio (líquido e semissólido), com ou sem uso de membrana e sob duas concentrações de sacarose (0 e 20 g L⁻¹). (A) espessura da epiderme adaxial; (B) espessura da epiderme abaxial; (C) espessura do parênquima paliçádico; (D) espessura do mesófilo; (E) espaços intercelulares. Letras maiúsculas comparam tipos de meio dentro de cada tratamento e letras minúsculas comparam os tratamentos dentro de cada meio, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras representam média \pm erro padrão.

5. DISCUSSÃO

A germinação e formação de plântulas de *C. fissilis in vitro* foram otimizadas pela presença de sacarose e membrana, que também proporcionou menor tempo para o estabelecimento das plântulas. Esses dados evidenciam a importância do ajuste das condições físico-químicas e das trocas gasosas para o sucesso da propagação *in vitro* da espécie. A presença de membrana não influenciou na velocidade de germinação, o que sugere que a difusão de gases promovida pela membrana não impactou de forma expressiva o tempo necessário para germinação.

A presença de membranas no sistema de vedação foi o fator que mais influenciou no desenvolvimento das plantas germinadas *in vitro* de *C. fissilis*, o que favoreceu o crescimento evidenciado em termos de comprimento da parte aérea e radicular, número de nós e raízes, área foliar e biomassa fresca e seca. Esses resultados indicam que a membrana proporciona um

ambiente favorável para o desenvolvimento das plântulas, o que influenciou a absorção de nutrientes e o incremento das trocas gasosas dentro do recipiente. Resultados semelhantes foram observados em cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.), em que o uso de membranas porosas favoreceu o desenvolvimento das gemas e a formação posterior de plantas, devido à melhora nas trocas gasosas que mantêm níveis adequados de CO₂ e reduzem o acúmulo de etileno, e aumentam a eficiência da fotossíntese e o crescimento das plantas *in vitro* (Pinheiro *et al.* 2013). Na micropropagação de *Psidium* spp., também têm sido reportado melhor desempenho morfofisiológico e anatômico das plantas cultivadas com tampas com membranas permeáveis a gases, associadas a diferentes meios de cultura (JADS, MS, WPM), o incremento da taxa de CO₂ proporcionado pelas membranas favoreceram a biossíntese de compostos de reserva e o desenvolvimento radicular, com alta sobrevivência durante a aclimação (Santos 2015).

A adição de sacarose também favoreceu o desenvolvimento de alguns órgãos das plantas de *C. fissilis* neste trabalho, especialmente do hipocótilo e da raiz primária. A suplementação com sacarose pode compensar a redução de compostos nitrogenados, o que favorece o alongamento celular no hipocótilo e raízes (Silva *et al.*, 2020).

A combinação entre o uso de membrana porosa e sacarose (20 g L⁻¹) mostrou-se promissora para otimizar alongamento radicular e induzir o acúmulo de biomassa, parâmetros essenciais para aclimatização de plantas arbóreas como *C. fissilis*. Resultados similares foram alcançados em *C. fissilis* com uso de GA₃, que induziu alongamento de brotações e enraizamento em médios WPM (Silva *et al.*, 2020). A ausência de diferenças no número de folhas entre tratamentos sugere que fatores adicionais podem ser necessários para modular a organogênese foliar, como proposto em protocolos com BAP (5 µM) (Silva *et al.*, 2020). Os fatores avaliados influenciam predominantemente parâmetros relacionados ao crescimento e à qualidade fisiológica das plântulas, sem afetar a produção foliar quantitativa.

O maior conteúdo de clorofila *a* e clorofila total nas plantas cultivadas em meio semissólido, independente da concentração de sacarose, indicou que este meio favoreceu a síntese de pigmentos fotossintéticos. Além disso, a presença da membrana promoveu aumento significativo nas concentrações de clorofila *b* e carotenoides, o que sugere que ela pode contribuir para melhores condições fisiológicas nas plântulas de *C. fissilis*. A superioridade do meio semissólido na biossíntese de clorofila *a* e acúmulo de clorofila total reflete a influência da aerobiose na atividade fotossintética. Em condições naturais, sementes de *C. fissilis* mantidas em substratos bem drenados apresentam maior vigor germinativo (Amaral, 2006), o que sugere que a oxigenação otimizada em meios semissólidos *in vitro* replica esse benefício.

A presença de sacarose no meio líquido durante a germinação de *C. fissilis* atenuou o déficit de clorofila, possivelmente por fornecer substratos para a biossíntese de pigmentos independentemente da autotrofia, mecanismo também descrito em culturas de *Eucalyptus* spp. (Silva et al., 2020). Aragão (2013) estudou alterações bioquímicas durante a germinação e o desenvolvimento de brotações *in vitro* em *C. fissilis* e destacou a importância da mobilização de carboidratos durante o desenvolvimento, o que está relacionado à disponibilidade de sacarose no meio para a biossíntese de compostos essenciais, e incluiu pigmentos fotossintéticos. A concentração de sacarose influenciou também o crescimento e desenvolvimento *in vitro* de explantes de marmeleiro (*Cydonia oblonga*) em meio MS e WPM semissólido, que corrobora a ideia de que a sacarose é fundamental para a biossíntese de pigmentos e vigor das plantas *in vitro*, especialmente em meio semissólido (Grimaldi et al. 2016).

O aumento de carotenoides em *C. fissilis* na presença da membrana indica maior proteção fotooxidativa, fator crítico em sistemas *in vitro* expostos a estresses luminosos. A estabilidade da razão clorofila a/b entre os tratamentos indica manutenção da integridade funcional do aparato fotossintético sob as diferentes condições experimentais. Esses dados corroboram com estudos que associam a integridade da membrana à estabilidade de cloroplastos em plântulas de espécies florestais (Silva et al., 2021).

Hoshino et al. (2019) observaram que em cultura de tecidos vegetais em concentrações mais altas de sacarose podem afetar a expansão celular e o desenvolvimento do espaço intercelular, com níveis mais altos de sacarose possivelmente reduziu a espessura do parênquima paliádico ou impactou o tamanho da célula, em paralelo aos resultados de anatomia foliar de *C. fissilis*.

Um estudo sobre *Castanea sativa* x (híbrido de castanha) comparou os efeitos de diferentes concentrações de sacarose em sistemas de cultura líquida, e observou mudanças significativas nos parâmetros de tamanho dos brotos e folhas que dependeram dos níveis de sacarose, embora isso se concentre mais nas métricas de proliferação do que na anatomia detalhada das folhas (Gago et al., 2022). Ayub et al. (2019) apontam a sacarose como fator limitante das estruturas anatômicas foliares de *Rubus spp* cv. Tupy (amora-preta) em sistema de cultivo de biorreator de imersão temporária (meio líquido), uma vez que a sacarose associada a outros fatores favorece o processo de hiperidricidade (Polivanova; Bedarev, 2022).

A maior área dos espaços intercelulares obtidos com a adição de 20 g L⁻¹ de sacarose pode estar associada ao aumento da turgescência celular e expansão do parênquima lacunoso, Mohamed e Alsadon (2010) associaram o aumento do parênquima lacunoso em relação a

aumento de sacarose e maior nível de ventilação em folhas de batatas micropropagadas, e descreveram com camadas bem-organizadas com espaços intercelulares. Esses resultados reforçam a interação entre disponibilidade de carboidratos exógenos e estrutura foliar, e que a adição de sacarose, embora favoreça a formação de espaços intercelulares, pode comprometer a espessura do parênquima paliçádico, que impacta potencialmente a eficiência fotossintética, em estudos com *Physalis angulata*. Santos et al. (2020) observaram que sem sacarose ou em concentrações baixas, o parênquima paliçádico é mais espesso, e em concentrações elevadas de sacarose, esse tecido apresenta redução.

A combinação adequada de sacarose, tipo de meio e controle da troca gasosa via membrana foi fundamental para otimizar o crescimento e a qualidade das plântulas de *C. fissilis* em cultivo *in vitro*, o que pode proporcionar maior vigor e potencial de sobrevivência durante a aclimação *ex vitro*.

Apesar dos avanços obtidos com o uso combinado de membranas porosas e sacarose no cultivo *in vitro* de *C. fissilis*, persistem gargalos que devem ser abordados em trabalhos futuros. A ausência de resposta significativa na produção no número de folhas e melhoria na biomassa foliar sugere a necessidade de investigar outros reguladores de crescimento, como citocininas, para induzir a organogênese foliar de forma mais eficaz. Outro ponto crítico é a padronização da concentração ideal de sacarose em diferentes fases de desenvolvimento, bem como sua interação com formas alternativas de fornecimento energético, como fontes de carbono orgânico ou fotossíntese assistida. A integração desses fatores em protocolos otimizados pode ampliar a eficiência da micropropagação e a taxa de sobrevivência na aclimação, especialmente para espécies florestais com potencial econômico e ecológico, como *C. fissilis*.

6. CONCLUSÃO

A utilização de membranas porosas no cultivo *in vitro* de *Cedrela fissilis* melhorou o desenvolvimento morfofisiológico das plantas, independentemente da consistência do meio (líquido ou semissólido). O meio semissólido, em especial combinado com a presença da membrana e a adição de sacarose (20 g L⁻¹), apresentou desempenho superior, evidenciado por incrementos significativos na biomassa fresca e seca, comprimento do hipocótilo e parte aérea, número de nós e raízes, além de maior área foliar e coloração foliar mais intensa.

A suplementação com sacarose demonstrou efeito positivo na mitigação dos déficits de crescimento observados em meios líquidos, que promove aumento dos teores de clorofila *a* e total, com valores próximos dos obtidos em meio semissólido. Adicionalmente, a presença da

membrana contribuiu para a elevação significativa dos teores de clorofila *b* e carotenoides, o que sugere um microambiente otimizado, devido à melhora na disponibilidade de nutrientes, retenção hídrica e trocas gasosas.

A combinação adequada de sacarose, consistência do meio e controle da troca gasosa via membranas porosas é fundamental para otimizar o crescimento e a qualidade das plântulas de *C. fissilis* em cultivo *in vitro*. A associação do meio semissólido com membranas permeáveis a gases e a adição de sacarose promoveu o desenvolvimento radicular e aéreo, bem como a síntese de pigmentos fotossintéticos nas plantas germinadas *in vitro* de *Cedrela fissilis*, o que pode favorecer a micropropagação e a posterior aclimação da espécie.

REFERÊNCIAS

- Alves, J. de P. (2021). **Morfofisiologia do abacaxizeiro cv. Pérola em cultivo fotomixotrófico *in vitro* e em condição *ex vitro***. 2021. 65p. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente) – Universidade Estadual do Maranhão, Balsas, MA, 2021.
- Amaral, V. F. M. do. (2006). **Multiplicação *in vitro* de *Cedrela fissilis* Vell.** 2006. Dissertação (Mestrado) – Curso de Silvicultura, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006. Disponível em: <http://repositorio.ufsm.br/handle/1/8655>. Acesso: 02 abr. 2025.
- Aragão, V. P. (2013). **Alterações bioquímicas durante a germinação e desenvolvimento de brotações *in vitro* em *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)**. 2013. 106p. Dissertação (Mestrado), Curso de Produção Vegetal, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes. Disponível em: <https://uenf.br/posgraduacao/producao-vegetal/wp-content/uploads/sites/10/2014/08/Victor-Paulo.pdf>. Acesso em: 12 de Abr. 2025.
- Aragão, V. P. M; Ribeiro, Y. R. de S; Reis, R. S; Macedo, A. F; Floh, E. I. S; Silveira, V; Santa-Catarina, C. (2015). *In vitro* organogenesis of *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae): the involvement of endogenous polyamines and carbohydrates on shoot development. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 124: 611-620. <https://doi.org/doi:10.1007/s11240-015-0919-8>
- Ayub, R. A; Santos, J. N. dos; Junior, L. A. Z; Da Silva, D. M; De Carvalho, T. C; Grimaldi, F. (2019). Sucrose concentration and volume of liquid medium on the *in vitro* growth and development of Blackberry cv. Tupy in temporary immersion systems. **Ciência e Agrotecnologia**, 43:e007219. <http://dx.doi.org/10.1590/1413-7054201943007219>
- Barbosa, R. R. do. (2016). **Cultivo *in vitro* de pimenta malagueta em frascos com ventilação natural: respostas mixotróficas e fotoautotróficas**. 2016. 84f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro- UENF, Campos dos Goytacazes – RJ.

Batista, D. S; Dias, L. L. C; Rêgo, M. M; Saldanha, C. W; Otoni, W. C. (2017). Flask sealing on *in vitro* seed germination and morphogenesis of two types of ornamental pepper explants. **Ciência Rural**, 47: p.e20150245. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150245>

Bolhar-Nordenkamp, H.R; Long, S.P; Baker, N.R; Oquist, G; Schreiber, U.L.E.G; Lechner, E.G. (1989). Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. **Functional Ecology**, 3(4): 18. <https://doi.org/10.2307/2389624>

Carvalho (2003). **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica.

Cha-um, S; Chanseetis, C; Chintakovid, W; Pichakum, A. (2011). Promoting root induction and growth of *in vitro* macadamia (*Macadamia tetraphylla* L. ‘‘Keauu’’) plantlets using CO²-enriched photoautotrophic conditions. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, 106(2): 435-444. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-011-9940-8>

Costa Nunes, E; Volkmer de Castilho, C; Netto Moreno, F; Viana, A. M. (2002). *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 70: 259–268. <https://doi.org/10.1023/A:1016509415222>

Couto, T.R. do; Silva, J.R. da; Netto, A.T; Carvalho, V.S; Campostrini, E. (2014). Eficiência fotossintética e crescimento de genótipos de abacaxizeiro cultivados *in vitro* em diferentes qualidades de luz, tipos de frasco de cultivo e concentrações de sacarose. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 36(2): 459-466. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-2945-167/13>

Cusatis, A. C. (2014). **Melhoramento genético e silvicultural de *Cedrela fissilis* Vell.** 2014. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

Cruz, C. D. (2016). **Programa GENES: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV.

Freire, J. M; Romano, I. S; De Souza, M. V. dos S. C; Garofolo, A. C. S; Filho, T. B. S. (2022). Forest seedlings supply for restoration of the atlantic forest in Rio de Janeiro, Brasil. **Floresta e Ambiente**, 29(3): e20210058. <https://doi.org/10.1590/2179-8087-FLORAM-2021-0058>

Gago, D; Bernal, M. A; Sanchez, C; Aldrey, A; Cuenca, B; Christie, C. B; Vidal, N. (2022). Effect of sucrose on growth and stress status of *Castanea sativa* x *C. crenata* shoots cultured in liquid medim. **Plants**, 11(7):965. <https://doi.org/10.3390/plants11070965>

Gago, D; Vilavert, S; Bernal, M.Á; Sánchez, C; Aldrey, A; Vidal, N. (2021). The Effect of Sucrose Supplementation on the Micropropagation of *Salix viminalis* L. Shoots in Semisolid Medium and Temporary Immersion Bioreactors. **Forests**, 12: 1408. <https://doi.org/10.3390/f12101408>

Grimaldi, F; Meneguzzi, A; Weber, G. C; Correa, D; Gonçalves, M. J; Rufato, L; Kretzschmar, A. A. (2016). Protocolo para micropropagação de marmeleiro BA29 em meio semissólido. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, 15(3):266-270. <https://doi.org/10.5965/223811711532016266>

Guimarães, Z. T. M; Da Silva, D. C; Ferreira, M. J. (2024). Seedling quality and short-term field performance of three Amazonian forest species as affected by site conditions. **Iforest - Biogeosciences and Forestry**, 17(2): 80-89. <https://doi.org/10.3832/ifor4317-016>

Hoshino, R; Yoshida, Y; Tsukaya, H. (2019). Multiple steps of leaf thickening during sun-leaf formation in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, 100(4): 738-753. <https://doi.org/10.1111/tpj.14467>

Krainovic, P.M; Resende, A.F. de; Amazonas, N.T; Almeida, C.T. de; Almeida, D.R.A. de; Silva, C.C.S; Andrade, H.S.F. de; Rodrigues, R.R; Bracalioni, P.H.S. (2023). Potential native timber production in tropical forest restoration plantations. **Perspectives in Ecology and Conservation**, 21(4): 294-301. <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2023.10.002>

Kozai, T; Kubota, C. (2005). Concepts, definitions, ventilation methods, advantages and disadvantages. In: Kozai, T; Afreen, F; Zobayed, S.M.A (Eds). **Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system** (pp. 19-30). Springer Netherlands.

Mohamed, M. A. H; Alsadon, A. A. (2010). Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. **Scientia Horticulturae**, 123(3): 295-300. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.09.014>

Murashige, T; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. 15 (3):473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

O'Brien, T.P; McCully, M.E. (1981). **The Study of Plant Structure: Principles and Selected Methods**; Termarcaphi Pty., Ltd.: Melbourne, Australia, 1981.

Otalakoski, J; Masiero, A.M; Brandstetter, R.D; Antonio, A.F; Jaretta, G. (2021). Biometria de frutos e armazenamento de sementes de *Cedrela fissilis* Vell. **Revista Brasileira De Agropecuária Sustentável**, 11(1), 86–94. <https://doi.org/10.21206/rbas.v11i1.10299>

Paredes-Villanueva, K; López, L; Cerrilo, R. M.N. (2016). Regional chronologies of *Cedrela fissilis* and *Cedrela angustifolia* in three forest types and their relation to climate. **Trees**, 30(5): 1581–1593. <https://doi.org/10.1007/s00468-016-1391-8>

Pinheiro, M. V. M; Martins, F. B; Xavier, A; Otoni, W. C. (2013). Trocas gasosas influenciam na morfogênese *in vitro* de duas cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.). **Revista Árvore**, 37(1):19–29. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622013000100003>

Polivanova, O. B; Bedarev, V. A. (2022). Hyperhydricity in Plant Tissue Culture. **Plants**, 11(23): 3313. <https://doi.org/10.3390/plants11233313>

Pospíšilová, J; Tichá, I; Kadleček, P; Haisel, D; Plzáková, Š. (1999). Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. **Biologia Plantarum**, v. 42, p. 481–497. <https://doi.org/10.1023/A:1002688208758>

Ribeiro, I. de S; Ribeiro, L.M; Soares, J.S; Ramos, J.C.M; Sorgato, J.C. (2022). Light condition, flask sealing, and cultivation time on the germination and initial *in vitro* development of

Dendrobium nobile Lindl. **Ornamental Horticulture**, 28(4): 407-413.
<https://doi.org/10.1590/2447-536X.v28i4.2515>

Ríos-Ríos, A. M; Silva, J. V. S. da; Fernandes, J. V. M; Batista, D. (2019). Micropropagation of *Piper crassinervium*: an improved protocol for faster growth and augmented production of phenolic compounds. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 137(3):495-509.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-019-01585-8>

Saldanha, C. W; Otoni, C. G; Azevedo, J. L. F. de; Dias, L. L. C; Rêgo, M. M. do; Otoni, W. C. (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**, 110:413–422. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0162-5>

Santos, G; Cardoso, F. P; Martins, A.D; Pasqual, M. (2020). Effect of light and sucrose on photoautotrophic and photomixotrophic micropropagation of *Physalis angulata*. **Bioscience Journal**, 36(4): 1353-1367. <https://doi.org/10.14393/BJ-v36n4a2020-47738>

Santos, M. A. C. dos. (2015). **Micropropagação de *Psidium* spp.** 2015. 160p. Tese (Doutorado) – Curso de Agronomia, Universidade Federal da Paraíba, Areia. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/tede/8227/2/arquivototal.pdf>. Acesso: 12 de abr. 2025.

Santos, R. P; Cruz, A. C. F. da; Iarema, L; Kuki, K. N; Otoni, W. C. (2008). Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados, **Revista Ceres**, 55(4): 356-364.

Santos, S. da S; Moura, M.F. de; Guedes, R.S; Gonçalves, E.P; Alves, E.U; Melo, P.A.F.R. de. (2009). Emergência e vigor de plântulas de *Cedrela fissilis* L. em função de diferentes posições de profundidades de semeadura. **Revista Biotemas**, 22(4): 45-52. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2009v22n4p45>

Schneider, C.A; Rasband, W.S; Eliceiri, K.W. (2012). NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat Methods** 9:671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>

Silva, D. da; Stuepp, C. A; Wendling, I; Helm, C; Fragoso, R. de O; Angelo, A. C. (2020) Can seeds storage conditions influence the quality of *Cedrela fissilis* seedlings? **Global Journal of Agricultural Innovation, Research & Development**, 8: 88-94.
<https://doi.org/10.15377/2409-9813.2021.08.6>

Silva, D. da; Stuepp, C. A; Wendling, I; Helm, C; Fragoso, R. de O; Angelo, A. C. (2021) Physiological and biochemical changes in *Cedrela fissilis* seeds during storage. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 55(e01309):1-8. <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2020.v55.01309>

Silva, K. B. da; Reiniger, L. R. S; Rabaiolli, S. M. dos S; Ziegler, A. C. da F; Stefanel, C. M. (2021). Efeito de diferentes períodos de cultivo na micropropagação de brotações de *Luehea divaricata*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, 41(e201901921): 1-6.
<https://doi.org/10.4336/2021.pfb.41e201901921>

Silva, T.D; Chagas, K; Batista, D.S; Felipe, S.H.S; Louback, E; Machado, L.T; Fernandes, A.M; Buttrós, V.H.T; Koehler, A.D.; Farias, L.M; Santos, A.F; Silva, P.O; Otoni, W.C. (2019). Morphophysiological *in vitro* performance of Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) based on culture medium formulations. **In Vitro Cellular Development Biology-Plant**, 55: 454–467. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-10003-9>

Souza, L. M. de; Barbosa, M. R; Souza, R.A. de; Bussmeyer, E.C. (2020). Influência da sacarose no crescimento e no perfil de pigmentos fotossintéticos em duas espécies arbóreas cultivadas *in vitro*. **Brazilian Journal of Development**, 6(1): 1916-1926. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n1-135>

Trazzi, P. A; Rocha, L. F; Cunha, F. L; Carvalho, D. de; Santos, J.A. dos. (2019). Cultura de tecidos vegetais na conservação da biodiversidade. In: Freitas, R.M. de. **Ciências Biológicas Campo Promissor em Pesquisa**. Atena Editora, 2019. Disponível em: <https://atenaeditora.com.br/catalogo/post/cultura-de-tecidos-vegetais-na-conservacao-da-biodiversidade>. Acesso em: 12 jun. 2025.

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**, 144(3): 307-313. [http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)

Capítulo II

Aspectos fisiológicos de *Cedrela fissilis* Vellozo germinada *in vitro* sob condições de ventilação forçada e elevado CO₂

1. INTRODUÇÃO

A propagação *in vitro* de espécies arbóreas nativas como a *Cedrela fissilis* Vell., tem se consolidado como uma ferramenta estratégica para conservação e restauração ambiental, sobretudo, diante das ameaças impostas pela exploração madeireira e degradação de habitats naturais (Paredes-Villanueva et al., 2016; Otalakovski et al., 2021). O cultivo *in vitro* permite controlar variáveis ambientais críticas ao desenvolvimento vegetal, tais como luminosidade, temperatura, umidade e trocas gasosas, o que favorece a multiplicação de plantas com maior eficiência e qualidade genética (Trazzi et al., 2019).

Para otimizar o microambiente dos recipientes no cultivo *in vitro*, tecnologias alternativas têm sido propostas para promover a melhor ventilação e enriquecimento com CO₂, como o uso de membranas microporosas, que favorecem a troca de gases com o meio externo, elevam a disponibilidade de CO₂ e reduzem a umidade relativa, e assim contribuem para o fortalecimento das estruturas vegetais e o aumento da eficiência fotossintética (Saldanha et al., 2012; Barbosa et al., 2021). Além do uso de membranas, em condições de cultivo *in vitro* também podem ser utilizadas câmaras de crescimento climatizadas com controle automatizado de luz, temperatura e ventilação para maximizar o desempenho das culturas, e promover condições próximas aos naturais e que facilita a transição para o ambiente *ex vitro* (Kozai, 2010; Xiao et al., 2011).

Em adição ao uso de membranas porosas e câmaras de crescimento, o uso de ventilação forçada, tampas com filtros permeáveis a gases e a suplementação de CO₂ têm sido implementadas com sucesso no cultivo *in vitro* de diversas espécies, que promove o aumento da biomassa, folhas e raízes mais robustas, e maior taxa de sobrevivência durante a aclimatização (Ríos-Ríos et al., 2019; Ahmed et al., 2022; Silva et al., 2023). O aprimoramento do controle do fluxo de ar e da composição da atmosfera dentro dos frascos *in vitro* é, portanto, um dos fatores determinantes para a obtenção de plantas vigorosas e aptas à adaptação em condições naturais.

Outro gargalo técnico do cultivo *in vitro* de plantas, especialmente em arbóreas, e uma das etapas fundamentais do processo é a aclimatização, pois é uma etapa que demanda uma readaptação fisiológica e morfológica das plantas às condições ambientais externas. A eficiência dessa etapa está diretamente relacionada à qualidade das plantas produzidas *in vitro*, a qual pode ser incrementada pela adoção de sistemas que favoreçam a fotossíntese e a formação de estruturas funcionais (Alves et al., 2021; Chandra et al., 2010). Dessa forma, investir em sistemas de vedação alternativos e no enriquecimento com CO₂ durante o cultivo representa

uma estratégia promissora para garantir a eficácia do processo de propagação de *Cedrela fissilis*, e contribui para a conservação e uso sustentável dessa importante espécie florestal.

Diante dos resultados observados, a combinação do uso de membranas microporosas com o enriquecimento de CO₂ no interior dos recipientes de cultivo surge como um gargalo técnico ainda pouco explorado para *C. fissilis*, especialmente exigências fisiológicas da espécie durante a fase de transição para o ambiente *ex vitro*. Embora as membranas porosas tenham demonstrado potencial para melhorar as trocas gasosas e favorecer o desenvolvimento *in vitro*, a ausência de controle preciso sobre a composição atmosférica interna, particularmente em relação aos níveis de CO₂, pode limitar o desempenho fotossintético e o acúmulo de biomassa em fases críticas do cultivo. Assim, propõe-se como hipótese que o aumento da porosidade das membranas, aliado ao enriquecimento controlado de CO₂, resultará em plântulas mais vigorosas, com maior eficiência fotossintética e maior taxa de sobrevivência durante a aclimatização, etapa-chave para o sucesso da micropropagação de espécies arbóreas nativas e ameaçadas como o cedro-rosa.

2. OBJETIVOS

2.2 Geral

Avaliar o efeito do enriquecimento de CO₂ e da permeabilidade das membranas gasosas no crescimento, nos aspectos anatômicos e na atividade fotossintética de *Cedrela fissilis*, a fim de compreender como essas condições influenciam seu desempenho e aclimatação.

2.3 Específicos

- Quantificar o crescimento da parte aérea, biomassa e área foliar de *Cedrela fissilis* sob diferentes concentrações de CO₂ e níveis de permeabilidade gasosa (número de membranas);
- Verificar a integridade do fotossistema II em resposta ao aumento de CO₂ e permeabilidade;
- Investigar a relação entre o aumento da concentração de CO₂ aliado à maior permeabilidade das membranas e o desempenho fisiológico global da espécie, além de contribuir para estratégias de manejo e cultivo de *Cedrela fissilis* em ambientes enriquecidos com CO₂.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Desinfestação das sementes

A metodologia adotada neste item seguiu o mesmo procedimento metodológico descrito no item 4.1 capítulo I.

3.2. Germinação *in vitro* de *Cedrela fissilis*

Após a desinfestação das sementes de *C. fissilis*, estas foram inoculadas em tubos de ensaio (24 x 150 mm) (1 semente por tubo) com 10 mL de meio de cultura semissólido Murashige & Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) à metade da concentração de macronutrientes e micronutrientes ($\frac{1}{2}$ MS), acrescido com mio-inositol (100 mg L^{-1}), vitaminas MS e ágar ($5,5 \text{ g L}^{-1}$), sem sacarose. O pH dos meios de cultura foi ajustado para $5,8 \pm 0,03$ antes do processo de autoclavagem que ocorreu a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos. Após a inoculação das sementes, os tubos foram vedados com tampas de polipropileno, envolvidas com filme PVC e mantidas em sala de crescimento de crescimento a $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro, por um período de 10 dias, sob irradiância de $40 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fornecida por duas lâmpadas LEDs (Diodos Emissores de Luz) de cor branca (Tubular T8 Led, 10w, Brasília, Brasil).

3.3. Cultivo de *Cedrella fissilis* em câmara climática de crescimento de plantas

Após 10 dias da inoculação *in vitro*, as sementes livres de contaminação foram transferidas para frasco de vidro com capacidade para 350 mL (1 unidade experimental em cada frasco), com 50 mL de meio de cultura $\frac{1}{2}$ MS, suplementado com mio-inositol (100 mg L^{-1}), vitaminas MS e ágar ($5,5 \text{ g L}^{-1}$), sem sacarose. Os frascos foram vedados com tampas de polipropileno com dois e quatro orifícios de 10 mm de diâmetro cobertos por membranas porosas elaboradas a partir da metodologia descrita por Saldanha et al. (2012).

Posteriormente, os frascos de vidro foram transferidos para duas câmaras climáticas, Modelo: TE-4002/3 (Tecnal®, Piracicaba – SP, Brasil), com dimensões internas: A: 1500 mm x L: 1000 mm x P: 800 mm (Figura 1), localizadas no Laboratório de Ciências Ambientais e Biodiversidade (LCAB/UEMA). O ambiente experimental dentro de cada câmara climática foi de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, umidade relativa de 60%, irradiância de $100 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas LED SG Delta 3 módulos (azul, vermelha e branca); ar forçado com ventilação contínua, Vazão: $500 \text{ m}^3/\text{ha}$ 0Pa. O ar no interior da câmara foi enriquecido com $420 \pm 30 \text{ ppm}$ (Câmara 1) e $800 \pm 30 \text{ ppm}$ (Câmara 1) de CO_2 injetado a partir de cilindro de CO_2 . O fotoperíodo dentro

das câmeras foi de 12 horas luz. As plantas foram mantidas nas condições acima mencionadas, por 45 dias.



Figura 1. Experimento de germinação de sementes de *Cedrela fissilis* conduzido em câmara climática (TE-4002/3) com duas concentrações de CO₂ (420 e 800 ± 30 ppm) e vedação (2 e 4 membranas porosas).

3.4. Análises de crescimento

Após 45 dias de cultivo foram avaliados o comprimento da parte aérea (CPA) e da maior da raiz (CMRA), o número de raízes (NR), folhas (NF) e folíolos (NFO), diâmetro do caule (DPA) e da raiz (DRA), massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSRA), área foliar (AF) e conteúdo relativo de água (CRA). A área foliar foi medida através do software ImageJ (National Institute of Health, EUA), através das imagens das folhas.

3.5. Determinação de pigmentos fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos foram extraídos com base na metodologia de Santos *et al.* (2008), com algumas modificações, conforme a metodologia descrita no item 3.6. do experimento I.

3.6. Conteúdo relativo de água (%)

Para estimar o conteúdo relativo de água das folhas, seguiu-se a metodologia proposta por Barr e Weatherley (1962), com algumas modificações. Cinco discos foliares de 3 mm de diâmetro foram excisados a partir do terceiro par de folhas, contados a partir do ápice, e imediatamente foi determinada a sua massa fresca (MF); em seguida, os discos foliares foram submersos em água destilada (copos plásticos de 50 mL) por 24 horas em local com fotoperíodo controlado de 16 horas luz e 8 horas escuro. Posteriormente, a água foi descartada com o auxílio de uma peneira e o excesso de água na superfície dos discos foliares foi eliminado com papel toalha. Após esse procedimento, os discos foram pesados para obtenção da massa túrgida (MT) e logo após, foram secas em estufa a 45 °C por 24 horas. Depois desse processo, os discos foliares foram novamente pesados para obtenção da massa seca (MS). O conteúdo relativo foi calculado de acordo com a equação 1:

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

Onde,

CRA= Conteúdo Relativo de Água

MF = Matéria fresca das folhas

MT = Matéria túrgida das folhas

MS = Matéria seca das folhas.

3.7. Anatomia vegetal

A metodologia deste item segue a mesma descrita no capítulo I, especificamente no item 4.7.1 de forma geral realizada em cinco etapas: (1) coleta de folhas, caules e raízes e fixação em FAA₅₀ por 48 horas; (2) Desidratação em série etílica (30 a 100%) e inclusão em historesina; (3) cortes (5-7 µm) e coloração com azul de toluidina; (4) Montagem e visualização das lâminas; (5) Fotos capturadas em diferentes aumentos (4X e 10X).

3.8. Índice estomático

A impressão epidérmica foi feita com o quarto par de folhas completamente expandidas, contadas a partir do ápice; a parte abaxial da folha inteira, ou segmentos dela, foi pressionada sob adesivo instantâneo (SuperBonder®) em lâminas de vidro. As impressões foram examinadas em microscópio de luz (modelo B20T; Bioptika, Colombo, PR, Brasil) com o sistema U-photo acoplado a uma câmera digital (modelo CMOS-5.0; Bioptika, Colombo, PR, Brasil) e um computador com o software capture V2.1. As imagens capturadas foram processadas pelo software Image J® e o índice estomático foi calculado conforme Cutter (1968):

$$\text{Índice Estomático (\%)} = C2 \cdot 100 / (C1 + C2)$$

Em que: C1 = células epidérmicas e C2 = estômatos

3.9. Aclimação de *Cedrela fissilis*

Após serem retiradas da câmara climática de CO₂ as plantas foram transferidas para copo de poliestireno com capacidade para 350 mL com substrato Carolina Soil® (Solo Carolina®, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil), foram mantidas por 18 dias em estufa com irrigação realizada 6 vezes por dia (07:00h; 09:00h; 11:00h; 13:00h; 15:00h e 17:00h) por 10 minutos. Posteriormente, após o desenvolvimento do sistema radicular, as plantas foram transferidas para vasos de 10 litros, preenchidos com substrato Carolina Soil e mantidos em estufa nas mesmas condições anteriores. Após completar 30 dias, as plantas que apresentaram sobrevivência foram submetidas a análise de fluorescência da clorofila *a* e teor de clorofila.

3.10. Análises de Fluorescência da Clorofila *a* em plantas aclimatadas

As medidas de fluorescência foram avaliadas com um fluorímetro portátil não modulado (Pocket-PEA, Reino Unido). Folhas selecionadas do 3º par, totalmente expandidas, foram adaptadas no escuro por 30 minutos, com cliques foliares. Com a análise foi determinado: rendimento quântico do fotossistema II (Fv/Fm), Energia absorvida por centro de reação ativo (RC/ABS), Eficiência de transferência de elétrons no fotossistema II (PSII) (Fv/F0) e o Índice de desempenho fotossintético (PI).

3.11. Teor de clorofila em plantas aclimatadas

Para análise do índice de clorofila, foi utilizado o medidor portátil SPAD (Konica Minolta). As medições foram realizadas com as folhas expandidas e saudáveis, realizadas 4 medições por tratamento, uma vez que o número de plantas sobreviventes limitou a extensão da análise. As medições foram realizadas no período diurno, entre as 08:00 e 11:00 horas da manhã, sob condições climáticas da estufa onde as plantas estavam aclimatadas.

3.12. Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados em arranjo fatorial 2x2, onde os fatores foram: número de membranas (duas e quatro membranas), concentração de CO₂ (420 e 800 ± 30 µL L⁻¹), cada tratamento teve 6 repetições, cada uma

constituída por um frasco com uma semente como unidade experimental. Os dados foram analisados por meio de análise de variância bidirecional (ANOVA), com as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa Genes, versão 1990.2018.39 (Cruz, 2016).

4 RESULTADOS

4.1. Efeito do número de membranas e da concentração de CO₂ no crescimento

A quantidade de membranas usadas no sistema de vedação (2 e 4) em conjunto com diferentes concentrações de CO₂ (420 e 800 ± 30 ppm) exerceu influência significativa no crescimento e desenvolvimento de *C. fissilis* (Figura 3). As plantas cultivadas com duas membranas apresentaram maior desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular, caracterizado pela formação de um número superior de raízes laterais, submetidas à maior concentração de CO₂. O uso de 800 ppm de CO₂ em combinação com quatro membranas demonstrou influência positiva na produção de biomassa, em comparação com 420 ppm. As plantas submetidas a 420 ppm de CO₂ exibiram caules mais finos (Figura 3).

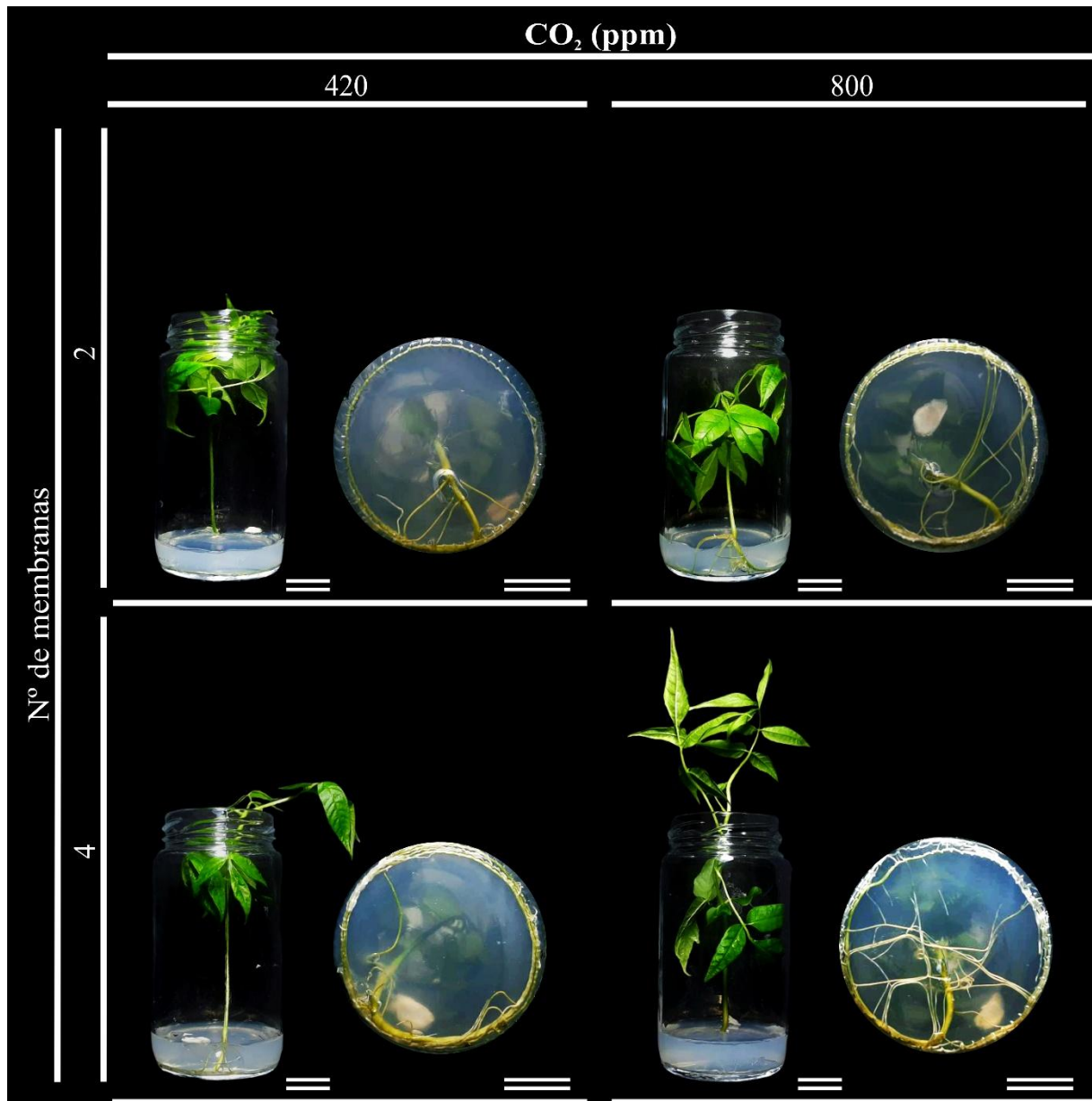


Figura 3. Plantas de *Cedrela fissilis* germinadas *in vitro* e mantidas em câmara climática de CO₂ sob diferentes níveis de trocas gasosas (2 ou 4 membranas) e concentrações de CO₂ (420 ou 800 ± 30 ppm) por 45 dias. Barras = 2 cm.

Em relação a parte aérea o tratamento no qual utilizou-se duas membranas na concentração de 420 ppm foi o único que apresentou diferença significativa dos demais com os menores valores (Figura 4A). O número de membranas usadas no sistema de vedação influenciou no diâmetro da raiz, no qual duas membranas na concentração de 420 ppm apresentou maiores resultados e na concentração de 800ppm frascos com quatro membranas obtiveram os maiores diâmetros (Figura 4D). Quanto ao número de raízes laterais observou-se o mesmo comportamento em relação a parte aérea, no tratamento em que o uso das membranas

associados a condição de duas membranas em 420 ppm obteve os menores resultados (Figura 4G).

As plantas não apresentaram diferenças significativas nas variáveis massa seca da parte aérea, massa seca das raízes e área foliar quanto as membranas testadas, porém, em relação ao CO₂, houve diferença no efeito das concentrações, onde as plantas na concentração de 800 ppm proporcionou os maiores valores para as variáveis (Figura I-K).

Não houve diferença significativa no efeito das membranas e no efeito das concentrações nas variáveis comprimento da maior raiz (Figura 4B), diâmetro do caule (Figura 4C), número de folhas (Figura 4E), número de folíolos (Figura 4F), e conteúdo relativo de água (Figura 4H).

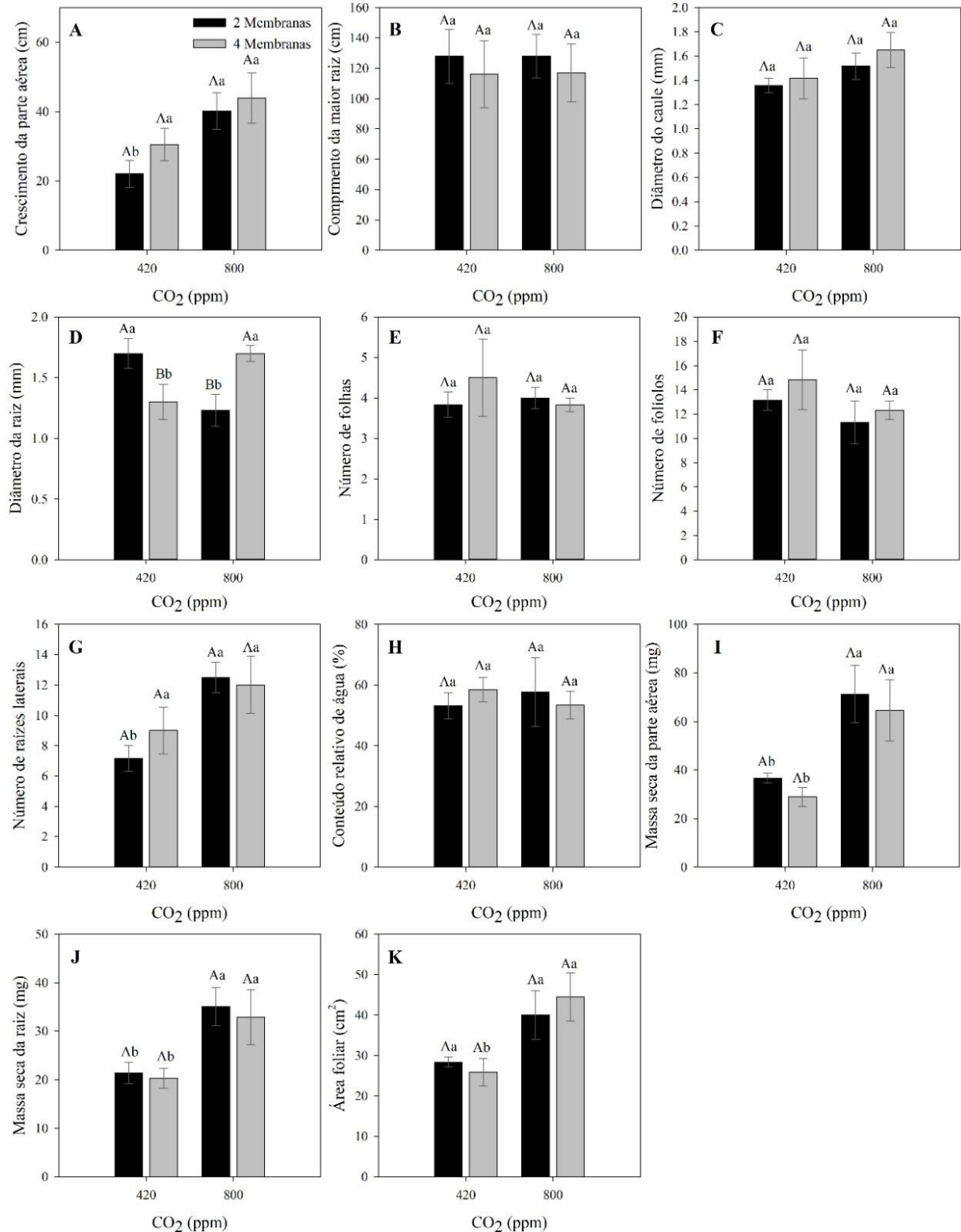


Figura 4. Efeito da concentração de CO₂ (420 e 800 ± 30 ppm) e do número de membranas permeáveis a gases (duas e quatro) sobre características morfológicas e fisiológicas de plantas de *Cedrela fissilis* cultivadas *in vitro*. (A) crescimento da parte aérea, (B) comprimento da maior raiz, (C) diâmetro do caule, (D) diâmetro da raiz, (E) número de folhas, (F) número de folíolos, (G) número de raízes laterais, (H) conteúdo relativo de água, (I) massa seca da parte aérea, (J) massa seca da raiz e (K) área foliar. Letras maiúsculas comparam o número de membranas para a mesma concentração de CO₂; enquanto letras minúsculas comparam as concentrações de CO₂

para um mesmo número de membranas. Letras distintas indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras de erro: erro padrão para $n = 6$.

4.2. Produção de pigmentos fotossintéticos sob diferentes sistemas de vedação associados à concentração de CO₂

O teor de clorofila *a* (Figura 5A), carotenoides (Figura 5C) e clorofila total (Figura 5D) das plantas de *C. fissilis* foi influenciado pelo sistema de vedação a penas associadas à 420 ppm de CO₂, no qual as plantas cultivadas com quatro membranas obtiveram valores superiores. Ao comparar o efeito da concentração de CO₂ sob as plantas em 420 ppm com duas membranas, evidenciou-se menor conteúdo de clorofila *a* (Figura 5A), carotenoides (Figura 5C) e clorofila total (Figura 5D); enquanto para plantas cultivadas com quatro membranas alterou apenas a produção de carotenoides, o que aumentou a produção do pigmento em 420 ppm de CO₂ (Figura 5C).

Para a clorofila *b* (Figura 5B) e a razão clorofila *a*/clorofila *b* (Figura 5E) não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos.

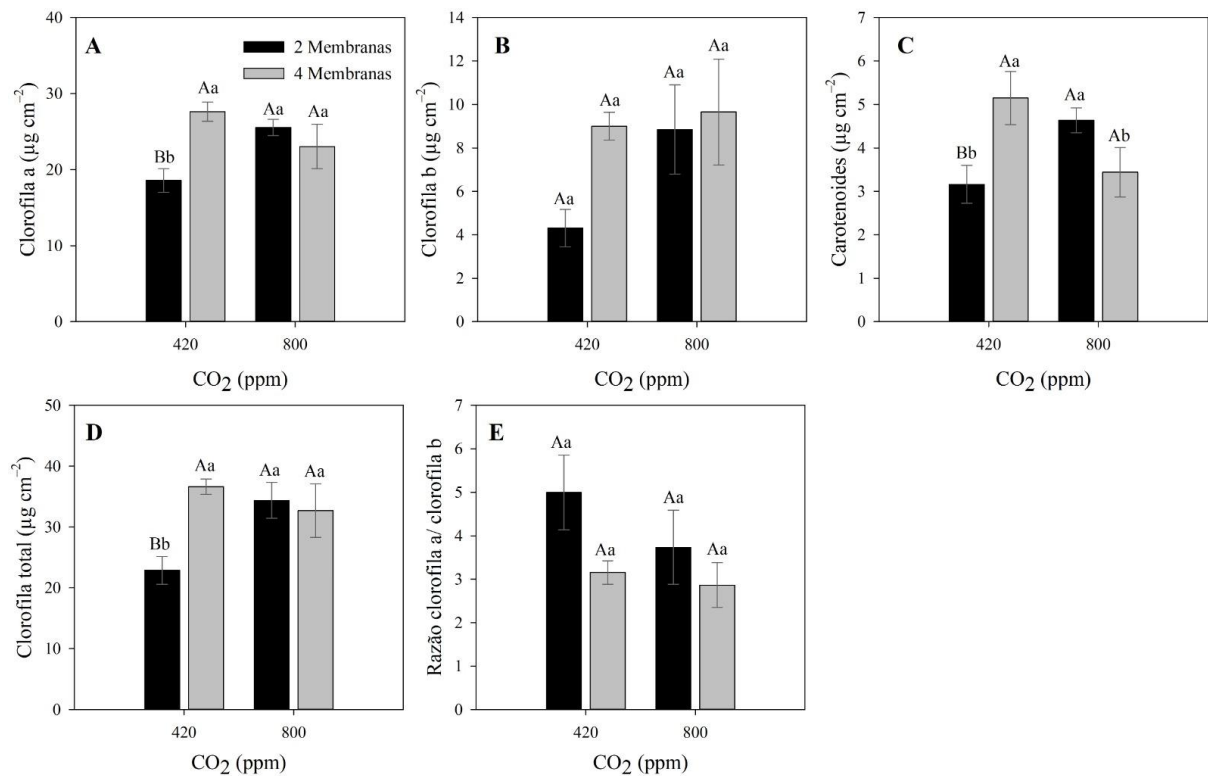


Figura 5. Teores de pigmentos fotossintéticos em plantas de *Cedrela fissilis* cultivadas *in vitro* submetidas a diferentes concentrações de CO₂ (420 e 800 ± 30 ppm) e número de membranas permeáveis a gases (duas e quatro). (A) Clorofila *a*, (B) Clorofila *b*, (C) Carotenoides, (D) Clorofila total e (E) Razão clorofila *a*/clorofila *b*. Médias seguidas por letras diferentes (maiúsculas para comparação entre o número de membranas e minúsculas para comparação de

concentrações de CO₂) diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Barras de erro: erro padrão para $n = 6$.

4.3 O nível de CO₂ fornecido e o sistema de vedação alteraram a densidade estomática nas plantas *in vitro*

Em 420 ppm de CO₂, não houve diferença estatística entre plantas cultivadas com duas ou quatro membranas, que apresentaram valores médios semelhantes de densidade estomática (DE) (~60 estômatos mm⁻²). Já em 800 ppm de CO₂, observou-se aumento expressivo da DE em plantas cultivadas com quatro membranas, atingiram os maiores valores (~120 estômatos mm⁻²), em comparação com as com duas membranas (~95 estômatos mm⁻²). Ao comparar os resultados obtidos entre as duas concentrações de CO₂ testadas, com um mesmo sistema de vedação, constatou-se que níveis superiores de CO₂, independentemente do número de membranas, estimularam maior densidade estomática (Figura 6).

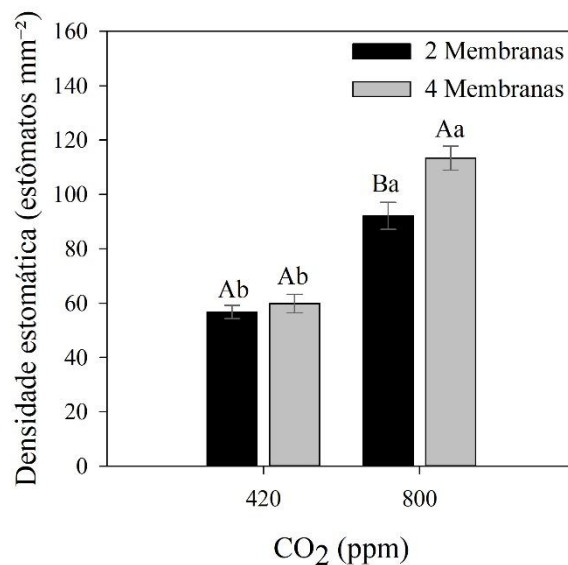


Figura 6. Densidade estomática em folhas de *Cedrela fissilis* cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de CO₂ (420 e 800 ± 30 ppm) e número de membranas permeáveis à troca gasosa (duas ou quatro). Médias seguidas por letras distintas (maiúsculas para comparação entre o número de membranas e minúsculas para comparação de concentrações de CO₂) diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barras de erro: erro padrão para $n = 6$.

4.4. Efeito do número de membranas e da concentração de CO₂ na fisiologia de plantas aclimatadas

Os valores de eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm) (Figura 7A), a razão entre centros de reação ativos e absorção de energia (RC/ABS) (Figura 7B), o índice de

vitalidade do fotossistema II (Fv/Fo) (Figura 7C) e o índice de desempenho fotossintético (Figura 7D) não apresentaram diferença significativa nas plantas de todos os tratamentos.

Por outro lado, o teor relativo de clorofila, avaliado pelo índice SPAD (Figura 7E), foi a única variável que apresentou diferença significativa, em que as plantas mantidas nos tratamentos com duas membranas a 420 ppm apresentaram valores de SPAD superiores em relação àquelas mantidas em condições com quatro membranas na mesma concentração. Nos demais tratamentos, os valores de SPAD foram semelhantes.

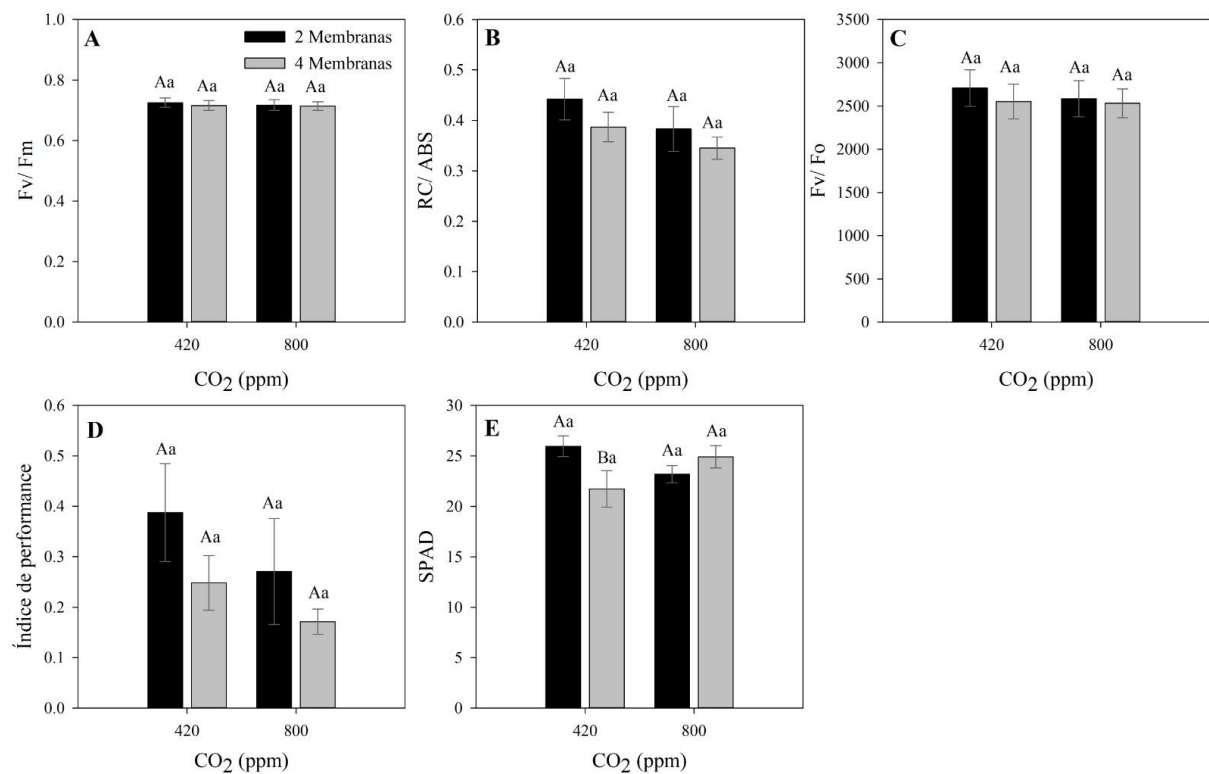


Figura 7. Parâmetros fotossintéticos de plantas de *Cedrela fissilis* cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de CO₂ (420 e 800 ± 30 ppm) e número de membranas permeáveis a gases (duas e quatro membranas), após a aclimação. (A) Eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm), (B) razão entre centros de reação ativos e absorção de energia (RC/ABS), (C) índice de vitalidade do fotossistema II (Fv/Fo), (D) índice de desempenho fotossintético e (E) teor relativo de clorofila (SPAD). Letras maiúsculas comparam o número de membranas para a mesma concentração de CO₂; enquanto letras minúsculas comparam as concentrações de CO₂ para um mesmo número de membranas. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey (p < 0,05). Barras de erro: erro padrão para n = 4.

5 DISCUSSÃO

A concentração de CO₂ fornecida nas câmaras de crescimento, em comparação com o sistema de vedação, foi a condição de cultivo que mais influenciou no crescimento e desenvolvimento das plantas *in vitro* de *C. fissilis*. No entanto, para alguns parâmetros

avaliados, houve interação entre as duas variáveis testadas, no qual a combinação de 420 ppm de CO₂ e duas membranas limitou o crescimento da parte aérea e a formação de raízes laterais e, a interação do CO₂ com quatro membranas diminuiu a área foliar das plantas. A baixa concentração de CO₂ no sistema de cultivo associado com o número inferior de membranas porosas diminuiu a taxa de troca de CO₂ entre o ambiente interno e externo do recipiente de cultivo, o que limitou a disponibilidade de carbono para as plantas e, portanto, reduziu o seu crescimento, em estudos realizados por Banerjee et al. (2019) foi demonstrado que a disponibilidade de CO₂ para as plantas de *Arabidopsis thaliana* foi determinado pelo tipo de vedação, os autores afirmaram que as membranas porosas aumentaram essa disponibilidade, ou seja podemos sugerir que o uso de membranas nos frascos otimizou a utilização de CO₂ pelas plantas de *C. fissilis*.

O maior número de raízes laterais obtidas sob 800 ppm de CO₂ combinadas com o uso de duas membranas, corrobora com resultados obtidos em outros trabalhos que demonstram que o enriquecimento de CO₂ pode promover o crescimento radicular lateral, e melhora a absorção de nutrientes e a estabilidade da planta (Li et al., 2022). A expansão significativa da área foliar sob 800 ppm de CO₂ e maior permeabilidade das membranas observada nas plantas de *C. fissilis* corrobora com outros estudos que demonstraram que o enriquecimento de CO₂ pode incrementar a área foliar em diversas espécies, o que promove maior captação de luz e eficiência fotossintética (Li et al., 2024). Por exemplo, em pepino (*Cucumis sativus*), a exposição a 800 ± 50 ppm de CO₂ incrementou em 19,32% a área foliar após 35 dias, com células do mesófilo mais organizadas e volumosas, o que indica maior eficiência fotossintética (Li et al., 2024; Villagran et al., 2025). Portanto, o aumento da área foliar pode resultar em maior biomassa da parte aérea como observado em nosso estudo.

A produção de biomassa nas plantas *in vitro* de *C. fissilis*, tanto da parte aérea como radicular foi alterada pela concentração de CO₂, foi superior nas plantas cultivadas em condições de 800 ppm de CO₂. Em sistemas de cultivo fotoautotróficos o aumento da disponibilidade de CO₂ é chave para estimular o acúmulo de biomassa das plantas *in vitro* (Arigita et al., 2010; Tomimatsu; Tang 2016). Por exemplo, em seagrass (*Thalassia hemprichii*), o enriquecimento de CO₂ estimulou o aumento da biomassa, como resultado do crescimento foliar acelerado e da maior eficiência fotossintética (Jiang et al., 2010). Em alface, o aumento do CO₂ para 800 ± 30 ppm também incrementou a biomassa (Holley et al., 2022).

O diâmetro da raiz variou o aumento diante da concentração de CO₂ e do número de membranas porosas, no qual em 420 foi superior nas plantas cultivadas com duas membranas e sob 800 ppm foi maior nas plantas cultivadas com quatro membranas, o que indica que a

elevação do CO₂ pode neutralizar o efeito da permeabilidade das membranas sobre essa característica. Estudos indicam que o enriquecimento de CO₂ pode modular a expressão de aquaporinas, proteínas de membrana que facilitam o transporte de CO₂ e água, o que influencia a morfologia radicular (Li et al., 2020; Ermakova et al., 2021).

A ausência de diferenças significativas no comprimento da maior raiz e no diâmetro do caule em nosso estudo é consistente com pesquisas já realizadas em pepino, onde o enriquecimento de CO₂ não afetou significativamente essas variáveis sob estresse hídrico, mas melhorou a condutividade hidráulica e a biomassa radicular (Li et al., 2020). A estabilidade no número de folhas e folíolos das plantas de *C. fissilis* entre os tratamentos testados também foi observada em estudos com ginseng brasileiro (*Pfaffia glomerata*), onde o enriquecimento de CO₂ não alterou significativamente esses parâmetros, mas aumentou o conteúdo relativo de água nas folhas, o que indicou estabilidade fisiológica (Saldanha et al., 2013). De fato, o aumento no conteúdo relativo de água sob enriquecimento de CO₂ pode estar associado à redução na densidade e condutância estomática, o que reduz a transpiração e aumenta a eficiência do uso da água (Teng et al., 2006). Contudo, neste estudo, plantas de *C. fissilis* cultivadas com diferentes concentrações de CO₂ e número de membranas porosas não evidenciaram diferenças para este parâmetro.

O teor de clorofila *a* foi menor em plantas de *C. fissilis* cultivadas com duas membranas sob 420 ppm de CO₂, enquanto o aumento para quatro membranas ou a elevação do CO₂ resultou em valores mais elevados, o que sugere que tanto o enriquecimento de CO₂, quanto o aumento da permeabilidade ao gás, favorecem o acúmulo de clorofila *a*. Em plantas de videiras, o enriquecimento de CO₂ promoveu o acúmulo de clorofila, uma vez que concentrações de CO₂ de 700 ± 30 ppm e 850 ± 30 ppm aumentaram os teores de clorofila *a* e *b* em comparação a 500 ± 30 ppm (Zhou et al. 2024).

A ausência de diferenças significativas nos teores de clorofila *b* entre os tratamentos testados neste estudo para a germinação de *C. fissilis* indica uma menor sensibilidade desse pigmento às variações de CO₂ e permeabilidade de membranas. Estudos de Zhang et al. (2012) em *Impatiens hawkeri* os autores demonstraram que, embora o CO₂ elevado tenha aumentado a taxa fotossintética, houve uma redução significativa nos teores de clorofila *a*, enquanto a clorofila *b* apresentou uma redução menos evidente. A variação na produção de clorofila *a* e *b*, com relação à taxa de troca gasosa dentro dos recipientes depende da espécie vegetal. No presente estudo a razão clorofila *a/b* das plantas de *C. fissilis* não diferiu entre as condições de vedação e CO₂ usados, enquanto em *Pinus densiflora* expostos a longo prazo a CO₂ elevado

mostraram alterações na razão clorofila *a/b*, o que indicou possíveis adaptações no aparato fotossintético (Kim et al., 2022).

A obtenção de menores teores de carotenoides em plantas de *C. fissilis* cultivadas com duas membranas e 420 ppm de CO₂, com aumento significativo ao elevar para quatro membranas ou aumentar o CO₂, indica que o enriquecimento de CO₂ pode influenciar a concentração de carotenoides (Loladze et al. 2019). Contudo, em 800 ppm com quatro membranas, houve uma redução significativa no teor de carotenoides, o que sugere que o excesso de permeabilidade em alta concentração de CO₂ pode limitar o acúmulo desse pigmento, Segundo Song et al. (2021) o efeito do enriquecimento de CO₂ no conteúdo de carotenoides das plantas varia de acordo com a espécie. Namraj et al. (2018) observaram que o acúmulo de carotenoides é influenciado pela idade das folhas, em estudo com *Arabidopsis* em ambiente enriquecido com CO₂ (800ppm) notaram que o maior acúmulo de carotenoides acontece nas folhas mais novas comparado ao acúmulo nas folhas mais velhas.

O número de membranas porosas alterou a densidade estomática (DE) das folhas de plantas de *C. fissilis* cultivadas sob 800 ppm de CO₂, foi superior nas plantas dos tratamentos com quatro membranas, já ao comparar o nível de CO₂ dentro das câmaras climáticas, esse parâmetro foi reduzido com 420 ppm de CO₂. Esses resultados demonstram que concentrações elevadas de CO₂, associadas ao maior número de membranas, potencializam a formação estomática em *C. fissilis* cultivada *in vitro*. Geralmente, a densidade estomática diminui em altas concentrações de CO₂, mas há casos de aumento dependendo de fatores genéticos e ambientais, ligando expressão gênica, metabolismo das células-guarda e vias de sinalização no controle estomático, ou seja, não existe um efeito linear simples quanto a esse fator (Santrucek et al., 2014; Engineer et al., 2016; Xu et al. 2016). Portanto, o comportamento observado no presente estudo para densidade estomática está relacionado às características individuais da *C. fissilis*. Resultados semelhantes foram encontrados em acessos de diferentes linhagens de trigo, onde os materiais genéticos não considerados “elites” apresentaram aumento de em ambientes com maior concentração de CO₂, e o contrário para linhagens elites (Wall et al. 2023). Ademais, também tem sido reportada maior DE em plantas de milho cultivadas em ambiente enriquecido com 700 ± 30 ppm de CO₂ (Khan et al. 2024) e em 800 ± 30 ppm de CO₂ sob estresse hídrico (Wel et al. 2022).

A manutenção dos valores de Fv/Fm em torno de 0,74 a 0,77 indica que o fotossistema II (PSII) permaneceu funcionalmente íntegro nas plantas aclimatadas de *C. fissilis* germinadas sob as diferentes condições avaliadas, o que indica que tanto o aumento da concentração de CO₂ quanto a variação no número de membranas não afetaram a integridade funcional do

fotossistema II. Esse resultado é consistente com estudos de Hao *et al.* (2013) em *Isatis indigotica*, onde o Fv/Fm também se manteve estável sob enriquecimento de CO₂, o que sugeriu ausência de fotoinibição do PSII. De fato, valores de Fv/Fm entre 0,75 e 0,85 estão dentro da gama que refletem adequada eficiência do PSII (BolhárNordenkampf *et al.* 1989). A observação de valores de SPAD mais elevados em plantas de *C. fissilis* aclimatadas provenientes do cultivo *in vitro* com duas membranas a 420 ppm de CO₂, em comparação com aquelas com quatro membranas na mesma concentração, indica uma influência da permeabilidade das membranas na retenção de clorofila sob condições de CO₂ ambiente. Estudos de Xie *et al.* (2020) em culturas como milho e arroz demonstraram que o enriquecimento de CO₂ pode aumentar os valores de SPAD, refletiu um maior conteúdo de clorofila. No entanto, Wheeler *et al.* (2023) afirmam que a resposta pode variar entre espécies e cultivares, como observado em variedades de hortaliças, onde algumas mostraram aumento nos valores de SPAD com CO₂ elevado, enquanto outras não apresentaram mudanças significativas.

A espessura foliar e a distribuição interna dos pigmentos afetam a refletância e a transmitância da luz nas bandas sensíveis ao SPAD, interferiu na correspondência entre os valores medidos e os teores reais de clorofila (Li *et al.*, 2009). Ainda, a saturação do sensor em folhas com alta concentração de clorofila pode reduzir a sensibilidade do SPAD, o que levou a desvios na estimativa do conteúdo total (Gitelson *et al.*, 2003). Além disso, fatores como iluminação ambiente, variações na estrutura foliar e no conteúdo de nitrogênio podem impactar a acurácia das leituras ópticas, mesmo em condições de campo controladas (Wang *et al.*, 2014).

6 CONCLUSÕES

O estudo demonstrou que o crescimento e a fisiologia de *Cedrela fissilis* são favorecidos pela elevação da concentração de CO₂ (800 ± 30 ppm) e pelo aumento da permeabilidade ao gás (quatro membranas). Observou-se maior desenvolvimento da parte aérea, biomassa seca e área foliar nessas condições. Parâmetros fotossintéticos como Fv/Fm, PI, RC/ABS e Fv/Fo mantiveram-se estáveis, o que indica a preservação da integridade do fotossistema II. Os teores de clorofila *a* e total aumentaram com o CO₂ elevado e maior permeabilidade, enquanto os carotenoides apresentaram redução em 800 ± 30 ppm com quatro membranas. O enriquecimento de CO₂, aliado à melhor difusão gasosa (membranas permeáveis a gases), beneficia o desempenho fisiológico e o crescimento de *Cedrela fissilis*.

REFERÊNCIAS

- Ahmed, H. A; Tong, Y., Li, L; Sahari, S. Q; Almogahed, A. M.; Cheng, R. (2022). Integrative Effects of CO₂ Concentration, Illumination Intensity and Air Speed on the Growth, Gas Exchange and Light Use Efficiency of Lettuce Plants Grown under Artificial Lighting. **Horticulturae**, 8(3): 270. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8030270>
- Arigita, L; Canã, M.J; Tamés, R.S; Gonzáles, A. (2010). CO₂ enriched microenvironment affects sucrose and macronutrients absorption and promotes autotrophy in the *in vitro* culture of kiwi (*Actinidia deliciosa* Chev. Liang and Ferguson). **In Vitro Cellular Developmental Biology – Plant**, 46: 312-322. <https://doi.org/10.1007/s11627-009-9267-x>
- Banerjee, S; Siemianowski, O; Liu, M; Lind, K.R; Tian, X; Nettleton, D; Cademartiri, L. (2019). Stress response to CO₂ deprivation by *Arabidopsis thaliana* in plant cultures. **PLoS One**, 14(3): e0212462. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212462>
- Barrs, H. D.; Weatherley, P. E. (1962). A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. **Australian journal of biological sciences**, v. 15(3): 413-428.
- Bolhár-Nordenkampf, H.R; Long, S.P; Baker, N.R; Oquist, G; Schreiber, U; Lecher, E.G. (1989). Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. **Functional Ecology**, 3: 497–514. <https://doi.org/10.2307/2389624>
- Chandra, S; Bandopadhyay, R; Kumar, V; Chandra, R. (2010). Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. **Biotechnology Letters**, 32: 1199–1205 <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0290-0>
- Costa Nunes, E; Volkmer de Castilho, C; Netto Moreno, F; Viana, A. M. (2002). *In vitro* culture of *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 70: 259–268. <https://doi.org/10.1023/A:1016509415222>
- Dhami, N; Tissue, D.T; Cazzonelli, C.I. (2018). Leaf-age dependent response of carotenoid accumulation to elevated CO₂ in *Arabidopsis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 647: 67-75. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.03.034>
- Engineer, C. B; Hashimoto-Sugimoto, M; Negi, J; Israelsson-Nordström, M; Azoulay-Shemer, T; Rappel, W. J; Iba, K; Schroeder, J. I. (2016). CO₂ Sensing and CO₂ Regulation of Stomatal Conductance: Advances and Open Questions. **Trends in Plant Science**, 21(1):16-30. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.08.014>
- Ermakova, M; Osborn, H; Groszmann, M; Bala, S; Bowerman, A; McGaughey, S; Byrt, C; Alonso-Cantabrana, H; Tyerman, S; Furbank, R. T; Sharwood, R. E; von Caemmerer, S. (2021) Expression of a CO₂-permeable aquaporin enhances mesophyll conductance in the C₄ species *Setaria viridis*. **Elife**. 10: e70095. <https://doi.org/10.7554/eLife.70095>.

Gitelson AA, Gritz Y, Merzlyak MN. 2003. Relationships between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves. **J Plant Physiol**, 160(3):271-82. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00887>.

Hao, X; Li, P; Feng, Y; Han, X; Gao, J; Lin, E; Han, Y. (2013). Effects of fully open-air [CO₂] elevation on leaf photosynthesis and ultrastructure of *Isatis indigotica* fort. **PLoS**, 8(9):e74600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074600>.

Holley, J; Mattson, N; Ashenafi, E; Nyman, M. (2022). The Impact of CO₂ Enrichment on Biomass, Carotenoids, Xanthophyll, and Mineral Content of Lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Horticulturae**, 8(9):820. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8090820>

Jiang, Z. J; Huang, X. P; Zhang, J. P. (2010). Effects of CO₂ Enrichment on Photosynthesis, Growth, and Biochemical Composition of Seagrass *Thalassia hemprichii* (Ehrenb.) Aschers. **Journal of Integrative Plant Biology**, 52(10): 904-913. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00991.x>

Khan, I; Vanaja, M; Sathish, P; Faizan, M; Soysal, S; Rajput, V. D; Djalovic, I; Trivan, G; Alam, P. (2024). Response of maize (*Zea mays* L.) on yield, physiology and stomatal behavior under two different elevated CO₂ concentrations. Do these anatomical changes affect the physiology of the C₄ crop plant under high CO₂ conditions? **Plant, Soil and Environment**, 70(10): 601-616. <https://doi.org/10.17221/105/2024-PSE>

Kim, T. L; Lim, H; Chung, H; Veerappan, K; Oh, C. (2022). Elevated CO₂ Alters the Physiological and Transcriptome Responses of *Pinus densiflora* to Long-Term CO₂ Exposure. **Plants**, 11(24):3530. <https://doi.org/10.3390/plants11243530>.

Kozai, T. (2010). Photoautotrophic micropropagation - Environmental control for promoting photosynthesis. **Propagation of Ornamental Plants**, 10(4)1: 88-204

Li J; Yang, J; Fei, P; Song, J; Li, D; Ge, C; Chen, W. (2009). Responses of rice leaf thickness, SPAD readings and chlorophyll a/b ratios to different nitrogen supply rates in paddy field. **Field Crops Research**, 114(3): 426-432. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2009.09.009>

Li, Y; Li, S; He, X; Jiang, W; Zhang, D; Liu, B; Li, Q. (2020). CO₂ enrichment enhanced drought resistance by regulating growth, hydraulic conductivity and phytohormone contents in the root of cucumber seedlings. **Plant Physiology Biochemistry**, 152:62-71. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.04.037>.

Li, Y; Zhang, W; Zhang, D; Zheng, Y; Xu, Y; Liu, B; Li, Q. (2022). Mechanism of [CO₂] Enrichment Alleviated Drought Stress in the Roots of Cucumber Seedlings Revealed via Proteomic and Biochemical Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, 23(23):14911. <https://doi.org/10.3390/ijms232314911>

Li, Y; Song, H; Li, X; Hou, L; Li, M. (2024). An Analysis of the Mechanism About CO₂ Enrichment Promoting Carbohydrate Metabolism in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Leaves. **International Journal of Molecular Sciences**, 25(20):11309. <https://doi.org/10.3390/ijms252011309>.

Loladze, I; Nolan, J.M; Ziska, L.H; Knobbe, A.R. (2019). Rising atmospheric CO₂ lowers concentrations of plant carotenoids essential to human health: a meta-analysis. **Molecular Nutrition & Food Research**, 63(15). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201801047>

Otalakoski, J; Masiero, A.M; Brandstetter, R.D; Antonio, A.F; Jaretta, G. (2021). Biometria de frutos e armazenamento de sementes de *Cedrela fissilis* Vell. **Revista Brasileira De Agropecuária Sustentável**, 11(1), 86–94. <https://doi.org/10.21206/rbas.v11i1.10299>

Paredes-Villanueva, K; López, L; Cerrilo, R. M.N. (2016). Regional chronologies of *Cedrela fissilis* and *Cedrela angustifolia* in three forest types and their relation to climate. **Trees**, 30(5): 1581–1593. <https://doi.org/10.1007/s00468-016-1391-8>

Ribeiro, I. de S; Ribeiro, L.M; Soares, J.S; Ramos, J.C.M; Sorgato, J.C. (2022). Light condition, flask sealing, and cultivation time on the germination and initial *in vitro* development of *Dendrobium nobile* Lindl. **Ornamental Horticulture**, 28(4): 407-413. <https://doi.org/10.1590/2447-536X.v28i4.2515>

Ríos-Ríos, A. M; Silva, J. V. S. da; Fernandes, J. V. M; Batista, D. (2019). Micropropagation of *Piper crassinervium*: an improved protocol for faster growth and augmented production of phenolic compounds. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. 137(3):495-509. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-019-01585-8>

Saldanha, C. W; Otoni, C. G; Azevedo, J. L. F. de; Dias, L. L. C; Rêgo, M. M. do; Otoni, W. C. (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**, 110:413–422. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0162-5>

Saldanha, C. W. S; Otoni, C. G; Notini, M. M; Kuki, K. N; Da Cruz, A. C. F; Neto, A. R; Dias, L. L. C; Otoni, W. C. (2013). A CO₂-enriched atmosphere improves in vitro growth of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, 49:433-444. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9529-5>

Santrůček, J; Vráblová, M; Simková, M; Hronková, M; Drtinová, M; Květoň, J; Vrábl, D; Kubásek, J; Macková, J; Wiesnerová, D; Neuwithová, J; Schreiber, L. (2014). Stomatal and pavement cell density linked to leaf internal CO₂ concentration. **Annals of Botany**, 114(2):191-202. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu095>

Sevcikova, H; Lhotakova, Z; Hamet, J; Lipavská, H. (2019). Mixotrophic *in vitro* cultivations: the way to go astray in plant physiology. **Physiologia plantarum**, 167(3): 365-377. <https://doi.org/10.1111/ppl.12893>

Song, H; Lu, Q; Hou, L; Li, M. (2021). The genes crucial to carotenoid metabolism under elevated CO₂ levels in carrot (*Daucus carota* L.) **Scientific reports**, 11:12073. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91522-7>

Teng, N; Wang, J; Chen, T; Wu, X; Wang, Y; Lin, J. (2006). Elevated CO₂ induces physiological, biochemical and structural changes in leaves of *Arabidopsis thaliana*. **New Phytol**, 172(1):92-103. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01818.x>

Tomimatsu, H; Tang, Y. (2016). Effects of high CO₂ levels on dynamic photosynthesis: carbon gain, mechanisms, and environmental interactions. **Journal of Plant Research**, 129(3): 365-377. <https://doi.org/10.1007/s10265-016-0817-0>

Trazzi, P. A; Rocha, L. F; Cunha, F. L; Carvalho, D. de; Santos, J.A. dos. Cultura de tecidos vegetais na conservação da biodiversidade. In: Freitas, R.M. de. **Ciências Biológicas Campo Promissor em Pesquisa**. Atena Editora, 2019. Disponível em: <https://atenaeditora.com.br/catalogo/post/cultura-de-tecidos-vegetais-na-conservacao-da-biodiversidade>. Acesso em: 12 jun. 2025.

Villagran, E; Espitia, J. J; Amado, G; Rodriguez, J; Gomez, L; Velasquez, J. F; Gil, R; Baeza, E; Aguilar, C. E; Akrami, M; Arias, L. A. (2025). CO₂ Enrichment in Protected Agriculture: A Systematic Review of Greenhouses, Controlled Environment Systems, and Vertical Farms—Part 2. **Sustainability**, 17(7), 1-40. <https://doi.org/10.3390/su17072809>

Wall, S; Cockram, J; Vialet-Chabrand, S; Van Rie, J; Gallé, A; Lawson, T. (2023). The impact of growth at elevated [CO₂] on stomatal anatomy and behavior differs between wheat species and cultivars. **Journal of Experimental Botany**, 74(9):2860–2874. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad011>

Wang, Y; Wang, D; Shi, P; Omasa, K. (2014). Estimating rice chlorophyll content and leaf nitrogen concentration with a digital still color camera under natural light. **Plant Methods**, 10(36): 1-11. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-36>

Wei, Z; Abdelhakim, L. O. A; Fangb, L; Peng, X; Liu, J; Liub, F. (2022). Elevated CO₂ effect on the response of stomatal control and water use efficiency in amaranth and maize plants to progressive drought stress. **Agricultural Water Management**, 266: 10. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2022.107609>

Wheeler, R. M; Spencer, L. E; Bhuiyan, R. H; Mickens, M. A; Bunchek, J. M; Van Santen, E; Massa, D. G; Romeyn, M. W. (2023). Effects of elevated and super-elevated carbon dioxide on salad crops for space. **Journal of Plant Interactions**, 19(1). <https://doi.org/10.1080/17429145.2023.2292219>

Xiao, Y; Niu, G; Kozai, T. (2011). Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, 105(1):149–158. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-010-9863-9>

Xie, X. J; Li, R. Y; Huang, L. D; Bao, Y. X. (2020). Impact of increasing atmospheric CO₂ concentration on growth characteristics and yield in maize and rice. **Quality Assurance and Safety of Crops & Foods**, 12 (2): 61–72. <https://doi.org/10.15586/qas.v12i2.628>.

Xu, Z; Jiang, Y; Jia, B; Zhou, G. (2016). Elevated- CO₂ response of stomata and Its dependence on environmental factors. **Plant Science**, 7:657. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00657>

Yang, Q; Li, P; Zhang, D; Lin, W; Hao, X; Zong, Y. (2023). Effects of elevated CO₂ in the photosynthesis chlorophyll fluorescence and yield of two wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) under persistent drought stress. **Sustainability**, 15(1593):1-13. <https://doi.org/10.3390/su15021593>

Zhang, F. F; Wang, Y. L; Huang, Z. Z; Zhu, X. C; Zhang, F. J; Chen, F. D; Fang, W. M; Teng, N. J. (2012). Effects of CO₂ enrichment on growth and development of *Impatiens hawkeri*. **The Scientific World Journal**. 2012:601263. <https://doi.org/10.1100/2012/601263>.

Zhou, Y; Mahmoud Ali, H. S; Xi, J; Yao, D; Zhang, H; Li, X; Yu, K; Zhao, F. (2024). Response of photosynthetic characteristics and yield of grapes to different CO₂ concentrations in a greenhouse. **Frontiers in Plant Science**, 15:1378749. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1378749>.